



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos

Juliana Dias Maia

**Investigação da produção de carreadores biodegradáveis
para veicular larvicida natural contra *Aedes aegypti***

Campinas

2019

Juliana Dias Maia

**Investigação da produção de carreadores biodegradáveis para veicular
larvicida natural contra *Aedes aegypti***

Tese apresentada ao Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como pré-requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Silvia Prata Soares

Coorientador: Prof. Dr. Julian Martinez

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA JULIANA DIAS MAIA, ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ANA SILVIA PRATA SOARES E COORIENTADA PELO PROF. DR. JULIAN MARTINEZ.

Campinas

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 001; FAPESP, 16/09824-4

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

M28i Maia, Juliana Dias, 1990-
Investigação da produção de carreadores biodegradáveis para veicular larvicida natural contra *Aedes aegypti* / Juliana Dias Maia. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Ana Silvia Prata.
Coorientador: Julian Martínez.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Amido. 2. Extrusão. 3. Microencapsulação. I. Prata, Ana Silvia. II. Martínez, Julian. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Investigation of the production of biodegradable carriers to convey natural larvicide against *Aedes aegypti*

Palavras-chave em inglês:

Starch

Microencapsulation

Extrusion

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Doutora em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Ana Silvia Prata [Orientador]

Ana Carla Kawazoe Sato

Izabela Dutra Alvim

Moacir Rossi Forim

Roseli La Corte dos Santos

Data de defesa: 23-04-2019

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Profa. Dra. Ana Silvia Prata Soares
DEA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Ana Carla Kawazoe Sato
DEA/FEA/UNICAMP

Dra. Izabela Dutra Alvim
Cereal Chocotec/ITAL

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim
DQ/UFSCAR

Profa. Dra. Roseli La Corte dos Santos
DMO/UFS

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças e oportunidades para que eu chegasse até aqui. À Nossa Senhora da Conceição por me proteger, guiar e rogar por mim em qualquer lugar que eu esteja.

À minha família por todo carinho, incentivo e amor. Aos meus pais Joran Maia e Teresinha Dias, muito obrigada pelo dom da vida, por sempre me incentivarem e serem meus exemplos. Aos meus irmãos Débora Dias e Estevan Dias por todo apoio e paciência. À minha querida sobrinha Geovana Borin, minha Florzinha. Desculpem minha ausência prolongada, mas foi por um bom motivo. Ao meu noivo Danilo Vieira que mais do que provou o que é um amor verdadeiro. Amo todos vocês, do fundo do meu coração.

À toda equipe do Laboratório de Inovação em Alimentos (LINA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelo apoio nos experimentos e no dia a dia, principalmente à Profa. Dra. Ana Silvia Prata Soares pela orientação, credibilidade e ter confiado a mim um projeto de doutorado tão inovador. À aluna de Iniciação Científica Caroline Paredes pelo auxílio no desenvolvimento do projeto. Aos meus amigos Amanda Badaró, Bianca Fernandes, Bruna Barbon, Diana Vargas, Fernanda Fleury, Fernanda Ramos, Fernando Divino, Josimar Elerate, Maria Paula Maciel, Marciano Oliveira, Matheus Gouveia, Nathália Dias, pelo companheirismo, momentos belos vividos e carinho. À técnica Patrícia Cardoso por todo apoio.

Ao meu amigo Romaildo Sousa, que mesmo à distância, em qualquer hora do dia, me ajudou com dúvidas sobre *softwares* e aplicativos utilizados para construção desta tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste projeto (#16/09824-4). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Obrigada pela bolsa de estudos.

Ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela oportunidade. Ao Prof. Dr. Julian Martinez pela coorientação e também pela oportunidade de estágios em docência no Ensino Superior, juntamente com a Profa. Dra. Miriam Hubinger.

Ao Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical (LEPAT) do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS) pela realização dos testes biológicos, especialmente à Profa. Dra. Roseli La Corte pela oportunidade, acolhimento, ideias e incentivo.

Agradecimentos

Aos alunos de Iniciação Científica Victor Carvalho e Iracema Bispo, à técnica Elisângela Tavares por todo apoio operacional e aprendizado com as larvas e mosquitos.

Ao Laboratório de Ecologia Química do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela realização dos testes cromatográficos, em especial ao Prof. Dr. José Roberto Trigo (*in memoriam*).

Ao Laboratório de Cereais, Raízes e Tubérculos (LABCER) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP pelos testes de produção das partículas, em especial à Profa. Dra. Maria Teresa Clerici e ao Prof. Marcio Schmiele.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP pelo auxílio na obtenção dos extratos de jambu e com a doação das folhas de neem, especialmente ao Prof. Dr. Rodney Rodrigues e aqueles responsáveis pelos testes microbiológicos das partículas.

Ao Prof. Dr. Johan Bernard Ubbink pela orientação nas correções das publicações.

À Ingredion pela gentil doação dos amidos para produção das partículas.

A todos professores e colegas que de alguma forma auxiliaram na realização deste projeto.

Aos meus amigos e professores, desde o jardim de infância até o doutorado, que incentivaram meus estudos, alcance do sonho realizado e estão nessa caminhada comigo até hoje.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é uma praga urbana presente em diversos países, principalmente aqueles de clima tropical. Ele é responsável pela veiculação de vírus de doenças como dengue, zika, chikungunya e febre amarela, as quais podem ocasionar mortes ou sequelas graves, como a microcefalia em bebês. Uma das melhores maneiras de combater o mosquito é ainda na sua fase larval, a qual ocorre em ambiente aquoso. Para isto, larvicidas de origem natural e sintética podem ser utilizados, entretanto, quando aplicados em sua forma livre podem degradar, perdendo sua eficácia. A microencapsulação surge como uma alternativa, protegendo o composto ativo e liberando-o controladamente. Assim, o objetivo desta tese foi produzir um sistema carreador biodegradável e de baixo custo para liberar controladamente um larvicida natural contra *Ae. aegypti*. O método de microencapsulação utilizado a extrusão termoplástica, pouco utilizada para este propósito, além de ser contínua, rápida, aplicável em escala industrial e que utiliza amido como material de parede. O amido de milho é barato, abundante e incha ao entrar em contato com a água. Inicialmente, foram avaliados larvicidas naturais (óleos comerciais de neem, extrato etanólico de neem, óleo essencial de tomilho e extrato etanólico de jambu) e larvicida sintético (composto puro temefós). Dentre os larvicidas avaliados, o óleo de tomilho foi escolhido para ser o composto ativo a ser microencapsulado devido ao seu metabólito timol apresentar coeficiente de partição intermediário entre as amostras, por ser *green*, por ter sido o larvicida natural com melhor eficiência larvicida e por apresentar custo relativamente barato e disponibilidade em grande quantidade para produção mínima do equipamento. Dois tipos de extrusores (mono-rosca e dupla-rosca), três tipos de recheio (nenhum, óleo livre e óleo emulsionado) e diferentes teores de amilose do amido (1,8, 15, 28, 45 e 71%) foram utilizados para produzir as partículas, as quais foram caracterizadas quanto às suas características físicas, físico-químicas e biológicas. A microencapsulação foi eficiente, pois mesmo tendo sido aplicada temperatura de 100°C, as partículas apresentaram entre 48 a 69% de eficiência de encapsulação e a sua atividade biológica foi preservada. Foi verificado que a liberação do óleo é dependente do grau de hidratação e de lixiviação e da formulação (processamento, teor de amilose e tipo de recheio). A liberação foi fortemente correlacionada ao mecanismo de inchamento e maior liberação de óleo não significa maior mortalidade larval. A formulação com 15% de amilose e óleo de tomilho livre como recheio produzida em extrusor dupla-rosca se destacou em relação à capacidade de liberar o óleo de forma controlada, de proteger mais o composto ativo e de eliminar 100% das larvas. Ela também foi capaz de eliminar larvas recém-eclodidas e larvas de população resistente. O sistema particulado

apresentou uma concentração letal três vezes menor e manteve a mortalidade 10 dias a mais, ambos comparados ao óleo de tomilho não encapsulado. As partículas são ideais para utilização em recipientes que possam acumular água e a fêmea deposite seus ovos e além de ter aplicações contra outros organismos (microrganismos, insetos, larvas de mosquitos de outras espécies).

Palavras-chave: Amido, Extrusão, Microencapsulação.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is an urban pest present in several countries, especially those of tropical climate. It is responsible for the placement of virus diseases such as dengue, zika, chikungunya and yellow fever, which can cause death or serious consequences, such as the microcephaly in babies. One of the best ways to combat the mosquito is still in their larval stage, which occurs in an aqueous environment. For this, larvicides of natural and synthetic origin may be used, however, when applied freely may degrade, losing their effectiveness. The microencapsulation emerges as an alternative, protecting the active compound and releasing it under control. Thus, the aim was to produce a biodegradable carrier system with a low cost to release gradually a natural larvicidal against *Ae. aegypti*. The microencapsulation method used was thermoplastic extrusion, unusual for this purpose, furthermore, to be continuous, rapid, applicable on an industrial scale and which uses starch as wall material. The maize starch is cheap, abundant and swells when in contact with water. Initially, distinct natural larvicides were evaluated (commercial neem oils, neem ethanolic extract, commercial thyme essential oil and jambu ethanolic extract) and synthetic larvicide (temephos). Among the larvicides evaluated, the thyme essential oil was chosen to be the active compound to be microencapsulated due to its metabolite thymol presents an intermediary partition coefficient comparing with the other samples, is green, showed the best larvicidal efficiency among the natural larvicides and posed relatively inexpensive cost and was availability in large amount for the minimum production of equipment. Two types of extruders (mono-screw and twin-screw), three types of core (without oil, free oil and emulsified oil) and different amylose content of starch (1.8, 15, 28, 45 and 71%) were used to produce the particles, which were characterized according to their physical characteristics, chemical and biological characteristics. The microencapsulation was effective because even having been applied temperature of 100°C, the particles presented encapsulation efficiency among 48 to 69% and the biological activity was preserved. It was verified that the release of oil is dependent on the degree of hydration and leaching and on the formulation (processing conditions, amylose content, and type of core). The release was strongly correlated to the mechanism of swelling and greater oil release did not mean increased larval mortality. The formulation with 15% amylose and free oil as core produced in twin-screw extruder stood in relation to the gradual oil release, more protection of the active compound and elimination of 100% of larvae. It was also able to eliminate newly hatched larvae and larvae of resistant populations. The particulate system presented a lethal concentration three times lower and kept the mortality 10 more days, both compared to the thyme oil not encapsulated. The particles are

ideal for use in containers that may accumulate water and the female deposits her eggs and beyond have applications against other organisms (organisms, insects, mosquito larvae of other species).

Keywords: Extrusion, Microencapsulation, Starch.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: NÚMEROS DE CASOS E ÓBITOS DAS PRINCIPAIS DOENÇAS TRANSMITIDAS PELO MOSQUITO <i>Aedes Aegypti</i> NOS ÚLTIMOS ANOS NO BRASIL	29
TABELA 2: CONCENTRAÇÃO LETAL PARA ELIMINAR 50% DAS LARVAS (CL ₅₀) APÓS 24 H DE EXPOSIÇÃO DE LARVICIDAS SINTÉTICOS NÃO ENCAPSULADOS PARA DIFERENTES VETORES	33
TABELA 3: CONCENTRAÇÃO LETAL PARA ELIMINAR 50% (CL ₅₀) DE LARVAS DE DIFERENTES VETORES OU MORTALIDADE (%) APÓS 24 H DE EXPOSIÇÃO DE EXTRATOS E ÓLEOS DE PLANTAS E DE SEUS COMPOSTO MAJORITÁRIO E METABÓLITO ATIVO	36
TABELA 4: PROPRIEDADES GERAIS DE AMIDO DE MILHO E SUAS PASTAS	55
TABELA 5: CONCENTRAÇÃO LETAL PARA ELIMINAR 50% (CL ₅₀) DAS LARVAS DIFERENTES VETORES OU MORTALIDADE (%) APÓS 24 H DE EXPOSIÇÃO DE LARVICIDAS SINTÉTICOS ENCAPSULADOS POR DIFERENTES MÉTODOS.	62
TABELA 6: CONCENTRAÇÃO LETAL PARA ELIMINAR 50% (CL ₅₀) DAS LARVAS DIFERENTES VETORES OU MORTALIDADE (%) APÓS 24 H DE EXPOSIÇÃO DE LARVICIDAS NATURAIS ENCAPSULADOS POR DIFERENTES MÉTODOS.	63
TABELA 7: FATORES QUE AFETAM A LIBERAÇÃO DO ATIVO.....	65
TABELA 8: PRINCIPAIS MODELOS UTILIZADOS PARA MODELAR LIBERAÇÃO DE ATIVO DE PARTÍCULAS MATRICIAIS	68
TABELA 9: FORMULAÇÕES PARA A PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA	87
TABELA 10: CONCENTRAÇÕES LETAIS CONTRA LARVAS L3 DO MOSQUITO <i>Aedes Aegypti</i> LINHAGEM ROCKFELLER DOS COMPOSTOS ATIVOS.....	109
TABELA 11: COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS COMPOSTOS ATIVOS	112
TABELA 12: PERFIL QUÍMICO VOLÁTIL DO ÓLEO DE TOMILHO.	115
TABELA 13: ENERGIA MECÂNICA ESPECÍFICA (EME) DURANTE A PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA COM AMIDO COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE COMO MATERIAL DE PAREDE	117
TABELA 14: CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS EM DOIS EXTRUSORES DIFERENTES [MONO-ROSCA (MR) E DUPLA-ROSCA (DR)] COM DIFERENTES TIPOS DE RECHEIO E DIVERSOS TEORES DE AMIOSE.....	123
TABELA 15: ORDEM MOLECULAR DE AMOSTRAS COM 28% DE AMIOSE: AMIDO PURO, AMIDO MODIFICADO E PARTÍCULAS OBTIDAS COM DIFERENTES TIPOS DE RECHEIO EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA DE ACORDO COM A ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	132

TABELA 16: EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (<i>EE</i>) DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE E EM DIFERENTES EXTRUSORES [MR (MONO-ROSCA) E DR (DUPLA-ROSCA)]	150
TABELA 17: CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE AS VARIÁVEIS: INCHAMENTO E LIXIVIAÇÃO COM LIBERAÇÃO DE ÓLEO DE TOMILHO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA.....	157
TABELA 18: PARÂMETROS DA MODELAGEM DA LIBERAÇÃO DE ÓLEO DE TOMILHO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA COM DOIS TIPOS DE EXTRUSORES (MR – MONO-ROSCA E DR – DUPLA-ROSCA), DOIS TIPOS DE RECHEIO E DIFERENTES TEORES DE AMIOSE.....	163
TABELA 19: PARÂMETROS DA MODELAGEM DA LIBERAÇÃO DE ÓLEO DE TOMILHO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA COM DOIS TIPOS DE EXTRUSORES (MR – MONO-ROSCA E DR – DUPLA-ROSCA), DOIS TIPOS DE RECHEIO E DIFERENTES TEORES DE AMIOSE.....	171
TABELA 20: ATIVIDADE LARVICIDA DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA COM AMIDO COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE EM DOIS EXTRUSORES DISTINTOS [MONO-ROSCA (MR) E DUPLA-ROSCA (DR)] CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> LINHAGEM ROCKFELLER ESTÁDIO L3.....	177
TABELA 21: PERCENTUAL DE LARVAS ECLODIDAS A PARTIR DE OVOS DE <i>Aedes aegypti</i> LINHAGEM ROCKFELLER E ATIVIDADE LARVICIDA DA PARTÍCULA OBTIDA COM 15% DE AMIOSE COM ÓLEO LIVRE COMO RECHEIO OBTIDA EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA CONTRA LARVAS EM ESTÁDIO L1	181
TABELA 22: ATIVIDADE LARVICIDA DAS PARTÍCULAS COM ÓLEO DE TOMILHO LIVRE E 15% DE AMIOSE PRODUZIDAS EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA CONTRA DIFERENTES LINHAGENS DE <i>Aedes aegypti</i> EM ESTÁDIO L3	182
TABELA 23: CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO DOUTORADO	212

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: FASES DE DESENVOLVIMENTO DO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> EM FUNÇÃO DO TEMPO E DO AMBIENTE.	28
FIGURA 2: ESTRUTURA QUÍMICA DO TEMEFÓS.	31
FIGURA 3: CAULE, FOLHAS E FLORES DE JAMBU (A) E ESTRUTURA QUÍMICA DO ESPILANTOL (B).	42
FIGURA 4: FOLHAS E SEMENTES DE NEEM (A) E ESTRUTURA QUÍMICA DA AZADIRACTINA (B). .	44
FIGURA 5: FOLHAS E FLORES DO TOMILHO BRANCO (A) E ESTRUTURA QUÍMICA DO TIMOL (B).	46
FIGURA 6: EXEMPLO GERAL DE UM EXTRUSOR (A) - <i>gear box</i> É A CAIXA DE VELOCIDADES, <i>raw materials</i> É A ENTRADA DE MATÉRIA-PRIMA, <i>extruder</i> É O EXTRUSOR, <i>hot die face</i> É A FACE DE MOLDAGEM À QUENTE, <i>cutting device</i> É O DISPOSITIVO DE CORTE, <i>fan</i> É O VENTILADOR, <i>granules</i> É A SAÍDA DAS PARTÍCULAS. VISÃO LATERAL DE UM EXTRUSOR MONO-ROSCA (B).	50
FIGURA 7: MODELO DE ESTRUTURA DA PARTÍCULA PRODUZIDA POR EXTRUSÃO.....	52
FIGURA 8: ESTRUTURA DO GRÂNULO DE AMIDO (A) E ESTRUTURA LINEAR DA AMIOSE E ESTRUTURA RAMIFICADA DA AMILOPECTINA (B)	54
FIGURA 9: GELATINIZAÇÃO DO AMIDO DURANTE A EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA.	56
FIGURA 10: MODELO PROPOSTO PARA O COMPLEXO AMIOSE-ÁCIDO GRAXO, COM AS MOLÉCULAS DE ÁCIDOS GRAXOS ENTRELAÇADAS NO INTERIOR DA ESTRUTURA.....	58
FIGURA 11: ESTRUTURA DO AMIDO MODIFICADO APÓS A SUBSTITUIÇÃO QUÍMICA DO GRUPO OCTANAL NA PRESENÇA DE ÁGUA E EM MEIO ALCALINO.	59
FIGURA 12: APARÊNCIAS DAS AMOSTRAS ANALISADAS DE ÓLEO COMERCIAL DE TOMILHO (A), EXTRATO DE JAMBU OBTIDO COM ETANOL (B), ÓLEO COMERCIAL DE NEEM I (C), ÓLEO DE NEEM COMERCIAL II (D), FOLHAS DESIDRATADAS E TRITURADAS DE NEEM (E) E EXTRATO DE NEEM III OBTIDO COM ETANOL.....	76
FIGURA 13: PAPÉIS CONTENDO OVOS DO MOSQUITO RECÉM-COLETADOS DA GAIOLA (A), BANDEJA COM ALIMENTO PARA O DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS (B), GAIOLA COM OS MOSQUITOS ADULTOS E ALIMENTAÇÃO COM SACAROSE (C) E TAMPA DO <i>glytube</i> COM MEMBRANA PARA ALIMENTAÇÃO DOS MOSQUITOS FÊMEAS COM SANGUE DE CORDEIRO (D).	77
FIGURA 14: LARVA DE <i>Aedes aegypti</i> NO ESTÁGIO L3 (A), PREPARO DAS DILUIÇÕES DOS COMPOSTOS ATIVOS PARA O TESTE LARVICIDA (B) E ELIMINAÇÃO DAS LARVAS SOBREVIVENTES NO TESTE (C).	78

FIGURA 15: EXEMPLO ESQUEMATIZADO DO PREPARO DAS DILUIÇÕES PARA VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS/EXTRATOS NATURAIS LIVRES.....	79
FIGURA 16: VARIAÇÃO DA INTENSIDADE DA COR AZUL DURANTE A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CFT POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS E A COR AMARELA DO REAGENTE DE FOLIN-CIOCALTEU ANTES DA REAÇÃO.....	80
FIGURA 17: FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DAS PARTÍCULAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA .	84
FIGURA 18: HOMOGENEIZAÇÃO DO AMIDO MODIFICADO (CAPSUL) EM ÁGUA SOB AQUECIMENTO (A) E PREPARO DA EMULSÃO DO ÓLEO DE TOMILHO COM O AMIDO MODIFICADO (B).	85
FIGURA 19: APARÊNCIAS DOS MATERIAIS DE PAREDE UTILIZADOS: AMISOL 4000 (A), AMISOL 3408 (B) E HYLLON VII (C).	86
FIGURA 20: HOMOGENEIZAÇÃO DO AMIDO EM BATEDEIRA PLANETÁRIA E ADIÇÃO DE ÁGUA COM BURETA.	89
FIGURA 21: ESQUEMA DO ENSAIO PARA AVALIAR A ATIVIDADE LARVICIDA DAS PARTÍCULAS.	103
FIGURA 22: ESQUEMA DO ENSAIO DA ATIVIDADE CONTRA LARVAS RECÉM-ECLODIDAS.	104
FIGURA 23: FLUXOGRAMA GERAL DA CONDUÇÃO DA PARTE EXPERIMENTAL.....	107
FIGURA 24: CURVA DE MORTALIDADE DAS LARVAS L3 DE <i>Aedes aegypti</i> LINHAGEM ROCKFELLER SUBMETIDAS A COMPOSTOS LIVRES DE ORIGEM NATURAL E SINTÉTICA	111
FIGURA 25: CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO (A) E CROMATOGRAMA DA MISTURA DE ALCANOS (B).....	116
FIGURA 26: APARÊNCIA E FORMATO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE SEM RECHEIO EM EXTRUSOR MONO-ROSCA (MR) E DUPLA-ROSCA (DR).....	119
FIGURA 27: APARÊNCIA E FORMATO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE E ÓLEO DE TOMILHO LIVRE COMO RECHEIO EM EXTRUSOR MONO-ROSCA (MR) E DUPLA-ROSCA (DR).....	120
FIGURA 28: APARÊNCIA E FORMATO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE E ÓLEO DE TOMILHO EMULSIONADO COMO RECHEIO EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA (DR).....	121
FIGURA 29: ASPECTO VISUAL DAS GOTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO COM AMIDO COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE COM ÓLEO DE TOMILHO LIVRE E EMULSIONADO COMO MATERIAL DE RECHEIO	122
FIGURA 30: DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA DIFERENTES TEORES DE AMIOSE, DIFERENTES TIPOS DE RECHEIO (A – SEM RECHEIO, B – ÓLEO LIVRE E C – ÓLEO EMULSIONADO) E DOIS TIPOS DE EXTRUSORES (MR: MONO-ROSCA E DR: DUPLA-ROSCA).....	126

FIGURA 31: RELAÇÃO ENTRE VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO EM ÁGUA, VOLUME E DIÂMETRO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA DIFERENTES TEORES DE AMIOSE, DIFERENTES TIPOS DE RECHEIO (SEM RECHEIO – A, COM ÓLEO LIVRE – B E COM ÓLEO EMULSIONADO - C) E DOIS TIPOS DE EXTRUSORES (MR: MONO-ROSCA E DR: DUPLA-ROSCA).....	129
FIGURA 32: ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DE AMOSTRAS COM 28% DE AMIOSE: AMIDO PURO, AMIDO MODIFICADO E PARTÍCULAS COM DIFERENTES TIPOS DE RECHEIO OBTIDAS EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA.	131
FIGURA 33: ANÁLISE DE DRX DE AMOSTRAS COM 28% DE AMIOSE - AMIDO PURO, AMIDO MODIFICADO E PARTÍCULAS COM DIFERENTES TIPOS DE RECHEIO OBTIDAS EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA (A) E ANÁLISE DE DRX DAS PARTÍCULAS SEM RECHEIO PRODUZIDAS EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA EM FUNÇÃO DO TEOR DE AMIOSE (B).	133
FIGURA 34: CINÉTICAS DE INCHAMENTO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE, DIFERENTES TIPOS DE RECHEIO (SEM RECHEIO – A, COM ÓLEO LIVRE – B E COM ÓLEO EMULSIONADO - C) E DOIS TIPOS DE EXTRUSORES (MR: MONO-ROSCA E DR: DUPLA-ROSCA).....	136
FIGURA 35: CINÉTICAS DE LIXIVIAÇÃO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE, DIFERENTES TIPOS DE RECHEIO (SEM RECHEIO – A, COM ÓLEO LIVRE – B E COM ÓLEO EMULSIONADO - C) E DOIS TIPOS DE EXTRUSORES (MR: MONO-ROSCA E DR: DUPLA-ROSCA).....	138
FIGURA 36: IMAGENS DO INCHAMENTO/LIXIVIAÇÃO DAS PARTÍCULAS SEM RECHEIO PRODUZIDAS EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA AO LONGO DO TEMPO DE IMERSÃO EM ÁGUA.....	140
FIGURA 37: IMAGENS DO INCHAMENTO/LIXIVIAÇÃO DAS PARTÍCULAS COM ÓLEO LIVRE PRODUZIDAS EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA AO LONGO DO TEMPO DE IMERSÃO EM ÁGUA .	141
FIGURA 38: IMAGENS DO INCHAMENTO/LIXIVIAÇÃO DAS PARTÍCULAS COM ÓLEO EMULSIONADO PRODUZIDAS EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA AO LONGO DO TEMPO DE IMERSÃO EM ÁGUA .	142
FIGURA 39: COMPARAÇÃO DO INCHAMENTO (A) E DA LIXIVIAÇÃO (B) DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA COM DIFERENTES TIPOS DE RECHEIO E TEORES DE AMIOSE APÓS 96 H DE IMERSÃO EM ÁGUA .	144
FIGURA 40: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA COM DIFERENTES TIPOS DE RECHEIO E TEORES DE AMIOSE PARA AMOSTRAS SELECIONADAS PRODUZIDAS EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA.	147

FIGURA 41: LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE, DIFERENTES TIPOS DE RECHEIO (COM ÓLEO LIVRE – A E COM ÓLEO EMULSIONADO - B) E DOIS TIPOS DE EXTRUSORES (MR: MONO-ROSCA E DR: DUPLA-ROSCA)	152
FIGURA 42: CINÉTICAS DE LIBERAÇÃO DE ÓLEO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE E TIPOS DE RECHEIO (COM ÓLEO LIVRE – A E COM ÓLEO EMULSIONADO - B).	154
FIGURA 43: ESQUEMA DA HIPÓTESE DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA LIBERAÇÃO DE ÓLEO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA CONTENDO ÓLEO DE TOMILHO LIVRE (A) E EMULSIONADO (B).	156
FIGURA 44: CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS INCHAMENTO/LIBERAÇÃO E LIXIVIAÇÃO/LIBERAÇÃO PARA AS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE, TIPOS DE RECHEIO E EXTRUSORES [MONO-ROSCA (MR) E DUPLA-ROSCA (DR)]	159
FIGURA 45: COMPARAÇÃO DAS CINÉTICAS DE INCHAMENTO, LIBERAÇÃO DE ÓLEO E LIXIVIAÇÃO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA COM ÓLEO DE TOMILHO LIVRE COM 15% DE AMIOSE EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA.	160
FIGURA 46: RELAÇÃO ENTRE OS DADOS EXPERIMENTAIS E O MODELO EXPONENCIAL DA LIBERAÇÃO DE ÓLEO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICAS EM FUNÇÃO DO TIPO DE RECHEIO (COM ÓLEO LIVRE – A E COM ÓLEO EMULSIONADO - B), TEOR DE AMIOSE E TIPO DE EXTRUSOR [MONO-ROSCA (MR) E DUPLA-ROSCA (DR)].....	164
FIGURA 47: RELAÇÃO ENTRE OS DADOS EXPERIMENTAIS E O MODELO DIFUSIONAL DA LIBERAÇÃO DE ÓLEO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICAS EM FUNÇÃO DO TIPO DE RECHEIO, TEOR DE AMIOSE E TIPO DE EXTRUSOR [MONO-ROSCA (MR) E DUPLA-ROSCA (DR)]	165
FIGURA 48: RELAÇÃO ENTRE OS DADOS EXPERIMENTAIS E O MODELO DE WEIBULL DA LIBERAÇÃO DE ÓLEO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICAS EM FUNÇÃO DO TIPO DE RECHEIO (COM ÓLEO LIVRE – A E COM ÓLEO EMULSIONADO - B), TEOR DE AMIOSE E TIPO DE EXTRUSOR [MONO-ROSCA (MR) E DUPLA-ROSCA (DR)]	166
FIGURA 49: ADEQUAÇÃO DE DIFERENTES MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS NA LIBERAÇÃO DA PARTÍCULA OBTIDA EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA CONTENDO ÓLEO DE TOMILHO EMULSIONADO E 71% DE AMIOSE	167

FIGURA 50: RELAÇÃO ENTRE AS CONSTANTES K E N DOS MODELOS EXPONENCIAL E DE WEIBULL COM A MENOR DIMENSÃO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS EXTRUSOR MONO-ROSCA (MR) E DUPLA-ROSCA (DR)	168
FIGURA 51: RELAÇÃO ENTRE OS DADOS EXPERIMENTAIS E O MODELO DE WEIBULL DO INCHAMENTO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICAS EM FUNÇÃO DO TIPO DE RECHEIO (SEM RECHEIO – A, COM ÓLEO LIVRE – B E COM ÓLEO EMULSIONADO - C), TEOR DE AMIOSE E TIPO DE EXTRUSOR [MONO-ROSCA (MR) E DUPLA-ROSCA (DR)].....	172
FIGURA 52: RELAÇÃO ENTRE OS DADOS EXPERIMENTAIS E O MODELO DE WEIBULL DA LIXIVIAÇÃO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICAS EM FUNÇÃO DO TIPO DE RECHEIO, TEOR DE AMIOSE E TIPO DE EXTRUSOR [MONO-ROSCA (MR) E DUPLA-ROSCA (DR)]	173
FIGURA 53: RELAÇÃO ENTRE OS DADOS EXPERIMENTAIS E O MODELO DE WEIBULL DO INCHAMENTO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICAS EM FUNÇÃO DO TIPO DE RECHEIO (SEM RECHEIO – A, COM ÓLEO LIVRE – B E COM ÓLEO EMULSIONADO - C), TEOR DE AMIOSE E TIPO DE EXTRUSOR [MONO-ROSCA (MR) E DUPLA-ROSCA (DR)].....	174
FIGURA 54: RELAÇÕES ENTRE A QUANTIDADE DE ÓLEO LIBERADA NO EQUILÍBRIO (ME LIBERAÇÃO), ISTO É, EM $T = 96$ H, INCHAMENTO NO EQUILÍBRIO (ME INCHAMENTO), CONSTANTE K DO MODELO DE WEIBULL E DIFUSIVIDADE DO ÓLEO DE TOMILHO EM ÁGUA (D_{AB}) OBTIDA PELO MODELO DIFUSIONAL PARA PARTÍCULAS OBTIDAS EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA (DR) POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE, COM ÓLEO LIVRE (A) E COM ÓLEO EMULSIONADO (B).....	176
FIGURA 55: COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA APÓS 48 H E LIBERAÇÃO DE ÓLEO DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA COM DIFERENTES TEORES DE AMIOSE E TIPOS DE RECHEIO APÓS 48 H DE CONTATO	180
FIGURA 56: EFEITO RESIDUAL CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> LINHAGEM ROCKFELLER EM ESTÁGIO L3 DO ÓLEO DE TOMILHO NÃO ENCAPSULADO E DA PARTÍCULA COM 15% DE AMIOSE E ÓLEO LIVRE COMO RECHEIO PRODUZIDA EM EXTRUSOR DUPLA-ROSCA, COM VARIAÇÃO OU MANUTENÇÃO DO VOLUME DA SOLUÇÃO E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	184

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1: RENDIMENTO DO EXTRATO	74
EQUAÇÃO 2: MORTALIDADE DAS LARVAS (L3) EM TESTES COM COMPOSTOS BIOATIVOS	79
EQUAÇÃO 3: TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	81
EQUAÇÃO 4: ÍNDICE DE RETENÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA	83
EQUAÇÃO 5: QUANTIDADE DE ÓLEO A SER MISTURADO COM AMIDO	85
EQUAÇÃO 6: QUANTIDADE DE EMULSÃO A SER ADICIONADA À FORMULAÇÃO	86
EQUAÇÃO 7: QUANTIDADE NECESSÁRIA DE CADA AMIDO PURO PARA OBTER TEORES DE AMIOSE INTERMEDIÁRIOS	87
EQUAÇÃO 8: VERIFICAÇÃO DO TEOR DE AMIOSE DA FORMULAÇÃO COM ÓLEO EMULSIONADO	88
EQUAÇÃO 9: QUANTIDADE DE ÁGUA A SER ADICIONADA AO AMIDO	89
EQUAÇÃO 10: CORREÇÃO DA QUANTIDADE DE ÁGUA A SER ADICIONADA ÀS FORMULAÇÕES COM ÓLEO EMULSIONADO COMO RECHEIO	89
EQUAÇÃO 11: ENERGIA MECÂNICA ESPECÍFICA	91
EQUAÇÃO 12: TEOR DE UMIDADE CONTIDA NA AMOSTRA	92
EQUAÇÃO 13: DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS	92
EQUAÇÃO 14: DENSIDADE APARENTE DAS PARTÍCULAS	93
EQUAÇÃO 15: ÍNDICE DE EXPANSÃO	94
EQUAÇÃO 16: VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO DAS PARTÍCULAS	95
EQUAÇÃO 17: VOLUME MÉDIO DAS PARTÍCULAS	95
EQUAÇÃO 18: INCHAMENTO DAS PARTÍCULAS IMERSAS EM ÁGUA	96

EQUAÇÃO 19: LIXIVIAÇÃO DAS PARTÍCULAS IMERSAS EM ÁGUA	96
EQUAÇÃO 20: TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	98
EQUAÇÃO 21: QUANTIDADE MÁXIMA DE ÓLEO DA PARTÍCULA	98
EQUAÇÃO 22: EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS PARTÍCULAS	99
EQUAÇÃO 23: QUANTIFICAÇÃO DO ÓLEO LIBERADO	99
EQUAÇÃO 24: MODELO EXPONENCIAL (KORSMEYER-PEPPAS)	100
EQUAÇÃO 25: MODELO DE WEIBULL	101
EQUAÇÃO 26: MODELO DIFUSIONAL.....	101
EQUAÇÃO 27: COEFICIENTE DE DIFUSÃO	101
EQUAÇÃO 28: CONCENTRAÇÃO LETAL DA PARTÍCULA	102
EQUAÇÃO 29: ECLOSÃO DOS OVOS	104
EQUAÇÃO 30: MORTALIDADE DAS LARVAS RECÉM-ECLODIDAS (L1)	104

LISTA DE ABREVIÇÕES

Ae. aegypti – *Aedes aegypti*

An. culicifacies - *Anopheles culicifacies*

An. labranchiae - *Anopheles labranchiae*

CFT - Compostos fenólicos totais

CL – Concentração letal

CMI - Concentração mínima inibitória

Cx. pipiens - *Culex pipiens*

Cx. quinquefasciatus - *Culex quinquefasciatus*

DRX – Difração de raios-X

EE – Eficiência de encapsulação

EME - Energia mecânica específica

FTIR - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

IR - Índice de retenção

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

Oc. caspius - *Ochlerotatus caspius*

OET – Óleo essencial de tomilho

ROCK - Rockefeller

SSR - Soma dos quadrados dos resíduos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVOS	26
2.1. OBJETIVO GERAL	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3.1. ARBOVIROSES.....	27
3.1.1. <i>Larvicidas sintéticos</i>	30
3.1.2. <i>Larvicidas naturais</i>	34
3.1.2.1. Jambu.....	42
3.1.2.2. Neem.....	44
3.1.2.3. Tomilho	46
3.2. MICROENCAPSULAÇÃO.....	47
3.2.1. <i>Extrusão termoplástica</i>	49
3.2.1.1. Microencapsulação por extrusão termoplástica.....	51
3.2.2. <i>Amido</i>	53
3.2.2.1. Amido como material de parede em microencapsulação por extrusão termoplástica.....	56
3.2.3. <i>Microencapsulação de larvicidas naturais e sintéticos</i>	59
3.2.4. <i>Modelagem matemática da liberação de ativo</i>	65
3.2.5. <i>Microencapsulação de jambu, tomilho e neem</i>	70
4. MATERIAL E MÉTODOS	73
4.1. MATERIAL	73
4.1.1. <i>Insumos</i>	73
4.1.2. <i>Equipamentos</i>	73
4.2. COMPOSTOS ATIVOS.....	74
4.2.1. <i>Obtenção dos compostos ativos</i>	74
4.2.2. <i>Avaliação dos compostos ativos</i>	75
4.2.2.1. <i>Atividade larvicida</i>	75
4.2.2.2. <i>Compostos fenólicos totais</i>	80
4.2.2.3. <i>Análise cromatográfica</i>	82
4.3. PRODUÇÃO DAS PARTÍCULAS	83
4.3.1. <i>Material de recheio</i>	84
4.3.2. <i>Preparo da emulsão</i>	85
4.3.3. <i>Formulações do material de parede</i>	86
4.3.4. <i>Condicionamento das formulações</i>	88
4.3.5. <i>Extrusão termoplástica</i>	90
4.3.5.1. <i>Extrusor mono-rosca</i>	90
4.3.5.2. <i>Extrusor dupla-rosca</i>	91
4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS	92
4.4.1. <i>Caracterização física e físico-química</i>	92
4.4.1.1. <i>Teor de umidade</i>	92

4.4.1.2.	Distribuição do tamanho e diâmetro médio.....	92
4.4.1.3.	Menor dimensão da partícula	93
4.4.1.4.	Análise de cor das partículas	93
4.4.1.5.	Densidade aparente das partículas	93
4.4.1.6.	Índice de expansão radial das partículas.....	94
4.4.1.7.	Sedimentação das partículas	94
4.4.1.8.	Difração de raios-X	95
4.4.1.9.	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	95
4.4.1.10.	Inchamento e lixiviação.....	96
4.4.1.11.	Microscopia eletrônica de varredura	97
4.4.1.12.	Eficiência de encapsulação	97
4.4.1.13.	Liberção de óleo.....	99
4.4.1.14.	Correlação entre inchamento, lixiviação e liberação.....	100
4.4.1.15.	Modelagem matemática.....	100
4.4.2.	<i>Caracterização biológica</i>	101
4.4.2.1.	Atividade contra larvas em estágio tardio (L3)	101
4.4.2.2.	Atividade contra larvas recém-eclodidas (L1).....	103
4.4.2.3.	Atividade contra larvas de população resistente à inseticida	105
4.4.2.4.	Efeito residual.....	105
4.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	106
4.6.	RESUMO DOS EXPERIMENTOS	107
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
5.1.	AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS ATIVOS	108
5.1.1.	<i>Atividade larvicida</i>	108
5.1.2.	<i>Compostos fenólicos totais</i>	112
5.1.3.	<i>Escolha do composto ativo para microencapsulação</i>	113
5.1.4.	<i>Perfil cromatográfico do óleo essencial de tomilho</i>	114
5.2.	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO.....	116
5.3.	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS	122
5.3.1.	<i>Caracterização física e físico-química</i>	122
5.3.1.1.	Teor de umidade das partículas	124
5.3.1.2.	Distribuição do tamanho, diâmetro médio e menor dimensão das partículas 124	
5.3.1.3.	Índice de expansão radial das partículas.....	127
5.3.1.4.	Densidade aparente das partículas	127
5.3.1.5.	Análise de cor das partículas	128
5.3.1.6.	Sedimentação das partículas	128
5.3.1.7.	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	131
5.3.1.8.	Difração de raios-X	132
5.3.1.9.	Inchamento e lixiviação.....	134
5.3.1.10.	Microscopia eletrônica de varredura	145
5.3.1.11.	Eficiência de encapsulação	148
5.3.1.12.	Cinética de liberação de óleo.....	153
5.3.1.13.	Correlação entre inchamento, lixiviação e liberação.....	156
5.3.1.14.	Modelagem matemática.....	160

5.3.2. <i>Caracterização biológica</i>	177
5.3.2.1. Atividade contra larvas em estágio mais avançado (L3).....	177
5.3.2.2. Atividade contra larvas recém-eclodidas (L1).....	180
5.3.2.3. Atividade contra larvas de população resistente (L3)	182
5.3.2.4. Efeito residual.....	182
6. CONCLUSÃO.....	185
7. REFERÊNCIAS	186
8. ANEXOS	210
8.1. SUGESTÕES PARA OUTROS TRABALHOS FUTUROS	210
8.2. CADASTRO DA PESQUISA NO SIGEM	211
8.3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	211
8.3.1. <i>Participação em eventos científicos</i>	212
8.3.2. <i>Estágios em docência</i>	213
8.3.3. <i>Monitoria</i>	213
8.3.4. <i>Inscrição em prêmios</i>	214
8.4. PUBLICAÇÕES	214
8.4.1. <i>Resumos</i>	214
8.4.2. <i>Patente</i>	215
8.4.3. <i>Artigos científicos</i>	215

1. INTRODUÇÃO

Atualmente um dos principais problemas de saúde enfrentados por países de clima tropical são aqueles relacionados às doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti* como a dengue, a zika, a chikungunya e a febre amarela, as quais levam a óbito centenas de pessoas ano após ano. A vacina contra a febre amarela existe há décadas, mas contra a dengue e a zika, as vacinas ainda estão em fase de estudo (BRASIL, 2016). Além disso, a elevada incidência de surtos leva a concluir que apenas as vacinas já existentes não são suficientes. Sendo assim, a principal forma de prevenção é o combate à reprodução do mosquito, com incentivo à redução de reservatórios de água, sendo tais medidas dependentes da eliminação das larvas do mosquito (BENELLI et al., 2016).

A utilização de inseticidas sintéticos com esta finalidade pode selecionar populações do mosquito resistentes (BRAGA; VALLE, 2007), além de serem prejudiciais à saúde do homem e ao meio ambiente (GARCEZ et al., 2013). Como alternativa, tem-se os larvicidas naturais, menos prejudiciais, geralmente provenientes de plantas, como no caso do neem (*Azadirachta indica*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e jambu (*Acmella oleracea*). Os extratos e óleos essenciais dessas plantas apresentam diversas atividades biológicas, tais como: antimicrobiana, inseticida, larvicida e antioxidante (CRUZ et al., 2016; EL-AKHAL et al., 2016; FORIM et al., 2010; KADIR et al., 1989; KNIO et al., 2008; MACIEL et al., 2010; MARCOMINI et al., 2009; MESQUITA; SOUSA; INNECCO, 2010; MORDUE; NISBET, 2000; NICOLETTI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016b; PANDEY et al., 2007; PAVELA, 2007; PAVELA; VRCHOTOVÁ; TŘÍSKA, 2009; PEREIRA et al., 2009a, 2009b; PRATES; VIANA; WAQUIL, 2003; ROMÃO et al., 2015; SARAF; DIXIT, 2002; SHARMA et al., 2012; SIMAS et al., 2013; TRINDADE et al., 2000), as quais são associadas com a presença de metabólitos ativos: no caso do jambu, o espilantol; no caso do neem, a azadiractina; no caso do tomilho, o timol.

Os compostos ativos geralmente são sensíveis a fatores abióticos como luz, oxigênio, temperatura e podem volatilizar, como no caso de óleos essenciais, os quais são ricos em compostos voláteis. Como forma de melhorar a efetividade dos compostos ativos, a microencapsulação surge como uma técnica que permite proteger, liberar gradualmente e no local desejado, além de aumentar a praticidade de aplicação e a vida útil dos compostos ativos (material de recheio), fatores chave no sucesso de empregabilidade pela população. Dentre os

inúmeros métodos de microencapsulação disponíveis, um método pouco utilizado é a extrusão termoplástica, a qual é uma técnica rápida, contínua e que permite a produção em maior escala (GUEVARA-BRÉTON; JIMÉNEZ-MUNGUÍA, 2008). Aliado a isto, dentre os diferentes materiais de parede (matrizes poliméricas) atóxicos mais utilizados (proteínas, hidrocoloides e carboidratos), o amido é uma das opções mais baratas e amplamente utilizada na extrusão termoplástica. O amido também é hidrossolúvel e incha ao entrar em contato com a umidade, o que facilita a dispersão do composto ativo na água (YILMAZ et al., 2001), ambiente este onde as larvas do mosquito *Ae. aegypti* se reproduzem.

Este foi um Doutorado multidisciplinar que abrange as áreas de parasitologia com os testes larvicidas; engenharia, ciência e tecnologia de alimentos na parte de produção das partículas, obtenção de extrato natural e a caracterização dos extratos e das partículas e a aplicação da tese é na grande área de epidemiologia no combate ao vetor de diversas doenças, o mosquito *Ae. aegypti*. A ideia de aplicação das partículas desenvolvidas é em ambiente interno, como vasos de plantas, ralos de banheiro desprotegidos, ou em ambientes externos, como pneus, copos, entre outros resíduos sólidos descartados de maneira incorreta e que podem acumular água.

A tese está escrita no formato tradicional. Inicialmente serão apresentados os objetivos, a revisão de literatura, o material e os métodos, os resultados obtidos juntamente com a discussão e as conclusões. Por final, são apresentadas sugestões para outros trabalhos futuros, as atividades desenvolvidas durante o Doutorado, bem como as publicações pertinentes.

Este projeto de Doutorado faz parte de um projeto mais amplo (Fapesp, #16/09824-4) que visava produzir partículas de amido extrusadas capazes de conter e liberar adequadamente compostos com caráter lipofílico e hidrofílico. Inicialmente foi feita uma triagem de compostos ativos com atividade inseticida. Foi observado o extrato de jambu e o óleo essencial de tomilho atendiam a este pré-requisito, sendo então escolhidos como modelos de composto hidrofílico e lipofílico respectivamente. No entanto, com o desenvolvimento do plano de trabalho, foi observada uma proximidade entre os coeficientes de partição do espilantol e do timol em água, sendo os dois lipofílicos. Além disso, o extrato de jambu apresentou um elevado custo de obtenção. Desta forma, foi feito um estudo mais aprofundado para encontrar um candidato a composto hidrofílico e com atividade larvicida, resultando na escolha do neem.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um sistema carreador biodegradável e de baixo custo para liberação controlada de larvicida natural contra *Aedes aegypti*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade larvicida de diferentes compostos ativos, de origem natural e sintética, contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* e selecionar o melhor composto ativo;

Produzir uma partícula de baixo custo com escala de produção para proteger e liberar controladamente compostos ativos larvicidas;

Avaliar diferentes teores de amilose, formas de incorporação do composto ativo e tipos de extrusor nas propriedades de inchamento, lixiviação e liberação;

Identificar mecanismos envolvidos na liberação do composto ativo nas partículas produzidas;

Avaliar a proteção conferida ao composto ativo pela cápsula;

Avaliar a atividade larvicida das partículas contra *Ae. aegypti* e selecionar a melhor formulação;

Avaliar a eficácia biológica da melhor formulação em relação à manutenção da atividade larvicida ao longo do tempo por meio do efeito residual, bem como sua eficácia contra larvas de *Ae. aegypti* resistentes a inseticidas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ARBOVIROSES

Arboviroses são doenças transmitidas por artrópodes, tais como dengue, Zika, febre amarela, malária, chikungunya, entre outras. A dengue é uma doença viral infecciosa aguda de curta duração, podendo assumir formas letais e que vem preocupando autoridades na área de saúde. Sua transmissão ocorre pela picada do mosquito fêmea *Ae. aegypti* infectado, sendo o principal vetor da dengue. A maior preocupação se dá pela existência desta espécie nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (COSTA et al., 2005).

No Brasil, os números são alarmantes e crescentes. Na Tabela 1 é possível observar a quantidade de casos registrados no Brasil das principais arboviroses transmitidas pelo mosquito *Ae. aegypti* entre os anos 2015 e 2018 (BRASIL, 2017a, 2017b, 2017c, 2018a, 2018b). A febre provocada pelo Zika vírus foi confirmada pela primeira vez no Brasil em 2015 (BRASIL, 2017c), mas foi registrada pioneiramente em 1947 na Uganda (BENELLI et al., 2016). Atualmente, pesquisas estão comprovando a relação entre Zika vírus e microcefalia, malformações congênitas e síndromes neurológicas (PROENCA-MODENA et al., 2018; VENTURA et al., 2016). A febre amarela é relatada há décadas no Brasil, com períodos de surtos e óbitos em seres humanos e primatas (BRASIL, 2017a).

Foi realizada uma pesquisa dos focos mais comuns de larvas do *Ae. aegypti* por região do Brasil, de modo que os principais foram: reservatórios de água, depósito domiciliar e lixo. O resultado apontou que em novembro de 2015 os reservatórios de água corresponderam a 82,5% dos focos na região Nordeste, 34,7% no Norte, 32,5% no Centro-oeste, 30,9% no Sudeste e 17,6% no Sul (BRASIL, 2015). De acordo com outro estudo realizado em Goiânia (GO, Brasil) em 1999, a categoria de vaso de plantas, garrafas abertas, latas e utensílios domésticos de plástico foi responsável por 65% dos locais de reprodução do mosquito (SANTOS et al., 1999). A alta prevalência de criadouros domésticos é a razão pela qual o controle de mosquitos é intensamente promovido pelos governos e nas mídias sociais; a mensagem é eliminar os focos de água parada e proteger os reservatórios de água do acesso por mosquitos, para evitar a proliferação do vetor. No entanto, este método depende da adesão da população à política de descarte de utensílios não utilizados e cobertura dos reservatórios. Conforme os dados da Tabela 1, apesar de, em 2018, os números de casos de doenças transmitidas pelo mosquito registrados

e de óbitos serem menores do que em anos anteriores, apenas a conscientização da população e combate aos focos não tem sido suficiente.

A metamorfose completa do *Ae. aegypti* é: fase ovo, fase larva (4 estádios: L1, L2, L3 e L4), fase pupa e fase adulto, as quais podem ser observadas na Figura 1. As ações para controlar a sua população são realizadas principalmente na fase de larva (ambiente aquoso), quando o inseto se encontra mais vulnerável, ainda não é um vetor em potencial (GUARDA et al., 2016) e tem menor mobilidade do que em ambiente terrestre.

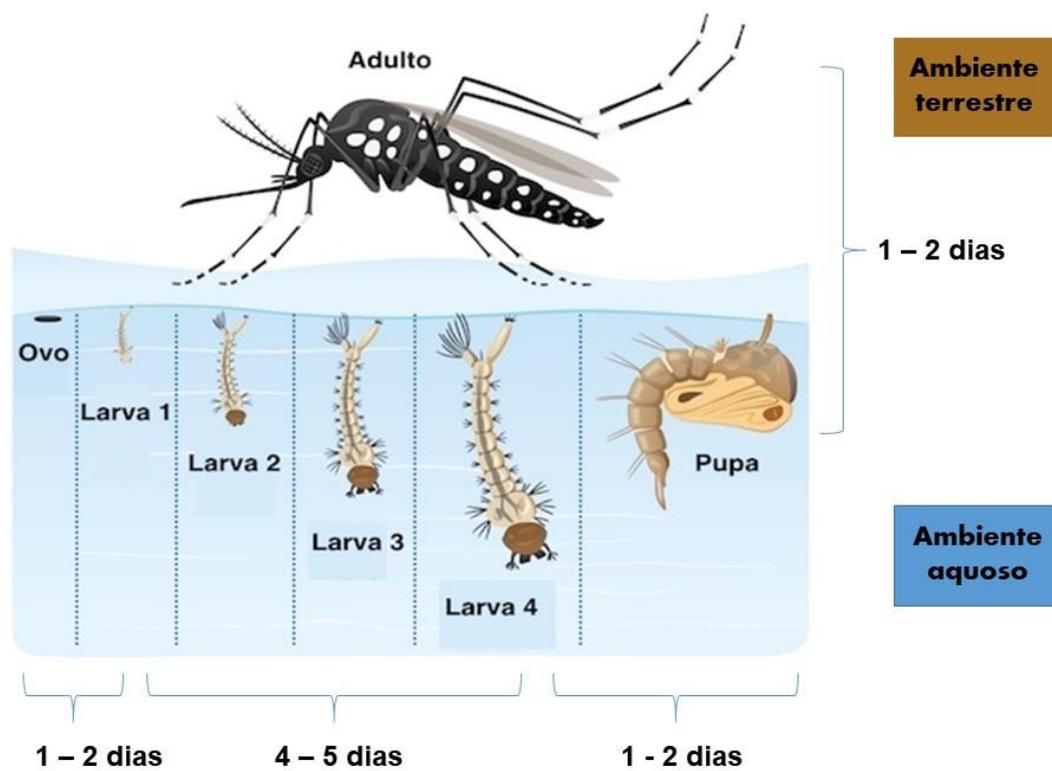


Figura 1: Fases de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti* em função do tempo e do ambiente.

Fonte: Adaptado de Shutterstock (2019)

Tabela 1: Números de casos e óbitos das principais doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti* nos últimos anos no Brasil.

Arbovirose	Ano							
	2015		2016		2017		2018	
	Registros	Óbitos	Registros	Óbitos	Registros	Óbitos	Registros	Óbitos
Dengue	1.688.688 ^a	986 ^a	1.500.535 ^a	642 ^a	239.389 ^b	185 ^b	265.934 ^b	155 ^b
Chikungunya	38.499 ^a	14 ^a	271.824 ^a	196 ^a	185.593 ^b	192 ^b	87.687 ^b	39 ^b
Zika	NI ^a	3 ^a	215.319 ^a	8 ^a	17.593 ^b	1 ^b	8.680 ^b	5 ^b
Febre amarela		< 80 ^c			750 ^c		218 ^c	1 ^c

^a Boletim Epidemiológico volume 48 (BRASIL, 2017c)

^b Boletim epidemiológico volume 50 (BRASIL, 2019)

^c Informe nº 02 (BRASIL, 2018a) - a taxa de letalidade média entre o período de 1980 a 2017 foi de 42,7%

Além do *Ae. aegypti*, outras espécies de mosquito são vetores de doenças, principalmente dos gêneros *Culex* e *Anopheles*, sendo também preocupação aos órgãos governamentais. Eles podem transmitir malária, filariose, entre outras doenças (PAVELA, 2016). De acordo com Pavela (2015), a proteção química contra o mosquito é baseada em três métodos: 1) matar o mosquito adulto utilizando inseticidas, mas nesta fase o mosquito pode estar contaminado com o vírus da doença; 2) prevenir a alimentação de sangue pelo mosquito adulto utilizando repelentes, mas é necessário aplicar corriqueiramente para continuar tendo seu efeito; 3) reduzir a população de mosquito, evitando a eclosão dos ovos ou matando as larvas, com o uso de larvicidas naturais ou sintéticos. Na Tabela 2, Tabela 3, Tabela 5 e na Tabela 6 é possível verificar o estudo da atividade larvicida de compostos sintéticos e naturais, encapsulados ou não, para diferentes espécies. A seguir, eles serão detalhados separadamente.

3.1.1. Larvicidas sintéticos

De modo geral, os inseticidas sintéticos mais utilizados pertencem às classes dos organofosforados, carbamatos e piretróides. Um dos mecanismos de ação deles se baseia na inibição da enzima acetilcolinesterase presente no sistema nervoso do mosquito, aumentando o nível de acetilcolina nas sinapses e, conseqüentemente, ocasionando a paralisia e morte do inseto. O uso intenso dos inseticidas sintéticos pode selecionar os mosquitos mais resistentes, acarretando na redução da sua eficácia e, conseqüentemente, menor eliminação dos mosquitos. O alerta é que o *Ae. aegypti* é uma praga urbana e que se adapta rapidamente às mudanças ambientais e apresenta rápida recuperação após as intervenções de controle (GARCEZ et al., 2013).

Um exemplo de larvicida sintético organofosforado é o temefós (Figura 2). A sua duração residual é de aproximadamente 60 dias. A recomendação da Fundação Nacional da Saúde é de usar o temefós com concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Porém, Guarda et al. (2016) concluíram que em concentrações menores (70 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) é possível obter a atividade larvicida eficaz e, provavelmente o larvicida sintético estaria sendo aplicado em dosagem maior do que a necessária para eliminar o mosquito, o que seria preocupante para a saúde do homem e para o meio ambiente.

Na Tabela 2 é possível verificar alguns estudos com larvicidas sintéticos. Verifica-se que a concentração letal para eliminar 50% das larvas (CL_{50}) dos larvicidas sintéticos é muito pequena e por isso são considerados eficazes. Entretanto, o uso contínuo de inseticidas sintéticos descontrola a população de mosquitos, causam toxicidade ao homem e a outros organismos não-alvo, poluem o meio ambiente e o custo para o desenvolvimento de novas moléculas com efeito potencializado é alto (GARCEZ et al., 2013; MACIEL et al., 2010). Por isso, uma das tendências atuais neste sentido é a prospecção de produtos naturais de origem vegetal com propriedades larvicidas, visando maior sustentabilidade (GARCEZ et al., 2013), aproveitando também a enorme biodiversidade botânica brasileira com inúmeros compostos bioativos ainda a ser explorada (MACIEL et al., 2010) como será discutido na próxima seção.

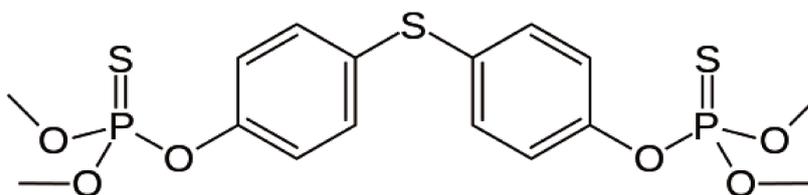


Figura 2: Estrutura química do temefós.

Fonte: Shiralipour; Zargar; Parham (2015)

Uma informação importante apresentada na Tabela 2 é o coeficiente de partição ($\log P$) do composto ativo puro. O $\log P$ é uma grandeza que informa a tendência do composto em se distribuir entre fases líquidas imiscíveis, geralmente formadas por octanol e água. Quanto menor o valor de $\log P$, mais hidrofílico é o composto. De modo contrário, quanto maior o valor de $\log P$, maior é a afinidade de composto pela fase orgânica (octanol, por exemplo) e ele é denominado hidrofóbico (CANTO, 2016). Se a estrutura química da substância é conhecida, a partir do seu número *Smiles*, é possível obter o valor do coeficiente de partição de forma online (VIRTUAL COMPUTATIONAL CHEMISTRY LABORATORY, 2017).

Desta forma, pode-se dizer que de acordo com a Tabela 2, o temefós tem maior afinidade com a fase oleosa do que a imidacloprida. O estudo da miscibilidade e da partição do composto na fase água é muito importante, pois pode justificar a eficácia larvicida do composto, visto que o meio de aplicação é aquoso.

Além das diferentes espécies de vetores como mostra a Tabela 2, o larvicida pode ter diferentes concentrações letais a depender da origem da população de larvas. Na pesquisa

desenvolvida por Araújo et al. (2016), a CL_{50} do temefós para a linhagem Rockefeller (0,0035 ppm) é menor do que a CL_{50} para populações coletadas em áreas urbanas de diferentes municípios (0,0130 – 0,0088 ppm). Isto ocorre porque a linhagem ROCK é criada em laboratório, geralmente sem acesso a herbicidas (larvicidas, inseticidas, repelentes) ou perfumes e, por isso, são mais susceptíveis do que as populações encontradas em ambientes comuns (urbanos ou rurais). O que geralmente é realizado é o cálculo da resistência à morte entre uma população comum e comparar com a população da linhagem ROCK. Quando a resistência é alta, implica dizer que o larvicida não tem mais efeito sobre aquela população na concentração testada, pois a mesma já adquiriu resistência e, o larvicida deve ser substituído pois sua eficiência diminuiu ou a sua dose deve ser aumentada.

Tabela 2: Concentração letal para eliminar 50% das larvas (CL₅₀) após 24 h de exposição de larvicidas sintéticos não encapsulados para diferentes vetores

Composto	Coefficiente de partição*	Espécie	CL ₅₀ (ppm)	Referência
Cipermetrina	5,81	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	196 ppm eliminou 100% das larvas	(MACIEL et al., 2010)
Imidacloprida	0,62	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0,027	(BHAN; MOHAN; SRIVASTAVA, 2014)
		<i>Ae. aegypti</i>	0,0412	(MOREIRA et al., 2016)
		<i>Ae. aegypti</i>	0,030	(SANTOS et al., 2010)
		<i>Ae. aegypti</i>	0,042	(LIMA et al., 2015)
Temefós	5,47	<i>Ae. aegypti</i>	0,0035	(ARAUJO et al., 2016)
		<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0,006	(BHAN; MOHAN; SRIVASTAVA, 2014)
		<i>Cx. pipiens</i>	0,01	(BADAWY et al., 2015)

*O logaritmo do coeficiente de partição foi calculado de acordo com a literatura (VIRTUAL COMPUTATIONAL CHEMISTRY LABORATORY, 2017) a partir do número *Smiles* da estrutura do composto puro.

3.1.2. Larvicidas naturais

Atualmente o uso de produtos amigáveis ao meio ambiente com atividade inseticida tem aumentado. As investigações por tais fitoquímicos são renovadas à medida que sua seletividade aumenta e menores concentrações são necessárias para se obter o efeito biológico desejado (SARAF; DIXIT, 2002). Muitas plantas produzem substâncias em resposta a um ataque patogênico e algumas delas têm a capacidade de atrair insetos (polinizadores) ou repelir insetos (predadores), de modo que os óleos essenciais das plantas são fontes de substâncias com estas atividades biológicas (COSTA et al., 2005).

Existem inúmeros compostos de origem natural, principalmente de origem vegetal, cuja atividade biológica contra insetos e larvas já foi avaliada. Algumas revisões de literatura estão disponíveis (BENELLI; PAVELA, 2018; GARCEZ et al., 2013; KISHORE et al., 2011; NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010; PAVELA, 2015; REHMAN; ALI; KHAN, 2014) e apresentam descrição vasta sobre óleos essenciais como repelentes, isto é, com ação no mosquito adulto (ambiente terrestre), mas a proposta aqui é fazer uma revisão dos compostos que apresentam eficácia no ambiente aquoso como agente larvicida. Na Tabela 3 são apresentadas as concentrações letais para eliminar 50% da população de larvas (CL₅₀) de diferentes óleos e extratos.

As substâncias naturalmente presentes nas plantas têm vantagem quando comparadas aos inseticidas sintéticos por serem recursos renováveis, serem rapidamente degradáveis e a seleção de indivíduos resistentes por parte dos mosquitos ser um processo mais lento, visto que as substâncias são compostas por associações complexas de princípios ativos (PROPHIRO et al., 2008) e não simplesmente por moléculas puras como os larvicidas sintéticos são.

Na Tabela 3 é possível observar que diferentes partes das plantas são utilizadas (folhas, sementes, frutos, bulbos, castanhas) para obter o óleo/extrato ou, de forma mais prática, o óleo comercial. O composto ativo pode ser isolado utilizando-se vários métodos de extração e com solventes com distintas polaridades (PAVELA, 2016).

Em relação ao método de obtenção do óleo essencial, o mais comum é a hidrodestilação (Tabela 3), em razão das substâncias serem voláteis. Neste sentido, uma informação importante que precisa ser verificada é o efeito residual que o óleo essencial apresenta, ou seja, por ele ser

volátil e facilmente oxidado (ação do oxigênio e da luz), por quanto tempo a sua atividade larvicida é/será mantida.

Outro dado relevante apresentado na Tabela 3 é o composto majoritário presente na planta e a sua respectiva quantidade. Não necessariamente, o composto majoritário é o composto ativo, isto é, aquele que confere a atividade biológica da planta. Sabendo qual é a estrutura desse composto, é possível averiguar o coeficiente de partição. Neste sentido, o neem se destaca por conter a azadiractina, cujo coeficiente de partição é o menor de todos (1,53) apresentado na Tabela 3, sendo que o neem apresenta uma CL_{50} abaixo de 200 ppm (ALOUANI; REHIMI; SOLTANI, 2009; DUA et al., 2009; MACIEL et al., 2010; PANT et al., 2012; VATANDOOST; VAZIRI, 2004). A moringa por sua vez contém o fitol como composto majoritário e apresentou o maior coeficiente de partição de todos (7,89) e CL_{50} superior a 1000 ppm (FERREIRA et al., 2009). A partir dessas informações, é possível fazer uma associação entre coeficiente de partição e atividade larvicida.

É importante perceber que os compostos majoritários ou considerados os agentes ativos das plantas tiveram sua atividade biológica avaliada de maneira isolada. Em alguns casos, a CL_{50} do composto puro é maior do que do óleo/extrato, como no caso do cebolinho, do tomilho, da salsa e do neem (Tabela 3). Entretanto, em outros casos isso não ocorre, como no caso de *Croton jacobinensis* e *Hyptis pectinata* (Tabela 3), provavelmente porque o efeito sinérgico entre todos os compostos presentes no óleo/extrato promoveu maior eficácia contra as larvas do que o composto puro. É importante ressaltar que o custo para a obtenção do composto ativo isolado é alto, sendo preferível que o óleo/extrato bruto apresente atividade larvicida eficiente.

Tabela 3: Concentração letal para eliminar 50% (CL₅₀) de larvas de diferentes vetores ou mortalidade (%) após 24 h de exposição de extratos e óleos de plantas e de seus compostos majoritários e metabólito ativo

Planta (Nomes científico e comum)	Metabólito ativo e sua quantidade estimada	Coefficiente de partição ¹	Parte da planta usada	Metabólito isolado	Método de extração	Espécie	CL ₅₀ (ppm)	Referência
<i>Acmella oleracea</i> (Jambu)	Espilantol (65%) ²	4,10	Flores	-	Partição com diferentes solventes	<i>Ae. aegypti</i> , <i>An. culicifacies</i> e <i>C. quinquefasciatus</i>	4 – 5	(SARAF; DIXIT, 2002)
			Folhas secas	-	Partição com diferentes solventes	<i>Ae. aegypti</i>	145 - 1193	(SIMAS et al., 2013)
<i>Allium macrostemon</i> (Cebolinho)	Dissulfeto de metil propil (47,23%)	2,29	Bulbos secos	-	Hidrodestilação	<i>Ae. albopictus</i>	72,86	(LIU et al., 2014)
			-	Dissulfeto de metil propil	-		86,16	
<i>Anacardium occidentale</i> (Caju)	-	-	Castanha seca	-	Partição com diferentes solventes	<i>Ae. aegypti</i>	3,18 – 6,55	(GUISSONI et al., 2013)
<i>Azadirachta indica</i> (Neem)	Azadiractina ³	1,53	Óleo comercial	-	-	<i>An. stephensi</i> , <i>C. quinquefasciatus</i>	0,35 – 0,69	(VATANDOOST; VAZIRI, 2004)
			Óleo concentrado	-	-	<i>Ae. aegypti</i>	1,7	(DUA et al., 2009)
			Óleo comercial	-	-	<i>Ae. aegypti</i>	5,1	(PANT et al., 2012)
			Folhas	-	Soxhlet com etanol	<i>Ae. aegypti</i>	100% de mortalidade a 0,03%	(PEREIRA et al., 2009b)
			Sementes	-	Prensa mecânica à frio	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	60,98	(MACIEL et al., 2010)
			Óleos comerciais	-	-	<i>Ae. albopictus</i>	142 – 171	(BENELLI et al., 2015)

¹ O logaritmo do coeficiente de partição foi calculado de acordo com a literatura (VIRTUAL COMPUTATIONAL CHEMISTRY LABORATORY, 2017) a partir do número Smiles da estrutura do composto puro. ² Extrato das flores de jambu obtido com dióxido de carbono supercrítico apresenta até 65% de espilantol (DIAS et al., 2012). ³ Extrato de neem aquoso apresenta 17 µg g⁻¹ de azadiractina (Ghimeray et al., 2009).

Continuação da Tabela 3:

Planta (Nomes científico e comum)	Metabólito ativo e sua quantidade estimada	Coefficiente de partição ¹	Parte da planta usada	Metabólito isolado	Método de extração	Espécie	CL ₅₀ (ppm)	Referência
<i>Azadirachta indica</i> (Neem)	Azadiractina	1,53	Resíduos industriais comerciais	-	Extração com metanol	<i>Ae. albopictus</i>	3 g de pó em suspensão em 40 mL de água após 17 dias de incubação no escuro eliminou entre 0 – 95% de larvas em até 4 dias	(NICOLETTI et al., 2012)
			Extrato da planta	-	-	<i>C. pipiens</i>	0,357	(ALOUANI; REHIMI; SOLTANI, 2009)
			Resíduo industrial	-	Partição com diferentes solventes	<i>An. culicifacies</i>	1,3 – 2,4	(CHANDRAMOHAN et al., 2016a)
			Resíduo industrial	-	Extração com água	<i>Ae. aegypti</i>	106 - 189	(CHANDRAMOHAN et al., 2016b)
			-	Azadiractina	-	<i>An. stephensi</i>	0,025 a 0,1 ppm matou entre 65 a 95% das larvas	(NATHAN; KALAIVANI; MURUGAN, 2005)
<i>Cinnamomum cassi</i> (Cássia chinesa)	Cinnamaldeído (63%)	2,0	Óleo comercial	-	-	<i>Ae. aegypti</i>	80	(ZHU et al., 2006)
<i>Clausena lansium</i>	Lansiumamida B	-	Sementes secas	-	Partição com diferentes solventes	<i>Ae. albopictus</i>	22,9 – 115,87	(HAN et al., 2013)
			-	Lansiumamida B	-	-	0,45	

Continuação da Tabela 3:

Planta (Nomes científico e comum)	Metabólito ativo e sua quantidade estimada	Coefficiente de partição ¹	Parte da planta usada	Metabólito isolado	Método de extração	Espécie	CL ₅₀ (ppm)	Referência
<i>Copaifera reticulata</i> (Copaíba)	Ácido [(-)-3 β -acetoxilabdan-8(17)-13-dien-15-óico]	-	Óleoresina	-	Partição com diferentes solventes	<i>Ae. aegypti</i>	0,8	(GERIS et al., 2008)
	Ácido alepterolico [(-)-3 β - hidroxilabdano-8(17)-13-dien-15-óico]	-		-			87,3	
	-	-	Óleoresina	-	-	<i>Ae. aegypti</i>	48	(KANIS et al., 2012)
<i>Coriander sativum</i> (Coentro)	Linalol (57,11 %)	2,68	Frutas secas -	-	Hidrodestilação	<i>Oc. caspius</i>	156	(KNIO et al., 2008)
				Linalol	-		155,73	
<i>Croton jacobinensis</i>	1,8-Cineol (24,3 %)	2,6	Inflorescências -	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	65,8	(PINTO et al., 2016)
				1,8-Cineol	-		1381	(SILVA et al., 2008)
<i>Hyptis fruticosa</i>	1,8-Cineol (15,79 %)	2,6	Folhas secas	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	502	(SILVA et al., 2008)
<i>Hyptis martiusii</i>	1,8-Cineol (24,3 %)	2,6	Folhas secas -	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	19,5	(COSTA et al., 2005)
				1,8-Cineol	-		1381	(SILVA et al., 2008)
<i>Hyptis pectinata</i>	β -Cariofileno (40,90 %)	5,35	Folhas secas -	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	366	(SILVA et al., 2008)
				β -Cariofileno	-		1202	

Continuação da Tabela 3:

Planta (Nomes científico e comum)	Metabólito ativo e sua quantidade estimada	Coefficiente de partição ¹	Parte da planta usada	Metabólito isolado	Método de extração	Espécie	CL ₅₀ (ppm)	Referência
<i>Moringa oleifera</i> (Moringa)	Fitol (21,6%) ¹	7,89	Folhas secas	-	Agitação com água	<i>Ae. aegypti</i>	1260	(FERREIRA et al., 2009)
			Folhas secas	-	Extração Soxhlet com metanol	<i>An. stephensi</i>	72,45	(PRABHU et al., 2011)
<i>Lippia gracillis</i>	Carvacrol (44,43%)	3,21	Folhas secas	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	98	(SILVA et al., 2008)
			-	Carvacrol	-		70	
<i>Lippia sidoides</i>	Timol (43,5%)	3,17	Folhas secas	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	19,5	(COSTA et al., 2005)
			Óleo comercial	-	-	<i>Ae. aegypti</i>	36	(PAULA et al., 2010a)
			-	Timol	-	<i>Ae. aegypti</i>	79	(SILVA et al., 2008)
<i>Lippia pedunculosa</i>	Óxido de piperitenona (70,35%)	1,96	Folhas secas	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	58	(NASCIMENTO et al., 2016)
			-	Óxido de piperitenona	-		24,2	
<i>Peumus boldus</i> <i>Molina</i> (Boldo)	Ascaridole (31,4%)	2,64	Folhas secas	-	Hidrodestilação	<i>C. quinquefasciatus</i>	82,14	(CASTRO et al., 2016)

¹ Referência: (BARRETO et al., 2009).

Continuação da Tabela 3:

Planta (Nomes científico e comum)	Metabólito ativo e sua quantidade estimada	Coefficiente de partição ¹	Parte da planta usada	Metabólito isolado	Método de extração	Espécie	CL ₅₀ (ppm)	Referência
<i>Petroselinum crispum</i> (Salsa)	Timol (49,7%)	3,17	Folhas secas	-	Hidrodestilação	<i>Oc. caspius</i>	34,3	(KNIO et al., 2008)
			-	Timol	-		33,65	
<i>Pimpinella anisum</i> (Anis)	Trans-Anetol (76,7%)	3,40	Folhas secas	-	Hidrodestilação	<i>Oc. caspius</i>	65,07	(KNIO et al., 2008)
			-	Trans-Anethole	-		74,99	
<i>Piper aduncum</i> (Apertaruão)	1,8-Cineol (53,9%)	2,6	Folhas frescas	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	289,9	(OLIVEIRA et al., 2013)
	E-isocroecacina (29,52%)	2,44		-			46	(SANTANA et al., 2015)
<i>Piper betle</i> (Pimenta betéle)	Hidroxichavicol (39,31%) ¹	2,20	Folhas	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	50	(WIDAWATI; DHEWANTARA, 2013)
<i>Piper arboretum</i> (Pimenta jaborandi)	Germacreno (31,8%)	5,64	Folhas frescas	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	55	(SANTANA et al., 2015)
<i>Piper marginatum</i> (Pimenta-do-mato)	E-metil-isoeugenol (27,08%)	3,47	Folhas frescas	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	34	(SANTANA et al., 2015)
<i>Pongamia glabra</i> (Karanja)	-	-	Óleo comercial	-	-	<i>Ae. aegypti</i>	4,0	(PANT et al., 2012)
<i>Syzigium aromaticum</i> (Cravo)	Eugenol (80,8%)	2,66	Folhas secas	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	21,4	(COSTA et al., 2005)

¹ Referência: (NALINA; RAHIM, 2007)

Continuação Tabela 3:

Planta (Nomes científico e comum)	Metabólito ativo e sua quantidade estimada	Coefficiente de partição ¹	Parte da planta usada	Metabólito isolado	Método de extração	Espécie	CL ₅₀ (ppm)	Referência
<i>Thymus vulgaris</i> (Tomilho)	Timol (≈50%) ¹	3,17	Biomassa da matéria vegetal	-	Hidrodestilação	<i>An. labranchiae</i>	352,63	(EL-AKHAL et al., 2016)
			-	Timol	-	<i>C. pipiens</i>	52,3	(ZAHKAN; ABDELGALEIL, 2011)
			Folhas secas	-	Hidrodestilação	<i>C. quinquefasciatus</i>	14 - 117	(PAVELA; VRCHOTOVÁ; TRÍSKA, 2009)
	Carvacrol (70,6%)	3,20	Folhas	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	17,3	(MASSEBO et al., 2009)
			-	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	2,14 – 25,37	(LÓPEZ et al., 2015)
			-	-	Hidrodestilação assistida por microondas	<i>Ae. aegypti</i>	45,73	(RÍOS; STASHENKO; DUQUE, 2017)
<i>Zingiber officinale</i> (Gengibre)	α -zingibereno (27,14%)	5,77	Folhas secas	Hidrodestilação	<i>Oc. caspius</i>	15	(KNIO et al., 2008)	
			-	Carvacrol	-		35,48	
			Rizomas	-	Hidrodestilação	<i>Ae. aegypti</i>	76,07	(GOMES et al., 2016)

¹Referência: (JAKIEMIU et al., 2010).

A seguir, será detalhada a importância de três plantas consideradas, dentre inúmeras atividades biológicas comprovadas, larvicidas naturais: o jambu, o tomilho e o neem.

3.1.2.1. Jambu

O jambu (*Acmella oleracea*) é denominado também de agrião-do-brasil (Figura 3A), sendo nativo do Brasil, mas também é encontrado na África, Ásia e América do Sul. Em território nacional, é mais comum na região Norte, principalmente no estado do Pará, onde é amplamente consumido na culinária como condimento em pratos como tucupi e tacacá. As folhas do jambu apresentam sabor acre e pungente, principalmente pela presença do metabólito espilantol (FAVORETO; GILBERT, 2010).

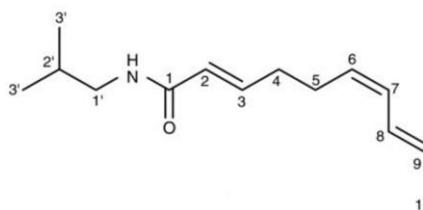
**A****B**

Figura 3: Caule, folhas e flores de jambu (A) e estrutura química do espilantol (B).
Fonte: Barbosa et al. (2016) e Campelo (2018)

De acordo com Barbosa et al. (2016), o espilantol é uma alquilamida anfifílica, ou seja, possui uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica (Figura 3B). O grupo amida da molécula de espilantol é relativamente polar, enquanto que a parte insaturada é menos polar. Isto permite que o composto seja extraído com solventes de diferentes polaridades. Esta estrutura confere ao espilantol atividade anestésica, sendo utilizado na medicina popular, principalmente contra dor de dente, ferimentos na boca e tuberculose, e vem sendo utilizado em cosméticos para compor máscaras faciais antissinais de idade (FAVORETO; GILBERT, 2010).

Além disso, o extrato de jambu possui propriedades antioxidantes que permitem seu uso como conservante de alimentos ou ingrediente funcional. Por exemplo, Romão et al. (2015) estudaram a constituição fitoquímica e a atividade antioxidante das flores de jambu. A análise

fitoquímica indicou a presença de alquilamida e flavonóides e o extrato aquoso apresentou atividade antioxidante (IC₅₀) próximo a 307 µg mL⁻¹.

Além destas aplicações, o extrato do jambu está associado a muitas atividades praguicidas. Ele foi testado contra carrapatos como alternativa para acaricidas sintéticos para doenças do gado bovino (CRUZ et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016b). Também já foi testado contra insetos, tais como: barata (KADIR et al., 1989), pulgão-das-brássicas em repolho verde (MESQUITA; SOUSA; INNECCO, 2010) e traça de couve (SHARMA et al., 2012). O seu efeito contra larvas de mosquito não é recente e a atividade larvicida do jambu vem sendo investigada desde a década de 1940 (JACOBSON, 1956).

Em estudo desenvolvido por Saraf e Dixit (2002), foi avaliada a atividade inseticida do extrato com éter das flores do jambu contra três espécies de mosquito em diferentes estádios de desenvolvimento: *An. culicifacies* Giles, vetor da malária, *Cx. quinquefasciatus*, vetor da filariose e *Ae. aegypti*, vetor da dengue. Os resultados apontaram CL₅₀ em torno de 5 ppm para o *Ae. aegypti*. Além disso, os autores observaram também que o espilantol é mais efetivo em doses baixas. Na fase de pupas dos mosquitos, o espilantol provavelmente age no sistema nervoso, devido aos movimentos anormais e atividade muscular desordenada observados experimentalmente.

Observando que *S. Acmella* é sinonímia de *A. oleracea*, Pandey et al. (2007) investigaram a eficiência larvicida de três espécies de plantas do gênero *Spilanthes* (*S. acmella*, *S. calva* e *S. paniculata*) contra três espécies de mosquito (*An. stephensi*, *An. culicifacies* e *Cx. quinquefasciatus*). Extratos das sementes e das flores das plantas foram obtidos a partir de extração com hexano. A *S. acmella* apresentou as menores concentrações letais (CL₅₀) em relação às outras plantas investigadas: 4,57 ppm para *A. stephensi*, 0,87 ppm para *An. culicifacies* e 3,11 ppm para *Cx. quinquefasciatus*.

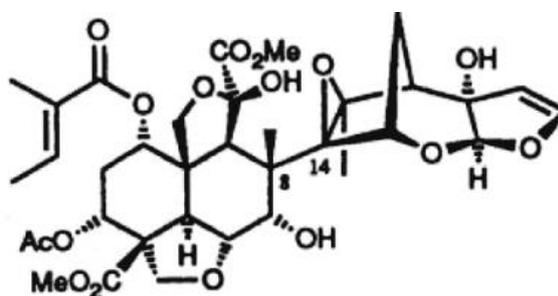
Simas et al. (2013) verificaram o efeito do extrato etanólico das folhas de jambu proveniente de Pará/Brasil contra larvas do mosquito *Ae. aegypti*. Os resultados apontaram que o extrato bruto apresentou CL₅₀ equivalente a 251 ppm, mas o extrato particionado com hexano foi mais ativo e exibiu CL₅₀ igual a 145 ppm, mostrando que a partição do extrato bruto em frações de hexano foi importante para promover redução da concentração necessária para obter o efeito desejado contra as larvas.

3.1.2.2. Neem

O neem ou nim (*Azadirachta indica*) ilustrado na Figura 4A é bastante conhecido por sua atividade inseticida. Tem origem na Ásia, mas é amplamente distribuído na América e África (SCHMUTTERER, 1990). O neem contém o limonóide azadiractina (Figura 4B), um dos principais metabólitos responsáveis pela sua atividade biológica (GARCEZ et al., 2013). A azadiractina A e um grupo de outros limonoides estão intimamente associados à ação supressora de apetite ou inibidora de crescimento em insetos (VIEGAS JÚNIOR, 2003).



A



B

Figura 4: Folhas e sementes de neem (A) e estrutura química da azadiractina (B).
Fonte: Mordue(Luntz); Nisbet (2000) e Investor Square (2014)

O local de origem, idade da planta e solvente utilizado na extração são alguns fatores que podem ocasionar variações nos teores do composto ativo e na sua atividade biológica (TRINDADE et al., 2000). A qualidade da matéria-prima utilizada pela indústria para fabricação de inseticidas de origem natural também reflete na qualidade do produto final, visto que diversos fatores são responsáveis pela produção de metabólitos secundários na planta, o que influencia diretamente a sua atividade biológica. Além disso, condições de armazenamento e procedimentos de preparo dos óleos/extratos afetam a qualidade do produto final. Por isso que algumas indústrias costumam enriquecer os produtos com limonoides, principalmente o óleo de neem. Mas o sucesso na execução do procedimento só é possível pelo monitoramento do conteúdo de compostos ativos, como a azadiractina, em cada etapa do processo (FORIM et al., 2010).

O neem também tem atividade antimicrobiana, tendo sido eficiente contra *Staphylococcus aureus*, mais especificamente, agindo como um fntocida, isto é, um antibiótico contra um dos principais causadores de mastite bubalina (PEREIRA et al., 2009a).

Sobre sua atividade inseticida, o extrato metanólico da semente de neem foi eficiente contra ovos e larvas da traça-do-tomateiro (TRINDADE et al., 2000). Em outra pesquisa, o extrato aquoso das folhas de neem foi eficiente contra lagarta-do-cartucho do milho (PRATES; VIANA; WAQUIL, 2003). Óleo comercial de neem foi diluído em água (10%) com a utilização de surfactante Tween-20 e foi pulverizado sob cascudinhos-dos-aviários e após 7 dias de contato 97,5% dos insetos morreram (MARCOMINI et al., 2009).

Forim et al. (2010) estudaram diferentes métodos de extração com solventes distintos para obter maior quantidade de azadiractina a partir de sementes de neem e aplicar os extratos em dietas e verificar a mortalidade da lagarta-de-cartucho. Os resultados dos autores mostraram que o melhor método foi a extração com hexano seguida da extração com etanol. Para matar 100% das larvas de lagarta-de-cartucho, foi necessário que o extrato apresentasse no mínimo 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de azadiractina e esta concentração foi obtida utilizando-se 250 mg kg^{-1} de extrato na dieta fornecida às larvas do inseto.

Em relação à atividade larvicida do neem, a Tabela 3 informa que sua CL_{50} é menor que 200 ppm (ALOUANI; REHIMI; SOLTANI, 2009; DUA et al., 2009; MACIEL et al., 2010; PANT et al., 2012; VATANDOOST; VAZIRI, 2004). Contudo, alguns trabalhos detalham que a sua ação em meio aquoso é lenta. É importante ressaltar que o ideal é eliminar o vetor antes de atingir a fase adulta.

Maciel et al. (2010) avaliaram o efeito do óleo das sementes de neem proveniente do Ceará frente ao principal vetor da Leishmaniose visceral no Brasil: o mosquito palha (*Lutzomyia longipalpis*). Os autores verificaram que o óleo diluído em água e emulsificado com Tween-20 apresentou mortalidade sobre ovos e larvas apenas após 10 dias de contato, atingindo uma eficácia em torno de 65% na maior concentração testada (100 ppm). A CL_{50} frente às larvas foi de 60,98 mg mL^{-1} . Por outro lado, cerca de 96% dos adultos expostos ao óleo morreram nas primeiras 24 h de contato. Isto implica dizer que o óleo de neem é mais eficiente contra o mosquito em sua fase adulta do que na fase larval. Além disso, a azadiractina não age matando diretamente o inseto como a maioria dos inseticidas, mas atua sobre a reprodução, alimentação e crescimento (ROY; SARAF, 2006).

Nicoletti et al. (2012) avaliaram a eficiência de seis resíduos industriais de neem de diferentes origens após extração com metanol e evaporação do solvente contra larvas nos quatro estádios (L1 a L4) de *Aedes albopictus* e quantificaram o teor de compostos ativos nas amostras. Cerca de 3 g dos pós de neem foram diluídos em 40 mL de água e incubados no escuro a 26°C por até 7 a 17 dias. Os resultados apontaram que poucas amostras foram capazes de eliminar 100% das larvas apenas após 4 dias de exposição. A quantidade de azadiractina presente nas amostras variou de 15 a 180 ppm. Após 4 dias de exposição, uma delas atingiu 95% de mortalidade (mas também houve mortalidade no tratamento controle, assim, provavelmente houve morte por outros fatores, como falta de alimentação provavelmente) e nesse mesmo óleo foi verificada a maior concentração de salanina (2700 ppm) e nimbina (321 ppm), outros compostos ativos que contribuem para a atividade biológica do neem além da azadiractina.

3.1.2.3. Tomilho

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é uma planta com propriedades aromáticas e medicinais (Figura 5A) e pertence à família Lamiaceae e possui origem Mediterrânea (PAVELA; VRCHOTOVÁ; TRÍSKA, 2009). A maior parte das pesquisas com este vegetal se deve às propriedades atribuídas à presença do metabólito timol (Figura 5B), o qual vem sendo estudado quanto às suas atividades antipasmódica, antisséptica, antidiurética, expectorante, antibacteriana, antifúngica e antioxidante (GROSSO et al., 2010). O timol é um fenol derivado de terpenos (MARCHESE et al., 2016) e está presente em outros óleos essenciais como apresentado previamente na Tabela 3.



Figura 5: Folhas e flores do tomilho branco (A) e estrutura química do timol (B).
Fonte: Carvalho (2003) e Soejarto (2007)

Devido a suas propriedades flavorizantes e conservantes, o óleo essencial de tomilho é utilizado como condimento, na produção de alimentos, como aditivo GRAS (*Generally Recognized As Safe*) - conservante, antioxidante, aroma, repelente, larvicida, cosmético e na medicina tradicional (MARCHESE et al., 2016).

Em relação ao seu potencial como inseticida natural, o óleo de tomilho contendo 77% de timol foi eficiente contra larvas e adultos de mosca doméstica (PAVELA, 2007).

Em relação à sua atividade larvicida, algumas pesquisas mostram a eficácia do tomilho. Quatro diferentes amostras de tomilho foram submetidas à hidrodestilação e para cada uma delas um metabólito distinto foi considerado majoritário: timol, linalol, geraniol e β -ciclocitral e a amostra que apresentou timol como composto majoritário expôs menor CL_{50} ($32,9 \text{ mg L}^{-1}$) contra larvas do mosquito *C. quinquefasciatus* (PAVELA; VRCHOTOVÁ; TRÍSKA, 2009). O óleo de tomilho mostrou-se eficiente também contra larvas de *An. labranchiae*, com CL_{50} igual a $352 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (EL-AKHAL et al., 2016), contra larvas de *Ae. aegypti* com CL_{50} variando entre 17 a $45 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (LÓPEZ et al., 2015; MASSEBO et al., 2009; RÍOS; STASHENKO; DUQUE, 2017). O óleo de tomilho contendo 70,6% de carvacrol como metabólito majoritário apresentou CL_{50} igual a $15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ contra larvas do mosquito *Oc. caspius*, enquanto que o carvacrol puro apresentou CL_{50} maior ($35 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), evidenciando que o sinergismo dos metabólicos presentes no óleo refletiu em maior eficiência larvicida (KNIO et al., 2008).

3.2. MICROENCAPSULAÇÃO

Microencapsulação é um processo que coloca pequenas partículas, sólido, líquido ou gás, dentro de uma camada de recobrimento. Neste trabalho, as partículas que serão distribuídas são chamadas de composto ativo (material de recheio) e a camada de recobrimento é chamada de material de parede (matriz polimérica). A microencapsulação vem sendo utilizada em indústrias farmacêuticas, químicas, alimentícias e agrícolas. Uma das razões de se utilizar a microencapsulação é a proteção conferida ao agente ativo, uma vez que se evita a degradação devido à exposição à água, ao oxigênio, ao calor e à luz. Em alguns casos, a microencapsulação é usada para mascarar gostos, odores e cores desagradáveis, para prevenir reações e interações indesejáveis entre os componentes do alimento, para melhorar a manipulação do produto (converter um ingrediente líquido em sólido por exemplo) e, conseqüentemente, para permitir a redução de volatilidade de alguns compostos e para controlar a liberação de um metabólito

(SOBEL; VERSIC; GAONKAR, 2014). Além disso, a microencapsulação pode prolongar a vida útil do composto ativo e diminuir a dosagem necessária para obter o efeito desejado a partir da liberação controlada (TACKENBERG; KLEINEBUDDE, 2015).

A microencapsulação é uma técnica que tem sido utilizada industrialmente por conferir maior proteção, melhorar o transporte e liberar controladamente o agente ativo no tempo e lugar mais adequado, ampliando as possibilidades de aplicações. Existem diferentes técnicas e, de acordo com o processo selecionado, as partículas variam: de forma (esferas, irregulares), de estrutura (porosa, compacta) e estado físico (amorfo ou sólido cristalino desidratado, elástico ou vítreo). Tudo isso afeta as propriedades de difusão ou a estabilidade durante o armazenamento. Outros parâmetros importantes na hora da escolha da melhor técnica de microencapsulação são: custo, rendimento e adaptação à produção em escala industrial (GUEVARA-BRÉTON; JIMÉNEZ-MUNGUÍA, 2008).

As partículas produzidas podem ser classificadas quanto ao seu tamanho em: macro ($> 5000 \mu\text{m}$), micro ($0,2$ a $5000 \mu\text{m}$) e nano ($< 0,2 \mu\text{m}$). Outra classificação está relacionada à distribuição do ativo no material de parede: sistema do tipo reservatório (“verdadeiras” microcápsulas, o núcleo é concentrado na região central e está circundado pelo material de parede) e sistema matricial (microesferas, o núcleo se encontra totalmente disperso na matriz) (AZEREDO, 2005).

Alguns fatores que influenciam na liberação do ativo são: proporção entre ativo e material de parede, viscosidade do material de parede, tamanho das partículas e volatilidade do recheio. A liberação pode ser ativada devido à ação de um ou mais mecanismos, como: difusão (propriedades que interferem na velocidade da transferência de massa), degradação (atividade enzimática), solvente (dissolução do material de parede; expansão ou inchamento), pH (meio ácido ou básico pode melhorar a solubilidade do ativo), temperatura (alteração do estado físico e da velocidade de transferência de massa) e pressão (força mecânica). Em produtos extrusados, os mecanismos mais comuns são liberação por ação de solvente e difusão (AZEREDO, 2005). Maiores detalhes sobre esta parte serão discutidos na seção 3.2.4.

3.2.1. Extrusão termoplástica

De modo geral, a extrusão na área alimentícia é um processo de produção de expandidos/massas e consiste na mistura inicial do material seco (geralmente pós de amidos de diferentes fontes vegetais) com água (agente umectante e melhorador do processo), seguida de aquecimento dentro do canhão do extrusor (onde ocorre a gelatinização do amido e cozimento parcial) e, finalmente, cisalhamento da mistura com rosca sem fim que gira a uma velocidade de rotação, fazendo com que essa mistura passe por um orifício pequeno, seguido de um corte com espessura e tamanho definidos (ORDÓÑEZ, 2005a).

A extrusão é um processo completo que contempla várias operações unitárias: transporte, mistura, amassamento, cocção, moldagem, redução do tamanho. O processo completo é relativamente rápido, a operação é contínua e eficiente, tem baixo custo de investimento e de operação, alta produtividade e, principalmente, não gera efluentes. A formulação sofre complexa reação físico-química a partir das energias mecânica e térmica aplicadas no extrusor, o qual pode ser considerado um reator químico contínuo. Nas condições de baixa umidade e taxa de cisalhamento e aquecimento, o biopolímero se funde e sua estrutura é fixada posteriormente ao sair pela matriz perfurada. Seu estado fluido original transforma-se em gomoso e, posteriormente, ao esfriar/secar, em vítreo e estável. As propriedades viscoelásticas da massa e a redução da pressão ao sair da matriz causam a evaporação instantânea de parte da água, levando a massa a inchar e a expandir, formando um produto com estrutura porosa, principalmente quando são aplicadas temperaturas superiores a 150°C (ORDÓÑEZ, 2005a).

Os extrusores mais utilizados na indústria de alimentos são: mono-rosca, dupla-rosca e co-rotacional, pois eles têm uma boa eficiência de mistura, capacidade de bombeamento, flexibilidade de usar diferentes matérias-primas e habilidade de reproduzir resultados (SOBEL; VERSIC; GAONKAR, 2014).

Na Figura 6A é possível visualizar um extrusor e as principais partes do equipamento. *Gear box* é a caixa de velocidades, *raw materials* é a entrada de matéria-prima, motor, *extruder* é o extrusor que pode conter uma ou mais roscas, que giram em sentido horário ou anti-horário, *hot die face* é a face de moldagem à quente, *cutting device* é o dispositivo de corte, *fan* é o ventilador, *granules* é a saída das partículas. Na Figura 6B é possível verificar com mais detalhes a parte interior do extrusor com uma rosca.

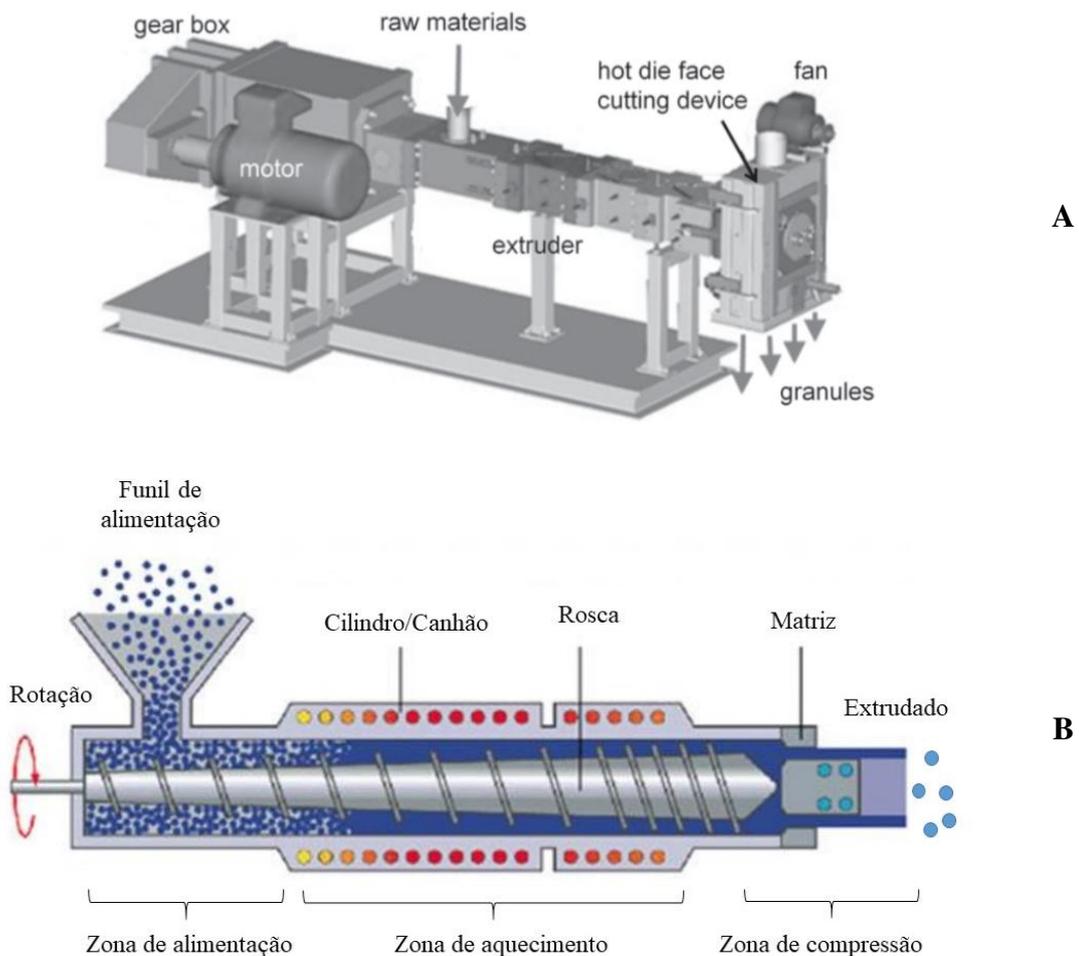


Figura 6: Exemplo geral de um extrusor (A) - *gear box* é a caixa de velocidades, *raw materials* é a entrada de matéria-prima, *extruder* é o extrusor, *hot die face* é a face de moldagem à quente, *cutting device* é o dispositivo de corte, *fan* é o ventilador, *granules* é a saída das partículas. Visão lateral de um extrusor mono-rosca (B).

Fonte: Adaptado de Tackenberg; Kleinebudde (2015) e ABIPLAST (2019)

Santos et al. (2004) definem o processo de produção de *pellets* como a aglomeração por via úmida de pós finos de substância ativa e excipientes em pequenas unidades esféricas. Este processo é dividido em três operações unitárias principais: malaxagem, extrusão e secagem. A malaxagem consiste no preparo da massa umidificada para a extrusão: mistura homogênea do pó seco com o excipiente e com o líquido de granulação. O líquido de granulação geralmente é a água, a qual vai tornar a massa mais coesa e plástica. Em caso de excesso de umidade, pode ocorrer migração excessiva de líquido para a superfície do *pellet*, levando a aglomeração dos *pellets* uns aos outros. Os excipientes, por exemplo óleos, empregados na produção de *pellets* geralmente são utilizados para obter partículas. Os excipientes são adicionados ao pó para promover a liberação da substância ativa num sítio específico ou durante um determinado

período de tempo e, para isto, o excipiente a ser incorporado deve ter a atividade biológica adequada ao seu propósito. A mistura deve ser armazenada em sacos plásticos selados em condições ideais para evitar a evaporação de água até o momento da próxima etapa. A extrusão é a próxima operação unitária e nela a massa sofre compactação, sendo modelada sob a forma de cilindros de aspecto semelhante a tira de espaguete de diâmetro uniforme. A capacidade de extrusar depende da plasticidade da massa obtida na malaxagem e do tipo de extrusor empregado.

3.2.1.1. Microencapsulação por extrusão termoplástica

O uso da extrusão como técnica de microencapsulação é recente, apesar da extrusão de *flavors* ser utilizada desde 1950, principalmente para aplicações alimentícias. O grande diferencial do processo normal de extrusão para o processo de microencapsulação por extrusão é a faixa de temperatura aplicada, de modo que para microencapsular óleos essenciais, é necessário utilizar temperaturas inferiores a 100°C para não ocorrer a volatilização do líquido e não ocorrer a expansão do produto (TACKENBERG; KLEINEBUDDE, 2015). Outra diferença importante que Reifsteck e Jeon (2000) salientam é que na extrusão para microencapsulação de *flavors*, a incorporação de tais compostos voláteis ocorre mais comumente na parte final do extrusor. Contudo, a proposta nesta tese é que o sistema carreador consiga realmente proteger o composto ativo, incorporando-o ao material de parede previamente a extrusão, com o intuito de garantir boa distribuição e melhor estabilidade. O tamanho do extrusado dependerá da matriz inserida no final do extrusor, podendo variar de 0,5 a 4,0 mm de diâmetro e diferentes comprimentos (SOBEL; VERSIC; GAONKAR, 2014).

A encapsulação por extrusão produz uma partícula com no mínimo duas fases: recheio (líquido – geralmente óleo) e material de parede (sólido), cuja estrutura é apresentada na Figura 7. O tipo de estrutura proposto contém vários núcleos dispersos na matriz, visto que é necessária uma homogeneização da matéria-prima antes de ocorrer a extrusão. A composição da matriz e as propriedades do agente ativo e a interação entre eles são importantes para que a extrusão ocorra com sucesso (SOBEL; VERSIC; GAONKAR, 2014).

As vantagens da extrusão termoplástica frente aos outros métodos de encapsulação são: não utiliza solvente orgânico; é um processo contínuo, rápido e com alto rendimento; diferentes formas de partículas podem ser obtidas; permite a versatilidade dos parâmetros de processo

(velocidade, temperatura, diâmetro do bocal, etc.); a partícula produzida é estável, pois apresenta baixo teor de umidade (GUEVARA-BRÉTON; JIMÉNEZ-MUNGUÍA, 2008); permite a encapsulação de inúmeros óleos essenciais ou extratos; utiliza o amido como principal polímero como material de parede, o qual é abundante, barato e biodegradável (YILMAZ et al., 2001).

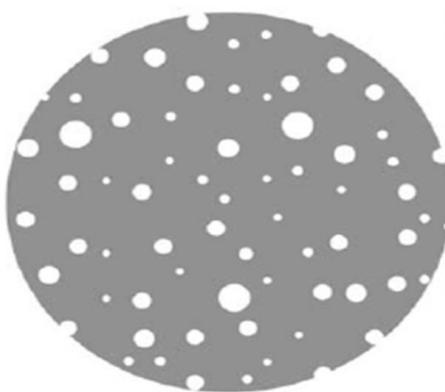


Figura 7: Modelo de estrutura da partícula produzida por extrusão
Fonte: Tackenberg; Kleinebudde (2015)

Para a encapsulação de fragrâncias, herbicidas, *flavors* e inseticidas em matrizes de amido, emulsificantes geralmente são utilizados para estabilizar a dispersão das duas fases do sistema. Com este intuito, foi realizada a encapsulação de óleo de girassol com amido de batata em extrusor dupla-rosca com diferentes emulsificantes (Tween, Span 20, e suas misturas em diferentes proporções) e os resultados apontaram que na presença de emulsificante houve redução do tamanho das gotículas de óleo dispersas ao comparar com o extrusado sem emulsificante. Além do mais, quanto maior o valor do balanço hidrofílico-lipofílico, menor o tamanho da partícula e menor a energia mecânica específica (*EME*) necessária durante a extrusão (YILMAZ et al., 2001).

Na literatura estão disponíveis alguns artigos sobre a encapsulação em extrusor dupla-rosca de herbicidas sintéticos amplamente utilizados na agricultura do Estados Unidos no início da década de 1990 (DOANE, 1993). São feitas comparações entre extrusão e cozimento por injeção de vapor em relação: ao grau de intumescimento, liberação em água, teor de herbicida, teor de amido como material de parede, eficiência de encapsulação, modo estático ou dinâmico de liberação do herbicida e diâmetro das partículas. A principal motivação para encapsular os

herbicidas (atrazina, EPTC, metolachlor, alachlor e dual) era reduzir os efeitos negativos ao meio ambiente devido à grande quantidade aplicada do herbicida não encapsulado, mas em nenhum desses trabalhos foi comparada a eficiência dos herbicidas sintéticos não encapsulados e as respectivas partículas produzidas (CARR; WING; DOANE, 1991; TRIMNELL et al., 1991; WING et al., 1991).

Deste modo, sabendo que os exemplos iniciais de microencapsulação de herbicidas em geral por extrusão termoplástica utilizam o amido como material de parede, a seção a seguir traz mais detalhes sobre esse biopolímero e a interação entre amido e o composto ativo.

3.2.2. Amido

Os carboidratos são substâncias orgânicas abundantes nos seres vivos. Dentre os inúmeros tipos de carboidratos e suas funções, o amido se destaca por ser o carboidrato de reserva das plantas, encontrado principalmente em sementes e grãos. O amido é classificado como um polissacarídeo formado por mais de 20 monossacarídeos de glicose, dispostos de forma linear ou ramificada, sendo caracterizado por seu alto peso molecular (ORDÓÑEZ, 2005b).

Na Figura 8A é possível verificar como é a estrutura do grão de amido. Quanto à sua forma, o grânulo pode ser redondo, oval ou poliédrico. Quanto ao seu tamanho, o grânulo pode ter entre 2 a 100 μm . Quanto à distribuição do tamanho dos grânulos, pode ser uni, bi ou trimodal, dependendo da origem botânica, entretanto, a distribuição bimodal é mais comum para a maioria dos cereais (DENARDIN; SILVA, 2009).

Estruturalmente, o amido é um polissacarídeo composto por amilose e amilopectina (Figura 8B). A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4 com cadeia linear. Já a amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em ligações α -1,4 e α -1,6 com cadeia ramificada (DENARDIN; SILVA, 2009). A amilopectina é estrutural e funcionalmente a mais importante dentre as duas frações que compõe o amido, pois sozinha é suficiente para formar o grânulo (DENARDIN; SILVA, 2009).

O amido contribui para diversas propriedades de textura em alimentos e possui várias aplicações industriais, tais como: espessante, estabilizador de colóides, geleificante, agente de volume, adesivo, retentor de água (DENARDIN; SILVA, 2009).

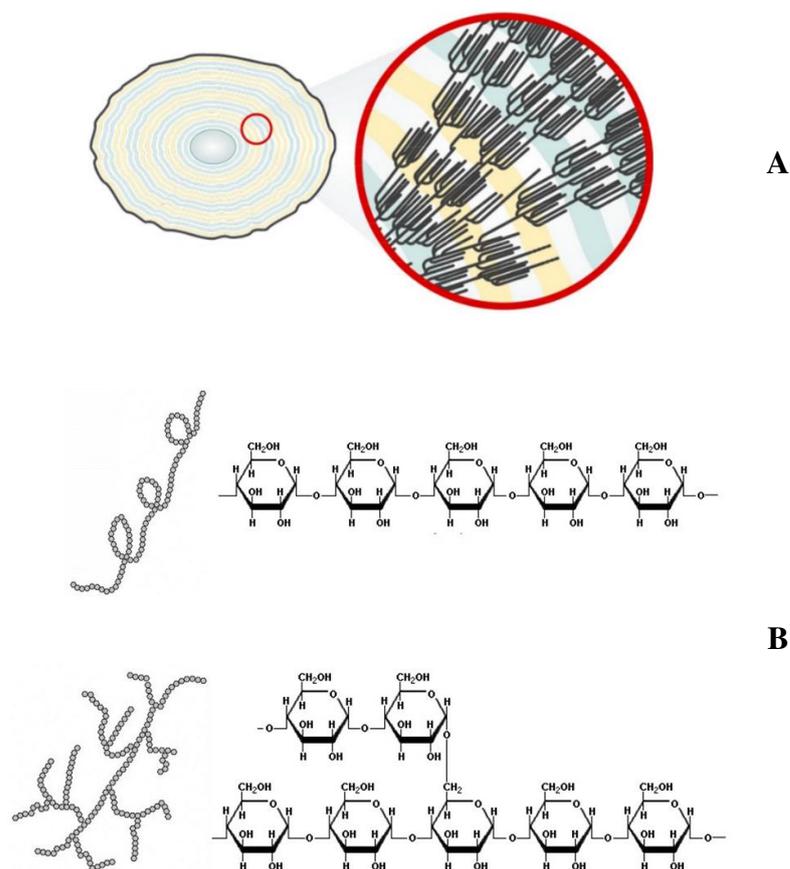


Figura 8: Estrutura do grânulo de amido (A) e estrutura linear da amilose e estrutura ramificada da amilopectina (B)

Fonte: Adaptado de Google (2011); Saunders, Izydorczyk, Levin (2011) e Zimmerman, Snow (2012)

O milho (*Zea mays*) é um cereal bastante cultivado no Brasil e no mundo, sendo o Brasil um dos principais produtores, juntamente com Estados Unidos e China. Em 2018, 23 milhões de toneladas de milho foram exportadas pelo Brasil, principalmente para o mercado europeu (ABMILHO, 2019). O milho se caracteriza por se destinar tanto ao consumo humano (como espiga e demais receitas de preparo caseiro ou industrializado), bem como para a alimentação de animais, sobretudo suínos e aves. O milho pode ser industrializado através dos processos de moagem úmida e seca, sendo esta última a mais empregada, gerando produtos como milho em conserva, congelado, farinha de milho, fubá, quirera, farelo, glicose, dextrose, óleo, entre

outros. Através do processo de moagem úmida, o principal subproduto obtido é o amido (GARCIA et al., 2006). O teor de amilose nos grânulos de amido varia de acordo com o tipo de vegetal. No caso do amido de milho, o amido considerado “normal” contém entre 25 a 28% de amilose, já o amido ceroso (*waxy*) é praticamente constituído por amilopectina, enquanto que o amido com teor de amilose superior a 50% é denominado “alto teor de amilose”. Os géis feitos com amido de milho ceroso geralmente são fracos, ao contrário dos géis feitos com amido com alto teor de amilose (WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009).

A gelatinização do amido geralmente causa um aumento da viscosidade, mas o aquecimento durante a extrusão promove a quebra das macromoléculas em unidades menores, reduzindo a viscosidade. Durante o aquecimento na extrusão, grânulos menores de amido são cozidos mais rapidamente do que partículas maiores, o que também altera a qualidade do produto (FELLOWS, 2006). Observando a Tabela 4, é possível verificar que o teor de amilose também altera a viscosidade da pasta e isto pode interferir durante o processo de extrusão ao longo do cisalhamento da pasta.

Tabela 4: Propriedades gerais de amido de milho e suas pastas

Propriedade	Amido ceroso	Amido comum	Amido com alto teor de amilose
Diâmetro do grânulo (μm)	2 – 30	2 – 30	2 – 24
Teor de amilose (%)	< 2	28	50 - 70
Temperatura de gelatinização ($^{\circ}\text{C}$)	63 – 72	62 – 80	66 – 170
Viscosidade relativa	Alta a média	Média	Muito baixa

Fonte: Damodaran; Parkin; Fennema (1996)

O amido é pouco solúvel em água fria, entretanto, absorve água na proporção de 30% do seu peso, com pequeno aumento do volume dos seus grânulos (BOBBIO; BOBBIO, 1992; ORDÓÑEZ, 2005a). Entretanto, com o aquecimento, a absorção de água, a viscosidade e a transparência do sistema aumentam. A viscosidade pode diminuir se o aquecimento for acima de 100°C , o que promove a destruição dos grânulos, sobrando apenas moléculas livres hidratadas ao invés das estruturas originais. Ao reduzir a temperatura, o sistema passa gradualmente para gel, o qual será mais ou menos duro de acordo com o tipo e proporção de amilose. A faixa de temperatura de gelatinização para diferentes teores de amilose pode ser observada na Tabela 4.

3.2.2.1. Amido como material de parede em microencapsulação por extrusão termoplástica

O amido é um polímero inerte, não-tóxico e não-carcinogênico. As partículas produzidas com o amido são estáveis durante a estocagem, principalmente quando a atividade de água é reduzida e isto depende do método de encapsulação utilizado. No caso da extrusão termoplástica, ao sair do extrusor, as partículas são desidratadas em estufa para redução do teor de umidade. Durante a extrusão, o calor e o atrito facilitam a hidratação do amido, o qual é transformado e plastificado (CHANG; SCHMIELE; MARTÍNEZ-BUSTOS, 2010).

A gelatinização total ou parcial do amido ocorre durante a extrusão na presença de água, aquecimento, cisalhamento e tempo de residência no extrusor (Figura 9). A adição de água promove um pequeno inchamento dos grânulos de amido. Em seguida, o aquecimento e o cisalhamento promovem o rompimento do grânulo de amido e a lixiviação da amilose. Por último, o grânulo contendo apenas amilopectina sofre colapso e a amilose forma matriz de gel. A massa amorfa formada depende da estrutura do grânulo de amido e do teor de amilose/amilopectina (CHANG; SCHMIELE; MARTÍNEZ-BUSTOS, 2010).

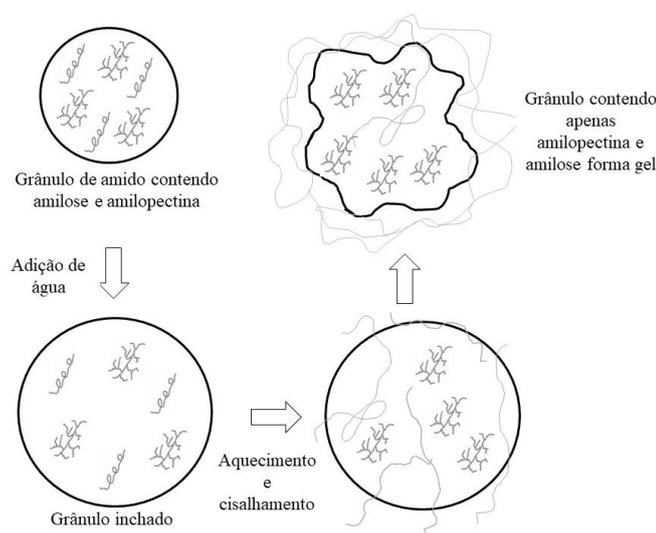


Figura 9: Gelatinização do amido durante a extrusão termoplástica.

Fonte: Adaptado de Chang; Schmiele; Martínez-Bustos (2010)

Durante a extrusão dos alimentos, os lipídios intrínsecos da própria matéria-prima podem estar presentes ou serem adicionados como ingredientes, como no caso da microencapsulação de óleo, na qual o óleo é adicionado ao polímero, de modo que o teor máximo de 5% facilita a extrusão. Além disso, apesar do amido ser uma molécula neutra (sem carga), os lipídios podem

formar complexos de inclusão helicoidal com a amilose, denominados complexos amilose-lipídios (CHANG; SCHMIELE; MARTÍNEZ-BUSTOS, 2010; DENARDIN; SILVA, 2009).

Thachil, Chouksey e Gudipati (2014) relatam que a incorporação de lipídio ao amido altera as propriedades físico-químicas dos extrusados. O tratamento térmico, como ocorre durante a extrusão, favorece a destruição parcial da estrutura de amilose e novos cristais são formados, correspondendo ao complexo amilose-lipídio. O lipídio é denominado ligante e pode estar em três locais diferentes no complexo amilose-lipídio: dentro da hélice de amilose (espiral), entre as hélices ou disperso na região amorfa.

Acredita-se que quanto maior a quantidade de ácidos graxos saturados, maior a capacidade de formar complexo amilose-lipídio e, preferencialmente, com o lipídio dentro da hélice (THACHIL; CHOUKSEY; GUDIPATI, 2014) como mostra a Figura 10, de modo que a hélice é hidrofílica na parte externa e hidrofóbica na parte interna (PUTSEYS; LAMBERTS; DELCOUR, 2010).

No caso do óleo de tomilho, o metabólito majoritário na maioria das plantas é o timol como verificado no item 3.1.2.3, que não é um ácido graxo e é uma molécula pequena (Figura 5B). Kawada e Marchessault (2004) fizeram um estudo do complexo formado entre amilose e algumas moléculas pequenas (timol, DMSO, ácido láurico, butanol, pentanol) após aquecimento, e verificaram que é possível verificar diferença pela análise de ressonância magnética nuclear entre o amido e o complexo amilose-timol, de modo a verificar a contribuição do grupo alquila e do grupo aromático da molécula de timol. A mobilidade da cadeia de amilose no complexo amilose-lipídio é inversamente proporcional ao comprimento do grupo alquila do agente ligante.

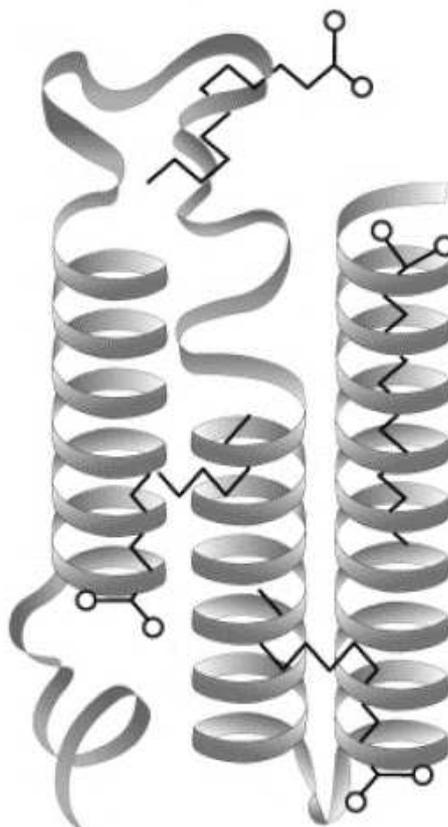


Figura 10: Modelo proposto para o complexo amilose-ácido graxo, com as moléculas de ácidos graxos entrelaçadas no interior da estrutura.

Fonte: Kawada; Marchessault (2004)

3.2.2.1.1. Amido modificado

A necessidade de amidos com propriedades especiais leva à produção de amidos modificados. Tais modificações visam obter produtos com cadeias menores (BOBBIO; BOBBIO, 1992). Os amidos nativos geralmente têm uma solubilidade limitada em água e, por isso, a sua aplicação industrial é reduzida. A modificação é realizada com o intuito de alterar a estrutura pela hidrólise do amido em moléculas menores e/ou substituição química pelo grupo succinato de octanal. Esta substituição implica o ganho de um elemento hidrofóbico na forma de grupos de octanal como ilustra a Figura 11, resultando em moléculas com caráter anfifílico (SWEEDMAN et al., 2013).

Estes polímeros apresentam uma variedade de aplicações, com destaque para emulsificação e encapsulação de óleos essenciais. Um exemplo de amido modificado é o Capsul, oriundo de amido de milho ceroso e desenvolvido pela *National Starch* (SWEEDMAN et al., 2013).

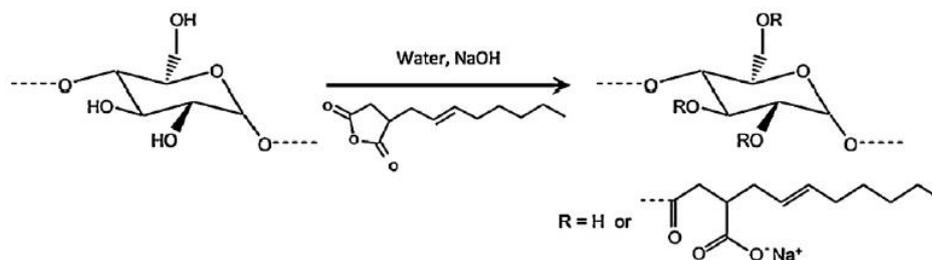


Figura 11: Estrutura do amido modificado após a substituição química do grupo octanal na presença de água e em meio alcalino.

Fonte: Sweedman et al. (2013)

3.2.2.1.1. Emulsão de óleo com amido modificado

Como o amido nativo não apresenta carga ou afinidade com compostos hidrofóbicos, é comum fazer uma emulsão entre o óleo e um amido modificado com o intuito de aumentar a retenção de óleo no amido.

Na pesquisa desenvolvida por Aburto et al. (1998), o amido modificado capsul foi diluído em água a 82°C e, em seguida, o óleo de laranja foi emulsionado em ultraturrax com o capsul diluído em diferentes concentrações de amido modificado (0 a 10%). Logo após, foi realizada a secagem da emulsão em atomizador. Os resultados apontaram que, de maneira geral, a forma e os diâmetros das microcápsulas não dependeram do teor de amido modificado, mas a presença do capsul conferiu melhor retenção de óleo. Em outro trabalho, o óleo de laranja foi encapsulado com goma arábica e maltodextrina também por atomização utilizando capsul (0 a 10%) e os resultados mostraram que quanto maior o teor de amido modificado, maior a retenção de óleo na cápsula (ASCHERI; MARQUEZ; MARTUCCI, 2003).

3.2.3. Microencapsulação de larvicidas naturais e sintéticos

Na Tabela 5 é possível verificar alguns trabalhos visando encapsular larvicidas sintéticos, enquanto que na Tabela 6, diferentes métodos de encapsulação foram aplicados para larvicidas naturais. Mais uma vez, diferentes compostos, com diferentes coeficientes de partição são listados, com atividade larvicida para diferentes espécies de mosquito.

De acordo com Kanis et al. (2012), os componentes da óleoresina de copaíba são poucos solúveis em água e a microencapsulação seria uma alternativa para permitir a aplicação dos

ativos da copaíba contra as larvas do mosquito *Ae. aegypti*. Assim, os autores microencapsularam por emulsificação/precipitação a óleoresina em diferentes proporções com dois polímeros diferentes, um natural e outro sintético, com o intuito de comparar a CL₅₀ das micropartículas. Os resultados apontaram eficiência de encapsulação entre 75 – 98%. A óleoresina não encapsulada apresentou CL₅₀ igual a 48 mg L⁻¹, enquanto que as microcápsulas apresentaram CL₅₀ entre 42 a 140 mg L⁻¹, destacando a menor CL₅₀ para o tratamento com 250 mg de óleoresina com o polímero natural acetato de celulose. Apesar da óleoresina não encapsulada ter a mesma atividade larvicida do que a óleoresina microencapsulada, a microencapsulação preveniu a separação das fases após alguns dias de acompanhamento. Além disso, o polímero sintético PEMA [poli(etileno-co-metil acrilato)] não permitiu a liberação máxima de ativo ao comparar com o polímero natural e isto foi verificado com menor mortalidade das larvas ao longo do tempo durante a avaliação do efeito residual. As partículas produzidas com acetato de celulose apresentaram a mesma cinética de mortalidade larval do que a óleoresina não encapsulada ao longo do tempo.

Pant et al. (2012) analisaram a atividade larvicida contra *Ae. aegypti* de micropartículas de óleos naturais de neem e de karanja (*Pongamia glabra*) e da mistura entre eles. A técnica de encapsulação foi gotejamento em alginato de cálcio com diferentes proporções de óleos. A CL₅₀ entre os tratamentos variou entre 3,1 a 5,1 g L⁻¹, sem diferença expressiva entre os recheios. Os autores não mencionaram os mecanismos envolvidos na liberação dos compostos ativos, tampouco verificaram a cinética de liberação dos mesmos.

Bhan, Mohan e Srivastava (2014) nanoencapsularam diferentes concentrações (1 a 16%) de larvicidas sintéticos (temefós e imidacloprida) pelo método de dispersão de fusão (*melt-dispersion*). A atividade contra larvas de *Cx. quinquefasciatus*, mosquito responsável pela transmissão da filariose linfática, foi avaliada em diferentes tempos de exposição aos larvicidas livres e encapsulados. Os resultados indicaram que o temefós livre e encapsulado foi mais eficiente do que o imidacloprida. De acordo com as concentrações letais, concluiu-se que para atingir a mesma eficiência larvicida, uma menor quantidade de temefós na forma encapsulada é necessária ao comparar com a forma livre.

De acordo com a Tabela 5 e com a Tabela 6 é possível verificar que o método mais comum utilizado para produção de partículas com aplicação contra larvas de mosquito é a geleificação iônica (gotejamento, pérolas) e nenhum trabalho foi encontrado utilizando a extrusão termoplástica com composto ativo para atuar como larvicida. Desta forma, tem-se uma

inovação em relação à técnica de encapsulação, de modo que a extrusão tem vantagens em relação à geleificação, como apresentado na seção anterior (3.2.1).

Outra observação importante apresentada na Tabela 5 é que apesar do coeficiente de partição do composto diclorvós ser baixo (1,27) e indicar que ele tem maior afinidade pela fase hidrofílica, o material de parede utilizado na microencapsulação é de fundamental importância para que o ativo seja liberado no momento e local desejados e possa atuar sobre as larvas, mas não foi o resultado verificado por Paula, de Paula e Bezerra (2006b), visto que menos de 50% das larvas de *Ae. aegypti* morreram utilizando entre 2 a 6 mg de pérolas de quitosana/goma de cajueiro contendo diclorvós. O ideal é que o máximo de mortalidade seja alcançado, para evitar a seleção de indivíduos resistentes.

Em contrapartida, observando a Tabela 6, Galvão et al. (2015) encapsularam óleo de laranja por três métodos: inclusão complexa, co-precipitação e mistura física, todos com β -ciclodextrina. Os resultados mostraram que o melhor método de encapsulação foi o de inclusão complexa, indicando que o método de encapsulação também influencia na eficácia da partícula como larvicida utilizando-se o mesmo composto ativo. Além disso, a CL_{50} do padrão R-limoneno foi maior do que a CL_{50} do óleo livre e do óleo encapsulado, mostrando que a eficiência larvicida é proveniente do sinergismo entre os componentes do óleo essencial de laranja e não apenas do componente majoritário. O mesmo exemplo ocorre para a planta *Lippia sidoides*, onde diferentes mortalidades foram observadas para o mesmo ativo, mas diferentes métodos de encapsulação foram aplicados (Tabela 6).

Além de estudar diferentes fontes naturais ou sintéticas para encapsular compostos com atividade larvicida, é de extrema importância avaliar a liberação do composto nas mesmas condições em que a larva do mosquito se desenvolve, isto é, meio aquoso, pH neutro, à temperatura ambiente, a pressão atmosférica, sem agitação, pois a larva é sensível, com períodos determinados de presença/ausência de luz. O estudo do efeito residual e a comparação entre o óleo/extrato livre e encapsulado também são primordiais. É importante fazer uma ressalva para a quantidade de óleo/extrato encapsulado, tipo de material de parede da partícula, os gatilhos para o ativo ser liberado da partícula nas condições citadas favoráveis para a larva, teor de umidade da partícula, eficiência de encapsulação que o método proporciona, dificuldade de produção, custo e praticidade do método de encapsulação, entre outros fatores. Maiores discussões serão realizadas na próxima seção acerca da modelagem matemática sobre a liberação de óleo de sistemas particulados.

Tabela 5: Concentração letal para eliminar 50% (CL₅₀) das larvas diferentes vetores ou mortalidade (%) após 24 h de exposição de larvicidas sintéticos encapsulados por diferentes métodos.

Composto	Coefficiente de partição ¹	Método de encapsulação	Espécie	CL ₅₀ (ppm)	Mortalidade (%)	Concentração (%)	Quantidade de partícula (mg)	Referência
Diclorvós	1,27	Pérolas de quitosana e goma de cajueiro	<i>Ae. aegypti</i>	-	0 - 45	-	2 - 6	(PAULA; PAULA; BEZERRA, 2006b)
Imidacloprida	0,62	Pérolas de alginato e quitosana	<i>Ae. aegypti</i>	6,11	20 - 100	-	2,5 - 20	(LIM; AHMAD, 2017)
Permetrina	6,24	Nanoencapsulação	<i>C. quinquefasciatus</i>	-	83 - 94	-	-	(ANJALI et al., 2010)
Temefós	5,47	Dispersão a quente com polietilenoglicol	<i>C. quinquefasciatus</i>	0,164 a 2,304	-	1 - 16	-	(BHAN; MOHAN; SRIVASTAVA, 2014)
		Cápsulas de quitosana com alginato e gelatina	<i>C. pipiens</i>		53 - 83	-	-	(BADAWY et al., 2015)

¹ Coeficiente de partição foi calculado de acordo com a literatura (VIRTUAL COMPUTATIONAL CHEMISTRY LABORATORY, 2017) a partir do número *Smiles* da estrutura do composto puro.

Tabela 6: Concentração letal para eliminar 50% (CL₅₀) das larvas diferentes vetores ou mortalidade (%) após 24 h de exposição de larvicidas naturais encapsulados por diferentes métodos.

Planta (Nomes científico e comum)	Metabólito majoritário e sua quantidade estimada	Coefficiente de partição ¹	Parte da planta usada	Método de extração	Método de encapsulação	Espécie	CL ₅₀ (ppm)	Quantidade e de partículas (mg)	Concentração (ppm)	Mortalidade (%)	Referência
Mistura de <i>Azadirachta indica</i> e <i>Pongamia glabra</i>	-	-	Óleo comercial	-	Gotejamento com alginato	<i>Ae. aegypti</i>	3,1 – 4,7	-	-	-	(PANT et al., 2012)
<i>Azadirachta indica</i> (Neem)	Azadiractina	1,53	Resíduo industrial	Extração com água	Nanopartículas de prata	<i>Ae. aegypti</i>	3,9 – 6,7	-	-	-	(CHANDRAMOHAN et al., 2016b)
<i>Azadirachta siamensis</i> (Thai neem)	-	-	Óleo comercial	-	Pérolas de alginato	<i>Ae. aegypti</i>	-	-	-	62	(SILAPANUNTAKUL et al., 2016)
<i>Citrus sinensis</i> (Laranja)	R-Limoneno (96,3 %)	3,19	Casca secas	Hidrodestilação	Microemulsão	<i>Ae. aegypti</i>	5,9 - 6,5	-	-	-	(FERREIRA et al., 2015)
					Mistura física		23	-	-	-	(GALVÃO et al., 2015)
<i>Copaifera duckei</i> (Copaíba)	-	-	Óleoresina	-	Nanoemulsão	<i>Ae. aegypti</i>	-	-	200 – 500	70 - 100	(RODRIGUES et al., 2014)
					Deposição polimérica interfacial		42 - 140	-	-	-	(KANIS et al., 2012)
<i>Croton zehntneri</i> (Canela de cunhã)	-	-	Folhas	Hidrodestilação	Pérolas de alginato e goma de cajueiro	<i>S. aegypti</i>	-	20 – 50	-	30 - 100	(PAULA et al., 2010b)
<i>Cymbopogon nardus</i> L. (Citronela)	-	-	-	-	Pérolas de alginato	<i>Ae. aegypti</i>	-	-	10 - 500	0 - 100	(WIDAWATI; RIANDI, 2013)

¹O logaritmo do coeficiente de partição foi calculado de acordo com a literatura (VIRTUAL COMPUTATIONAL CHEMISTRY LABORATORY, 2017) a partir do número *Smiles* da estrutura do composto puro.

Continuação da Tabela 6:

Planta (Nomes científico e comum)	Metabólito majoritário e sua quantidade estimada	Coefficiente de partição	Parte da planta usada	Método de extração	Método de encapsulação	Espécie	CL ₅₀ (ppm)	Quantidade de partículas (mg)	Concentração (ppm)	Mortalidade (%)	Referência
<i>Moringa oleifera</i> (Moringa)	-	7,89	Sementes	Extração com água e acetona	Atomização com goma de cajueiro	<i>S. aegypti</i>	-	50 - 75	-	20 - 50	(PAULA et al., 2012a)
<i>Lippia sidoides</i>	Timol (43,5%)	3,17	Óleo comercial	-	Nanopartículas de quitosana e goma de angico	<i>S. aegypti</i>	-	50	-	50 - 90	(PAULA et al., 2010a)
				-	Nanogels de quitosana e goma de cajueiro		-	12 - 24	-	20 - 50	(ABREU et al., 2012)
				-	Pérolas de quitosana e goma de cajueiro	<i>Ae. aegypti</i>	-	9 - 18	-	0 - 50	(PAULA et al., 2011)
				-	Gelatinização com alginato de goma de cajueiro		-	20	-	30 - 50	(PAULA et al., 2012b)
<i>Piper betle</i> (Pimenta betéle)	Hydroxychavicol (39,31%) ¹	2,20	Folhas	Hidrodestilação	Pérolas de alginato	<i>Ae. aegypti</i>	80	-	-	-	(WIDAWATI; DHEWANTARA, 2013)
<i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (Sucupira)	Diterpenos do tipo vouacapano	-	Frutas	Pressão fria	Nanoemulsão	<i>Ae. aegypti</i>	-	-	12,5 - 250	0 - 100	(OLIVEIRA et al., 2016a)
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)	1,8-Cineol (44%)	2,6	-	Hidrodestilação	Nanoemulsão	<i>Ae. aegypti</i>	-	-	250	80	(DUARTE et al., 2015)

¹ Referência: (NALINA; RAHIM, 2007)

3.2.4. Modelagem matemática da liberação de ativo

Como visto anteriormente no item 3.2.1.1, são vários os fatores que interferem no mecanismo de liberação do ativo, mas um resumo geral dos principais deles pode ser conferido na Tabela 7. A combinação deles ou a predominância de apenas um pode conferir o sucesso do sistema produzido. Os principais mecanismos envolvidos na cinética de liberação do ativo são: a difusão (na matriz através dos poros e no meio de liberação); o intumescimento, inchamento ou hidratação; a erosão, dissolução, lixiviação ou perda de sólidos. Além disso, quando as estruturas matriciais entram em contato com o meio de dissolução, podem manter a sua estrutura mais ou menos constante ao longo do tempo ou podem sofrer um fenômeno de intumescimento e, posteriormente, de erosão (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Tabela 7: Fatores que afetam a liberação do ativo

Propriedades do ativo	Hidrofobicidade/Hidrofilicidade (log P) Solubilidade no polímero Características de dissolução/difusão Solubilidade no meio de liberação	
Propriedades do polímero	Propriedades térmicas Grau de cristalinidade Hidrofobicidade/Hidrofilicidade Velocidade de absorção do meio de liberação	
Propriedades do meio de liberação	Velocidade de agitação Temperatura Íons pH	Viscosidade Enzimas Pressão
Propriedades do processo	Seleção do método de encapsulação Temperatura, pressão, cisalhamento Diagrama de fases do solvente com o ativo Umidade final	
Projeto do processo	Proporção entre polímero e ativo Composição e espessura da camada de polímero Carga inicial de ativo e distribuição no polímero Microestrutura da partícula Quantidade de ativo na superfície e eficiência de encapsulação Geometria do sistema Custo Rendimento	

Fonte: Adaptado de Raval; Parikh; Enginner (2010).

Campos et al. (2015) apresentam uma revisão de literatura sobre a importância do uso de polissacarídeos como sistemas seguros de liberação de agroquímicos. Os polissacarídeos, como o amido, são polímeros hidrofílicos e biodegradáveis. Quando eles são aplicados na microencapsulação, a liberação gradual minimiza o impacto ao meio ambiente a partir da redução da liberação de ativo. Entretanto, de modo geral, o enfoque dado para o amido é a verificação da influência da sua concentração na formulação junto com outros polissacarídeos sob a liberação do ativo e não do teor de amilose do amido como é verificado nesta tese. Por exemplo, Roy, Bajpai e Bajpai (2009) verificaram que quanto maior a proporção de amido na formulação com alginato, maior a liberação do inseticida clorpirifós.

É possível modelar também a hidratação de partículas obtidas por extrusão, uma vez que o solvente está sendo difundido na matriz polimérica e componentes solúveis estão sendo lixiviados. Pensando na extrusão como processo de produção de cereais matinais, a modelagem da absorção de leite, fluido composto principalmente por água, é importante para caracterizar o processo de hidratação e, conseqüentemente, perda da crocância. Neste sentido, Takeuchi, Sabadini e Cunha (2005) avaliaram a influência do tipo de amido (arroz, milho e trigo) e da geometria (esfera, placa) na absorção de umidade de cereais matinais, os quais quando em contato com o leite atingem uma textura amolecida indesejável em determinado tempo crítico. A estrutura porosa e a baixa atividade de água dos extrusados expandidos têm uma grande influência na difusão do líquido e elevados coeficientes de difusão implicam em perda mais rápida da crocância. Os autores observaram que a absorção de umidade foi distinta entre as amostras, dependendo do teor de umidade inicial, da porosidade, das condições do processo de extrusão e do tipo de amido. A difusividade mássica apresentou o seguinte comportamento em função do tipo de amido: milho < trigo < arroz, enquanto que o teor de amilose tem o seguinte comportamento: arroz < trigo < milho. Desta forma, o cereal à base de amido de arroz, que possui o menor teor de amilose, tinha uma menor resistência à difusão e apresentou a maior difusividade mássica. Este fato mostra que o processo de difusão de leite em cereais pode estar principalmente relacionado ao teor de amilose, que influencia a resistência da matriz do cereal em relação ao processo de difusão.

De acordo com Tabela 7, como um ou mais mecanismos podem estar envolvidos na liberação do ativo, o tratamento matemático para abranger a todos os fatores é muito complexo. Correlações empíricas e semi-empíricas para a modelagem matemática são elucidadas na literatura e as mesmas apresentam complexidade variável (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Apesar de existirem inúmeros modelos, alguns são mais conhecidos e utilizados como os apresentados na Tabela 8.

A modelagem matemática da liberação de óleo de partículas com atividade larvicida é bem elucidada. Alguns exemplos serão detalhados a seguir. Contudo, um dado que falta ser esclarecido é a concentração letal da partícula, determinada a partir do conhecimento de: carga da partícula, eficiência de encapsulação, quantidade de óleo liberado e atividade larvicida, todos no mesmo tempo de contato entre partícula e larvas. Como mostrado anteriormente na Tabela 5 e na Tabela 6, geralmente os autores apresentam o percentual de mortalidade em função da quantidade de partícula utilizada, nem todos mostram a cinética de liberação *in vitro* e nem sempre a mortalidade chega a ser 100%, o que dificulta o cálculo da CL₉₉ da partícula.

Paula et al. (2010a) realizaram a modelagem matemática da liberação de óleo de pérolas de quitosana e goma de angico contendo *L. sidoides*. Duas concentrações de goma de angico foram testadas. As pérolas liberaram aproximadamente 80% de óleo após 50 h em água com pH neutro. A equação de Korsmeyer foi aplicada e foi observado que a constante cinética k variou entre 0,06 a 0,08, o expoente n entre 1,09 a 1,10, com $R^2 > 0,999$.

Em outra pesquisa semelhante, partículas atomizadas de goma de cajueiro contendo duas proporções de óleo de moringa liberaram 100% de óleo em 25 h e apresentaram constante cinética k entre 0,38 a 0,45, o expoente n entre 0,37 a 0,28, com $R^2 > 0,98$ (PAULA et al., 2012a).

De Paula et al. (2010b) e Paula et al. (2012b) aplicaram o modelo de difusão de Fick para o inchamento de pérolas contendo óleo de cróton e de *L. sidoides* respectivamente. Foi possível calcular o coeficiente de difusão mássica, o qual variou entre $18 \cdot 10^{-10}$ a $1 \cdot 10^{-20}$ m² s⁻¹ respectivamente. Os autores concluíram que o teor de material de parede e o diâmetro da partícula são os principais parâmetros que interferem na determinação do coeficiente de difusão.

Tabela 8: Principais modelos utilizados para modelar liberação de ativo de partículas matriciais

Nome	Modelo	Características
Ordem zero	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 t + b$ <p>M_t: quantidade absoluta de ativo liberada no tempo t; M_∞: quantidade total de ativo (quantidade total de ativo incorporado ao sistema polimérico no $t = 0$); k_0: constante cinética; b: quantidade inicial de fármaco na solução (geralmente é igual a zero)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas não se dissolvem; • Partículas destinadas a veicular substâncias ativas com liberação prolongada • A velocidade de difusão do fármaco, do interior para a superfície da matriz, é menor que a respectiva velocidade de dissolução, formando uma solução saturada, que permite a cedência constante do fármaco. • Muitas limitações devido aos poucos fatores de ajuste ao modelo.
Equação de Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n$ <p>k: constante cinética que incorpora características estruturais e geométricas da partícula; n: expoente de liberação. Se $0,45 < n < 0,89$, o transporte é anômalo; se $n = 0,45$, o mecanismo é difusão Fickiana clássica; se $n = 0,89$, o mecanismo corresponde ao Caso II, regido pelo inchamento e lixiviação; se $n > 0,89$, trata-se de um Super Caso II</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizada quando o mecanismo que prevalece é uma combinação entre a difusão do ativo (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não-Fickiano), controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas
Equação de Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \sqrt{t} + b$ <p>k_H: constante de liberação de Higuchi</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Caso específico da Equação de Korsmeyer para $n = 0,5$ • Processo de difusão baseado na lei de Fick • Pouco utilizado para sistemas que incham e lixiviam
Modelo de Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m}$ <p>k_1 e k_2: são constantes que refletem as contribuições relativas do mecanismo de difusão Fickiana e do mecanismo de erosão/relaxamento (transporte Caso II); m: é o expoente de difusão Fickiana da partícula que apresenta uma liberação modificada, qualquer que seja a sua forma.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Caso específico da Equação de Korsmeyer para quantificar as contribuições relativas dos dois fenômenos responsáveis pela liberação (difusão e relaxamento)

Continuação da Tabela 8:

Nome	Modelo	Características
Equação de Weibull	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-(k \cdot t)^n)$ <p>k: constante cinética que incorpora características estruturais e geométricas da partícula n: parâmetro de taxa, descreve a forma de progressão da curva</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Descreve um processo clássico de liberação controlada por difusão
Lei de Difusão de Fick	$\frac{M_t}{M_\infty} = \left(\frac{36Dt}{\pi r^2}\right)^{\frac{1}{2}} - \left(\frac{3Dt}{r^2}\right) \text{ para } 0 \leq \frac{M_t}{M_\infty} \leq 0,7$ $\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6e^{-\frac{\pi^2 Dt}{r^2}}}{\pi^2} \text{ para } 0,7 \leq \frac{M_t}{M_\infty} \leq 1$ $D = \left(\frac{r\theta}{6}\right)^2 \pi$ <p>D: coeficiente de difusão ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) r: raio da partícula (m) t: tempo (s) θ: coeficiente angular da parte linear do gráfico M_t/M_∞ versus $t^{\frac{1}{2}}$</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Geometria esférica

Fonte: (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; MACHADO et al., 1998; PAULA et al., 2012b; SINGHVI; SINGH, 2011)

3.2.5. Microencapsulação de jambu, tomilho e neem

A microencapsulação de jambu é pouco elucidada, ao contrário da microencapsulação de neem e de tomilho.

O extrato de jambu foi microencapsulado para compor cosmético com o intuito proporcionar uma sensação de formigamento, por exemplo, nos lábios ao aplicar batom contendo as partículas (VOLLHARDT; MANZO; MALKAN, 2000).

A maior vantagem dos larvicidas naturais frente aos larvicidas sintéticos é a sua biodegradabilidade e, conseqüentemente, apresentam menor estabilidade ao longo do tempo e por isso a microencapsulação é uma alternativa de melhoria. Entretanto, os limonoides presentes no neem são facilmente hidrolisados ao entrar em contato com a água e o tempo de meia vida da azadiractina é reduzido com a elevação da temperatura e do pH (SZETO; WAN, 1996). Devido ao seu grande potencial como biocida natural, os extratos de neem já foram utilizados na produção de sistemas de liberação controlada utilizando biopolímeros, mas, dependendo do meio de aplicação do sistema carreador, a absorção de água pelos polímeros poderia ser um fator de promoção da degradação dos limonoides presentes no neem, devido à reação de hidrólise (MATTOS; ROJAS; MAGALHÃES, 2017), além de outros fatores como exposição à luz, oxigênio e aquecimento. Sendo assim, nanopartículas contendo óleo da casca de neem foram produzidas com sílica, que é um material inerte, termicamente estável e que não incha, uma vez que a absorção de umidade poderia promover maior degradação da azadiractina por hidrólise. Após mergulhar formigas-cortadeiras *Acromyrmex crassispinus* em solução contendo as nanopartículas imersas por 4 dias, 100% das formigas foram eliminadas (MATTOS; ROJAS; MAGALHÃES, 2017). Em outro estudo, a produção de nanoemulsão com goma de neem proporcionou uma redução significativa da concentração necessária para eliminar larvas de mariposas de duas espécies: CL₉₉ igual a 32 ppm para a nanoemulsão e de 120 ppm para a goma livre para a espécie *Helicoverpa armigera*; CL₉₉ igual a 36 ppm para a nanoemulsão e de 92 ppm para a goma livre para a espécie *Spodoptera litura* (KAMARAJ et al., 2018). Em outra pesquisa, a nanoemulsão de neem foi desenvolvida e mostrou-se eficiente contra fungos de diferentes espécies, de modo que a dose efetiva (ED₅₀) para eliminar 50% dos fungos para as nanoemulsões variou de 13 a 109 mg L⁻¹, enquanto que para o óleo de neem livre a ED₅₀ foi 532 mg L⁻¹ para a espécie *Rhizoctonia solani*; de maneira semelhante, a ED₅₀ para as nanoemulsões variou de 14 a 85 mg L⁻¹, enquanto que para o óleo livre a ED₅₀ foi 871 mg L⁻¹ para a espécie *Sclerotium rolfsii* (ALI et al., 2017). Nanocápsulas contendo limonoides

derivados do neem foram produzidas com polímeros biodegradáveis do tipo poli-ε-caprolactona (PCL) e poli-β-hidroxibutirato (PHB) por meio do processo de deslocamento de solvente/deposição interfacial. Elas foram aplicadas em água de irrigação de tomateiros contra ninfas da praga *Bemisia tabaci* biótipo B. A CL₅₀ do óleo de neem não encapsulado foi de 180,67 mg de azadiractina L⁻¹ e formulações específicas de nanocápsulas conseguiram eliminar pelo menos 50% das ninfas até 30 dias depois da aplicação, não diferindo do óleo comercial (CARVALHO et al., 2015). Produtos de neem foram emulsionados em ultraturrax e depois secos em *spray dryer*. As nanopartículas apresentaram maior estabilidade à luz e conseguiram eliminar mais de 95% das larvas de traça da espécie *Plutella xylostella* (FORIM et al., 2013).

Variados tipos de partículas contendo óleo de tomilho foram aplicadas para aumentar a conservação de vegetais: nanogel contra *Aspergillus flavus* (KHALILI et al., 2015) e nanotubos contra *Escherichia coli* (LEE; SEO; PARK, 2017) ambas aplicadas em tomates; nanopartículas contra *E. coli* em maçãs (MARCET et al., 2018); β-ciclodextrina aplicada em alface (VIACAVA et al., 2018); de modo que nestes estudos as partículas liberam gradualmente os compostos voláteis ao comparar com o óleo livre, prolongando a vida útil dos vegetais. Microesferas de alginato contendo óleo de tomilho também prolongaram a inibição do crescimento de *Aspergillus niger* e *Fusarium verticillioides* ao comparar com o óleo livre (SOLIMAN et al., 2013). Em outra pesquisa, a atividade antibacteriana do óleo de tomilho foi avaliada ao comparar os métodos de encapsulação e a maior inibição do halo foi com as nanocápsulas em comparação com as nanopartículas, ambas de quitosana (SOTELO-BOYÁS et al., 2017). A concentração mínima inibitória contra vários microrganismos foi menor para as partículas produzidas por coacervação complexa do que para o óleo livre e, além disso, as partículas foram incorporadas em bolo e prolongaram a sua vida útil (GONÇALVES et al., 2017). Também é elucidada a encapsulação do óleo de tomilho pelo método de inclusão em β-ciclodextrina para posterior aplicação em tecido para prevenir infecções dermatológicas (SCACCHETTI; PINTO; SOARES, 2017). Asprea et al. (2017) encapsularam o óleo de tomilho pelo método de *nanocochleates*, caracterizam a partícula por completo e indicam seu uso para manter a atividade antioxidante do óleo livre. Microcápsulas de tomilho produzidas por emulsão foram eficientes contra ácaros de poeira doméstica, mas o óleo não encapsulado não teve sua atividade acaricida avaliada (KIM; SHARMA, 2011).

Vista a importância de combater o mosquito *Ae. aegypti* ainda na fase larval, os larvicidas sintéticos e naturais, em sua forma livre e microencapsulada, a extrusão termoplástica com

amido de milho como opção relativamente de baixo custo para atingir o objetivo desta tese, a seguir tem-se a seção de Material e Métodos. De acordo com a proposta inicial do projeto, vários compostos ativos com coeficientes de partição distintos foram avaliados para haver a seleção do melhor composto ativo. O ideal seria trabalhar com um composto hidrofílico e outro lipofílico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Insumos

Os seguintes materiais foram utilizados: ácido gálico (Dinâmica), água destilada, água mineral, amido modificado Capsul (*National Starch Food Innovation*), amidos de milho gentilmente cedidos pela Ingredion (Mogi Guaçu, São Paulo, Brasil): Amisol 4000, Amisol 3408 e Hyllon VII, carbonato de sódio (Dinâmica), diclorometano (Dinâmica), etanol (Chemco; Synth), hidróxido de sódio (Dinâmica), óleo comercial de neem Dalneem Brasil (Jundiaí, Santa Catarina, Brasil), óleo comercial de neem Vitalplan (Cascavel, Paraná, Brasil), óleo comercial de tomilho branco Petit Marie (Itaquaquecetuba, São Paulo, Brasil) lote #318877 fabricação em 03/2015, ração para peixe Tetra Marine, reativo de fenol Folin-Ciocalteu (Dinâmica), sangue de cordeiro, sulfato de sódio (Dinâmica), temefós (Fluka), timol (Synth), Tween-20 (Croda do Brasil). Os bioensaios foram conduzidos com ovos e larvas da linhagem Rockefeller de *Ae. aegypti* (criada em laboratório e mais suscetível) e com larvas de uma população resistente encontrada comumente em áreas urbanas, de modo que os ovos foram coletados na cidade de Laranjeiras (Sergipe, Brasil) no primeiro semestre de 2017, identificados em laboratório e procriados.

4.1.2. Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados: agitador magnético (IKA Rh basic 2), Agitador tipo vórtex para tubos (772, Fisatom), balança analítica (AS 220/C/2 Radwag), balança semi-analítica (ARD Adventurer Ohaus), batedeira planetária (Hypo HB12), colorímetro Konica Minolta CM-700, agitador de peneiras (Bertel Metalurgic), cromatógrafo gasoso (HP 6890 System CG Sytem), difratômetro de raios-X (Philips Analytical X Ray, X'Pert-MPD), espectrofotômetro para espectroscopia (IRPrestige-21, Shimadzu, Kyoto, Japão), espectrofotômetro UV-visível (T60 PG Instruments), estufa (Nova ética, 400/ND; Tecnal TE 394/2), evaporador rotativo (IKA, RV10 Control V), extrusor dupla-rosca co-rotacional ZSK-30 (Werner e Pfleiderer, Ramsey, EUA), extrusor mono-rosca Brabender (modelo 20 D/N-GNF 1014/2), faca rotativa (FM56C, SXE, Cleveland, EUA), balança para determinação do teor de umidade por infravermelho (AD-4714A), microscópio eletrônico de varredura (Leo 440i, LEO Electron Microscopy/Oxford, Inglaterra), microscópio estereoscópio Nikon (SMZ 745T),

moinho de martelo (740064G TREU S.A.), paquímetro universal (100.001a Digimess), pulverizador catódico (Emitech, K450, Reino Unido), ultraturrax (IKA T15 basic).

4.2. COMPOSTOS ATIVOS

4.2.1. Obtenção dos compostos ativos

Foram analisadas amostras de origem natural (tomilho, neem e jambu) e de origem sintética (temefós).

O óleo essencial de tomilho branco (*Thymus vulgaris*) (Figura 12A) foi adquirido comercialmente.

O extrato de jambu (*Acmella oleracea*) foi obtido por maceração com etanol (Chemco) de acordo com Freitas-Blanco et al. (2016) no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP. Uma amostra foi depositada no herbário do Instituto de Biologia (IB) da Unicamp sob o número #A977ADE. Resumidamente, as partes aéreas (folhas, flores e caules – sem raiz) do jambu cultivado em Paulínia (São Paulo, Brasil) foram desidratadas em estufa a 40°C durante 72 h, submetidas à agitação mecânica com etanol na proporção 1:5 (massa desidratada/massa solvente), filtradas e em seguida, o solvente foi eliminado por evaporação à vácuo (Figura 12B). O rendimento mássico foi em torno de 7 % e calculado conforme a Equação 1.

Equação 1: Rendimento do extrato

$$X_0 (\%) = \frac{m_e}{m_i} * 100$$

Onde: X_0 é o rendimento mássico (%), m_e é a massa de extrato após evaporação do solvente (g) e m_i é a massa inicial da matéria-prima (g).

Três amostras de neem (*Azadirachta indica*) foram avaliadas: óleo comercial de neem I (Figura 12C) da Dalneem Brasil, óleo comercial de neem II (Figura 12D) da Vitalplan e extrato alcoólico de neem III. A obtenção do extrato foi a partir da coleta de folhas de um exemplar de neem coletadas em Paulínia/SP depositadas no herbário do IB/UNICAMP sob o número #184156. As folhas foram desidratadas em estufa com circulação de ar a 45°C durante 24 h. Em seguida, as folhas foram trituradas em liquidificador doméstico (Figura 12E). Cerca de 50 g de

amostra desidratada e triturada foram homogeneizadas em ultraturrax a 11200 rpm durante 60 min com 300 mL de etanol, resultando em proporção 1:6 (massa seca/solvente). Devido à agitação promovida durante a homogeneização, a solução atingiu 60°C infortunadamente e um sistema de refrigeração não foi utilizado para manter a temperatura a 25°C. Em seguida, a solução ficou em repouso durante 12 h. A solução foi filtrada com papel filtro (Figura 12F). Não foi feita a evaporação do solvente para concentrar o extrato, pois uma grande quantidade seria necessária para realizar a encapsulação e a opção seria utilizá-lo diluído com maior rendimento.

4.2.2. Avaliação dos compostos ativos

4.2.2.1. Atividade larvicida

4.2.2.1.1. Criação dos mosquitos

Mosquitos *Ae. aegypti* da linhagem ROCK foram obtidos de colônias livres de infecção, mantidos no Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Os mosquitos foram mantidos a cerca de 25 °C, com 60 – 70 % de umidade relativa e fotoperíodo de 12:12 horas (luz/escuro). Papel contendo cerca de 1000 ovos produzidos no insetário foi submerso em cerca de 3 L de água destilada em recipiente retangular de plástico (Figura 13A). Cerca de 2 dias após a eclosão dos ovos, as larvas foram alimentadas com ração para peixe por cerca de 3 a 4 dias (Figura 13B) e as mesmas foram se desenvolvendo de fase (L1, L2, L3 e L4). Após as larvas atingirem a fase pulpa, estas foram transferidas para copos descartáveis contendo água e colocadas em gaiolas blindadas (30 cm x 30 cm x 30 cm de dimensão) para o desenvolvimento até a fase adulta (Figura 13C). Os adultos foram alimentados com solução de sacarose a 10% continuamente e as fêmeas foram alimentadas com sangue de cordeiro três vezes por semana com a ajuda de um *glytube* (Figura 13D) conforme Costa-da-Silva (2013). O projeto nº 43/2016 foi licenciado pelo Comitê de Ética da UFS, com principal rigor a fonte de alimentação das fêmeas (animal vertebrado). Desta forma, a Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP relatou que a legislação brasileira abrange normas sobre experimentos apenas com animais filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, não incluindo o mosquito *Ae. aegypti* (filo *Arthropoda*).



A



B



C



D



E



F

Figura 12: Aparências das amostras analisadas de óleo comercial de tomilho (A), extrato de jambu obtido com etanol (B), óleo comercial de neem I (C), óleo de neem comercial II (D), folhas desidratadas e trituradas de neem (E) e extrato de neem III obtido com etanol.

Fonte: Autoria própria

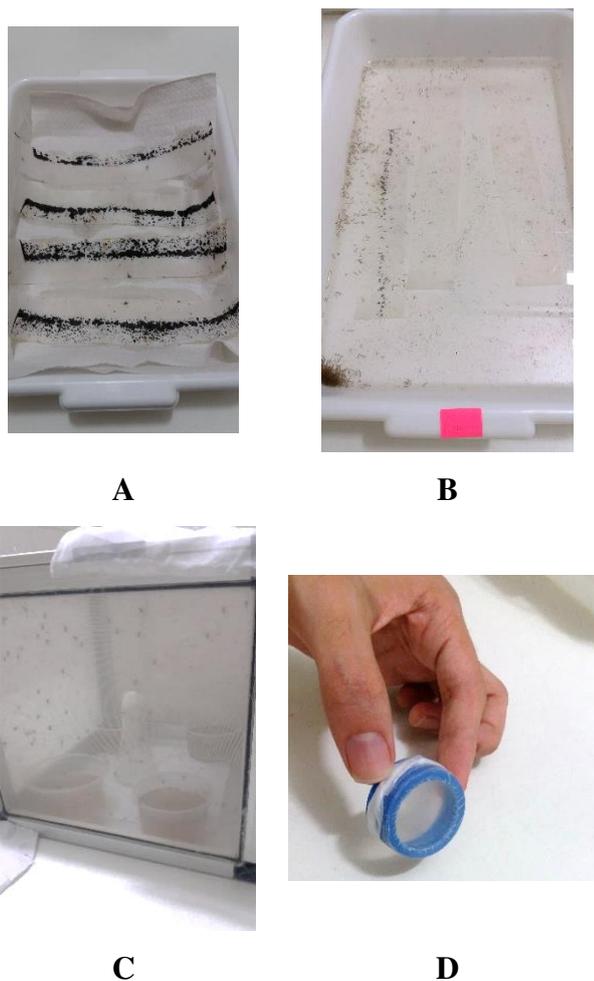


Figura 13: Papéis contendo ovos do mosquito recém-coletados da gaiola (A), Bandeja com alimento para o desenvolvimento das larvas (B), gaiola com os mosquitos adultos e alimentação com sacarose (C) e tampa do *glytube* com membrana para alimentação dos mosquitos fêmeas com sangue de cordeiro (D).

Fonte: Autoria própria.

4.2.2.1.2. Preparo das diluições

O óleo de tomilho, o extrato de jambu e os óleos comerciais de neem I e II foram diluídos em solução aquosa de Tween-20 a 10 % (v/v) a fim de obter solução-estoque a 100 mg mL^{-1} . Já o extrato alcoólico de neem III foi diluído em etanol a fim de obter solução-estoque a 1000 mg mL^{-1} . Temefós foi avaliado como controle positivo e sua solução-estoque foi preparada em etanol a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os respectivos solventes foram testados como controles negativos (brancos). Inicialmente, uma série de diluições foi testada (10 a 800 mg mL^{-1}) para os larvicidas naturais.

Após análise do resultado preliminar, uma nova série de diluições mais restrita foi realizada para preparar as concentrações de uso: 20 a 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo de tomilho, entre 40 a 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato de jambu, 10 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os óleos de neem I e II e entre 1 a 8 mg mL^{-1} para o extrato alcoólico de neem III. As diluições do temefós variaram entre 0,001 a 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estas diluições foram calculadas para um volume final de 100 mL de água e alíquotas de 1 mL da diluição como preconiza WHO (2005) em copos descartáveis com capacidade de 120 mL. As diluições foram homogeneizadas manualmente com a água destilada antes da adição das larvas para evitar morte por dano físico.

4.2.2.1.3. Análises dos compostos ativos

Vinte e cinco larvas no terceiro estágio (Figura 14A) obtidas de acordo com o item 4.2.2.1 foram coletadas cuidadosamente com pipeta Pasteur e transferidas para 20 mL de água mineral e reservadas em copos descartáveis com capacidade de 50 mL. As larvas foram transferidas para as diluições preparadas previamente no item 4.2.2.1.2. Quatro réplicas foram realizadas para cada diluição e controle negativo (Figura 14B). A mortalidade foi avaliada 24 h após a exposição a aproximadamente 25°C e as larvas foram consideradas mortas quando elas perderam a sua mobilidade ou estavam incapazes de se locomover na superfície. Nenhum alimento foi fornecido às larvas durante a realização do teste. As larvas sobreviventes foram eliminadas com a aplicação direta de calor (Figura 14). O esquema geral dos procedimentos experimentais realizados é apresentado na Figura 15 .

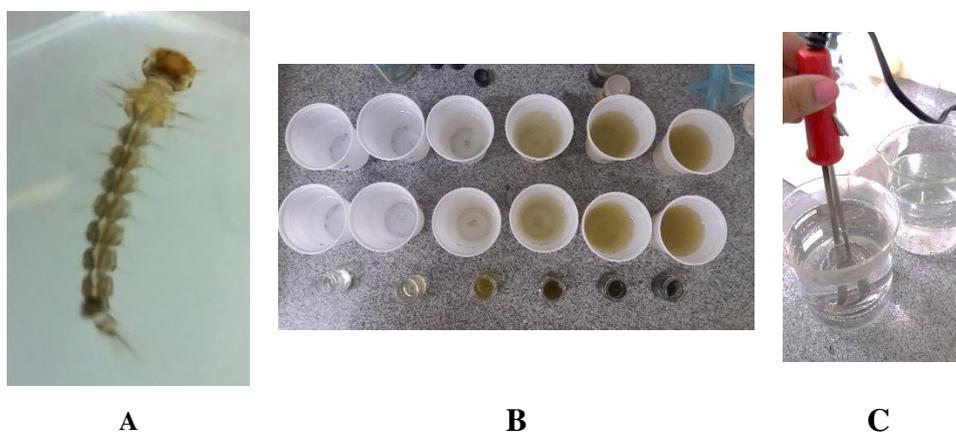


Figura 14: Larva de *Aedes aegypti* no estágio L3 (A), preparo das diluições dos compostos ativos para o teste larvicida (B) e eliminação das larvas sobreviventes no teste (C).
Fonte: Autoria própria

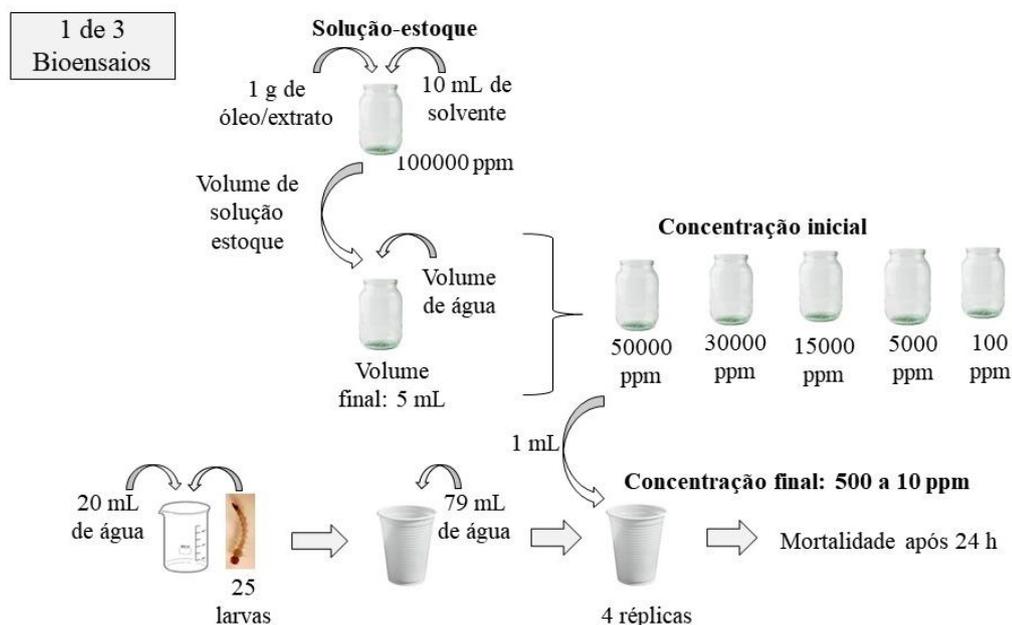


Figura 15: Exemplo esquematizado do preparo das diluições para verificação da atividade larvicida dos óleos/extratos naturais livres.

Fonte: Autoria própria

A mortalidade das larvas foi calculada de acordo com a Equação 2 e o resultado foi expresso pela média do resultado de três bioensaios realizados em dias diferentes. Foram construídas curvas de mortalidade *versus* concentração. O número de larvas vivas no início e o número de larvas mortas ao final do teste foram utilizados para calcular a concentração letal em $\mu\text{g mL}^{-1}$ para eliminar 50, 90 e 99% da população (CL_{50} , CL_{90} , CL_{99} respectivamente), conforme o item 4.5. Foram considerados válidos apenas testes sem o aparecimento de pupas e testes com até 5% de mortalidade no controle negativo para não ser necessário utilizar a Fórmula de Abbot (ABBOTT, 1925). Os resultados foram expressos com a média (CL_{50} , CL_{90} , CL_{99}) e o intervalo de confiança de 3 bioensaios realizados em dias diferentes.

Equação 2: Mortalidade das larvas (L3) em testes com compostos bioativos

$$M = \frac{L_{mortas}}{L_{expostas}} * 100$$

Onde: M é a mortalidade de larvas (%), L_{mortas} é a quantidade de larvas mortas no teste (adimensional) e $L_{expostas}$ é a quantidade de larvas expostas no início do teste (adimensional).

4.2.2.2. Compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi realizada por método espectrofotométrico de acordo com a metodologia de Folin-Ciocalteu (KOŞAR; DORMAN; HILTUNEN, 2005; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). O reagente é amarelo e na presença de fenol em meio alcalino a solução torna-se azul e em sua ausência, torna-se incolor. Quanto maior a concentração de CFT, maior a intensidade da cor azul como pode ser observado na Figura 16.



Figura 16: Variação da intensidade da cor azul durante a determinação do teor de CFT por espectrofotometria de acordo com a concentração de fenóis e a cor amarela do reagente de Folin-Ciocalteu antes da reação.

Fonte: Autoria própria

4.2.2.2.1. Curva do padrão ácido gálico

Inicialmente foi construída uma curva analítica do padrão ácido gálico para expressar os resultados dos CFT. A partir de uma solução-estoque a $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$, diluições em água foram preparadas com concentrações variando de 25 a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. As diluições foram analisadas de acordo com o item 4.2.2.2.3.

4.2.2.2.2. Análise dos óleos/extratos

Os óleos e extratos naturais livres foram dissolvidos em etanol, mas com concentrações diferentes: extrato de jambu, óleos de neem comercial I e II a $11000 \mu\text{g mL}^{-1}$; óleo de tomilho a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; extrato etanólico de neem a $50000 \mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram analisadas de acordo com o item 4.2.2.2.3.

4.2.2.2.3. Preparo do meio reacional

O preparo do meio reacional consistiu em adicionar em tubo de ensaio com tampa 6000 µL de água destilada, 100 µL da amostra e 500 µL de reagente fenol de Folin-Ciocalteu 2 N. O tubo foi homogeneizado em agitador tipo vórtex e após 1 min foram adicionados 1500 µL de solução de carbonato de sódio a 20% em água (m/v). Para completar o volume final de 10000 µL, foram adicionados 1900 µL de água destilada. O controle consistiu em adicionar 100 µL de etanol (solvente de diluição) no lugar da amostra. Os tubos foram incubados no escuro à temperatura ambiente por 1 h. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-visível a 760 nm após o equipamento ter sido calibrado com água. Todo o procedimento foi realizado em triplicata. As análises foram realizadas no Laboratório de Inovação em Alimentos (LINA) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da UNICAMP.

4.2.2.2.4. Análise dos resultados

As absorvâncias das amostras foram verificadas se estavam dentro da faixa da curva do padrão ácido gálico. A absorvância do controle foi descontada da absorvância da amostra e foi inserida na curva do padrão do tipo $Y = aX + b$ para expressar o resultado em equivalência ao ácido gálico. O teor de CFT foi calculado de acordo com a Equação 3. O resultado foi expresso em mg equivalente ao ácido gálico/g extrato (mg EAG/g extrato) ou mg EAG/g óleo, representado pela média \pm desvio-padrão.

Equação 3: Teor de compostos fenólicos totais

$$CFT = \frac{X}{C_{amostra}}$$

Onde: CFT é o teor de compostos fenólicos totais em mg EAG/g extrato ou mg EAG/g óleo, X é a concentração equivalente ao ácido gálico ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e $C_{amostra}$ é a concentração do extrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

4.2.2.3. Análise cromatográfica

De acordo com os testes preliminares dos compostos ativos, o óleo de tomilho foi selecionado como o melhor ativo e por isso foi o único a ser caracterizado quanto ao seu perfil químico.

4.2.2.3.1. Caracterização química

O óleo de tomilho foi diluído em triplicata em diclorometano a fim de obter solução a 10 mg mL⁻¹. Injetou-se 1 µL da solução conforme o item 4.2.2.3.3. Foram identificados os compostos majoritários presentes nas amostras. O resultado foi expresso pela média ± desvio-padrão do percentual em relação ao total da área dos compostos identificados e pela média ± desvio-padrão de acordo com a curva do padrão.

4.2.2.3.2. Curva do padrão timol

Uma solução-estoque de timol PA foi preparada com diclorometano a 10 mg mL⁻¹ e uma série de diluições foram feitas variando entre 0,05 a 10 mg mL⁻¹. Injetou-se 1 µL de cada diluição conforme o item 4.2.2.3.3.

4.2.2.3.3. Condições operacionais

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Ecologia Química do Departamento de Biologia Animal IB/UNICAMP. As condições de análise no cromatógrafo a gás (HP 6890 System CG System) acoplado a espectrômetro de massas (5973 Mass Selective Detector) foram: temperatura inicial 40°C, temperatura final 170°C. A coluna utilizada foi HP-5MS 5% *phenyl methyl siloxane* (Agilent 190915-433) com as seguintes dimensões: comprimento 30 m, diâmetro 250 µm, espessura 0,25 µm com vazão constante a 1,3 mL min⁻¹ de gás hélio em modo Split na proporção 20:1.

4.2.2.3.4. Índice de retenção

Uma mistura de alcanos (C9 a C18) serviu como base para o cálculo do índice de retenção (*IR*) experimental. A mistura foi diluída em acetato de etila e injetada no cromatógrafo gasoso de acordo com o item 4.2.2.3.3. A Equação de Van den Dool e Kratz (ADAMS, 2007) (Equação 4) foi utilizada para calcular o *IR*. O resultado foi comparado com o *IR* teórico de cada composto conforme os espectrogramas de massas disponíveis na biblioteca eletrônica do equipamento (*NIST MS Search 2.0*) e com dados da literatura (ADAMS, 2007).

Equação 4: Índice de retenção dos compostos identificados por cromatografia gasosa

$$IR = \left(\frac{(t_{R_X} - t_{R_{C_{n-1}}}) * (C_n - C_{n-1})}{(t_{R_{C_n}} - t_{R_{C_{n-1}}})} * 100 \right) + (100 * C_{n-1})$$

Onde: *IR* é o tempo de retenção, *n* é o número de carbonos do hidrocarboneto saturado alifático abaixo do número de átomos de carbono presentes no composto analisado, t_{R_X} é o tempo de retenção do analito, $t_{R_{C_n}}$ é o tempo de retenção do hidrocarboneto com *n* carbonos, $t_{R_{C_{n-1}}}$ é o tempo de retenção do hidrocarboneto com “*n-1*” carbonos, C_n é o número de carbonos do hidrocarboneto *n* e C_{n-1} é o número de carbonos do hidrocarboneto “*n-1*”.

4.3. PRODUÇÃO DAS PARTÍCULAS

O fluxograma da produção das partículas pode ser verificado na Figura 17 e em seguida será detalhado o processo.

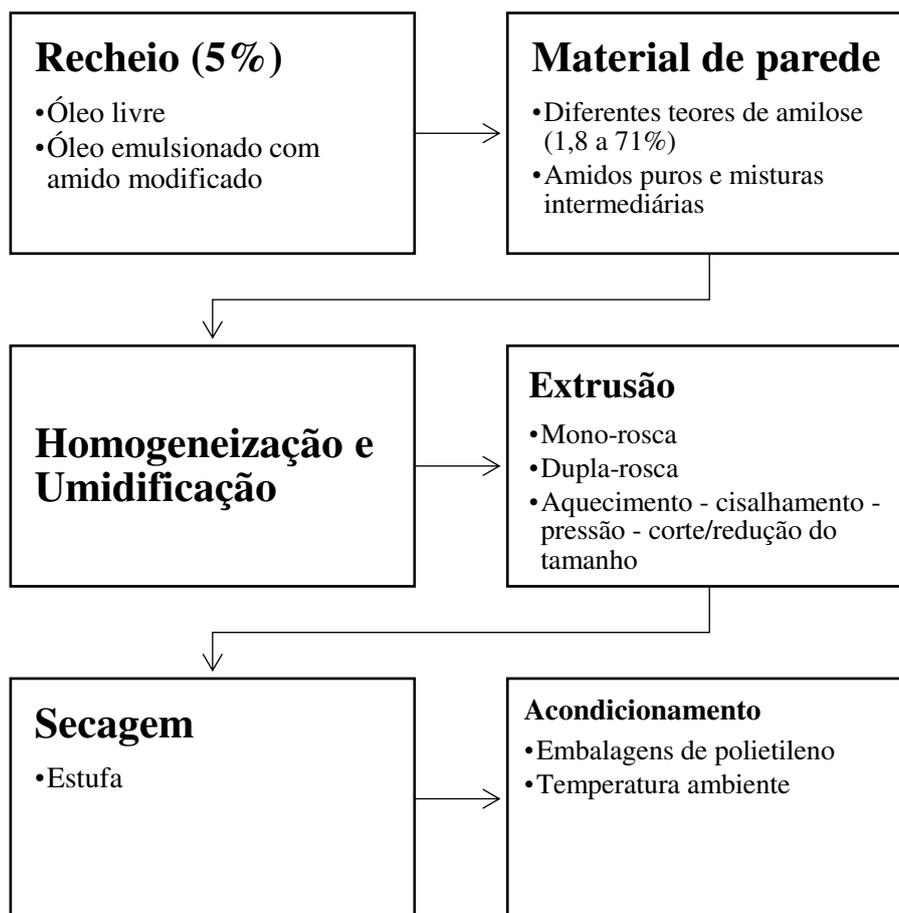


Figura 17: Fluxograma da produção das partículas por extrusão termoplástica

4.3.1. Material de recheio

De acordo com a atividade larvicida, quantidade disponível para atender a demanda mínima operacional do extrusor dupla-rosca (3 kg), custo de obtenção, coeficiente de partição e critério de sustentabilidade, o óleo essencial de tomilho foi escolhido dentre as matérias-primas avaliadas para ser o composto ativo a ser microencapsulado. Maiores detalhes serão discutidos no item 5.1.3. Para tal, duas formas do recheio foram avaliadas: livre (óleo puro) e óleo pré-emulsionado com amido modificado, ambos na proporção de 5% em relação à massa de material de parede (amido) em base seca. Desta forma, o *load* teórico ou carga da partícula foi de 5%. Para determinar a quantidade de óleo para misturar com o amido utilizou-se a Equação 5.

Equação 5: Quantidade de óleo a ser misturado com amido

$$m_o = m_a \cdot (100 - U_f) \cdot C_p$$

Onde m_o é a massa de óleo essencial de tomilho (g), m_a é a massa de amido (g), U_f é o teor de umidade final da mistura (%) e C_p é a carga da partícula (%).

4.3.2. Preparo da emulsão

A emulsão de óleo de tomilho foi preparada da seguinte forma: 12,5% de amido modificado (Capsul) foram homogeneizadas com 62,5% de água sob agitação magnética com aquecimento entre 75 a 80°C durante 2 h (Figura 18A). Após o resfriamento até 25°C, 25% de óleo de tomilho livre foi adicionado ao Capsul. Homogeneizou-se em ultraturrax durante 10 min a 20000 rpm (Figura 18B). Após o preparo da emulsão, para determinar a sua quantidade para ser adicionada à formulação (amido de milho regular) para obter 5% de óleo em relação à massa de amido (*load* teórico), utilizou-se a Equação 6.

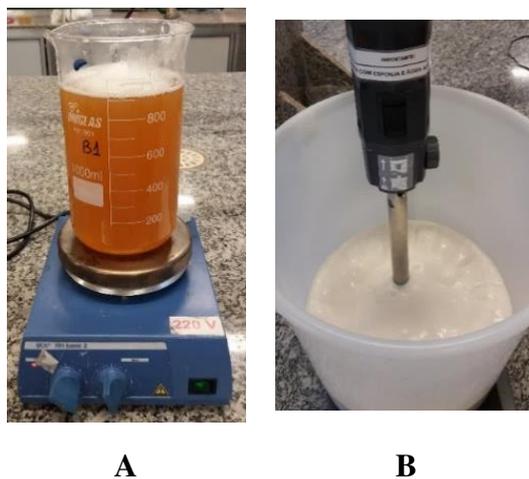


Figura 18: Homogeneização do amido modificado (capsul) em água sob aquecimento (A) e preparo da emulsão do óleo de tomilho com o amido modificado (B).
Fonte: Autoria própria.

cada amido puro na mistura foi utilizada a Tabela 9: Formulações para a produção de partículas por extrusão termoplástica

Tipo de recheio	Teor de amilose (%)	Tipo de amido utilizado e teor (%) na mistura (base úmida)
	1,8	Amisol 4000 puro
Nenhum, Óleo livre e Óleo emulsionado	15	49% Amisol 4000 e 51% Amisol 3408
	28	Amisol 3408 puro
	45	60% Amisol 3408 e 40% Hyllon VII
	71	Hyllon VII puro

Equação 7, com base em balanço de massa.

Tabela 9: Formulações para a produção de partículas por extrusão termoplástica

Tipo de recheio	Teor de amilose (%)	Tipo de amido utilizado e teor (%) na mistura (base úmida)
	1,8	Amisol 4000 puro
Nenhum, Óleo livre e Óleo emulsionado	15	49% Amisol 4000 e 51% Amisol 3408
	28	Amisol 3408 puro
	45	60% Amisol 3408 e 40% Hyllon VII
	71	Hyllon VII puro

Equação 7: Quantidade necessária de cada amido puro para obter teores de amilose intermediários

$$m_{mist} = \frac{m_{A_1}}{\left(1 - \frac{U_{A_1}}{100}\right)} + \frac{m_{A_2}}{\left(1 - \frac{U_{A_2}}{100}\right)}$$

Onde m_{mist} é a massa da mistura de amidos (g), m_{A_1} é a massa de amido puro 1 (g), U_{A_1} é o teor de umidade do amido puro 1 (%), m_{A_2} é a massa de amido puro 2 e U_{A_2} é o teor de umidade do amido puro 2 (%).

É importante ressaltar que a emulsão do óleo de tomilho com amido modificado influenciou o teor de amilose das formulações, uma vez que ele é considerado um amido regular contendo 28% de amilose. Entretanto, o percentual de variação foi mais significativo apenas para o menor de teor de amilose (1,8%) como será explicado a seguir. Aplicando-se a Equação 8 é possível verificar o teor de amilose mais adequado para cada formulação contendo óleo emulsionado.

Equação 8: Verificação do teor de amilose da formulação com óleo emulsionado

$$m_a * \%A_f + m_{am} * \%A_{am} = (m_a + m_{am}) * \%A_{ff}$$

Onde: m_a é a massa de amido (67 g) da formulação para manter a mesma carga da partícula (5% de óleo); $\%A_f$ é o percentual de amilose teórico com base na literatura que esperava-se que a formulação tivesse (1,8 – 71%); m_{am} é a massa de amido modificado (2,5 g) adicionado à emulsão; $\%A_{am}$ é o percentual de amilose do amido modificado (28%); $\%A_{ff}$ é o percentual de amilose da formulação final.

Após calcular o $\%A_{ff}$, obtém-se uma variação do teor de amilose igual a +52,2% para a formulação com 1,8% de amilose; +3,13% para a formulação com 15% de amilose; nenhuma variação para a formulação com 28% de amilose; -1,36% de variação para a formulação com 45% de amilose e -2,18% para a formulação com 71% de amilose. A variação mais expressiva é para a formulação com menor teor de amilose (1,8%). Entretanto, esta diferença não foi considerada na exibição dos resultados (seção 5), mantendo-se o teor de amilose apresentado na Tabela 9, por dois motivos: os teores de amilose utilizados são da literatura e a correção poderia não ser tão expressiva; o intuito era verificar também a influência da emulsificação do óleo na atividade biológica da partícula, mantendo-se o teor de amilose constante.

4.3.4. Condicionamento das formulações

A umidade final das formulações foi corrigida para 28%. A quantidade necessária de água a ser adicionada à formulação foi calculada de acordo com a Equação 9, com base em balanço de massa. A homogeneização foi realizada em batedeira planetária com adição da água gota a gota com uma bureta (Figura 20). As formulações com a umidade uniforme foram peneiradas e armazenadas em embalagens de polietileno sob refrigeração para atingir o equilíbrio hídrico até o momento da extrusão. No mesmo dia da extrusão, o material de recheio foi inserido à formulação e homogeneizado em batedeira até ficar uniforme. A quantidade de água proveniente da emulsão (62,5%) foi considerada para correção da umidade final conforme a Equação 10. A umidade final das amostras foi averiguada em determinador rápido de umidade (*Infrared*) antes do processo de extrusão. Quando necessário, fez-se a correção da umidade das amostras.

Equação 9: Quantidade de água a ser adicionada à formulação

$$m_a = \left(\frac{(100 - U_i)}{(100 - U_f)} - 1 \right) * m_{form}$$

Onde m_a a massa de água a ser adicionada à formulação (g), U_i é o teor de umidade inicial da formulação (%), U_f é o teor de umidade final da formulação (%) e m_{form} é a massa de formulação a ser preparada. Lembrando que a formulação pode ser o amido puro ou a mistura de amidos.

Equação 10: Correção da quantidade de água a ser adicionada às formulações com óleo emulsionado como recheio

$$m_{a_e} = m_a - \frac{m_o}{A_e}$$

Onde: m_{a_e} é a massa de água a ser adicionada à formulação com óleo pré-emulsionado como recheio para padronizar o teor de umidade final (28%), m_a é a massa de água que deveria calculada para ser adicionada à formulação (g), m_e é a massa de emulsão (g) a ser adicionada à formulação e A_e é o percentual de água na emulsão (62,5%).



Figura 20: Homogeneização do amido em batedeira planetária e adição de água com bureta.
Fonte: Autoria própria

4.3.5. Extrusão termoplástica

A produção das partículas por extrusão termoplástica foi realizada no Laboratório de Cereais, Raízes e Tubérculos (Labcer) da FEA/UNICAMP com dois tipos de extrusores, com duas diferenças básicas entre eles: a quantidade de roscas disponíveis (mono-roscas e duplas-roscas) e a presença do dispositivo de corte ao final da extrusão (presente apenas no duplas-roscas), além das distintas condições operacionais de processamento que cada equipamento proporciona. Não há um procedimento padrão para a extrusão, sendo que os parâmetros operacionais são ajustados de acordo com as matérias-primas utilizadas e o tipo de produto que se deseja obter. As condições a seguir descritas foram obtidas com base em testes preliminares em função da complexidade do processo. É importante lembrar que no processo de extrusão do OET foi almejado um processamento que preservasse ao máximo as características do composto ativo volátil, isto é, menor temperatura do processo e menor expansão da formulação.

4.3.5.1. Extrusor mono-roscas

Como testes preliminares, apenas um teor de amilose foi testado no extrusor mono-roscas. As partículas foram produzidas com 100% de Amisol 3408 com 28% de teor de amilose de duas maneiras: com óleo de tomilho livre e sem material de recheio. As formulações foram inseridas em um extrusor mono-roscas com capacidade mínima operacional de 1000 g. As variáveis do processo foram mantidas constantes ao longo do processo. A taxa de compressão foi de 3:1 e a velocidade de rotação foi de 120 rpm, as três zonas de temperatura foram: Zona₁ = 60°C, Zona₂ = 80°C e Zona₃ = 100°C (Figura 6B). Estas temperaturas foram utilizadas com o intuito de evitar a expansão do produto e a volatilização do material de recheio. Na saída, uma matriz circular com uma saída de 3,0 mm foi utilizada. Tiras da amostra (tipo “macarrão”) foram cortadas manualmente com tesoura com aproximadamente 20 cm de comprimento e foram esfriadas até temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram desidratadas em estufa com circulação de ar a 60°C durante 24 h. Após o resfriamento, as partículas foram trituradas em moinho e armazenadas em embalagens de polietileno à temperatura ambiente em local seco.

4.3.5.2. Extrusor dupla-rosca

As partículas foram produzidas com 15 formulações diferentes como mostra a Tabela 9. Foram avaliados 5 tipos de amidos (3 puros e 2 misturas intermediárias), sem adição de material de recheio e dois tipos de material de recheio (óleo de tomilho livre e óleo de tomilho emulsionado). As formulações foram inseridas em um extrusor dupla-rosca co-rotacional com capacidade mínima operacional de 3000 g. As variáveis foram mantidas constantes ao longo do processo.

A vazão de alimentação foi de 3,8 kg h⁻¹, a velocidade de rotação da rosca foi 300 rpm, as quatro zonas de temperatura foram: Zona₁ = 60°C, Zona₂ = 90°C, Zona₃ = 100°C e Zona₄ = 90°C. Estas temperaturas foram utilizadas com o intuito de evitar a expansão do produto e volatilização do material de recheio. Na saída foram utilizadas uma matriz circular com duas saídas de 3 mm e uma faca rotativa com 200 rpm de velocidade de rotação. O diâmetro do canhão era de 30 mm e o comprimento era de 872 mm, resultando em razão comprimento/diâmetro (*L/D*) igual a 29,07. Imediatamente após a extrusão, as amostras foram resfriadas até a temperatura ambiente e desidratadas em estufa com circulação de ar a 80°C durante 12 h. Após o resfriamento até 25°C, as partículas foram armazenadas em embalagens de polietileno e armazenadas à temperatura ambiente em local seco.

4.3.5.2.1. Energia mecânica específica

A energia mecânica específica (*EME*) foi calculada pela Equação 11 de acordo com Oliveira et al. (2017).

Equação 11: Energia mecânica específica

$$EME = \frac{v * P * T}{v_{m\acute{a}x} * Q * 100}$$

Onde: *EME* é a energia mecânica específica (kJ kg⁻¹), *v* é a velocidade de rotação da rosca (rpm), *P* é a potência do motor (kW), *T* é o torque (%), *v_{máx}* é a velocidade de rotação máxima da rosca (rpm) e *Q* é a vazão de alimentação (kg h⁻¹).

4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

4.4.1. Caracterização física e físico-química

4.4.1.1. Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com a Equação 12, após aquecimento de cerca de 5 g de amostra em estufa a 105°C até obter massa constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Equação 12: Teor de umidade contida na amostra

$$U = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} * 100$$

Onde: U é o teor de umidade da partícula (%), m_i é a massa inicial de partículas (g) e m_f é a massa final de partículas após a secagem (g).

4.4.1.2. Distribuição do tamanho e diâmetro médio

O perfil granulométrico das partículas foi determinado em ensaio com agitador de peneiras com uma quantidade mínima de 30 g de amostra durante 15 min em duplicata. Peneiras grossas e finas com diferentes aberturas ABNT foram utilizadas: 1 ¼, ¾, 8, 9, 10 e 16, com as seguintes aberturas: 31,7; 19,0; 4,76; 2,0; 1,7 e 1 mm respectivamente. A massa das frações retidas em cada peneira foi aferida e o diâmetro médio de Sauter foi calculado como mostra a Equação 13 (KUNII; LEVENSPIEL, 1991). O diâmetro médio foi expresso pela média \pm desvio padrão em cm. Curvas de perfil granulométrico foram construídas (percentual de retenção de amostra *versus* diâmetro médio entre as peneiras).

Equação 13: Diâmetro médio das partículas

$$\bar{D}_p = \frac{1}{\sum_i^n \frac{x_n}{\bar{a}_n}}$$

Onde x_n é a fração mássica retida na peneira (g retida/g total) retida na peneira n e \bar{a}_n é a média entre a abertura de duas peneiras (mm).

4.4.1.3. Menor dimensão da partícula

A menor dimensão da partícula (largura) foi medida com paquímetro. O resultado foi expresso como média \pm desvio padrão de 20 réplicas. Os resultados foram utilizados na modelagem matemática (item 4.4.1.15).

4.4.1.4. Análise de cor das partículas

A cor das partículas foi avaliada em triplicata utilizando-se o colorímetro. Cerca de 10 g de amostra foram dispostas em placa de petri, inserindo fundo branco ao fundo das placas. Os resultados foram expressos em valores de L (luminosidade), a e b , onde os valores de L variaram do preto (0) ao branco (100), os valores de a variaram do verde (-60) ao vermelho (+60) e os valores de b variaram do azul (-60) ao amarelo (+60).

4.4.1.5. Densidade aparente das partículas

A densidade aparente foi calculada através do método do deslocamento da massa de partículas (CARVALHO et al., 2010). Foi colocado 1 g de partículas em uma proveta de 25 mL contendo 7 mL de óleo vegetal em triplicata. O volume deslocado de óleo após a adição das partículas representa o volume ocupado por elas e foi usado para determinar a densidade aparente das partículas de acordo com a Equação 14. O resultado foi expresso como média \pm desvio padrão. O procedimento experimental foi realizado de maneira mais breve possível para evitar possível absorção do óleo pelas partículas.

Equação 14: Densidade aparente das partículas

$$\rho = \frac{m_p}{v_o}$$

Onde ρ (g mL^{-1}) é a densidade aparente das partículas, m_p é a massa de partículas e v_o é o volume de óleo deslocado (mL).

4.4.1.6. Índice de expansão radial das partículas

O índice de expansão (IE) das partículas foi calculado a partir da relação entre o diâmetro médio da formulação não cortada na saída do extrusor (“tira de espaguete”) obtida por paquímetro e o diâmetro da matriz do extrusor (3 mm – item 4.3.5.2) como indica a Equação 15 obtida conforme Mikalowski et al. (MIKALOUSKI et al., 2014). O resultado foi expresso como média \pm desvio padrão de 10 réplicas.

Equação 15: Índice de expansão

$$IE = \frac{D_{tira}}{D_{matriz}}$$

Onde: IE é o índice de expansão (adimensional), D_{tira} é diâmetro da amostra retirada do extrusor sem o corte final (mm) e D_{matriz} é o diâmetro da matriz do extrusor para saída da massa da formulação (mm).

4.4.1.7. Sedimentação das partículas

A sedimentação das partículas foi executada conforme metodologia para determinação do tempo de flutuação em água (SOARES-JÚNIOR; CALIARI; CHANG, 2004). A massa de dez partículas de cada amostra foi aferida. Em seguida, o conjunto foi imerso a partir da mesma altura em uma proveta de 500 mL contendo água destilada. O tempo para a última partícula atingir o fundo da proveta foi cronometrado. Sabendo a altura da proveta (29 cm), a velocidade de sedimentação foi calculada de acordo com a Equação 16. O volume médio das partículas desidratadas foi calculado a partir da Equação 17, considerando o processo de sedimentação rápido e que as partículas não absorvem umidade e lixiviam neste pequeno intervalo. O resultado foi expresso como média \pm desvio padrão de 3 réplicas.

Equação 16: Velocidade de sedimentação das partículas

$$v = \frac{H}{t}$$

Onde v é a velocidade de sedimentação das partículas (cm s^{-1}), H é a altura da queda (cm) e t é o tempo de sedimentação (s).

Equação 17: Volume médio das partículas

$$V_p = \frac{m_{\text{conjunto}}}{\rho_p}$$

Onde V_p é o volume das partículas (cm^3), m_{conjunto} é massa do conjunto formado por 10 unidades de partículas, ρ_p é a densidade aparente das partículas determinada experimentalmente (Equação 14).

4.4.1.8. Difração de raios-X

A análise da estrutura cristalina foi realizada em amostras selecionadas obtidas em extrusor dupla-rosca: partículas com 28% de amilose com diferentes recheios (sem recheio, óleo livre e óleo emulsionado) e dos materiais de constituição (amido de milho e amido modificado); partículas sem recheio com diferentes teores de amilose (28, 45 e 71%). As partículas foram trituradas manualmente em almofariz antes da análise. Foi utilizado um difratômetro de raios-X (DRX) do LRAC/FEQ/UNICAMP. A faixa de varredura foi de 5 – 40° (2θ) com passo de 1 ° min^{-1} .

4.4.1.9. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Para verificar a composição química quantitativa das partículas e detectar possíveis diferenças entre os grupos químicos presentes, as amostras selecionadas foram analisadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR): partículas com 28% de amilose com diferentes recheios (sem recheio, óleo livre e óleo emulsionado) e dos materiais

de constituição (óleo de tomilho, amido de milho e capsul). As partículas foram maceradas manualmente em almofariz antes da análise. Os espectros foram registrados utilizando um espectrofotômetro FTIR do Laboratório de Apoio Central (LAC) da FEA/UNICAMP. As amostras foram preparadas usando o método de pastilhas de brometo de potássio (KBr). Os espectros foram obtidos em modo de transmissão a 25°C. O intervalo de número de ondas foi de 4000 a 400 cm⁻¹, a resolução foi de 4 cm⁻¹, com 10 leituras por amostra.

4.4.1.10. Inchamento e lixiviação

Cerca de 1 g de partícula foi inserida em 10 mL de água destilada (pH neutro) em triplicata a 25°C, em modo estático durante 4 dias. Em intervalos de tempo regulares, as partículas foram separadas por filtração com peneira simples com abertura de aproximadamente de 1 mm. A massa das partículas foi aferida após secar o excesso de água com papel toalha no fundo da peneira para verificação da absorção de água conforme a Equação 18 (BADAWY et al., 2015). A fração líquida foi desidratada em estufa a 105°C por pelo menos 5 h para verificar o teor de sólidos lixiviados das partículas para a água. Esta condição de secagem foi suficiente para completa desidratação. O teor de lixiviação foi calculado pela Equação 19. Curvas de inchamento *versus* tempo e de perda de sólidos *versus* tempo foram construídas para cada amostra. Fotografias foram tiradas das partículas ao longo do tempo para observação da aparência do inchamento das partículas.

Equação 18: Inchamento das partículas imersas em água

$$I = \frac{m_f - m_i}{m_i} * 100$$

Onde: *I* é o inchamento ou grau de hidratação das partículas (%), *m_f* é a massa final do conjunto de partículas após a absorção de umidade e filtração do sistema (g), *m_i* é a massa inicial do conjunto de partículas secas (g).

Equação 19: Lixiviação das partículas imersas em água

$$L = \frac{m_s}{m_i} * 100$$

Onde: L é a lixiviação ou perda de sólidos (%), m_s é a massa de sólidos dissolvidos na água após desidratação (g) e m_i é a massa inicial do conjunto de partículas secas (g).

4.4.1.11. Microscopia eletrônica de varredura

A análise da superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em amostras selecionadas: partículas com 28% de amilose com diferentes recheios (sem recheio, óleo livre e óleo emulsionado) e com óleo de tomilho livre com diferentes teores de amilose (1,8, 28 e 71%). As partículas foram fixadas em tiras de alumínio com fita dupla face, foram revestidas com uma camada fina de ouro (200 Å) usando um pulverizador catódico e colocadas em um evaporador a vácuo. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da UNICAMP com potencial de aceleração de 10 kV com aumento de 1500 vezes.

4.4.1.12. Eficiência de encapsulação

A quantificação da liberação de CFT de sistemas particulados é comum e já foi aplicada em pesquisas anteriores (SHARMA et al., 2017; TALÓN et al., 2017; TRIFKOVIĆ et al., 2015). A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada indiretamente pelo método de Folin-Ciocalteu para quantificar o teor de CFT. De acordo com testes preliminares, a melhor forma de quantificar todo óleo que a partícula é capaz de liberar foi inserindo-a em água (pH neutro) e renovando o solvente periodicamente até obter exaustão completa da amostra. Desta forma, 1 g de partícula foi inserido em 10 mL de água destilada em recipiente com tampa em agitador magnético sem aquecimento para evitar volatilização e degradação do óleo. A cada 1 h, a parte sólida foi separada da fase líquida e novos 10 mL de água foram adicionados. A duração da análise foi de 13 a 15 h, dependendo da amostra. O momento final da análise foi de acordo com a absorbância da amostra chegou ao limite de detecção da curva do padrão ácido gálico (item 4.2.2.2.1). O procedimento foi realizado em duplicata. As amostras foram analisadas no mesmo dia ou foram refrigeradas e analisadas após 10 h no máximo. Dos 10 mL de solução retirados, apenas 100 µL foram analisados conforme o item 4.2.2.2.3 para determinar o teor de CFT (mg EAG/g partícula). Para as partículas produzidas com o amido com 1,8% de amilose, ocorreu

grande perda de sólidos como será verificado no item 5.3.1.9 e para não quantificar erroneamente, um branco com a amostra diluída em água foi descontado do valor da absorbância. Os amidos de milho puros também foram analisados quanto ao teor de CFT conforme o item 4.2.2.2 e não foram detectados CFT.

Uma curva de CFT *versus* tempo foi construída para as partículas em função da renovação de solvente. A quantidade total de CFT foi obtida pelo somatório do teor de CFT obtido de hora em hora conforme a Equação 20. De acordo com o resultado do teor de CFT do óleo de tomilho livre (item 5.1.2) foi possível calcular a quantidade de óleo contida na partícula conforme a Equação 21. A *EE* foi calculada de acordo com a Equação 22 lembrando que a carga da partícula foi de 5% (*load* teórico) conforme o item 4.3.1. O resultado foi expresso, pela média \pm desvio-padrão.

Equação 20: Teor de compostos fenólicos totais

$$CFT_p = \sum_{i=1}^{15} CFT_i$$

Onde: CFT_p é o teor total de compostos fenólicos totais contidos na partícula (mg EAG/g partícula), i é o número de repetições (de 1 a 15) e CFT_i é o teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/g partícula) determinado na repetição i .

Equação 21: Quantidade máxima de óleo da partícula

$$O_p = \frac{CFT_p}{CFT_{OET}}$$

Onde: O_p é a quantidade máxima de óleo contida na partícula ou *load* verdadeiro (g óleo/g partícula), CFT_p é o teor total de compostos fenólicos da partícula (mg EAG/g partícula) determinado pela Equação 20, CFT_{OET} é o teor de compostos fenólicos totais do óleo essencial de tomilho não encapsulado (mg EAG/g óleo).

Equação 22: Eficiência de encapsulação das partículas

$$EE = \frac{O_p}{C_p} \cdot 100$$

Onde: EE é a eficiência de microencapsulação da partícula (%), O_p é a quantidade máxima de óleo contida na partícula ou *load* verdadeiro (g óleo/g partícula) determinado pela Equação 21 e C_p é a carga da partícula ou *load* teórico (%).

4.4.1.13. Liberação de óleo

Sabendo a quantidade real de óleo contida na partícula a partir da EE (item 4.4.1.12), foi possível quantificar a quantidade de óleo liberada gradualmente ao longo do tempo pelo método de Folin-Ciocalteu. Desta forma, 1 g de partícula foi imersa em 10 mL de água destilada (pH neutro) em repouso à temperatura ambiente em frasco com tampa. Essas condições foram seguidas pensando-se em reproduzir o ambiente mais propício possível para o desenvolvimento das larvas, apesar dos recipientes contendo as larvas não serem tampados na maioria dos casos (por isso que a fêmea deposita seus ovos). Em determinados intervalos de tempo, foi realizada uma agitação leve e uma alíquota de 1 mL de solução foi retirada e 1 mL de água foi repostada para manter o volume constante. Deste 1 mL, apenas 100 μ L foram analisados conforme o item 4.2.2.2.3 para determinar o teor de CFT (mg EAG/g partícula). Para as partículas produzidas com o amido com 1,8% de amilose, ocorreu grande perda de sólidos como será verificado no item 5.3.1.9 e para não quantificar erroneamente, um branco com a amostra diluída em água foi descontado do valor da absorbância. O procedimento foi realizado em duplicata. O experimento foi realizado durante 4 dias conforme a duração das cinéticas de inchamento e de lixiviação (item 4.4.1.10). Foi realizado o cálculo da quantidade de óleo liberado no intervalo de tempo em relação à quantidade de óleo máxima contida na partícula como indica a Equação 23. Uma curva de liberação de óleo *versus* tempo foi construída.

Equação 23: Quantificação do óleo liberado

$$O_{lib_t} = \frac{O_{p_t}}{O_p} * 100$$

Onde: O_{lib_t} é a quantidade de óleo liberado da partícula no tempo t (%), O_{p_t} é a quantidade de óleo liberada da partícula no tempo t () e O_p é a quantidade máxima de óleo contida na partícula ou *load* verdadeiro (g óleo/g partícula) determinado pela Equação 21.

4.4.1.14. Correlação entre inchamento, lixiviação e liberação

Foi verificada a correlação de Pearson entre as variáveis inchamento e liberação de óleo e entre lixiviação e liberação de óleo para as partículas. Curvas foram construídas e o valor do coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis foi determinado com o software *Excel for Windows* para cada amostra.

4.4.1.15. Modelagem matemática

Foram aplicados três modelos matemáticos às cinéticas de liberação de óleo: Equação de Korsmeyer-Peppas (modelo Exponencial – Equação 24), Equação de Weibull (Equação 25) e o modelo difusional (Equação 26), com a utilização do software *Excel for Windows*. Os parâmetros destes modelos foram discutidos previamente na Tabela 8. Para os modelos exponencial e de Weibull foi utilizada a ferramenta *Solver* do *Excel* para determinar as constantes referentes aos modelos. Para o modelo difusional foi determinado o coeficiente de difusão (Equação 27). O termo θ da equação para cálculo da difusividade foi obtido a partir da plotagem do gráfico $\frac{M_t}{M_\infty}$ experimental *versus* a raiz do tempo. Foi obtida a equação da reta apenas para a parte linear do gráfico e o coeficiente angular correspondia ao termo θ . O raio utilizado na modelagem foi a metade da menor dimensão das partículas (Tabela 14). Para todos os modelos foi determinada a soma dos quadrados dos resíduos (SSR) e a correlação (R^2) entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo. O modelo de Weibull também foi aplicado na modelagem das cinéticas de inchamento e lixiviação das partículas.

Equação 24: Modelo Exponencial (Korsmeyer-Peppas)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n$$

Equação 25: Modelo de Weibull

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-(k \cdot t)^n)$$

Equação 26: Modelo Difusional

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \left(\frac{36Dt}{\pi r^2}\right)^{\frac{1}{2}} - \left(\frac{3Dt}{r^2}\right) \text{ para } 0 \leq \frac{M_t}{M_\infty} \leq 0,7$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6e^{-\frac{\pi^2 Dt}{r^2}}}{\pi^2} \text{ para } 0,7 \leq \frac{M_t}{M_\infty} \leq 1$$

Equação 27: Coeficiente de difusão

$$D_{AB} = \left(\frac{r\theta}{6}\right)^2 \pi$$

Onde M_t é a quantidade de ativo liberado no tempo t , M_∞ é a quantidade total de ativo liberada no equilíbrio (t_∞), k é a constante cinética que incorpora características estruturais e geométricas das partículas, n está relacionado à velocidade de liberação e descreve a progressão exponencial da curva, r é o raio da partícula, D e D_{AB} são a constante de difusividade do ativo no meio de liberação e θ é o coeficiente angular da parte linear do gráfico $\frac{M_t}{M_\infty}$ experimental versus $\sqrt[2]{t}$.

4.4.2. Caracterização biológica

4.4.2.1. Atividade contra larvas em estágio tardio (L3)

Cerca de 500 mg de partículas contendo óleo de tomilho (livre e emulsionado) foram avaliadas contra 25 larvas da linhagem Rockfeller no estágio L3 em 100 mL de água em quadruplicata conforme o item 4.2.2.1.3. O controle negativo foi apenas água. A mortalidade foi avaliada após 24 h e 48 h de contato entre partículas e larvas (Figura 21) a aproximadamente

25°C e com fotoperíodo de 12 h/12 h e foi calculada de acordo com a Equação 2. Após 24 h, as larvas mortas foram contadas e retiradas para que não servissem de alimentos para as larvas vivas. O resultado foi expresso como média \pm desvio-padrão de 3 bioensaios realizados em dias diferentes.

Este teste foi crucial para seleção da melhor formulação produzida para dar continuidade com os demais testes biológicos. Desta forma, como será apresentado no item 5.3.2.1, a formulação com óleo de tomilho livre e com 15% de amilose foi considerada a melhor, pois conseguiu eliminar 100% das larvas, evitando a possível sobrevivência de larvas resistentes quando o sistema particulado fosse aplicado no meio ambiente em geral. Para a melhor formulação foi calculada a concentração letal da partícula de acordo com a Equação 28, desenvolvida especificamente para este trabalho.

Equação 28: Concentração letal da partícula

$$CL_p = \frac{m_p}{v_a} * C_p * EE * L_o$$

Onde: CL_p é a concentração letal em $\mu\text{g mL}^{-1}$, m_p é a massa de partícula utilizada no teste (500 mg), v_a é o volume de água utilizado no teste (100 mL), C_p é a carga inicial da partícula – *load* teórico (5%), EE é a eficiência de encapsulação (Tabela 16) – *load* real e L_o é o percentual de óleo essencial de tomilho liberado em 48 h (Figura 42A).

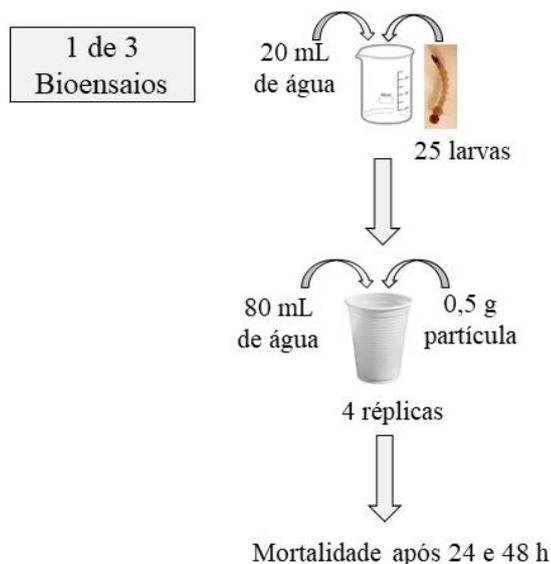


Figura 21: Esquema do ensaio para avaliar a atividade larvicida das partículas.
Fonte: Autoria própria

4.4.2.2. Atividade contra larvas recém-eclodidas (L1)

Essa análise não é comum, pois WHO (2005) recomenda a análise com larvas em terceiro estágio. No entanto, o objetivo foi simular uma situação cotidiana, quando a fêmea de *Ae. aegypti* põe ovos em um recipiente seco e quando a água entra em contato, as larvas eclodem. As partículas poderiam evitar a eclosão dos ovos, revelando uma atividade "ovicida". Neste sentido, ovos recentes (do mesmo mês do ensaio) foram contados individualmente com auxílio de um microscópio estereoscópio. Papel celulose contendo 100 ovos de *Ae. aegypti* da linhagem Rockfeller foi imerso em 100 mL de água destilada em recipiente descartável (15 cm x 9 cm x 4 cm) em triplicata como pode ser visualizado na Figura 22. Os ovos foram expostos a 500 mg das partículas selecionadas de acordo com o teste realizado com as larvas (item 4.4.2.1). Ração para peixe foi fornecida na mesma quantidade (cerca de 5 grãos) para todos os tratamentos com o intuito de evitar mortalidade por fome. O controle continha apenas água e ração. A taxa de eclosão dos ovos foi avaliada após 48 h de incubação a aproximadamente 25°C e calculada de acordo com a Equação 29. A mortalidade das larvas foi calculada de acordo com a Equação 30. O resultado foi expresso pela média \pm desvio-padrão de três bioensaios realizados em dias diferentes.

Equação 29: Eclosão dos ovos

$$E_o = \frac{L_{vivas} + L_{mortas}}{O_i} * 100$$

Onde: E_o é a eclosão dos ovos (%), L_{vivas} é a quantidade de larvas L1 vivas ou sobreviventes (em unidades), L_{mortas} é a quantidade de larvas L1 mortas (unidades) e O_i é a quantidade de ovos inicial (unidades).

Equação 30: Mortalidade das larvas recém-eclodidas (L1)

$$M = \frac{L_{mortas}}{O_i} * 100$$

Onde: M é a mortalidade de larvas L1 (%), L_{mortas} é a quantidade de larvas L1 mortas (unidades) e O_i é a quantidade de ovos inicial (unidades).



Figura 22: Esquema do ensaio da atividade contra larvas recém-eclodidas.

Fonte: Autoria própria

4.4.2.3. Atividade contra larvas de população resistente à inseticida

Ovos de mosquitos adultos comumente encontrados em áreas urbanas foram coletados na cidade de Laranjeiras (Sergipe, Brasil) no primeiro semestre de 2017. Para esta região, alguns estudos verificaram a resistência da população como resistente ao temefós (BRAGA et al., 2004; LA CORTE et al., 2018). Os ovos foram coletados em armadilhas do tipo *ovitrap* e foram transferidos para o LEPAT/UFS. Após a geração parental completar um ciclo biológico nas gaiolas, as larvas L3 da geração F1 foram utilizados no teste conforme o item 4.2.2.1.1. A eficiência das partículas contra larvas da população resistente foi avaliada conforme o item 4.4.2.1. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos realizados em dias diferentes.

4.4.2.4. Efeito residual

O efeito residual está relacionado com a capacidade de manter a mortalidade das larvas durante um determinado período. Os experimentos foram realizados em quadruplicata com 25 larvas de *Ae. aegypti* da linhagem ROCK no terceiro estágio (L3), totalizando 100 larvas por tratamento. Todas as larvas, vivas ou mortas, foram contadas e descartadas após 24 horas de exposição. Novas larvas vivas foram inseridas a cada 48 h nas primeiras semanas e a cada 72 h até o final do experimento (30 dias). O processo foi repetido até que não houvesse mais morte. Nenhum alimento foi fornecido durante o experimento.

Os testes foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito da microencapsulação e comparar os diferentes volumes de solvente que podem ser aplicados à partícula: menos ou mais água em caso de evaporação ou adição natural (quando chove e a água se acumula no recipiente) ou intencional (quando a água é adicionada ao vaso de planta). As concentrações foram de acordo com os resultados das concentrações letais (CL_{99}) do óleo de tomilho não encapsulado (item 5.1.1) e das partículas (item 5.3.2.1).

Os seis tratamentos foram:

1) Óleo essencial de tomilho (OET) não encapsulado a $94 \mu\text{g mL}^{-1}$ mantendo o volume do sistema constante: pesou-se 1 g de OET em 10 mL de solução aquosa de Tween-20 a 10% v/v (solução-estoque a 100 mg mL^{-1}). Diluiu-se $470 \mu\text{L}$ da solução-estoque em $4530 \mu\text{L}$ de água.

Pipetou-se 1 mL dessa concentração de uso ($9,4 \text{ mg mL}^{-1}$) e colocou-se em copo descartável com 99 mL de água e 25 larvas, para originar concentração final de $94 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. O procedimento foi repetido quatro vezes (4 copos com 100 larvas no total). O volume de 100 mL foi mantido constante ao longo do experimento (30 dias), tendo sido adicionada água quando necessário.

2) Partículas a uma concentração de OET de $94 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ mantendo o volume do sistema constante: 1523 mg de partículas em 100 mL de água.

3) Partículas mantendo o volume do sistema constante a uma concentração de OET de $31 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$: 500 mg de partículas em 100 mL de água.

4) Partículas a uma concentração de OET de $31 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ com adição de 10 mL de água ao sistema: 500 mg de partículas em 100 mL de água, adicionando 10 mL de água (o copo descartável tinha maior capacidade volumétrica).

5) Partículas a uma concentração de $31 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ com remoção de 10 mL de água do sistema: 1500 mg de partículas em 300 mL de água, removendo 10 mL de água (manter a concentração desejada, mas evitar morte das larvas por pequeno volume de água).

6) Controle apenas com água mantendo o volume do sistema constante: 25 larvas e 100 mL de água.

A modificação volumétrica dos tratamentos 4 e 5 ocorreu no mesmo período de adição de novas larvas como descrito inicialmente.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados de caracterização das partículas foi realizada no *software Statistic for Windows 7.0* a partir da análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey ao nível de 95% de confiança.

Para calcular as concentrações letais dos compostos ativos em sua forma livre (item 4.2.2.1.3) foi utilizada a análise estatística Probit a partir do *software Minitab 14* com 95% de confiança.

4.6. RESUMO DOS EXPERIMENTOS

Na Figura 23 é possível visualizar um resumo da sequência de tomada de decisões para realização dos experimentos.

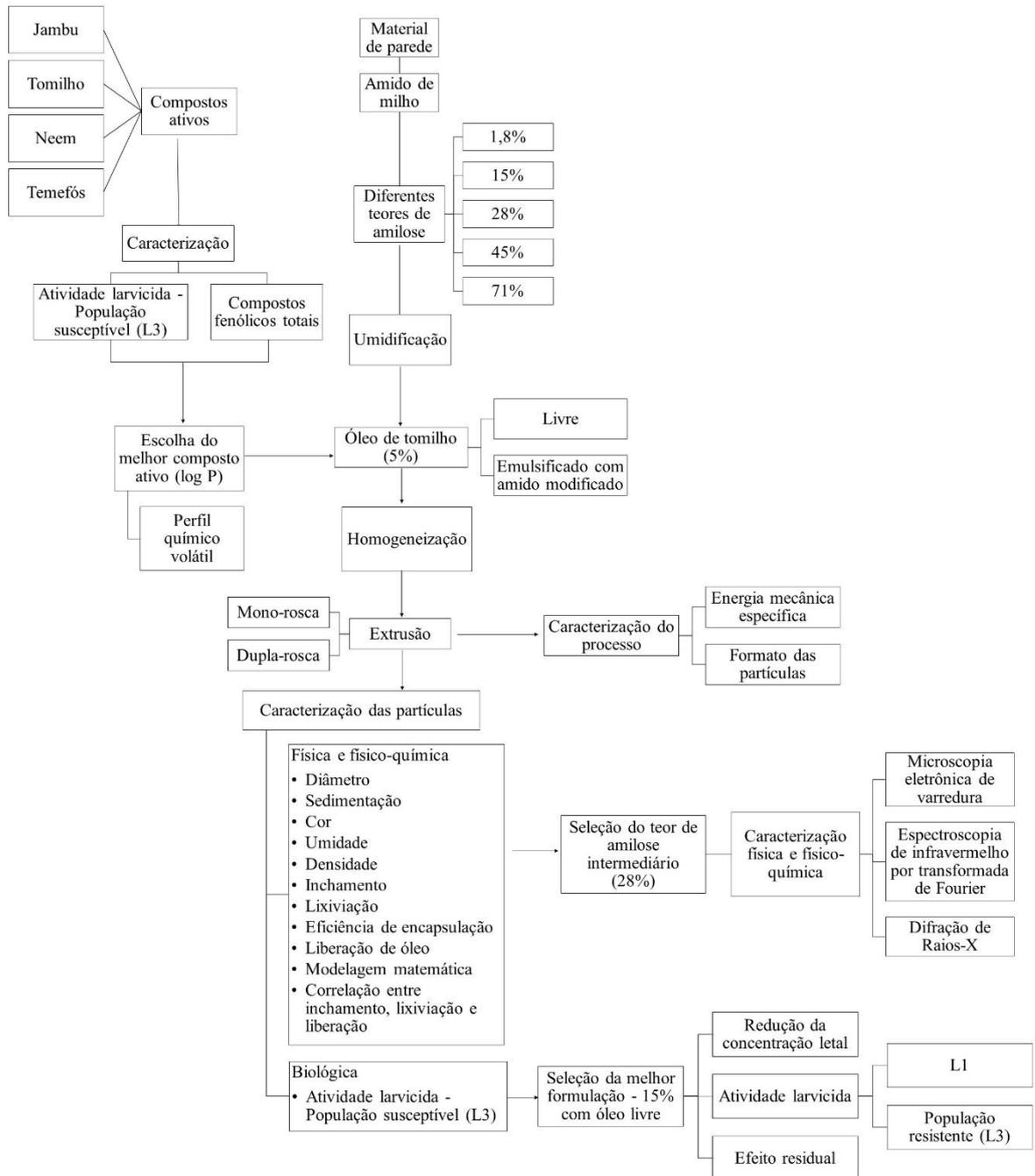


Figura 23: Fluxograma geral da condução da parte experimental

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS ATIVOS

5.1.1. Atividade larvicida

Na Tabela 10 é possível verificar os resultados das concentrações letais dos compostos naturais e sintético avaliados em sua forma não encapsulada contra as larvas de *Ae. aegypti*. A concentração letal em $\mu\text{g mL}^{-1}$ para matar 50, 90 e 99% da população (CL_{50} , CL_{90} , CL_{99} respectivamente) do extrato de jambu e do óleo de tomilho podem ser consideradas adequadas por se tratarem de compostos naturais brutos, ou seja, sem a necessidade de isolar os compostos ativos para obter eficiência larvicida. Dados para outros óleos/extratos podem ser conferidos na Tabela 3.

Dentre os compostos naturais avaliados (Tabela 10), o óleo de tomilho se destacou por apresentar CL_{50} aproximadamente 50% menor do que o extrato de jambu. Por ser um óleo comercial, a disponibilidade e o custo do óleo de tomilho também favoreceram para que ele fosse escolhido como o melhor composto ativo para a produção das partículas.

Estudos anteriores descrevem uma faixa ampla de concentração letal para o tomilho, variando em função da parte da planta analisada, método de extração e espécie de mosquito estudada, mas o resultado obtido (Tabela 10) está de acordo com a literatura. O óleo de tomilho obtido por hidrodestilação apresentou CL_{50} em 24 h de contato igual a $45,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ (RÍOS; STASHENKO; DUQUE, 2017), $25,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LÓPEZ et al., 2015) e $17,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MASSEBO et al., 2009) contra larvas de *Ae. aegypti* e $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra larvas de *Oc. caspius* (KNIO et al., 2008). O óleo da biomassa de tomilho obtido por hidrodestilação apresentou $352,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra larvas de *An. labranchiae* (EL-AKHAL et al., 2016).

Tabela 10: Concentrações letais contra larvas L3 do mosquito *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller dos compostos ativos

Amostra	Concentração letal ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a			χ^2 (gl) ^b	Valor-p
	CL ₅₀	CL ₉₀	CL ₉₉		
Óleo de tomilho	43,43 (42,49 – 44,38)	66,40 (64,05 – 69,17)	93,88 (88,64 – 100,28)	17,52 (5)	0,004
Extrato de jambu	94,97 (91,92 – 98,42)	175,03 (162,76 – 190,80)	288 (257,48 – 329,65)	15,99 (5)	0,007
Temefós	0,0034 (0,0033 – 0,0035)	0,0068 (0,0065 – 0,0072)	0,0121 (0,0112 – 0,0132)	42,19 (7)	< 0,0001
Óleo de neem comercial I	> 500	-	-	-	-
Óleo de neem comercial II	> 500	-	-	-	-
Extrato alcoólico de neem III	> 8000	-	-	-	-

^a Concentrações letais para eliminar 50, 90 e 99% da população de larvas (n = 100) e os respectivos intervalos de confiança ao nível de 95 % de significância

^b Qui-quadrado e graus de liberdade ao nível de 95% de significância

Para o extrato de jambu foi verificado durante os experimentos que não havia reprodutibilidade entre os bioensaios realizados em dias diferentes e por isso o intervalo de confiança foi grande para a CL_{99} (Tabela 10). Isto pode ter ocorrido devido a baixa solubilidade do espilantol em água. Resultados de pesquisas anteriores também apresentam uma faixa ampla de atividade larvicida para o jambu e os resultados apresentados na Tabela 10 estão de acordo com a literatura. O extrato das flores de jambu obtido pela partição com solventes de diferentes polaridades resultou em CL_{50} igual a $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SARAF; DIXIT, 2002), enquanto que o extrato das folhas obtido por Soxhlet com etanol apresentou CL_{50} igual a $252,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SIMAS et al., 2013), ambos contra larvas de *Ae. aegypti*. Não foi encontrado estudo sobre a avaliação da atividade larvicida do espilantol puro. Entretanto a eficiência larvicida do extrato de jambu foi inferior ao comparar com o óleo de tomilho.

Pesquisas sugerem o neem como bom larvicida com CL_{50} inferior a $190 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ALOUANI; REHIMI; SOLTANI, 2009; CHANDRAMOHAN et al., 2016b; DUA et al., 2009; MACIEL et al., 2010; PANT et al., 2012; VATANDOOST; VAZIRI, 2004), contudo a maior parte destas pesquisas foram realizadas com amostras oriundas da Índia e concentradas em azadiractina. As condições de clima, plantio, solo, época de colheita, polaridade do solvente, método e parte da planta utilizada para a obtenção do extrato/óleo podem interferir na quantidade inicial de azadiractina na amostra e na sua estabilidade ao longo do tempo (FORIM et al., 2010). Além disso, é difícil manter a composição do óleo/extrato igual em todos os lotes, o que pode acabar interferindo na atividade biológico. Inicialmente, dois óleos de neem comerciais foram testados e nenhuma morte larval foi observada, provavelmente devido à baixa qualidade dos produtos e/ou a degradação dos metabólitos ao longo do tempo devido a reações em presença de umidade, oxigênio e luz. Em seguida, um extrato alcoólico de neem foi obtido, mas o resultado continuou sendo negativo: nenhuma morte larval. Este resultado pode ter sido contribuído devido à degradação dos metabólitos do neem pelo indesejado aumento da temperatura durante o processo de obtenção do extrato. De acordo com os resultados presume-se que a CL_{99} das três amostras de neem sejam maiores que as faixas de concentrações avaliadas (Tabela 10). Pereira et al. (2009b) fizeram um extrato alcoólico das folhas de neem de origem brasileira e os testes biológicos apontaram que o extrato não matou instantaneamente as larvas, mas impediu o seu desenvolvimento. Schmutterer (1990) afirma que o neem apresenta efeitos na alimentação e crescimento de mosquitos, mas altas concentrações são necessárias para obter alta mortalidade. Ressalta-se que como o foco principal é encapsular um ativo que promova a

morte das larvas de modo mais rápido e em menor concentração possível, o tomilho mais uma vez se destacou entre os compostos naturais testados.

O valor da CL_{50} do temefós (Tabela 10) também está de acordo com a literatura, visto que em estudo realizado com larvas de *Ae. aegypti* da linhagem ROCK também foi de $0,0035 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ARAÚJO et al., 2016) e $0,030 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SANTOS et al., 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza determinar as concentrações letais com concentrações que proporcionem entre 10 e 95% de mortalidade das larvas e com o mínimo de 4 concentrações (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Para o presente trabalho isto foi seguido como é ilustrado na Figura 24, na qual é possível verificar o aumento da mortalidade com o aumento da concentração dos compostos livres analisados.

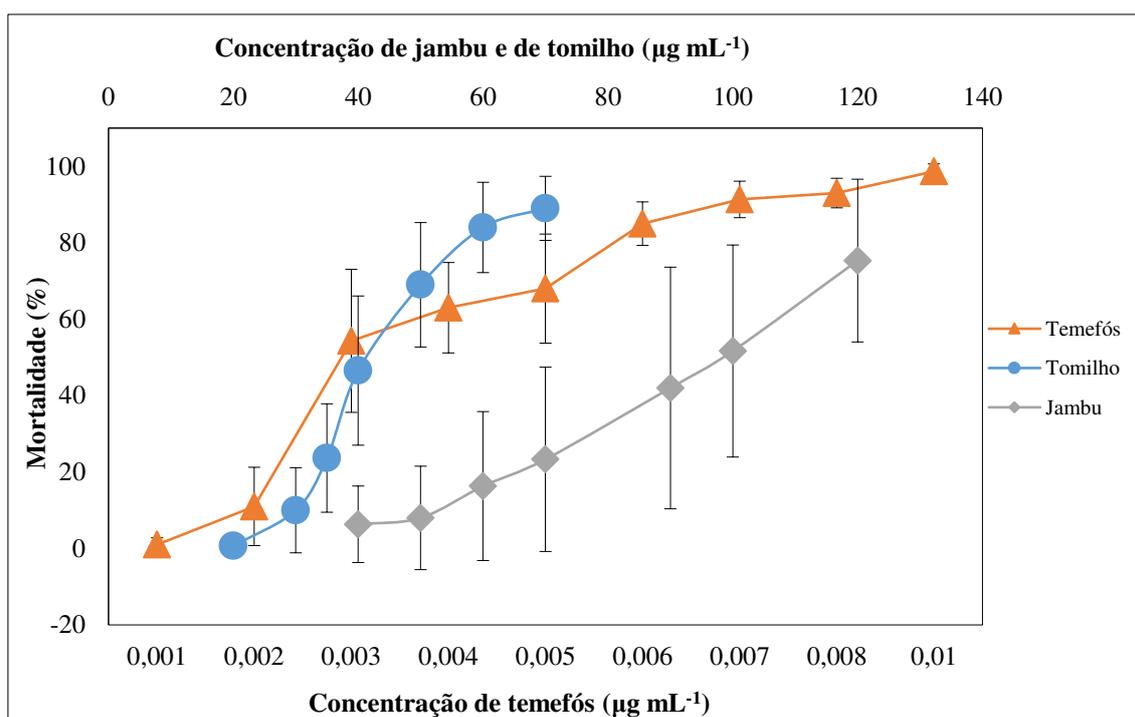


Figura 24: Curva de mortalidade das larvas L3 de *Aedes aegypti* linhagem Rockfeller submetidas a compostos livres de origem natural e sintética

A grande diferença entre os intervalos de confiança das concentrações letais apresentadas na Tabela 10 do extrato de jambu e do óleo de tomilho pode ser correlacionada com a Figura 24. Para o extrato de jambu uma maior faixa de concentração foi necessária para atingir a mortalidade máxima, a qual foi de apenas 75%. A análise Probit superestimou pelo cálculo de probabilidade e resultou em CL_{99} bem maior para o extrato de jambu ao comparar com o óleo

de tomilho (Tabela 10). Isto poderia ter sido evitado se a reprodutibilidade dos ensaios tivesse sido melhor e o intervalo de confiança não tivesse sido tão grande.

5.1.2. Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos são estruturas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que lhes confere o poder antioxidante. Quando presentes em vegetais, eles podem estar em formas livres ou complexadas com açúcares ou proteínas. Dentre eles, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os antioxidantes fenólicos mais comuns de fonte natural (ANGELO; JORGE, 2007). Para permitir a quantificação dos compostos fenólicos totais (CFT), foi necessário determinar a curva do padrão ácido gálico, tendo sido: $Absorbância = 0,0014 * Concentração + 0,0016$, $R^2 = 0,9998$, onde a concentração variou de 500 a 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as absorbâncias entre 0,68 e 0,03. Na Tabela 11 é possível verificar o teor de compostos fenólicos totais (CFT) de cada composto ativo de origem natural avaliado.

Tabela 11: Compostos fenólicos totais dos compostos ativos

Amostra	CFT (mg EAG/g)
Óleo de tomilho	342,7 ± 8,4
Extrato de jambu	15,7 ± 0,7
Óleo de neem comercial I	ND
Óleo de neem comercial II	ND
Extrato alcoólico de neem III	7,9 ± 0,5

ND: não detectado

É possível verificar na Tabela 11 que o óleo de tomilho se destacou novamente dentre todos as amostras. No reino vegetal, o tomilho é conhecido pelo seu poder antioxidante, o qual pode ser atribuído ao conteúdo de compostos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007). Tohidi, Rahimmalek e Arzani (2017) avaliaram a composição e a atividade antioxidante de diferentes espécies de *Thymus* oriundas do Irã. Os resultados apontaram que *Thymus vulgaris* (tomilho branco) apresentou 39,5% de timol e 4,2% de carvacrol, metabólito isômero do timol e, consequentemente, apresenta estrutura fenólica (Figura 5B) e 62,4 mg equivalente ao ácido tânico/g óleo. Em outro estudo, Roby et al. (2013) obtiveram extratos de tomilho com diferentes

solventes e o extrato obtido com metanol apresentou o maior teor de CFT (8,1 mg EGA/g) e indicou o ácido cinâmico como ácido fenólico majoritário (28,5%). O óleo de tomilho avaliado neste trabalho tem origem diferente, maior teor de timol como será verificado no item 5.1.4 e um teor de CFT bem superior que os dados da literatura, provavelmente devido à maior concentração de timol.

Nos óleos comerciais de neem não foram detectados CFT, provavelmente devido a sua composição que varia em função de: grande quantidade de terpenos (não apresentam fenóis detectáveis pelo método utilizado) ou presença de impurezas (como outros óleos, também apolares). Entretanto, no extrato etanólico de neem III obtido a partir das folhas, foi observado um teor razoável (Tabela 11), lembrando que se o extrato tivesse sido concentrado (evaporação do etanol), o teor de CFT poderia ser superior. Ressalta-se assim uma qualidade superior do extrato obtido experimentalmente do que os óleos comerciais em relação à presença de CFT, indicando que o método de obtenção e a pureza do extrato influenciam fortemente a sua composição química. Alguns trabalhos apontam teores variados de CFT para as folhas do neem: 46 mg EAG g⁻¹ para o extrato obtido com acetona (HISMATH; WAN AINDA; HO, 2011) e 96,4 mg EAG g⁻¹ para o extrato aquoso, o qual também apresentou 17 µg g⁻¹ de azadiractina (GHIMERAY et al., 2009).

No extrato de jambu obtido por Soxhlet-etanol, o rendimento mássico foi de 2,9%, o teor de espilantol foi 25,7% e o teor de CFT igual a 1,47% (DIAS et al., 2012). Em outro estudo, o teor de CFT presente no extrato de jambu obtido com solução etanólica a 70% foi igual a 31,58 mg EAG g⁻¹ (RAO; RAO; RAO, 2012).

5.1.3. Escolha do composto ativo para microencapsulação

Um dos fatores que influenciaram na escolha do melhor composto ativo a ser microencapsulado foi o logaritmo do coeficiente de partição do metabólito ativo e a sua solubilidade em água a cerca de 25°C, uma vez que tais propriedades podem ser relacionadas com a liberação do composto ativo devido à afinidade química que o metabólito tem para se dissolver no meio aquoso onde as larvas se desenvolvem. O log P dos metabólitos varia da seguinte forma azadiractina (1,53) < timol (3,17) < espilantol (4,10) < temefós (5,47), isto é, do mais hidrofílico para o mais hidrofóbico (VIRTUAL COMPUTATIONAL CHEMISTRY

LABORATORY, 2017). Outro fator considerado foi a solubilidade mg L^{-1} do metabólito em água: tomilho (900 mg L^{-1}) > azadiractina (260 mg L^{-1}) > espilantol ($13,32 \text{ mg L}^{-1}$) > temefós ($0,27 \text{ mg L}^{-1}$), isto é, do menos insolúvel para o mais insolúvel (PUBCHEM, 2019; SYSTEM, 2019).

Os resultados da atividade larvicida (Tabela 10) também foram decisivos para a escolha do óleo de tomilho como melhor ativo a ser encapsulado, pois a CL_{99} variou na seguinte ordem crescente: temefós < tomilho < jambu < neem. Critérios de sustentabilidade (*green*), disponibilidade em grande quantidade para suprir a capacidade mínima operacional do extrusor e menor custo da matéria-prima foram utilizados na escolha. Sendo assim, o óleo de tomilho foi escolhido como melhor dentre os compostos ativos avaliados pois atendia a todos pré-requisitos.

5.1.4. Perfil cromatográfico do óleo essencial de tomilho

O perfil químico volátil do óleo essencial de tomilho pode ser observado na Tabela 12. Os compostos começaram a eluir aos 7 min de análise e após 36 min não houve mais volatilização. Foram identificados 14 compostos, sendo os metabólitos majoritários o timol (53%) e o o-Cimeno (17%), valores estes determinados pela comparação da área do pico com a área total dos compostos voláteis do cromatograma (Figura 25A). O percentual relativo da área encontrada para o timol está de acordo com a literatura: 57,7% (ROTA et al., 2008) e 53,57% (GONÇALVES et al., 2017).

A curva do padrão timol foi $\text{Abundância} = 4 \cdot 10^7 * \text{Concentração}$, com R^2 igual a 0,999, onde a concentração de timol dissolvido em diclorometano variou entre 10 e $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ e a abundância da área dos picos nos cromatogramas referente ao composto timol variou entre $3,78 \cdot 10^7$ a $4,75 \cdot 10^5$ respectivamente. De acordo com a equação do padrão timol, a quantidade em massa de timol presente no óleo de tomilho é de $0,42 \pm 0,02 \text{ mg/mg}$ óleo ou 42%. Desta forma, dentre os compostos voláteis identificados no óleo de tomilho, o timol representa cerca de 53% de área relativa (análise qualitativa) e em termos de massa, dentre todos os compostos voláteis e não-voláteis presentes no óleo, o timol representa 42,1% (análise quantitativa).

É possível relacionar a boa atividade larvicida apresentada pelo óleo de tomilho (Tabela 10) e a grande quantidade de CFT (Tabela 11) com a alta concentração do metabólito timol. Além disso, como o timol é o composto químico majoritário presente no OET, bem como constitui a maior parte dos CFT presentes no OET, a liberação de CFT pode ser utilizada como forma de quantificar a liberação de timol da partícula de forma aproximada. Outros trabalhos já fizeram tal aproximação anteriormente (SHARMA et al., 2017; TALÓN et al., 2017). É importante destacar que não apenas o timol é responsável pela atividade larvicida e teor de CFT, podendo ter a contribuição de demais constituintes (efeito sinérgico) para obter tais efeitos.

Tabela 12: Perfil químico volátil do óleo de tomilho.

Tempo de retenção (min)	Índice de retenção		Nome	Área relativa (%)
	Experimental	Teórico		
7,86	918	921	Triciclano	0,375 ± 0,004
8,31	929	932	α -Pinoeno	3,22 ± 0,04
8,86	943	946	Camfeno	2,09 ± 0,02
9,96	972	974	β -Pinoeno	0,787 ± 0,008
12,07	1023	1022	o-Cimeno	17,00 ± 0,05
12,22	1026	1024	Limoneno	4,42 ± 0,04
12,3	1028	1026	1,8-Cineol	1,99 ± 0,02
17,36	1140	1141	Cânfora	1,572 ± 0,002
23,88	1286	1283	Acetato de isobornil	1,0 ± 0,1
23,95	1288	1287	Acetato de bornil	2,1 ± 0,1
24,57	1302	1289	Timol	53,2 ± 0,2
24,86	1309	1298	Carvacrol	5,46 ± 0,05
29,5	1412	1416	β -Cariofileno	2,165 ± 0,004
35,98	1579	1582	Óxido de cariofileno	0,35 ± 0,01

O índice de retenção calculado experimentalmente (Tabela 12) a partir da mistura de alcanos (Figura 25B) pode ser comparado com o índice de retenção teórico de cada composto de acordo com Adams (2007) e os valores são muito próximos, garantindo a confiabilidade dos resultados para identificação dos compostos voláteis presentes na amostra.

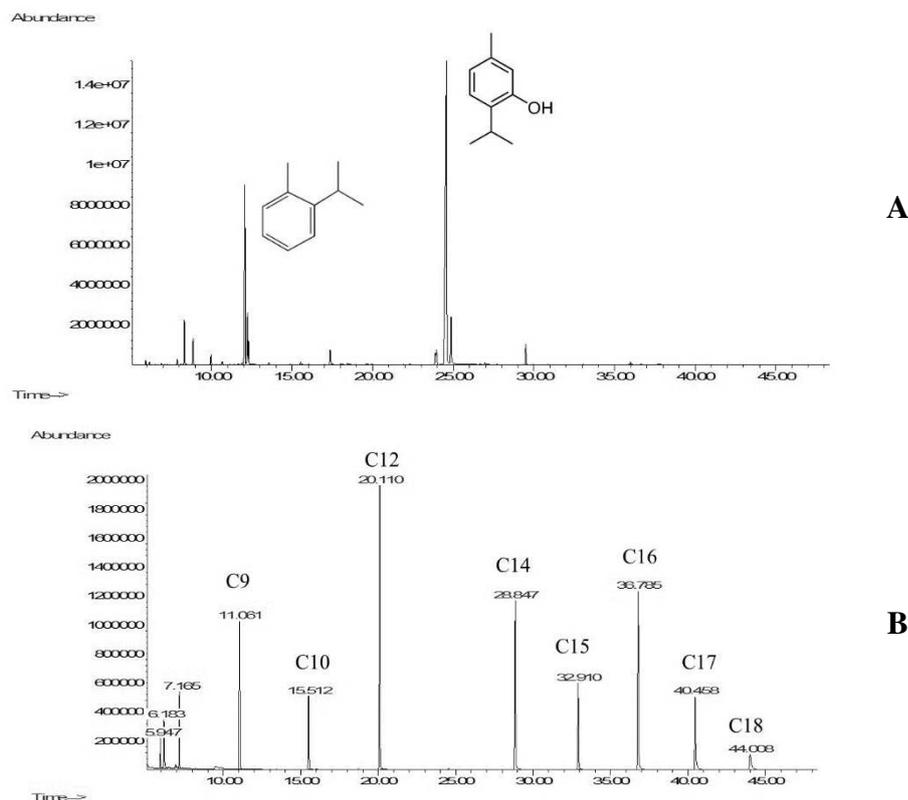


Figura 25: Cromatograma do óleo essencial de tomilho (A) e cromatograma da mistura de alcanos (B).

5.2. AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO

Como anteriormente visto na revisão de literatura (item 3.2.1), a extrusão é mais usada para produzir produtos expandidos. Com a finalidade de microencapsular, poucos trabalhos foram encontrados na literatura e, conseqüentemente, os efeitos das condições de processamento sob a formulação são pouco elucidados.

A adição do óleo de tomilho livre e pré-emulsificado ao amido favoreceu o processo de extrusão das formulações com baixo teor de amilose (1,8 e 15%) nas condições de processamento testadas, visto que não foi possível processar apenas com amido utilizando temperatura amena (100°C) em relação aos processos normais de extrusão termoplástica (> 150°C) sem que houvesse expansão da partícula ou entupimento do canhão durante a extrusão. Lai e Kokini (1991) salientam que durante a extrusão é possível ocorrer interações entre as moléculas das matérias-primas, formando complexos entre amilose e lipídeos, os quais sob ação de alta pressão, aquecimento, cisalhamento e na presença de umidade, transformam a matéria-prima em uma massa visco-elástica.

A energia mecânica específica (*EME*) é um parâmetro muito utilizado para caracterizar o processo de extrusão. A *EME* pode ser relacionada com o trabalho necessário para gelatinizar e plasticizar o amido e quantificar a extensão das transformações e interações macromoleculares que ocorrem durante a extrusão (OLIVEIRA et al., 2017). Condições severas de extrusão são caracterizadas pela elevada *EME* requerida no processo (CHANG; SCHMIELE; MARTÍNEZ-BUSTOS, 2010).

Nos ensaios realizados no extrusor dupla-rosca, a energia mecânica específica (*EME*) variou entre 96 a 324 kJ kg⁻¹ como pode ser observado na Tabela 13. Para as formulações sem recheio, quanto menor o teor de amilose, maior a *EME* necessária, porque o comportamento reológico da pasta de amido varia de média a alta como apresentado previamente (Tabela 4) e, conseqüentemente, mais energia deve ser fornecida para que a formulação esco. Diferentes tipos de matérias-primas podem levar a produtos completamente diferentes quando as mesmas condições operacionais são usadas no mesmo extrusor. Isso ocorre devido a diferenças no tipo e na quantidade de amidos, proteínas, umidade, adição de óleo, que resultam em viscosidade diferentes e, desse modo, características de fluxo diferentes (FELLOWS, 2006).

Tabela 13: Energia mecânica específica (*EME*) durante a produção de partículas em extrusor dupla-rosca com amido com diferentes teores de amilose como material de parede

Tipo de recheio	Teor de amilose (%)	EME (kJ kg⁻¹)
Sem recheio	28	324,1 ± 9,6 ^a
	45	307,2 ± 7,3 ^a
	71	126,3 ± 6,3 ^c
Óleo livre	1,8	147,3 ± 3,6 ^b
	15	120,0 ± 6,3 ^{cd}
	28	105,2 ± 9,6 ^{de}
	45	96,8 ± 3,6 ^e
	71	107,3 ± 6,3 ^{cde}
Óleo emulsionado	1,8	164,1 ± 6,3 ^b
	15	149,4 ± 3,6 ^b
	28	122,1 ± 9,6 ^{cd}
	45	107,3 ± 6,3 ^{cde}
	71	103,1 ± 3,6 ^{de}

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre as médias pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de significância.

A incorporação do óleo de tomilho (livre e emulsionado) proporcionou uma redução significativa da *EME* (Tabela 13), por facilitar a passagem da mistura no canhão do extrusor. Isto pode ter ocorrido devido à atuação do óleo como um lubrificante, pois permitiu a produção de partículas com amidos com baixo teor de amilose, o que não foi possível somente com o amido puro (partículas sem recheio com 1,8 e 25% não foram produzidas). A pesquisa desenvolvida por Volpe et al. (2018) comprovou a atuação de óleo como lubrificante no processo de extrusão. O óleo da semente de girassol cru e o mesmo reaproveitado de rede *fast-food* (pós-fritura) foram utilizados na substituição parcial de glicerol como plastificante ecológico de amido por extrusão termoplástica. A presença do óleo aumentou as propriedades de barreira ao vapor de água e as propriedades mecânicas dos filmes de amido. Além disso, do ponto de vista reológico, o óleo resultou em uma lubrificação mais efetiva, e não houve diferença significativa entre o óleo cru e o óleo frito.

Além de permitir a extrusão, a adição do óleo de tomilho facilitou o processo de corte na saída do extrusor, o que implicou em diferenças morfológicas entre as partículas (Figura 26, Figura 27 e Figura 28). O tipo de formulação influenciou na forma final da partícula produzida: tiras cortadas manualmente, raspas ou gotículas dependendo da aparência do produto. Em geral, as formulações sem recheio no extrusor dupla-rosca não possibilitaram o corte em formato de gotículas, de modo que as tiras produzidas foram cortadas aleatoriamente, conseqüentemente, em formato de raspas. Além disso, o aspecto visual das partículas com o mesmo teor de amilose (28%), mas produzidas em extrusores diferentes, foi bastante distinto, bem como a aparências das partículas com e sem recheio diferiu. As partículas produzidas no extrusor mono-rosca não eram cortadas ao final do extrusor, havendo a necessidade de uma etapa adicional de moagem. É importante ressaltar que foi possível extrusar as formulações com 1,8% de amilose a partir da adição do óleo de tomilho livre e emulsionado, mas as tiras produzidas eram tão frágeis que quebravam facilmente após a secagem em estufa, e, assim, as tiras quebraram-se em partículas menores, mas formando aglomerados (Figura 27).

Teor de amilose (%)	Extrusor	Formato da partícula produzida		
		Tiras	Raspas	Triturados
1,8*	DR	-	-	-
15*	DR	-	-	-
28	DR			-
28	MR		-	
45	DR			-
71	DR			-

Figura 26: Aparência e formato das partículas produzidas com diferentes teores de amilose sem recheio em extrusor Mono-rosca (MR) e Dupla-rosca (DR).

*Não foi possível processar a formulação.

Teor de amilose (%)	Extrusor	Formato da partícula produzida		
		Tiras	Gotículas	Triturados
1,8	DR		-	-
15	DR			-
28	DR			-
28	MR		-	
45	DR			-
71	DR			-

Figura 27: Aparência e formato das partículas produzidas com diferentes teores de amilose e óleo de tomilho livre como recheio em extrusor Mono-rosca (MR) e Dupla-rosca (DR)

Teor de amilose (%)	Extrusor	Formato da partícula produzida		
		Tiras	Raspas	Gotículas
1,8	DR		-	-
15	DR			-
28	DR		-	
45	DR		-	
71	DR		-	

Figura 28: Aparência e formato das partículas produzidas com diferentes teores de amilose e óleo de tomilho emulsionado como recheio em extrusor Dupla-rosca (DR)

As gotículas produzidas apresentaram formato diferente em relação ao formato esférico como pode ser observado na Figura 29. Desta forma, após a produção das partículas sugere-se uma classificação por granulometria das partículas para que os efeitos de liberação do ativo sejam mais uniformes, visto que o formato e o diâmetro da partícula interferem no mecanismo de difusão e hidratação (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). A seleção também é favorável para comercialização do produto (uniformidade, aparência) e melhor medida de dosagem (quantidade suficiente para matar as larvas de acordo com o número de partículas), mas levaria a uma perda de produto.

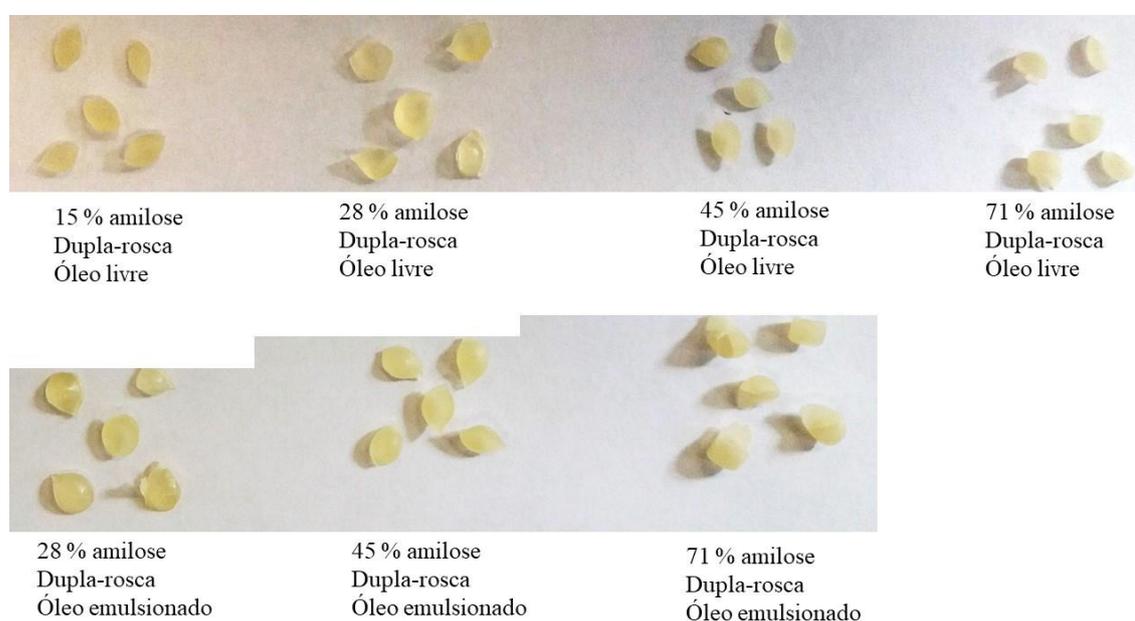


Figura 29: Aspecto visual das gotículas produzidas por extrusão com amido com diferentes teores de amilose com óleo de tomilho livre e emulsionado como material de recheio

5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

5.3.1. Caracterização física e físico-química

Na Tabela 14 é possível verificar os resultados de caracterização física das partículas, com resultados de diâmetro médio, teor de umidade, densidade aparente e o índice de expansão.

Tabela 14: Caracterização das partículas produzidas em dois extrusores diferentes [Mono-roscas (MR) e Dupla-roscas (DR)] com diferentes tipos de recheio e diversos teores de amilose

Tipo de recheio	Teor de amilose (%)	Extrusor	Formato	Diâmetro (cm)	Menor dimensão (cm)	Umidade (%)	Densidade aparente (g/mL)	Índice de expansão	Parâmetros de cor		
									L*	a*	b*
Sem recheio	28	MR	Irregular	0,80 ± 0,03 ^{AB}	0,40 ± 0,04 ^{AB}	10,5 ± 0,9 ^C	1,7 ± 0,2 ^A	1,5 ± 0,1 ^{ABCD}	50,1 ± 1,9 ^{EF}	-1,0 ± 0,3 ^{BC}	22,1 ± 0,7 ^G
	28	DR	Raspa	2,0 ± 0,1 ^D	0,63 ± 0,17 ^{CD}	3,7 ± 1,4 ^A	1,46 ± 0,06 ^A	1,49 ± 0,08 ^{ABCD}	33,0 ± 2,7 ^A	0,3 ± 0,4 ^{GHI}	10,46 ± 0,05 ^{AB}
	45	DR	Raspa	2,070 ± 0,004 ^D	0,49 ± 0,13 ^{BC}	3,1 ± 0,5 ^A	1,51 ± 0,03 ^A	1,4 ± 0,1 ^{ABC}	34,5 ± 1,9 ^{AB}	0,34 ± 0,07 ^{GHI}	9,4 ± 1,9 ^A
	71	DR	Raspa	0,52 ± 0,05 ^A	0,26 ± 0,11 ^A	1,8 ± 0,6 ^A	1,28 ± 0,02 ^A	1,37 ± 0,08 ^{ABC}	36,2 ± 0,3 ^{ABC}	-0,20 ± 0,07 ^{DEFG}	9,2 ± 1,3 ^A
Óleo livre	1,8	DR	Tira	1,3 ± 0,3 ^C	0,64 ± 0,16 ^D	6,5 ± 0,1 ^B	1,32 ± 0,07 ^A	2,3 ± 0,4 ^G	33,9 ± 2,5 ^{AB}	0,8 ± 0,2 ^{HI}	11,2 ± 0,3 ^{AB}
	15	DR	Gotícula	0,51 ± 0,01 ^A	0,38 ± 0,17 ^{AB}	4,0 ± 0,6 ^A	1,28 ± 0,04 ^A	1,47 ± 0,09 ^{ABCD}	45,4 ± 4,0 ^{DE}	-0,6 ± 0,2 ^{CDE}	12,7 ± 0,6 ^{BCD}
	28	MR	Irregular	0,510 ± 0,002 ^A	0,36 ± 0,08 ^{AB}	11,2 ± 0,6 ^C	1,3 ± 0,1 ^A	1,6 ± 0,2 ^{CDE}	57 ± 1 ^G	-1,7 ± 0,3 ^A	18,6 ± 0,6 ^{EF}
	28	DR	Gotícula	0,79 ± 0,04 ^{AB}	0,49 ± 0,16 ^{BC}	3,0 ± 0,5 ^A	1,3 ± 0,2 ^A	1,68 ± 0,09 ^{DEF}	53,5 ± 0,9 ^{FG}	-1,5 ± 0,2 ^{AB}	17,9 ± 2,5 ^{EF}
	45	DR	Gotícula	0,75 ± 0,05 ^{AB}	0,39 ± 0,08 ^{AB}	3,7 ± 1,7 ^A	1,28 ± 0,01 ^A	1,53 ± 0,06 ^{BCD}	68 ± 3 ^H	-0,7 ± 0,3 ^{CD}	19,3 ± 0,4 ^{FG}
Óleo emulsionado	71	DR	Gotícula	0,67 ± 0,04 ^{AB}	0,26 ± 0,05 ^A	3,1 ± 0,3 ^A	1,27 ± 0,02 ^A	1,29 ± 0,05 ^A	53 ± 4 ^{FG}	-0,5 ± 0,2 ^{CDEF}	11,6 ± 1,4 ^{ABC}
	1,8	DR	Tira	1,0 ± 0,2 ^{BC}	0,61 ± 0,16 ^{CD}	7,8 ± 0,7 ^B	1,4 ± 0,2 ^A	2,41 ± 0,3 ^G	40,2 ± 0,9 ^{BCD}	1,0 ± 0,4 ^I	13 ± 1 ^{BCD}
	15	DR	Raspa	1,3 ± 0,2 ^C	0,56 ± 0,17 ^{CD}	3,6 ± 0,3 ^A	1,31 ± 0,02 ^A	1,89 ± 0,08 ^F	54,9 ± 0,8 ^{FG}	0,01 ± 0,21 ^{EFG}	15,8 ± 0,3 ^{DE}
	28	DR	Gotícula	1,00 ± 0,02 ^{BC}	0,5 ± 0,2 ^{BCD}	4,1 ± 0,8 ^A	1,3 ± 0,2 ^A	1,78 ± 0,08 ^{EF}	41,5 ± 1,2 ^{CD}	-0,04 ± 0,10 ^{EFG}	17,7 ± 0,7 ^{EF}
	45	DR	Gotícula	0,82 ± 0,03 ^{AB}	0,4 ± 0,1 ^{AB}	3,5 ± 0,5 ^A	1,14 ± 0,08 ^A	1,53 ± 0,03 ^{BCD}	52,3 ± 1,3 ^{FG}	-0,04 ± 0,19 ^{EFG}	17,8 ± 0,7 ^{EF}
71	DR	Gotícula	1,07 ± 0,01 ^{BC}	0,36 ± 0,06 ^{AB}	4,0 ± 0,5 ^A	1,5 ± 0,1 ^A	1,30 ± 0,08 ^{AB}	44,5 ± 1 ^{DE}	0,2 ± 0,1 ^{FGH}	14,5 ± 0,3 ^{CD}	

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre as médias pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de significância. Sistema CIELab: L do preto (0) ao branco (100); a* do verde (-60) ao vermelho (+60), b* do azul (-60) ao amarelo (+60).

5.3.1.1. Teor de umidade das partículas

O teor de umidade das partículas produzidas variou entre 3 a 11% (Tabela 14), sendo maior quando produzidas em extrusor mono-rosca. Menor teor de umidade pode acarretar em menor atividade de água e, conseqüentemente, conferir maior vida útil para o produto devido à estabilidade à temperatura ambiente, menor incidência de contaminação microbológica, melhoria de transporte e de comercialização.

Ter uma umidade baixa implica também em dizer que o sistema é desidratado e ao imergir as partículas em água contendo as larvas do mosquito, a absorção de água torna-se um gatilho para a liberação do ativo, seja devido à erosão ou inchamento das partículas (dependente do tipo de amilose) ou pela diferença de concentração de ativo entre os meios sólido e líquido.

5.3.1.2. Distribuição do tamanho, diâmetro médio e menor dimensão das partículas

Como foi apresentado no item 5.3, não foi possível obter um formato e, conseqüentemente, um tamanho homogêneo para todas as formulações testadas, as quais dependiam do teor de amilose e do tipo de recheio. Desta forma, as formulações que produziram raspas resultaram em diâmetro médio superior àquelas formulações que resultaram em partículas menores e com formato de gotícula.

O diâmetro médio das partículas pode ser observado na Tabela 14. As partículas produzidas apresentaram entre 0,5 a 2,0 cm de diâmetro médio sem a trituração (extrusor dupla-rosca) e entre 0,5 a 0,8 cm com a trituração em moinho (extrusor mono-rosca). A etapa de redução do tamanho em moinho das partículas produzidas no extrusor mono-rosca consistiu em uma operação unitária adicional ao processo, o resultado foram partículas de formato irregular e o diâmetro médio igual estatisticamente foi possível de ser obtido com o extrusor dupla-rosca, mas com teor de amilose distinto (Tabela 14). Um ponto negativo que a trituração em moinho pode proporcionar também é a maior exposição do composto ativo aos fatores abióticos.

Ao encapsular óleo de girassol com amido de batata em extrusor dupla-rosca, Yilmaz et al. (2001) chegaram à conclusão de que quanto menor o tamanho da partícula, menor a *EME*. Semelhantemente, de acordo com a Tabela 13, a *EME* foi maior para formulações sem recheio,

enquanto que de acordo com a Tabela 14, maior é o diâmetro da partícula quando não tem recheio, principalmente para 28 e 45% de amilose.

A diferença entre as partículas obtidas pode ser observada também nos gráficos de distribuição do tamanho (Figura 30). Em geral, as partículas maiores apresentaram um percentual de retenção maior nas peneiras com maiores aberturas. Novamente, este grande tamanho pode ser relacionado com a formulação processada no extrusor, de modo que a adição do óleo de tomilho (livre ou emulsionado) favoreceu a produção de partículas menores. Isto provavelmente ocorreu porque o óleo agiu como um melhorador do cisalhamento durante a extrusão, além de facilitar a ação do dispositivo de corte ao final do extrusor. É importante destacar que para as partículas sem recheio, o aumento do teor de amilose proporcionou a redução do diâmetro, provavelmente devido à conformação das moléculas de amilose, o que caracteriza uma estrutura compacta e laminar como será discutido na seção 5.3.1.10. Desta forma, não apenas a adição do óleo foi o fator principal para a formação de partículas menores, mas também o teor de amilose influenciou.

O diâmetro médio obtido por granulometria não é suficiente para informar a dimensão das partículas obtidas. Desta forma, a medida da menor dimensão da partícula (L) foi realizada, medindo-se com paquímetro a largura delas. É possível perceber que há uma redução expressiva ao comparar o D_p e o L (Tabela 14) para todas as formulações, mas sem grandes alterações entre a análise estatística entre elas.

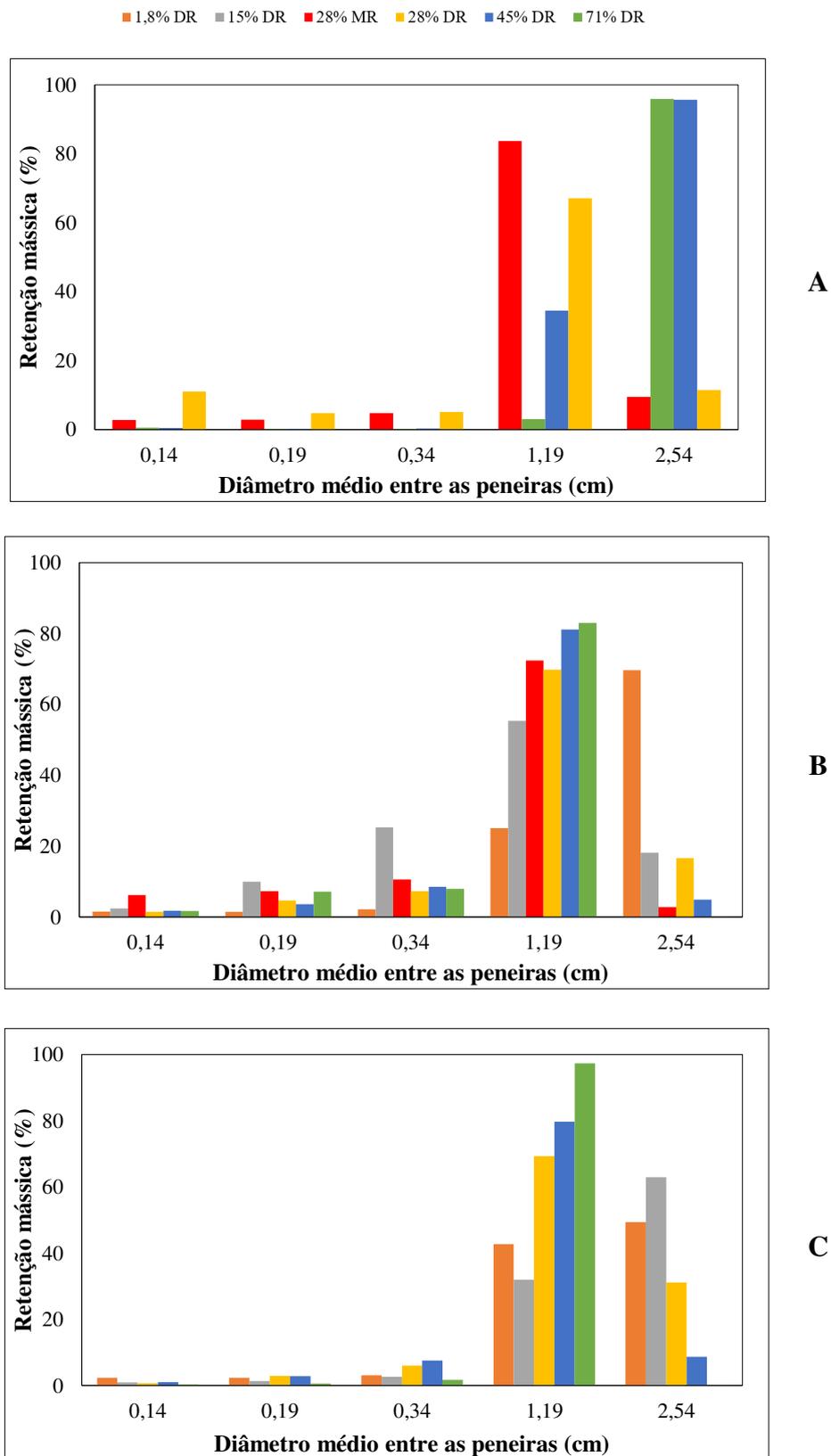


Figura 30: Distribuição do tamanho das partículas produzidas por extrusão termoplástica diferentes teores de amilose, diferentes tipos de recheio (A – sem recheio, B – óleo livre e C – óleo emulsionado) e dois tipos de extrusores (MR: mono-rosca e DR: dupla-rosca)

5.3.1.3. Índice de expansão radial das partículas

Dependendo da temperatura utilizada no processo de extrusão, pode-se ter um produto expandido e, para isso, são utilizadas temperaturas acima de 150°C (ORDÓÑEZ, 2005a). No entanto, para evitar a volatilização do ativo, a temperatura máxima utilizada durante a extrusão foi 100°C (item 4.3.5.2), o que não permitiu a expansão dos *pellets*. Contudo, os resultados do índice de expansão radial das partículas apresentados na Tabela 14 indicam que dependendo da formulação, ocorreu uma ligeira expansão. Para a grande maioria das amostras, o *IE* variou entre 1,29 a 1,39. Entretanto, para as formulações com 1,8% de amilose, independentemente do tipo recheio, o *IE* foi maior que 2. Esta expansão pode ocasionar a volatilização do óleo durante a extrusão, o que não é desejável, pois pode reduzir a eficiência de encapsulação e, conseqüentemente, a atividade biológica da partícula.

Carvalho et al. (2012) produziram *snacks* comestíveis com farinhas de arroz e feijão, sendo a crocância bastante relevante para a aceitação sensorial, sendo mais favorecida pela incorporação de ar e formação de poros no extrusado. A produção ocorreu em extrusor mono-rosca com temperatura máxima de 85°C e com matriz circular de 3,85 mm. O índice de expansão dos *snacks* foi de $7,75 \pm 0,25$, sendo bastante superior aos extrusados produzidos neste trabalho. Desta forma, dependendo da aplicação da partícula, a expansão é desejável ou não. Para as partículas com aplicação contra as larvas, a não expansão foi um resultado satisfatório.

5.3.1.4. Densidade aparente das partículas

A quantificação da densidade das partículas é importante para relacionar com a tendência à sedimentação/flutuação em água e também com a expansão das partículas. Não houve diferença significativa entre as formulações em relação à densidade das partículas, a qual variou entre 1,1 a 1,5 g mL⁻¹ (Tabela 14), evidenciando a estrutura compacta das partículas. Contraditoriamente, o *snack* comestível com farinha de arroz e feijão produzido por Carvalho et al. (2012) em extrusor mono-rosca apresentou densidade aparente de 0,17 g cm⁻³, evidenciando a estrutura porosa do *pellet* e que diferentes condições de processamento influenciam na densidade do extrusado, sendo a densidade obtida pelos autores bastante inferior ao resultado apresentado pelos extrusados produzidos neste trabalho.

Ao comparar os resultados de densidade e expansão dos extrusados produzidos nesta tese com amido de milho a 100°C com os *snacks* produzidos por Carvalho et al. (2012) com amido de arroz e feijão a 85°C, pode-se concluir que há uma relação entre alta densidade aparente com a não-expansão e vice-versa. Dependendo do foco do extrusado produzido (fim comestível ou não), estas duas propriedades são importantes e refletem se a partícula tem maior ou menor tendência a sedimentar/flutuar como será discutido na seção 5.3.1.6.

5.3.1.5. Análise de cor das partículas

A análise de cor das partículas é uma análise complementar à análise da aparência das partículas obtidas (item 5.2), uma vez que a cor das mesmas variou como pode ser constatado na Tabela 14. Algumas eram amarelas e outras esverdeadas. As partículas produzidas em extrusor dupla-rosca sem recheio com todos os teores de amilose testados e as partículas produzidas com 1,8% de amilose com óleo livre de tomilho eram as partículas mais escuras (menores valores de L^*), enquanto que a partícula com 45% de amilose e óleo de tomilho livre apresentou a maior luminosidade (L^*). De modo geral, as partículas apresentaram menores valores de a^* e de b^* .

5.3.1.6. Sedimentação das partículas

As diferentes partículas produzidas apresentaram diferentes tempos de sedimentação em água. Conseqüentemente, velocidades variadas foram obtidas como pode ser verificado na Figura 31. O mesmo número de partículas (10) foi utilizado no teste de sedimentação, mas as amostras apresentam formatos (seção 5.2), densidades e diâmetros diferentes (Tabela 14), o que resultou em volumes calculados diferentes.

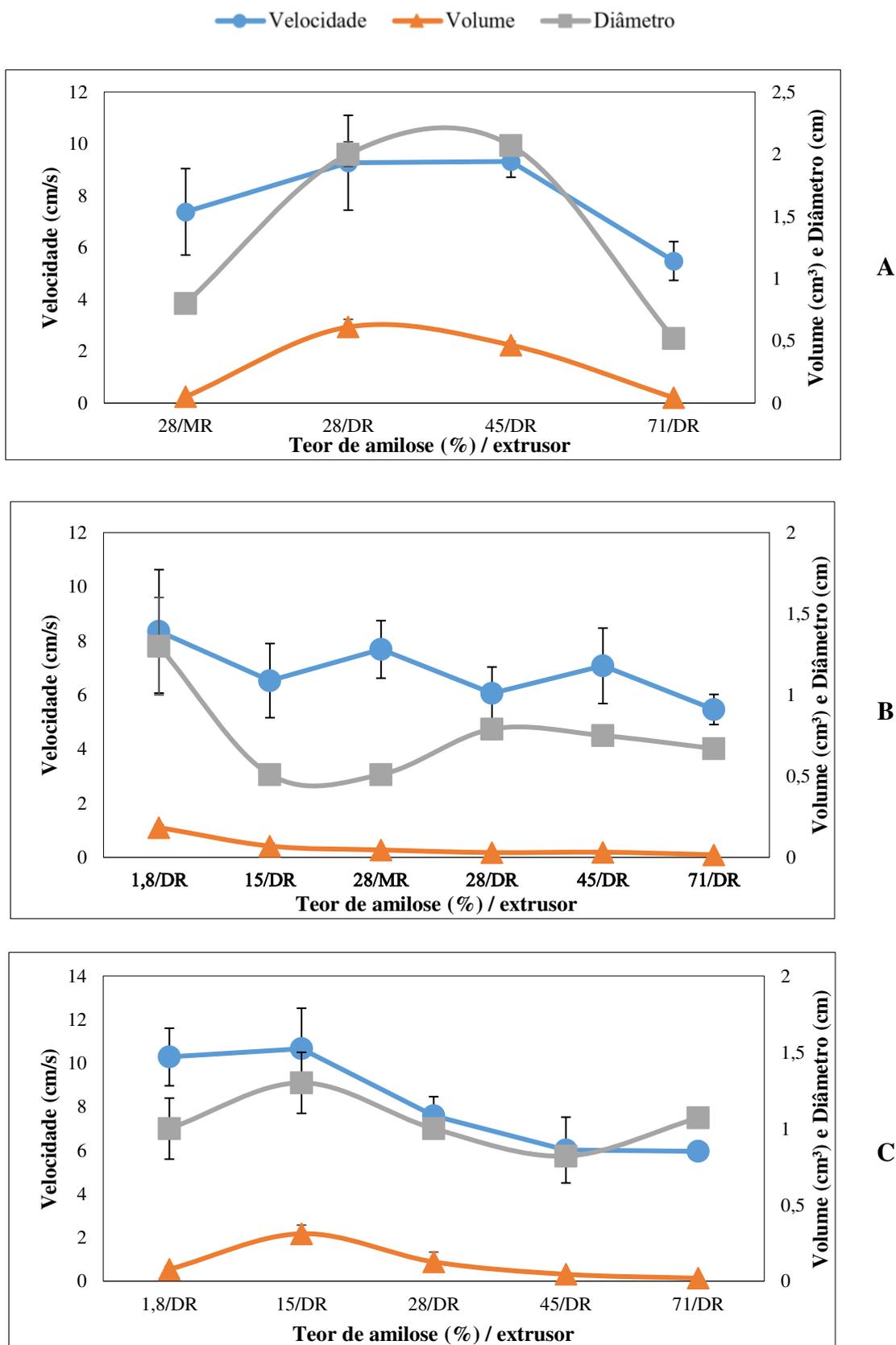


Figura 31: Relação entre velocidade de sedimentação em água, volume e diâmetro das partículas produzidas por extrusão termoplástica diferentes teores de amilose, diferentes tipos de recheio (sem recheio – A, com óleo livre – B e com óleo emulsionado - C) e dois tipos de extrusores (MR: mono-rosca e DR: dupla-rosca)

No caso das partículas sem recheio produzidas em extrusor dupla-rosca, quanto maior o teor de amilose, menor o volume e menor a velocidade de sedimentação (Figura 31A). Isto significa dizer que quanto menor o volume, mais tempo a partícula demora para sedimentar. Como as partículas obtidas no extrusor foram trituradas em moinho, o volume das partículas é menor e, logo, a velocidade é menor do que as partículas obtidas com o mesmo teor de amilose no extrusor dupla-rosca. O comportamento da variação do diâmetro foi análogo ao comportamento do volume das partículas com o aumento do teor de amilose.

De maneira semelhante, para as partículas com óleo livre, o aumento do teor de amilose levou a um menor volume e uma menor velocidade de sedimentação (Figura 31B). Entretanto, a ordem de grandeza do volume das partículas com recheio (0,2 a 1,8 cm³) foi menor do que das partículas sem recheio (0,4 a 6,1 cm³). Destaca-se também que o comportamento do diâmetro foi diferente do comportamento do volume das partículas, não apresentando uma tendência linear com o aumento do teor de amilose.

Para as partículas com óleo emulsionado, o aumento do teor de amilose resultou em menor velocidade de sedimentação, seguindo a tendência da variação do diâmetro, mas não proporcionalmente uma redução do volume (Figura 31C). A exceção foi a partícula com 1,8% de amilose que apresentou a maior velocidade (11 cm s⁻¹) dentre todas as partículas produzidas, isto é, menor é o tempo necessário para sedimentar e, contraditoriamente, não foi a partícula que apresentou menores diâmetro e volume.

A redução da velocidade de sedimentação com o aumento do teor de amilose para as formulações com recheio pode ser explicado pelo fato de menores teores de amilose promoverem maior expansão das partículas, reduzindo seu volume e possibilitando maior tendência à flutuação do que à sedimentação. Já as formulações sem recheio, mesmo com maior expansão e menor volume, não sofreram a influência da presença do óleo em sua composição.

É possível verificar que como as partículas apresentaram alta densidade aparente (Tabela 14), a tendência à sedimentação prevaleceu sob a tendência de flutuação das partículas, sendo que o contrário ocorre na maioria dos casos com cereais matinais (porosos) ao serem imersos em leite (os extrusados expandidos flutuam). Isto revela a importância de acompanhar a cinética de absorção de umidade do sistema particulado como será discutido na seção 5.3.1.9.

5.3.1.7. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Procurando por uma diferenciação molecular entre as formulações, as análises de FTIR e DRX foram realizadas com amostras selecionadas. Amaral et al. (2016) detectaram por análise de FTIR a hidrólise de amido devido à ação forte do ácido cítrico em extrusados obtidos com amido de milho, glicerol e ácido cítrico. Contudo, na presente tese não foi possível observar uma diferença expressiva entre as formulações, seja por formação ou eliminação de ligações químicas durante o processo de extrusão. Na Figura 32 é possível observar que nenhuma banda nova foi detectada comparando-se as partículas com os materiais de parede puros.

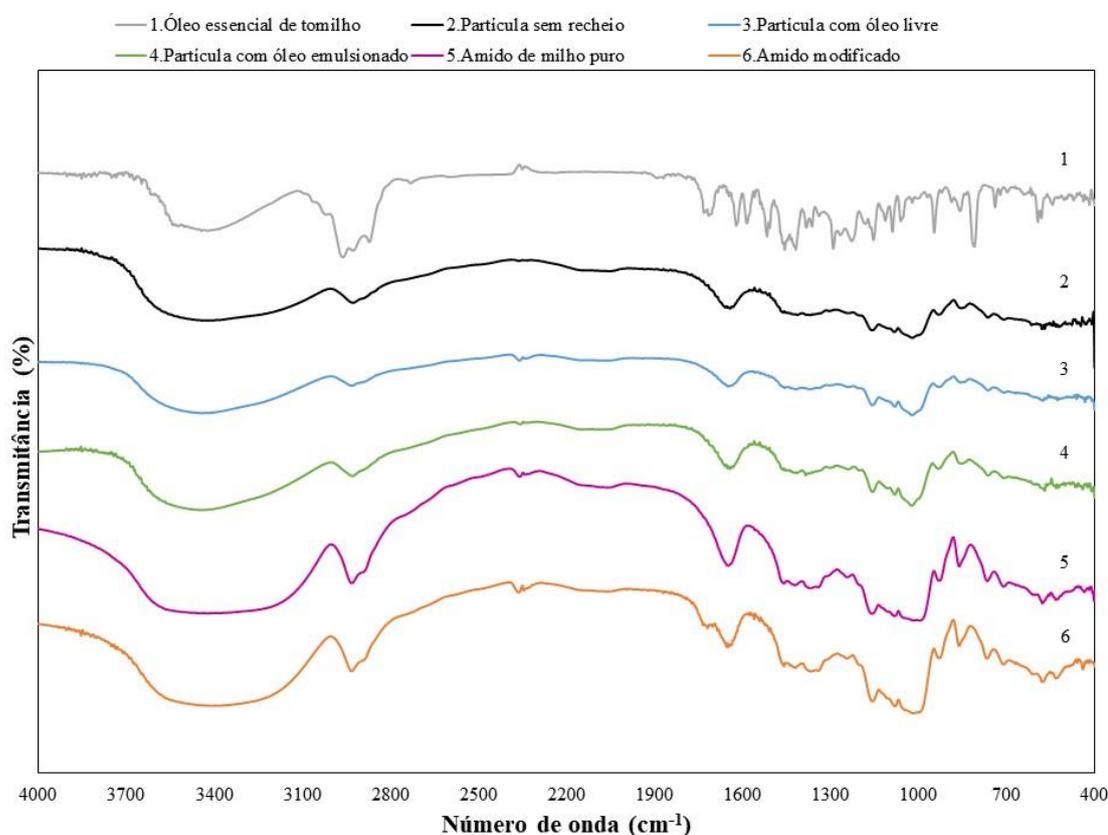


Figura 32: Análise de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) de amostras com 28% de amilose: amido puro, amido modificado e partículas com diferentes tipos de recheio obtidas em extrusor dupla-rosca.

As bandas 1022 e 1045 cm^{-1} foram atribuídas a estruturas do amido amorfas e a estruturas ordenadas respectivamente e a razão da transmitância referente a elas tem sido usada como forma de quantificar o grau de ordenação em amido (YANG et al., 2015). Sendo assim, na Tabela 15 é possível verificar que dependendo do tipo de recheio da formulação, uma menor ordem de ordenação molecular foi obtida. A menor ordenação foi obtida para a partícula sem

recheio, indicando que a estrutura ordenada do amido puro foi destruída durante o processo de extrusão, mas a adição do OET, em sua forma livre e emulsionada, permitiu uma estrutura mais ordenada. Como se trata de uma análise qualitativa de valores pontuais de transmitância não foram apresentados o desvio-padrão e a análise estatística entre as amostras.

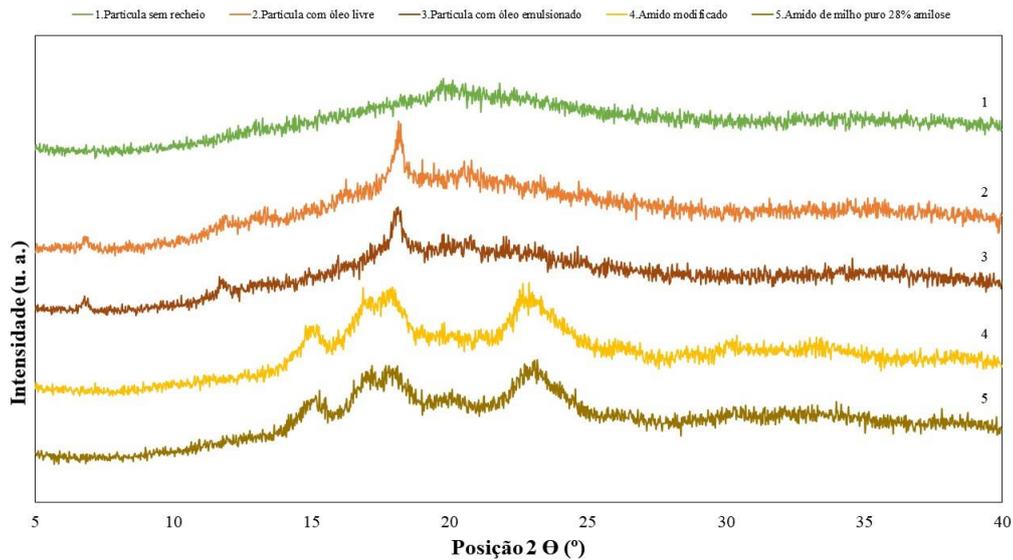
Tabela 15: Ordem molecular de amostras com 28% de amilose: amido puro, amido modificado e partículas obtidas com diferentes tipos de recheio em extrusor dupla-rosca de acordo com a análise de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Amostra	Razão entre as transmitâncias das bandas 1045/1022 cm⁻¹
Amido de milho com 28% de amilose	1,60
Amido modificado	1,46
Partícula com óleo emulsionado	1,08
Partícula com óleo livre	1,05
Partícula sem recheio	1,04

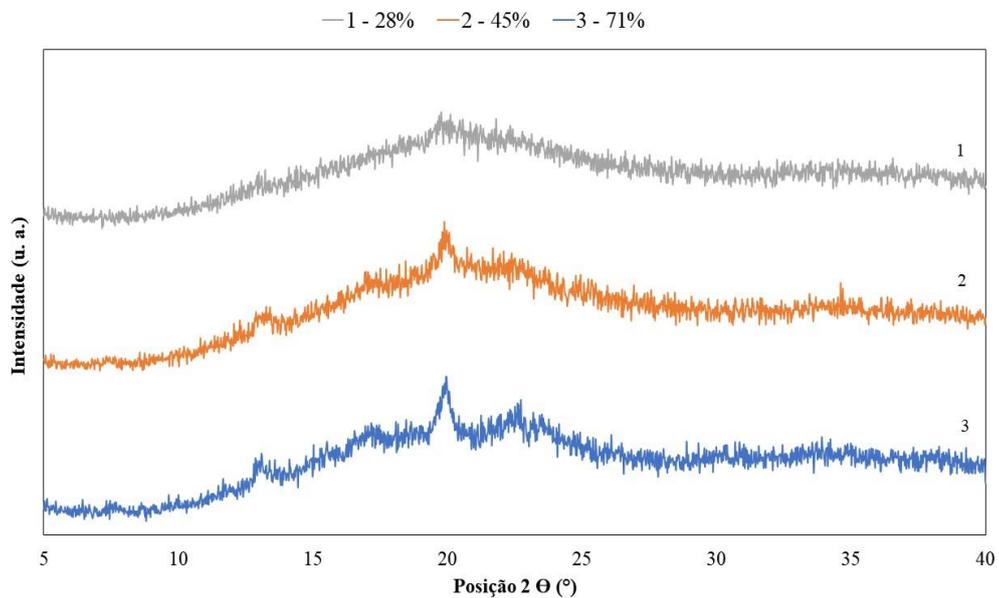
5.3.1.8. Difração de raios-X

O processo de extrusão reduziu a ordenação da estrutura molecular comparando as partículas com o material de parede de acordo com a análise de DRX (Figura 33A), como era esperado, devido à gelatinização do amido durante o processo. A análise de DRX também evidenciou que uma nova organização cristalina foi obtida ao se adicionar o óleo como recheio. Para a partícula sem recheio, uma fase amorfa foi obtida e para as partículas com óleo foi observada uma estrutura cristalina a 18° (2 Θ), com mais intensidade para as partículas com óleo livre do que para as partículas com óleo emulsionado, devido à formação do complexo amilose-lipídio. Isto ocorreu porque o processo de extrusão alterou o padrão cristalino do tipo A do amido de milho puro para o padrão cristalino do tipo V nas amostras com recheio, enquanto que as partículas de recheio foram totalmente gelatinizadas, não apresentando picos cristalinos. Durante a extrusão, a estrutura nativa da amilose é parcialmente destruída e novas estruturas cristalinas são formadas, correspondentes ao complexo amilose-lipídeo (THACHIL; CHOUKSEY; GUDIPATI, 2014).

Resultados semelhantes ao desta tese foram obtidos por Nuessli et al (1997). Os autores analisaram amostra de amido complexado com timol e observaram picos cristalinos em aproximadamente 7, 12 e 18° (2Θ) iguais aos representados na curva 3 da Figura 33A. Tais picos foram relacionados com a formação do completo amilose-*flavor*.



A



B

Figura 33: Análise de DRX de amostras com 28% de amilose - amido puro, amido modificado e partículas com diferentes tipos de recheio obtidas em extrusor dupla-rosca (A) e análise de DRX das partículas sem recheio produzidas em extrusor dupla-rosca em função do teor de amilose (B).

González-Seligra et al. (2017) produziram filmes com amido de mandioca com glicerol em extrusor variando-se a velocidade da rosca (40, 80 e 120 rpm). A análise de DRX dos filmes revelou estrutura mais cristalinas para amostras obtidas com a menor velocidade, provavelmente devido da presença de plasticizantes ou lipídeos, que podem formar complexos com a amilose, identificados como cristais do tipo V_H , V_A e E_H . Com a maior velocidade, a estrutura cristalina dos grânulos de amido foram destruídos e formaram uma fase amorfa. Em outro estudo, Santos et al. (2018) produziram extrusados com amidos de mandioca e de cenoura peruana em extrusor mono-rosca. Os resultados de DRX revelaram que o processo de extrusão destruiu completamente os grânulos de amido, eliminando a estrutura cristalina, formando uma massa amorfa fundida. Isto provavelmente ocorreu, segundo os autores, devido a total gelatinização promovida pela pressão, temperatura e força de cisalhamento intensas aplicadas por um determinado período.

Observando a Figura 33B, é possível verificar que quanto maior o teor de amilose das partículas sem recheio, maior a intensidade no ângulo próximo a 18° (2Θ), evidenciando maior ordenação com o aumento do teor de amilose, provavelmente devido à maior cristalinidade do amido com alto teor de amilose.

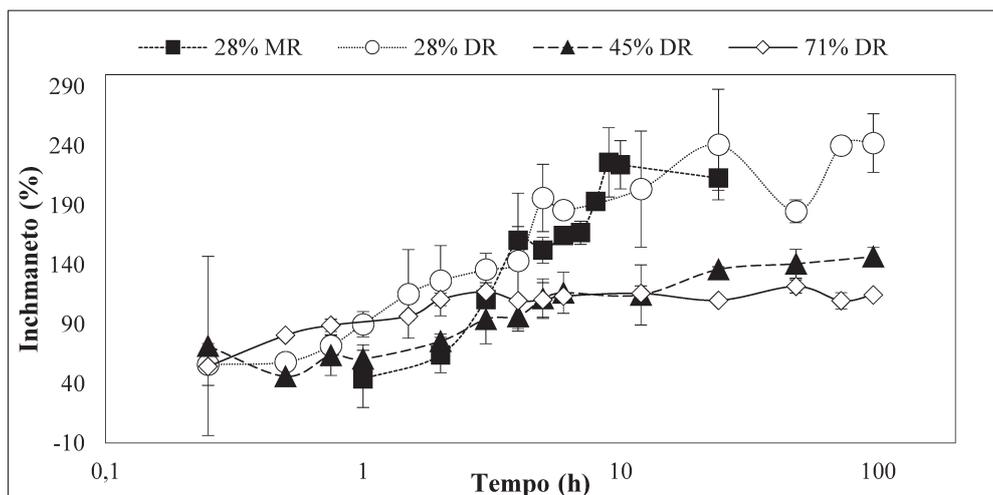
5.3.1.9. Inchamento e lixiviação

Na Figura 34 é possível verificar as cinéticas de inchamento das partículas. Para as amostras sem recheio é possível verificar que as partículas com 28% de amilose, independentemente do tipo de extrusor, apresentaram maior inchamento. De modo geral, para todas as partículas, o inchamento máximo ocorre nas primeiras 24 h de imersão das partículas em água. Quanto maior o teor de amilose, menor o inchamento, provavelmente devido ao menor teor de amilopectina, a qual não permite a absorção de água na mesma proporção que amidos com menores teores de amilose permitem. É possível correlacionar a cristalinidade das amostras avaliada pela análise de DRX (Figura 33B) com o inchamento: quanto maior o teor de amilose, menor o inchamento e maior a cristalinidade. Isto significa que a formulação e o tipo de processamento influenciam nas características de absorção de umidade, provavelmente devido à alteração do grau de ordenação da matriz polimérica.

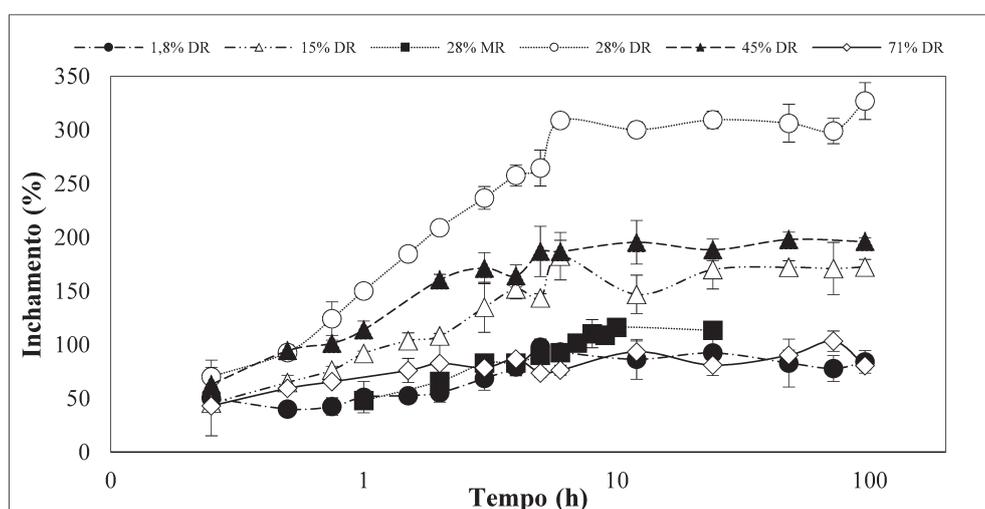
Para as partículas com óleo de tomilho livre como recheio, primeiramente, é possível observar diferença entre os tipos de extrusores e mesmo teor de amilose (28%), de modo que as partículas produzidas no duplas-rosca incharam em torno de 66% a mais do que as partículas produzidas no mono-rosca. Ao comparar as partículas produzidas com óleo livre com as partículas produzidas sem recheio, o inchamento máximo é observado nas primeiras 12 h de imersão das partículas em água. Outro dado importante é que os extremos de teor de amilose (1,8 e 71%) resultaram em partículas que incham menos do que as partículas com teores de amilose intermediários (15 e 45%), entretanto, 28% de amilose é o teor ideal para obter um inchamento máximo de partículas. As partículas com 1,8% incham menos porque o mecanismo de erosão exerce maior influência como será discutido a seguir, enquanto que o alto teor de amilose na formulação com 71% impactou na absorção de umidade devido a sua rede mais compacta e laminar como será apresentada na seção de MEV (5.3.1.10).

Para as partículas com óleo de tomilho emulsionado, de modo geral, o inchamento máximo ocorreu nas primeiras 6 h, com exceção da partícula com 15% de amilose, que apresentou inchamento máximo em torno de 24 h. Da mesma forma como foi observado para o óleo de tomilho livre, os extremos de teor de amilose (1,8 e 71%) não permitiram que as partículas inchassem muito. Entretanto, desta vez, o teor de amilose que permitiu maior inchamento foi o de 15%.

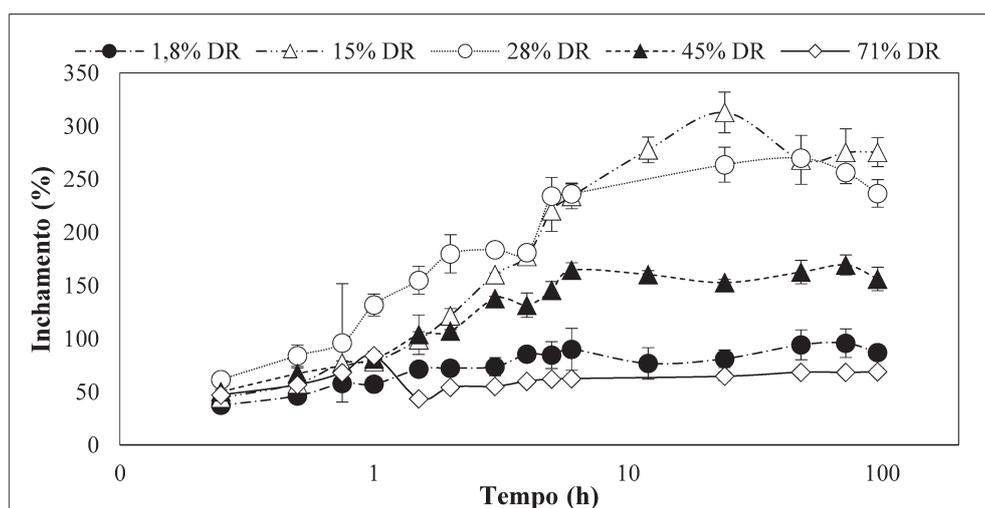
Os resultados apresentados nesta seção indicam novamente a influência das condições de processamento, do tipo de recheio e do teor de amilose no comportamento de absorção de água das partículas. Isto porque as condições operacionais aplicadas (força de cisalhamento e temperatura) atuaram de forma distinta sobre a formulação, promovendo diferentes graus de gelatinização do amido e complexo amilose-lipídio de com diferentes intensidades. Da mesma forma que houve influência durante o processo de extrusão em relação à capacidade de produção das partículas, estes fatores influenciaram também nas características físico-químicas apresentadas até o momento.



A



B



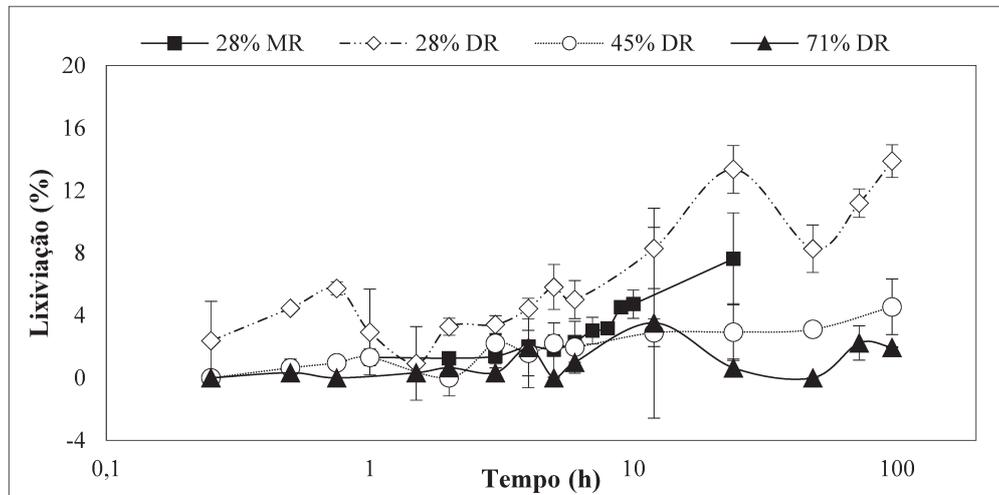
C

Figura 34: Cinéticas de inchamento das partículas produzidas por extrusão termoplástica com diferentes teores de amilose, diferentes tipos de recheio (sem recheio – A, com óleo livre – B e com óleo emulsionado - C) e dois tipos de extrusores (MR: mono-rosca e DR: dupla-rosca)

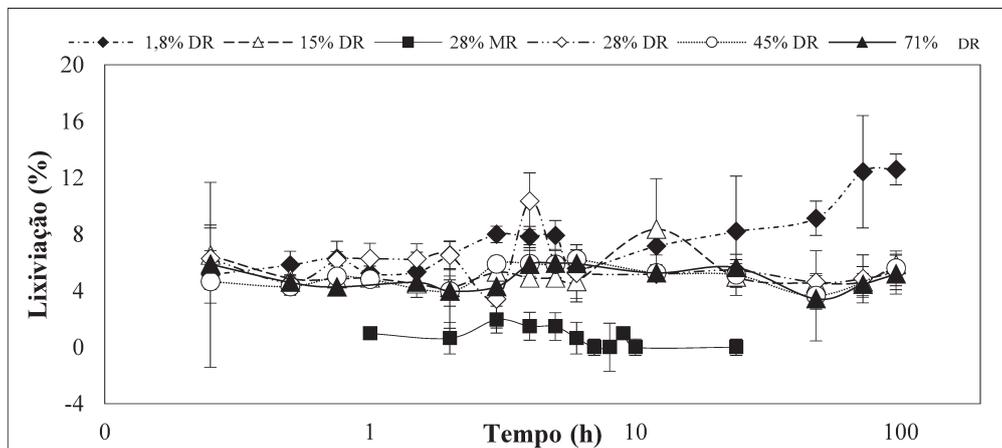
Na Figura 35 é possível conferir as cinéticas de lixiviação das partículas. Para as amostras sem recheio, de maneira semelhante ao observado na cinética de inchamento (Figura 34), quanto maior o teor de amilose, menor a perda de sólidos, independentemente do tipo de extrusor. Entretanto, a lixiviação diferiu do inchamento em relação ao comportamento das curvas, as quais apresentam oscilação entre pontos de máximos e mínimos, sem atingir uma tendência linear ao longo do tempo.

Para as partículas com óleo de tomilho livre, a maior perda de sólidos observada foi para a partícula com o menor teor de amilose. Além disso, o comportamento da curva de lixiviação para a amostra com 1,8% de amilose diferiu das demais amostras, crescendo ao longo do tempo e atingindo lixiviação máxima cerca de 10% maior do que as demais amostras. Relacionando as cinéticas de inchamento e lixiviação da partícula com 1,8% de amilose, pode-se observar que a partícula não incha pois está se desfazendo na água: à medida que o inchamento se torna constante, a lixiviação aumenta. Isto evidencia que ocorreu erosão da amostra com 1,8% de amilose ao entrar em contato com a água. De maneira semelhante como ocorreu na cinética de inchamento, a cinética de lixiviação das partículas com 28% de amilose produzidas em diferentes tipos de extrusores foi diferente, de modo que aquelas produzidas no mono-rosca perderam muito menos sólidos ao longo do tempo do que aquelas produzidas no dupla-rosca. Isto pode ter acontecido porque o processo físico-químico que ocorreu durante a extrusão proporcionou a produção de uma rede complexa diferente entre os dois tipos de extrusores. Outro dado semelhante entre as cinéticas de inchamento e de lixiviação é que a perda máxima de sólidos ocorre nas primeiras 12 h para os teores de amilose entre 15 a 71% da dupla-rosca.

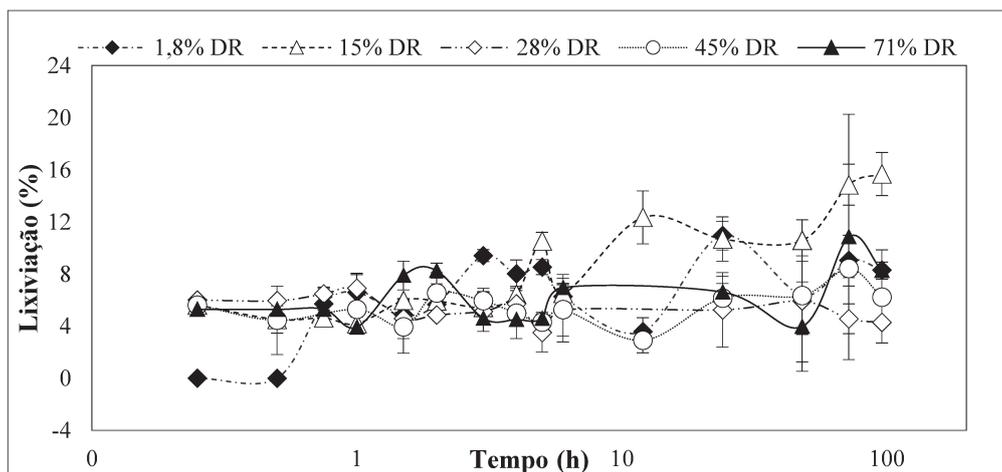
Para as partículas com óleo de tomilho emulsionado, esperava-se que o comportamento da partícula com 1,8% de amilose fosse igual à partícula com óleo livre (erodiu). Entretanto, percebe-se que o amido modificado adicionado para elaboração da emulsão (item 4.3.2) ajudou a diminuir a perda de sólidos durante a imersão das partículas em água, provavelmente porque o amido modificado pode ter ajudado a manter uma estrutura mais compacta em relação à liberação facilitada do óleo durante as reações físico-químicas na extrusão. Maiores detalhes serão discutidos no item 5.3.1.10.



A



B



C

Figura 35: Cinéticas de lixiviação das partículas produzidas por extrusão termoplástica com diferentes teores de amilose, diferentes tipos de recheio (sem recheio – A, com óleo livre – B e com óleo emulsionado - C) e dois tipos de extrusores (MR: mono-rosca e DR: dupla-rosca)

Nos figuras a seguir (Figura 36, Figura 37, Figura 38) é possível verificar a mudança da aparência das partículas ao longo do tempo de imersão em água. Como a partícula com 28% de amilose sem recheio produzida no extrusor dupla-rosca foi a amostra que apresentou maiores inchamento e lixiviação, a cor da partícula ao longo do tempo foi alterada, ficando mais clara (Figura 36). Outro destaque é a aglomeração e a perda de cor das partículas com 1,8% de amilose contendo óleo livre ao longo do tempo (Figura 37), evidenciando a erosão ocorrida. Enquanto que as demais partículas permanecem íntegras, com 1,8% de amilose ocorreu uma desintegração. Ao observar a Figura 38, com 1,8% de amilose e óleo emulsionado há uma tendência de aglomeração das partículas também, mas em menor grau do que como acontece com as partículas com o óleo livre. Isso mostra que o amido modificado adicionado à emulsão ajudou a reter a estrutura das partículas. É possível ressaltar que nas condições testadas (item 4.4.1.5), a quantidade de água não foi suficiente para solubilizar completamente as partículas no tempo avaliado, independentemente do teor de amilose.

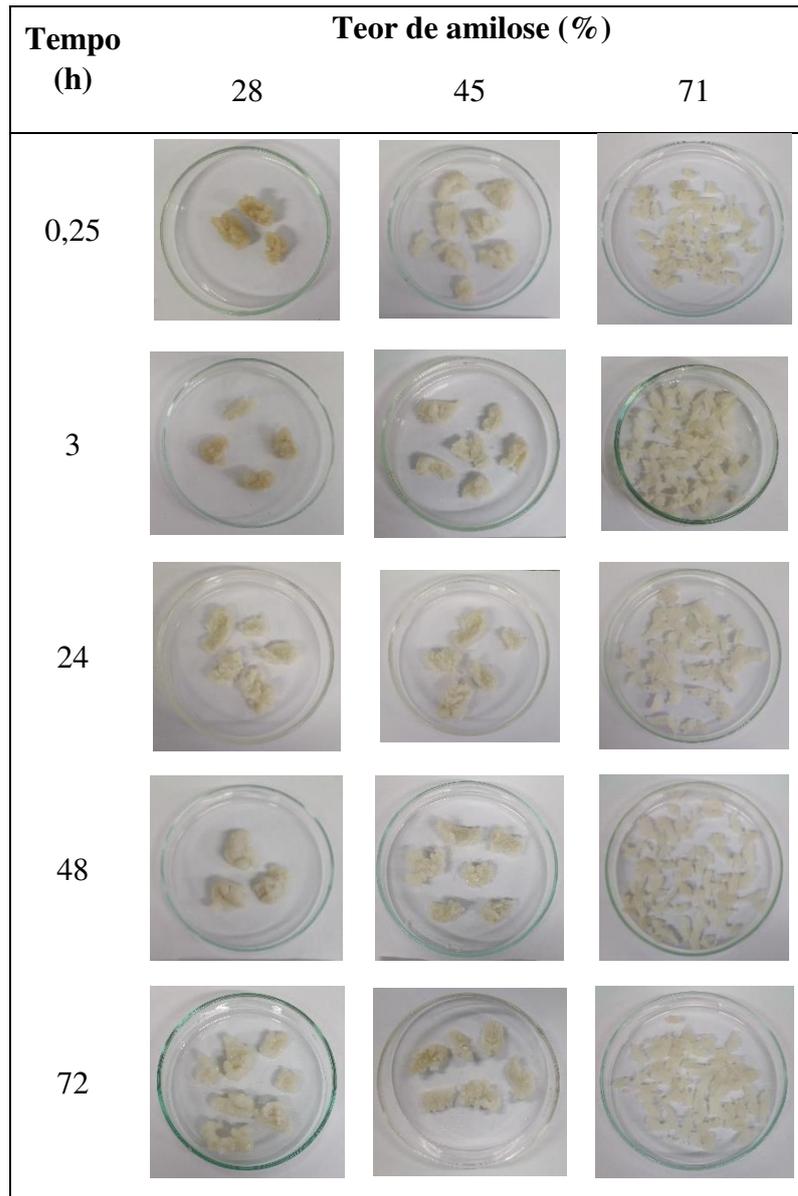


Figura 36: Imagens do inchamento/lixiviação das partículas sem recheio produzidas em extrusor dupla-rosca ao longo do tempo de imersão em água

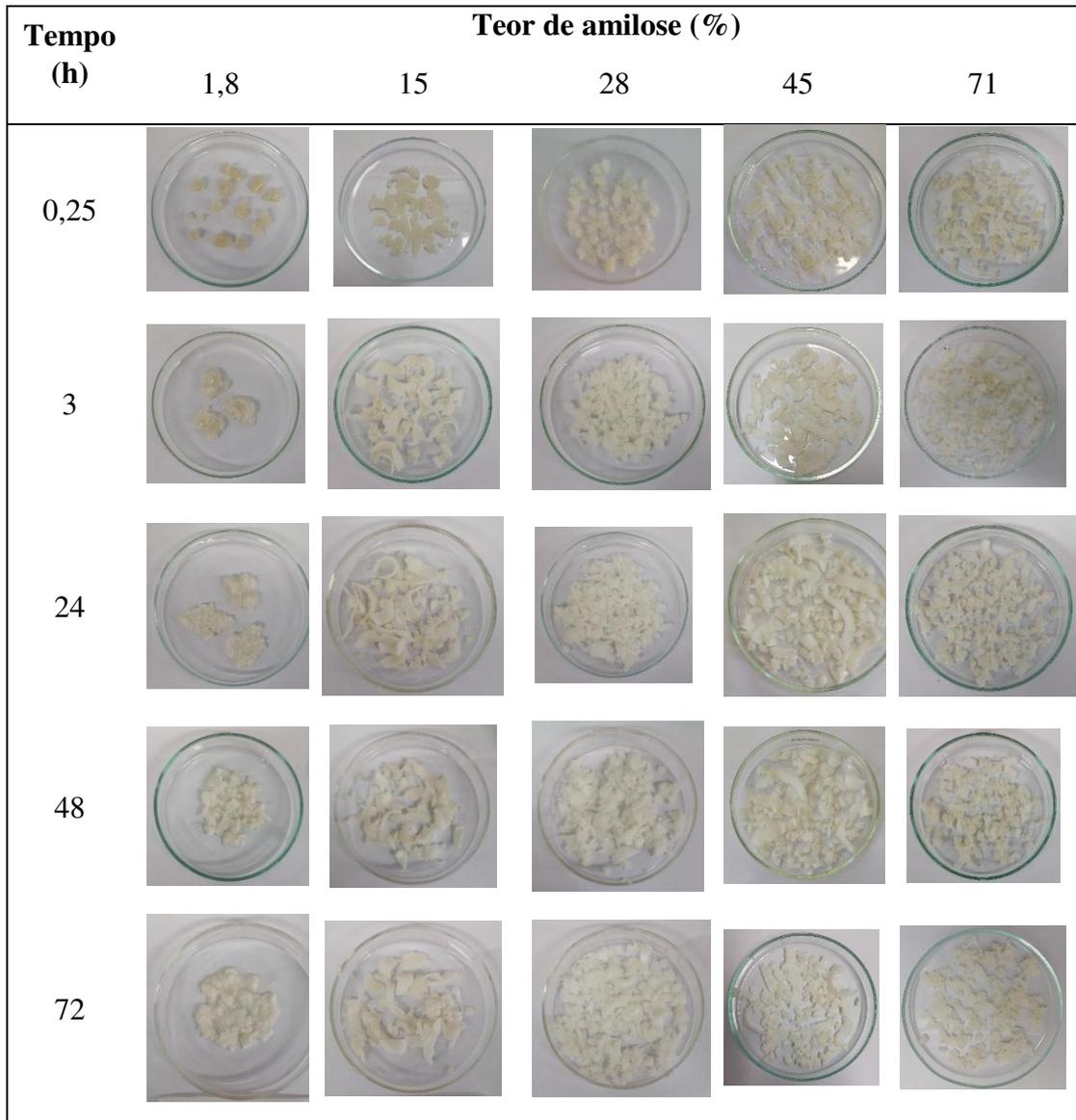


Figura 37: Imagens do inchamento/lixiviação das partículas com óleo livre produzidas em extrusor dupla-rosca ao longo do tempo de imersão em água

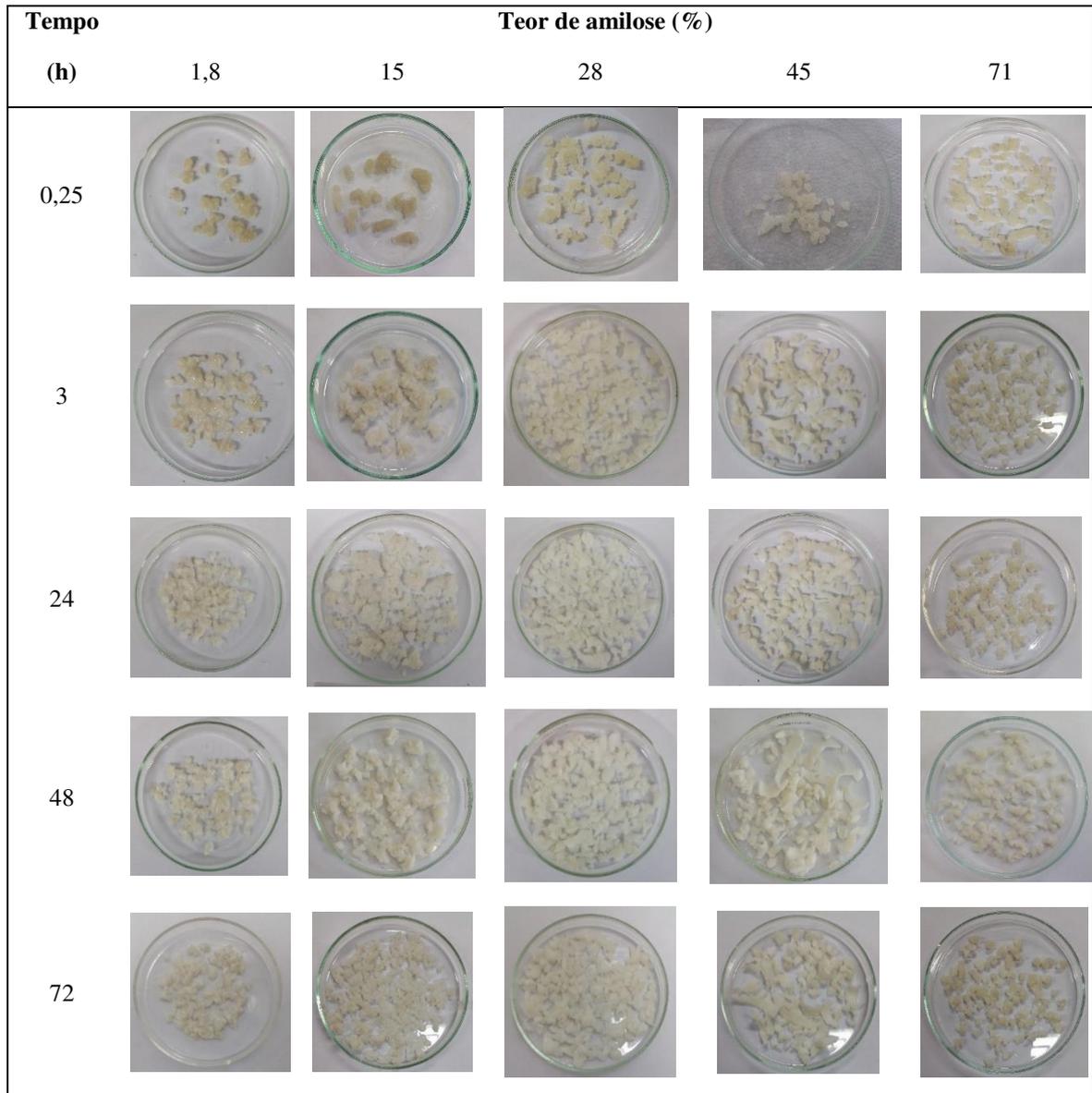


Figura 38: Imagens do inchamento/lixiviação das partículas com óleo emulsionado produzidas em extrusor dupla-rosca ao longo do tempo de imersão em água

Na Figura 39A é possível comparar o inchamento das partículas após a atingir a estabilidade ao longo do tempo (96 h) para diferentes tipos de recheio. É possível verificar que o inchamento máximo é atingido com teores intermediários de amilose (15 e 28%), independentemente do tipo de recheio. Esperava-se que o tipo de recheio não influenciasse na absorção de água, apenas o tipo de amido, mas observa-se que o inchamento segue o seguinte comportamento: sem recheio < óleo emulsionado < óleo livre. Isto ocorre provavelmente devido à interação entre recheio e material de parede, o que pode ter proporcionado diferentes tamanhos de poros na partícula, os quais podem facilitar a hidratação. Este resultado contraria a afirmação de Bhatnagar e Hanna (1994) que informam que amilose e os lipídeos presentes no amido poderiam inibir o inchamento sob condições nas quais o complexo amilose-lipídio são formados e, além disso, que os complexos juntamente com a parte linear do amido (amilose) poderiam formar uma estrutura mais rígida e restringir o inchamento.

Na Figura 39B é possível comparar a lixiviação das partículas após 96 h para diferentes tipos de recheio. De forma análoga para o inchamento, além dos diferentes teores de amilose, o tipo de recheio também influenciou na lixiviação. De modo geral, pode-se concluir que, quanto menor o teor de amilose, maior a lixiviação. A lixiviação segue o seguinte comportamento: sem recheio < óleo livre < óleo emulsionado.

Os resultados de inchamento e lixiviação das partículas são extremamente importantes pois com eles é possível ter uma ideia clara de que a água entra dentro da partícula, sólidos são lixiviados e que, conseqüentemente, óleo vai ser liberado da partícula. Então, mesmo que o logaritmo do coeficiente de partição do metabólito timol seja intermediário (3,17), esses mecanismos favorecem a expulsão do ativo e, conseqüentemente, ocorra a dispersão do timol no meio aquoso e, por fim, atue sobre as larvas do mosquito.

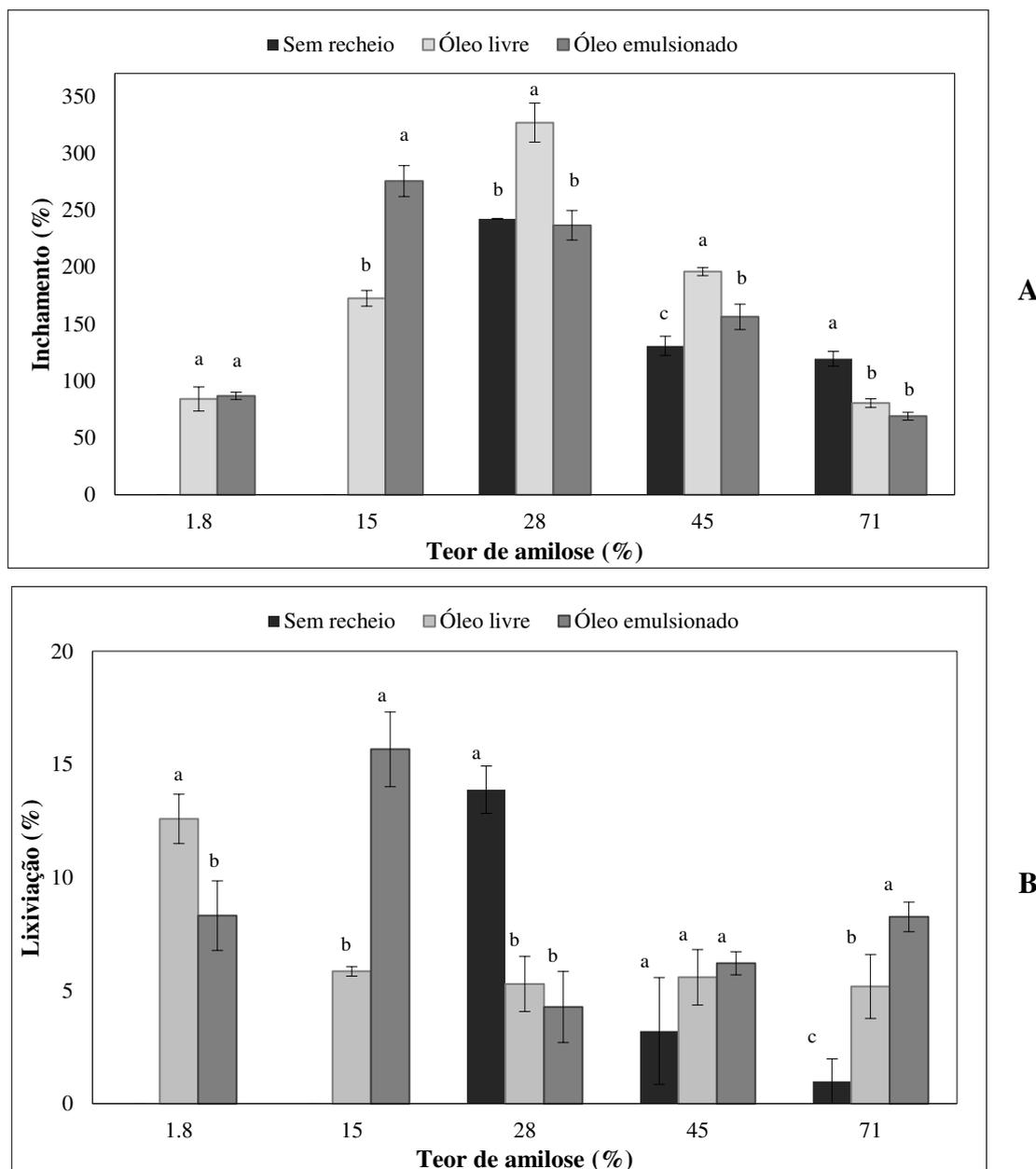


Figura 39: Comparação do inchamento (A) e da lixiviação (B) das partículas produzidas por extrusão termoplástica em extrusor dupla-rosca com diferentes tipos de recheio e teores de amilose após 96 h de imersão em água.

Médias seguidas de mesma letra sobre as barras, em cada teor de amilose avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95% de confiança.

Na literatura são reportadas duas pesquisas com microencapsulação de larvicidas sintéticos e a cinética de inchamento é elucidada. Na primeira deles, Badawy et al. (2015) desenvolveram partículas de quitosana/alginato/gelatina contendo temefós para verificar sua atividade larvicida e também fizeram o estudo da absorção de água das partículas com o ativo e sem o ativo ao longo de 10 dias. Os resultados mostraram que as partículas com temefós

incharam ao redor de 80% entre um a dez dias e mantiveram constante este inchamento ao longo do tempo, enquanto que as partículas sem recheio apresentaram absorção máxima (170%) após 72 h e de depois o inchamento foi diminuindo ao longo do tempo (70%). Os autores concluíram que esta redução no inchamento ocorreu devido a uma formação complexa entre os polímeros com o ativo, reduzindo a porosidade das partículas e, conseqüentemente, a absorção de água. Além disso, a liberação de temefós em modo estático foi crescente durante 7 dias e depois decresceu. Essa liberação gradual e a manutenção do temefós no meio aquoso permitiram um efeito residual contra as larvas durante meses, de modo que com maior quantidade de partícula testada, mais de 60% das larvas morriam após 6 meses de imersão das partículas em água.

Na segunda pesquisa, Lim et al. (2017) produziram partículas contendo imidacloprida por gelificação com alginato/quitosana e verificaram o inchamento em diferentes concentrações de material de parede, pH e temperatura. De modo geral, as partículas apresentaram inchamento máximo de 45% em 200 min em pH 7, a 25°C, com maior concentração de quitosana (25 g L⁻¹) e com menor concentração de alginato (7,5 g L⁻¹).

Desta forma, o inchamento das partículas produzidas por extrusão termoplástica é muito maior do que as partículas produzidas por Badawy et al. (2015) e por Lim et al. (2017), provavelmente devido às diferenças de material de parede, tamanho, interação entre material de parede e recheio. Este mecanismo pode ser relacionado com a liberação de óleo como será discutido no item 5.3.1.12 e pode influenciar fortemente na atividade biológica do sistema carreador desenvolvido.

5.3.1.10. Microscopia eletrônica de varredura

Os resultados de inchamento e lixiviação podem ser explicados com a relação entre material de recheio e de parede, os quais podem ter proporcionado diferentes tamanhos e quantidades de poros às partículas, o que pode facilitar o processo de hidratação. Isto foi evidenciado pela análise de MEV da superfície das partículas apresentada na Figura 40. Para o mesmo teor de amilose (28%), a partícula sem recheio mostrou ser uma massa compacta, com estrutura rígida, com ranhuras e sem poros. A adição de OET permitiu a formação de poros observados nas amostras com 1,8 e 28% de amilose, mas a emulsificação do OET promoveu a

formação de uma camada externa de material de recobrimento que cobriu os poros, o que pode ter dificultado a absorção de água e retenção de sólidos. Por outro lado, para o mesmo tipo de recheio (OET livre) e diferentes teores de amilose, quanto menor o teor de amilose, maior a quantidade de poros na estrutura das partículas, o que facilitou a rápida entrada de água e maior perda de sólidos. Entretanto, a partícula obtida com o maior teor de amilose revelou uma estrutura compacta e laminar, formada pelas cadeias de amilose devido à maior ordenação da estrutura cristalina como observado na análise de DRX na seção 5.3.1.8, sendo responsável pelos inchamento e lixiviação pouco expressivos da formulação e a presença de gotículas de óleo sob a superfície laminar (Figura 39).

Uma observação a ser feita sobre a partícula com 1,8% de amilose e óleo livre como recheio pode apresentar além da maior quantidade de poros, uma quantidade significativa de óleo em sua superfície como foi observado na pesquisa desenvolvida por Quillet, Taschi e Ubbink (2001). Isto poderia levar a menores eficiência de encapsulação e menor atividade biológica, pois o composto ativo não estaria protegido, apesar da maior quantificação de óleo liberado como serão discutidos nas seções a seguir.

Outra correlação é possível ser feita entre MEV e índice de expansão: durante o processo de extrusão com 1,8% de amilose, bolsas de gás foram formadas, evidenciando um maior *IE* (Tabela 14) e a estrutura porosa obtida (Figura 40).

A análise de MEV poderia ter sido realizada após as partículas serem partidas ao meio para verificar a estrutura interna, mas elas eram extremamente duras devido à gelatinização do amido e um simples corte com lâmina não seria suficiente. Além disso, o processo de trituração ou maceração para tal, poderia não evidenciar a sua real estrutura. Por exemplo, a amostra com 1,8% apresentou estrutura muito frágil e se quebrava facilmente como descrito na seção 5.2 e os poros poderiam não estar visíveis nesta condição. A alternativa seria o congelamento prévio e posterior fratura da partícula. Mas seria muito interessante fazer a análise de MEV após atingir o tempo de equilíbrio de inchamento para verificar a formação de caminhos preferenciais na estrutura, dependendo da aproximação do equipamento e do preparo da amostra, visto que ela não pode estar úmida. Essa metodologia foi aplicada por Gasmi et al. (2015).

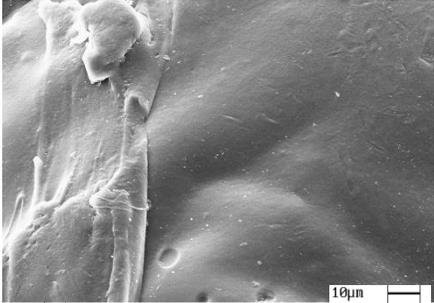
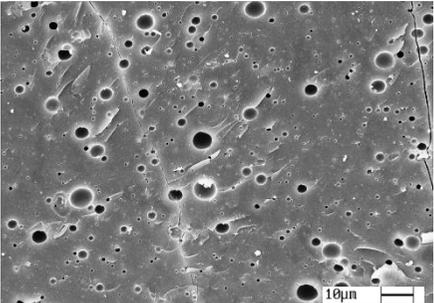
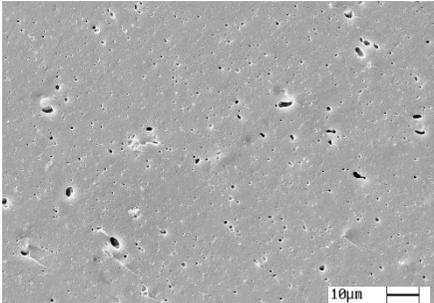
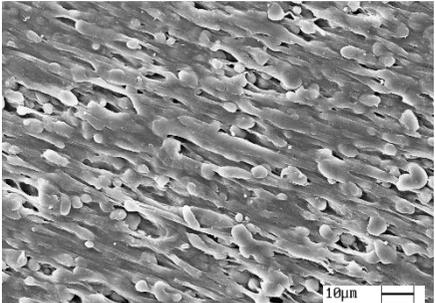
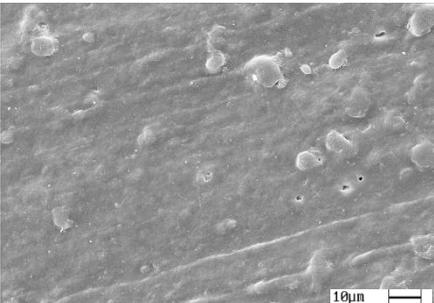
Tipo de recheio	Teor de amilose (%)		
	1,8	28	71
Sem recheio			
Óleo livre			
Óleo emulsionado			

Figura 40: Microscopia eletrônica de varredura da superfície das partículas produzidas por extrusão termoplástica com diferentes tipos de recheio e teores de amilose para amostras selecionadas produzidas em extrusor dupla-rosca.

5.3.1.11. Eficiência de encapsulação

Determinar a eficiência de encapsulação (*EE*) das partículas foi a etapa mais difícil de todo o procedimento experimental, pois tratou-se de um sistema complexo e nenhum trabalho foi encontrado para servir como base experimental na caracterização do sistema carreador produzido. O desafio consistiu em desenvolver uma metodologia nova. Para isso, seria necessário dissolver totalmente a partícula com um solvente que reagisse apenas com o material de parede (amido) e não consumisse o composto ativo (óleo de tomilho) para saber a quantidade total de óleo presente na amostra. Além disso, a dissolução da partícula deveria ocorrer sem aquecimento para evitar volatilização e degradação do ativo.

Desta forma, os seguintes solventes foram testados: etanol, água, diclorometano, solução aquosa de Tween-20 e solução de citrato de sódio. Mesmo macerando em almofariz a partícula ou agitando durante horas em agitador magnético, a dissolução do material de parede não ocorreu com tais solventes. Então foi utilizado, separadamente, dimetilsulfóxido e solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,2 mol L⁻¹ (pH 9) durante algumas horas e estes dois solventes conseguiram solubilizar o amido. Entretanto, o óleo não encapsulado foi submetido ao mesmo tratamento e ao ser analisado por cromatografia gasosa, o conteúdo de timol estava inferior (dados não mostrados) ao comparar com o óleo puro, indicando que houve reação química, provavelmente saponificação.

Resumidamente, a metodologia utilizada para preparar a amostra para a análise cromatográfica citada consistia em inserir 0,5 g de partícula em 10 mL de solução de NaOH, agitar por algumas horas, retirar uma alíquota de 1 mL e particionar com 1 mL de diclorometano para extrair a fase apolar, três vezes seguidas, secar com algumas gramas de sulfato de sódio, evaporar o diclorometano em evaporador rotativo sem aquecimento, ressuspender em diclorometano e injetar no cromatógrafo. A área do pico referente ao timol era comparada com a curva do padrão (item 4.2.2.3.2). Este método de isolamento do timol foi trabalhoso, com muitas etapas, além disso perdas estavam ocorrendo durante o processo e, conseqüentemente, a quantificação estava errada.

Então, a metodologia foi alterada de cromatografia gasosa para espectrofotometria para quantificação de CFT, principalmente porque o tomilho é uma excelente fonte de tais compostos como foi discutido no item 5.1.2. Além disso, foi constatado que dissolver a

partícula não seria a melhor opção. Como a atividade biológica foi testada com água pura, o ideal é que a quantificação ocorresse em meio aquoso e em pH neutro (habitat das larvas). Novos testes foram realizados para determinar o tempo ideal de quantificação e a influência da renovação do solvente para forçar a saída máxima de óleo da partícula por transferência de massa, pois em um determinado volume ocorre a saturação da solução ao longo do tempo, pois as partículas em sua maioria não se dissolvem por completo ao entrar em contato com a água. A gelatinização do amido promoveu a formação de uma estrutura firme para a maioria das formulações, que não se dissolve rapidamente e por completo, mas gradualmente de acordo com os mecanismos de inchamento e de lixiviação específicos para cada formulação. Além disso, uma maceração física durante o procedimento experimental talvez não fosse suficiente para aumentar a liberação de CFT, uma vez que houve a complexação química entre amilose e OET. Sendo assim, uma alternativa bioquímica específica como a utilização de amilase poderia trazer melhores resultados.

Na Tabela 16 é possível conferir a eficiência de encapsulação (*EE*) das partículas. A carga (*load* teórico) de óleo foi de 0,05 g de óleo/g partícula, considerado o teor máximo de óleo ideal a ser adicionado na extrusão (CHANG; SCHMIELE; MARTÍNEZ-BUSTOS, 2010) e o método de detecção foi por CFT, visto que o óleo de tomilho é uma importante fonte de polifenóis (item 5.1.2). De modo geral, a *EE* variou entre 48 – 69%, significando que em torno de 0,02 a 0,03 g óleo/g partícula foram quantificados. A emulsificação do óleo de tomilho não foi favorável para a *EE*, visto que para as partículas produzidas com OET pré-emulsionado foi menor do que com as partículas produzidas com o óleo livre. Isto ocorreu porque uma barreira física extra formada por material de emulsificação deveria ser ultrapassada para que o OET fosse liberado e a quantificação dos CFT fosse possível.

Apesar do óleo de tomilho ser um óleo essencial e que volatilize facilmente, o processo de microencapsulação, que operou a temperatura elevada (máximo de 100°C conforme item 4.3.5.2), conseguiu manter o óleo aprisionado na matriz de amido devido às altas *EE*. Em relação à aplicação do sistema particulado, isto permitirá que o óleo seja liberado no momento mais adequado, isto é, quando a partícula for imersa em água contendo as larvas, tendo sido até o momento o óleo preservado na matriz polimérica. Essa preservação da atividade biológica do OET será discutida no item 5.3.1.12.

Tabela 16: Eficiência de Encapsulação (*EE*) das partículas produzidas por extrusão termoplástica com diferentes teores de amilose e em diferentes extrusores [MR (mono-rosca) e DR (dupla-rosca)]

Tipo de recheio	Teor de amilose (%)	Extrusor	EE (%)
Óleo livre	1,8	DR	60,5 ± 0,9 ^{abc}
	15	DR	69,1 ± 0,8 ^a
	28	MR	48,7 ± 0,8 ^d
	28	DR	69,1 ± 0,6 ^a
	45	DR	68,2 ± 2,4 ^{ab}
	71	DR	58,6 ± 1,4 ^{bc}
Óleo emulsionado	1,8	DR	59,4 ± 6,9 ^{bc}
	15	DR	53,7 ± 0,2 ^{cd}
	28	DR	59,8 ± 2,5 ^{abc}
	45	DR	57,9 ± 0,5 ^{cd}
	71	DR	53,7 ± 1,3 ^{cd}

Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de significância.

Uma observação a ser feita é sobre a temperatura de volatilização dos materiais envolvidos durante o processo de produção das partículas. A temperatura máxima de 100°C foi aplicada no extrusor com o intuito de evitar a degradação dos voláteis. Em seguida, as partículas foram desidratadas em estufa entre 60 – 80°C dependendo do tipo de extrusor por um longo período, com o objetivo de evaporar o vapor de água formado na superfície das partículas ao final da extrusão. No processo de determinação da umidade das partículas, a temperatura aplicada foi 105°C. O aquecimento e o cisalhamento das matérias-primas durante a extrusão promoveram o aprisionamento do OET na matriz, a formação do complexo amilose-lipídio e a gelatinização do amido. Desta forma, o composto ativo já estava protegido e a desidratação não afetaria tanto a degradação do OET. A pressão de vapor do material de recheio pode favorecer a sua retenção no material de parede (AZEREDO, 2005). Uma informação que corrobora esta informação é a pressão de vapor do metabólito timol e da água. Aproximando-se a temperatura de 105°C para 127°C (equivalente a 400K), de acordo com Stull (1947), a 400K a pressão de vapor do timol é 0,032 bar e a pressão de vapor da água é 2,3 bar, ou seja, a tendência é que a água volatilize mais do que o timol. Entretanto, de forma ideal, teria sido melhor a utilização de estufa à vácuo no processo de desidratação e determinação do teor de umidade.

Como a metodologia utilizada consistiu em estagnar a amostra em meio aquoso e, assim, remover todos os CFT possíveis a partir da renovação de solvente em intervalos de tempo determinados, é possível verificar na Figura 41 a exaustão das amostras em água a 25°C, o que foi evidenciado pelo alcance do limite de detecção da curva do padrão de ácido gálico. O comportamento entre as curvas de cinética de liberação de CFT foi semelhante para os diferentes teores de amilose, independentemente do tipo de recheio, com exceção das formulações com 1,8% de amilose, as quais liberaram maior teor de CFT inicialmente devido à maior lixiviação (Figura 35B), mas atingiram a exaustão mais rapidamente (Figura 41). É importante destacar que para atingir a esgotamento das amostras, o tempo necessário foi análogo ao tempo de inchamento máximo das partículas (superior a 12 h) conforme a Figura 34.

Observando a Figura 41 é possível concluir que em relação ao metabólito ativo, o coeficiente de partição limita a quantidade que ele pode estar disponível em meio aquoso. O comportamento de liberação das partículas é sustentado, uma vez que o timol é hidrofóbico. Seu coeficiente de partição ($\log P = 3,17$) impõe limitações termodinâmicas para que ele não deixe completamente a fase sólida e por isso é necessário renovar o solvente em intervalos de tempo para aumentar o gradiente de concentração e, conseqüentemente, aumentar a difusão do soluto.

É importante frisar que todos CFT detectados são provenientes do óleo de tomilho, visto que não foram detectados CFT nos amidos de milho puros.

A partir da exaustão da amostra, o teor de CFT foi obtido pelo somatório de CFT quantificados em cada intervalo de tempo (item 4.4.1.12) e o total foi comparado ao máximo apresentado pelo óleo de tomilho não encapsulado (item 5.1.2). A quantidade de óleo presente em cada partícula foi utilizada para determinar o percentual em massa de óleo liberado em uma mesma alíquota de solvente, cujo resultado será apresentado no item 5.3.1.12.

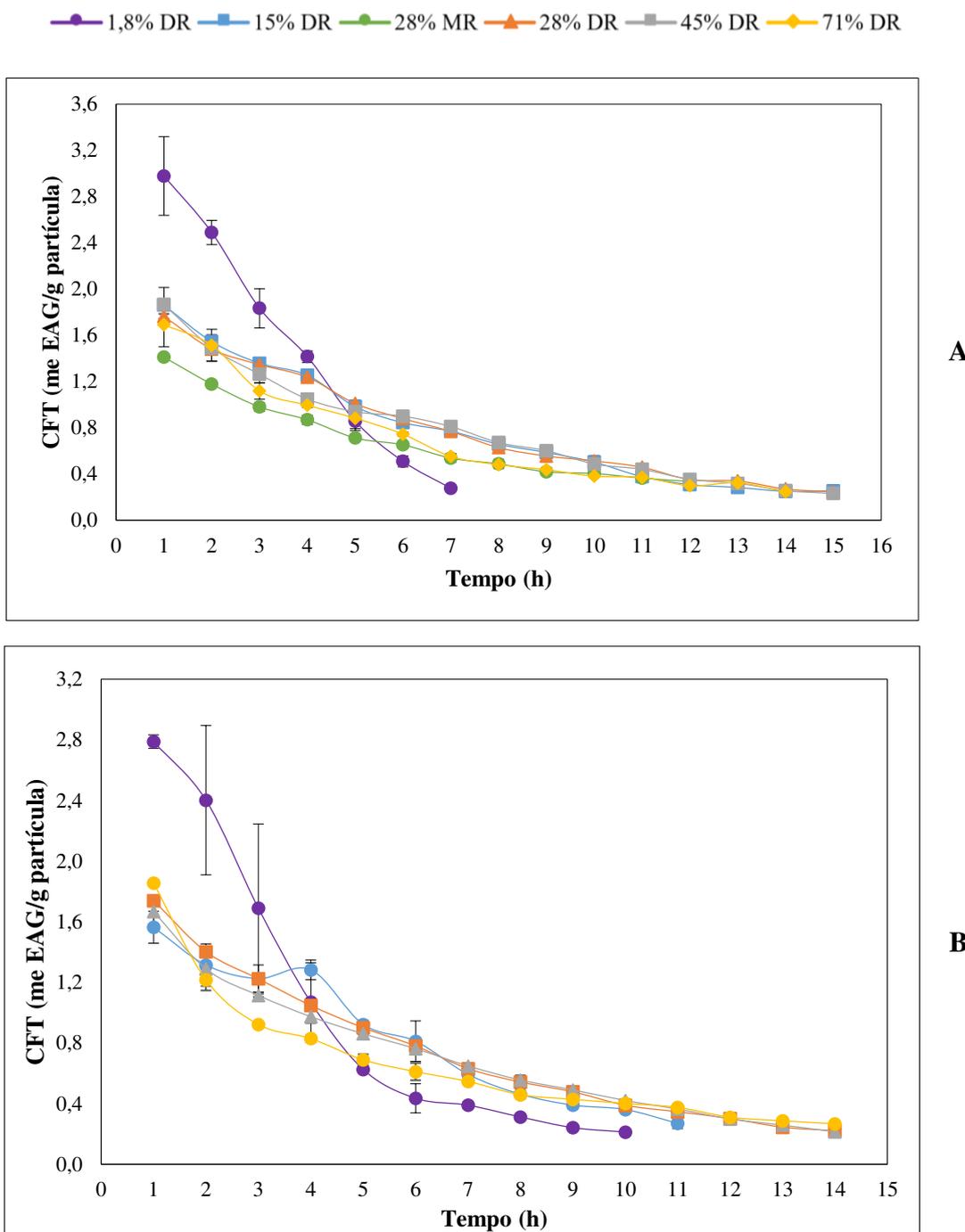


Figura 41: Liberação de compostos fenólicos totais das partículas produzidas por extrusão termoplástica com diferentes teores de amilose, diferentes tipos de recheio (com óleo livre – A e com óleo emulsionado - B) e dois tipos de extrusores (MR: mono-roscas e DR: dupla-roscas)

5.3.1.12. Cinética de liberação de óleo

Na Figura 42A é apresentada a cinética de liberação de óleo das partículas contendo OET livre. Para as amostras com óleo livre como recheio, a formulação com 1,8% de amilose apresentou a maior liberação de OET (~47%), provavelmente devido a maior lixiviação (Figura 35B). As demais partículas apresentaram um comportamento de liberação semelhante, com uma diferença para a partícula com 28% de amilose produzida em extrusor mono-rosca e para a partícula com 71% de amilose, as quais apresentaram uma liberação um pouco maior a partir de 24 h. Apesar do menor teor de amilose permitir maior liberação, o sistema não conseguiu manter uma liberação controlada, ou seja, constante ao longo do tempo, havendo redução da liberação após 48 h e provável menor proteção ao OET, permitindo sua volatilização. As demais amostras conseguiram manter constante a liberação (~18%), o que é interessante para manter a atividade biológica do sistema (efeito residual). É possível verificar que a liberação das partículas com 28% de amilose produzidas em extrusores distintos foi diferente entre as amostras, sendo que a partícula produzida em extrusor dupla-rosca apresentou menor liberação do que aquela produzida em extrusor mono-rosca. Isto pode ter ocorrido devido às diferenças durante o processamento que podem ocasionar alguns fatores que influenciam na liberação do ativo previamente citados na Tabela 7, tais como: teor de umidade, grau de gelatinização e, conseqüentemente, grau de mobilidade molecular, distribuição do ativo no polímero, formação do complexo amilose-lipídio. Tais fatores podem ser estendidos às diferenças entre os mecanismos de inchamento e lixiviação também distintos entre as amostras.

De um modo geral, para as partículas com óleo emulsionado como recheio Figura 42B, a liberação de óleo foi menor, mas semelhantemente ao ocorrido com óleo livre, a amostra com 1,8% de amilose apresentou maior liberação (~23%), com redução acentuada da concentração ao longo do tempo. A redução da liberação ao longo do tempo também é observada para as amostras com 15 e 45% de amilose a partir de 48 h. Um comportamento diferenciado foi apresentado pela partícula com 71% de amilose: aumento relevante da liberação a partir de 24 h (~19%), indicando uma necessidade de maior tempo para a difusão do óleo de tomilho em meio aquoso para esta formulação.

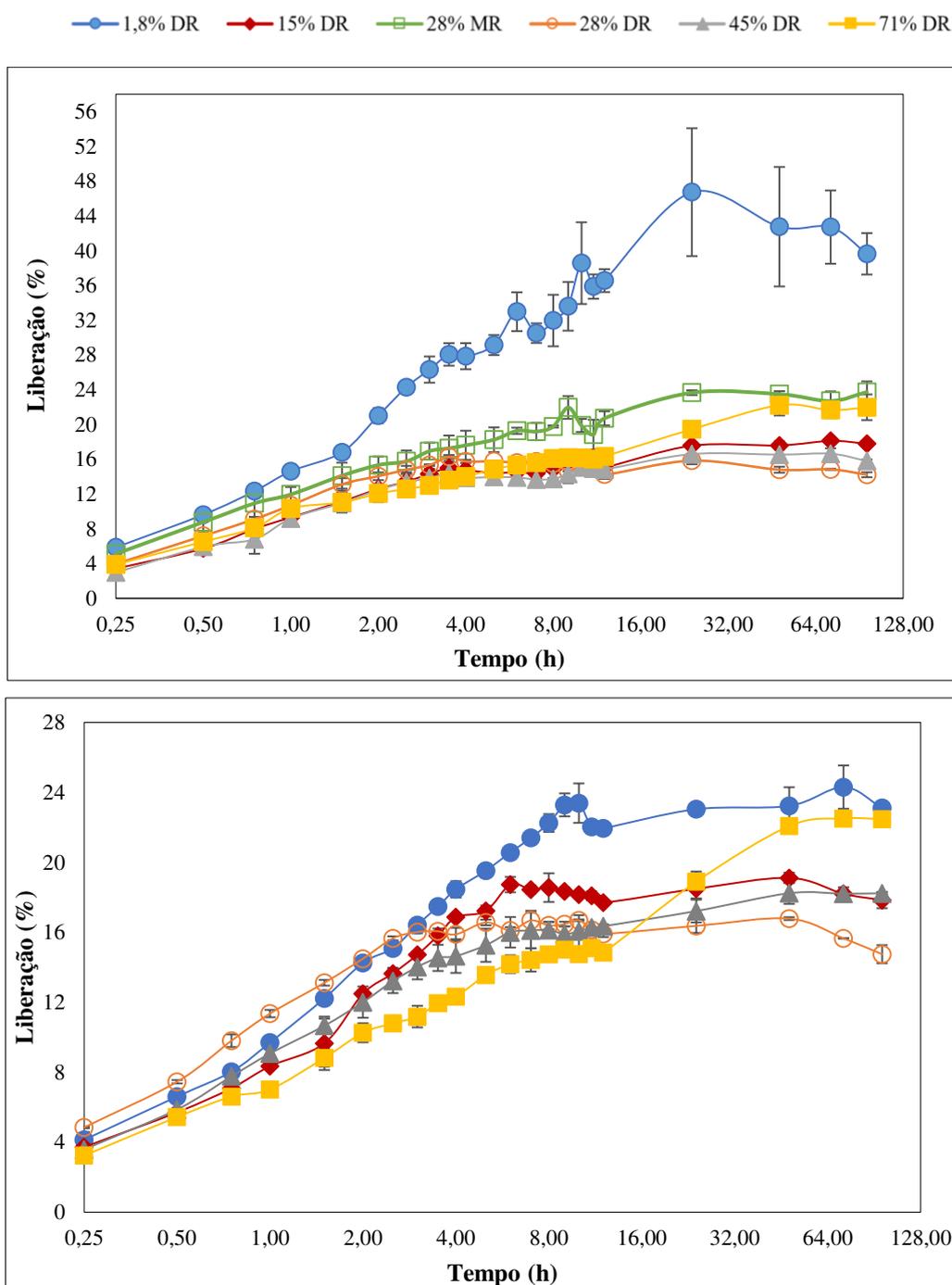


Figura 42: Cinéticas de liberação de óleo das partículas produzidas por extrusão termoplástica com diferentes teores de amilose e tipos de recheio (com óleo livre – A e com óleo emulsionado - B).

Para nenhuma formulação foi possível obter 100% de liberação, devido à hidrofobicidade do OET e à complexação do mesmo na cadeia de amilose. Mas isso não interferiu na atividade biológica como será discutido no item 5.3.2, pois a melhor formulação foi capaz de fazer uma liberação controlada, protegendo o composto ativo e liberando-o em concentração suficiente

para o objetivo almejado. Será observado mais adiante também que maior liberação não é indicativo de maior atividade larvicida. Entretanto, como nem todo óleo foi liberado do sistema particulado, a redução da carga da partícula é um parâmetro a ser pensado em trabalhos futuros.

Em geral, os mecanismos envolvidos ao imergir a partícula na água são:

1) A difusão do soluto: dispersão do óleo do centro da partícula para a superfície da partícula e da extremidade da partícula para a água;

2) O inchamento: saída do óleo pelo aumento dos poros do amido e expulsão do óleo de dentro da partícula devido à entrada de água;

3) A lixiviação: perda de sólidos pela solubilização do amido na água; a lixiviação fragiliza a estrutura da partícula, favorecendo a saída do composto ativo;

4) A erosão: dissolução parcial do amido na água dependendo do teor de amilose.

A hipótese dos gatilhos de liberação do óleo é apresentada na Figura 43. Os mecanismos ocorrem simultaneamente e a perda da cor amarela indica a lixiviação dos sólidos, a hidratação permite a abertura dos poros para liberação do óleo contido mais no centro da partícula e aumento do tamanho da matriz que aumenta o espaço a ser percorrido para atingir a superfície da partícula e o óleo emulsionado apresenta uma camada extra promovida pelo emulsificante.

Os resultados de inchamento, lixiviação e liberação indicam que a emulsificação do óleo com amido modificado antes da extrusão termoplástica favoreceu a formação de uma camada adicional em torno das moléculas de óleo. Conseqüentemente, ao ser liberado, o óleo saiu na forma de emulsão, e uma barreira a mais teria de ser ultrapassada para que o óleo fosse liberado da partícula. Este resultado pode influenciar negativamente a atividade biológica do sistema, visto que existe um período ideal para que a larva do mosquito seja eliminada, isto é, antes de se tornar mosquito adulto. Caso esta formulação seja escolhida para desenvolver outros sistemas particulados, seria interessante verificar a atividade larvicida do óleo pré-emulsionado também.

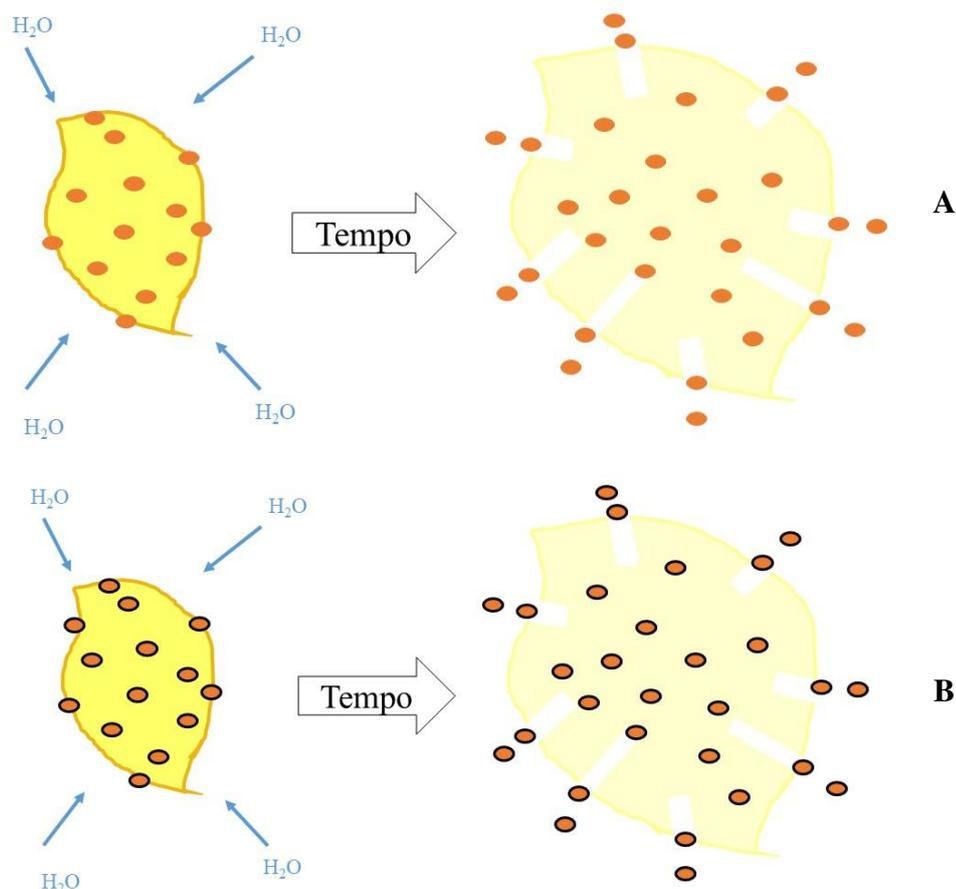


Figura 43: Esquema da hipótese dos mecanismos envolvidos na liberação de óleo das partículas produzidas por extrusão termoplástica contendo óleo de tomilho livre (A) e emulsionado (B).

5.3.1.13. Correlação entre inchamento, lixiviação e liberação

Na Tabela 17 é possível verificar a correlação entre as variáveis inchamento e liberação, bem como entre lixiviação e liberação de óleo das partículas.

O coeficiente de correlação Pearson varia de -1 (relação negativa) a +1 (relação positiva). Quanto mais perto de 1 (independente do sinal) maior é o grau de dependência estatística linear entre as variáveis. Por outro lado, quanto mais próximo de zero, menor é a força dessa relação (FIGUEIREDO FILHO; SILVA JÚNIOR, 2009). Desta forma, há uma classificação para os valores dos coeficientes: 0 a 0,19 a correlação é muito fraca; 0,20 a 0,39 a correlação é fraca; 0,40 a 0,69 a correlação é moderada; 0,70 a 0,89 a correlação é forte; 0,90 a 1 a correlação é muito forte.

Os coeficientes de Pearson entre inchamento e liberação estão entre 0,70 a 0,98, indicando uma correlação positiva e forte a muito forte. Entretanto, entre lixiviação e liberação os coeficientes estão entre -0,53 a 0,69, indicando que dependendo da formulação, a correlação é negativa, nula ou positiva e de muito fraca a moderada. As partículas com 45% de amilose, independentemente do tipo de recheio, apresentaram os maiores coeficientes de Pearson. As partículas com 28% de amilose, independentemente do tipo de recheio e do tipo de extrusor, apresentaram correlação negativa entre lixiviação e liberação.

Tabela 17: Correlação de Pearson entre as variáveis: inchamento e lixiviação com liberação de óleo de tomilho das partículas produzidas por extrusão termoplástica

Tipo de recheio	Teor de amilose (%)	Extrusor	Coeficiente da correlação de Pearson	
			Inchamento e Liberação	Lixiviação e Liberação
Óleo livre	1,8	DR	0,8186	0,6934
	15	DR	0,9288	0,1695
	28	MR	0,8138	-0,0584
	28	DR	0,9321	-0,4326
	45	DR	0,9824	0,2876
	71	DR	0,7524	0,0686
Óleo emulsionado	1,8	DR	0,9045	0,3920
	15	DR	0,9301	0,7017
	28	DR	0,8978	-0,5349
	45	DR	0,9720	0,3926
	71	DR	0,7079	0,3667

De modo geral, as partículas apresentaram teor de sólidos lixiviados entre 5 a 16% em média conforme a Figura 39. Ao comparar os valores de lixiviação com os coeficientes de Pearson entre lixiviação e liberação, observa-se que as partículas que apresentaram os maiores coeficientes de Pearson são as mesmas que apresentaram lixiviação mais expressiva. Isto pode ter ocorrido devido aos diferentes graus de gelatinização do amido devido às diferenças entre as formulações, sendo que o amido com sua estrutura modificada quimicamente apresenta

comportamentos distintos de inchamento e lixiviação. As amostras que lixiviam em torno de 5 a 8%, os coeficientes de Pearson variam entre positivos e negativos, com módulos distintos.

O mecanismo de liberação do composto ativo a partir de matrizes contendo polímeros que incham ou erodem é muito complexo e não é completamente compreendido. Alguns sistemas podem ser classificados como puramente difusivos ou controlados apenas por erosão, enquanto a maioria dos sistemas exibe uma combinação desses mecanismos (LAMOUDI; CHAUMEIL; DAOUD, 2016). Sendo assim, não é porque a correlação de Pearson entre lixiviação e liberação foi fraca que a erosão não influencia na liberação do sistema particulado produzido. As constantes dos modelos matemáticos ajudam a entender um pouco mais sobre os mecanismos predominantes ou a ação simultânea deles, como será apresentado na seção 5.3.1.14.1.

Na Figura 44 são mostrados os gráficos das correlações entre as variáveis estudadas. É possível observar que dependendo do teor de amilose e do tipo de recheio, a correlação é positiva ou negativa, linear ou não, ou nula.

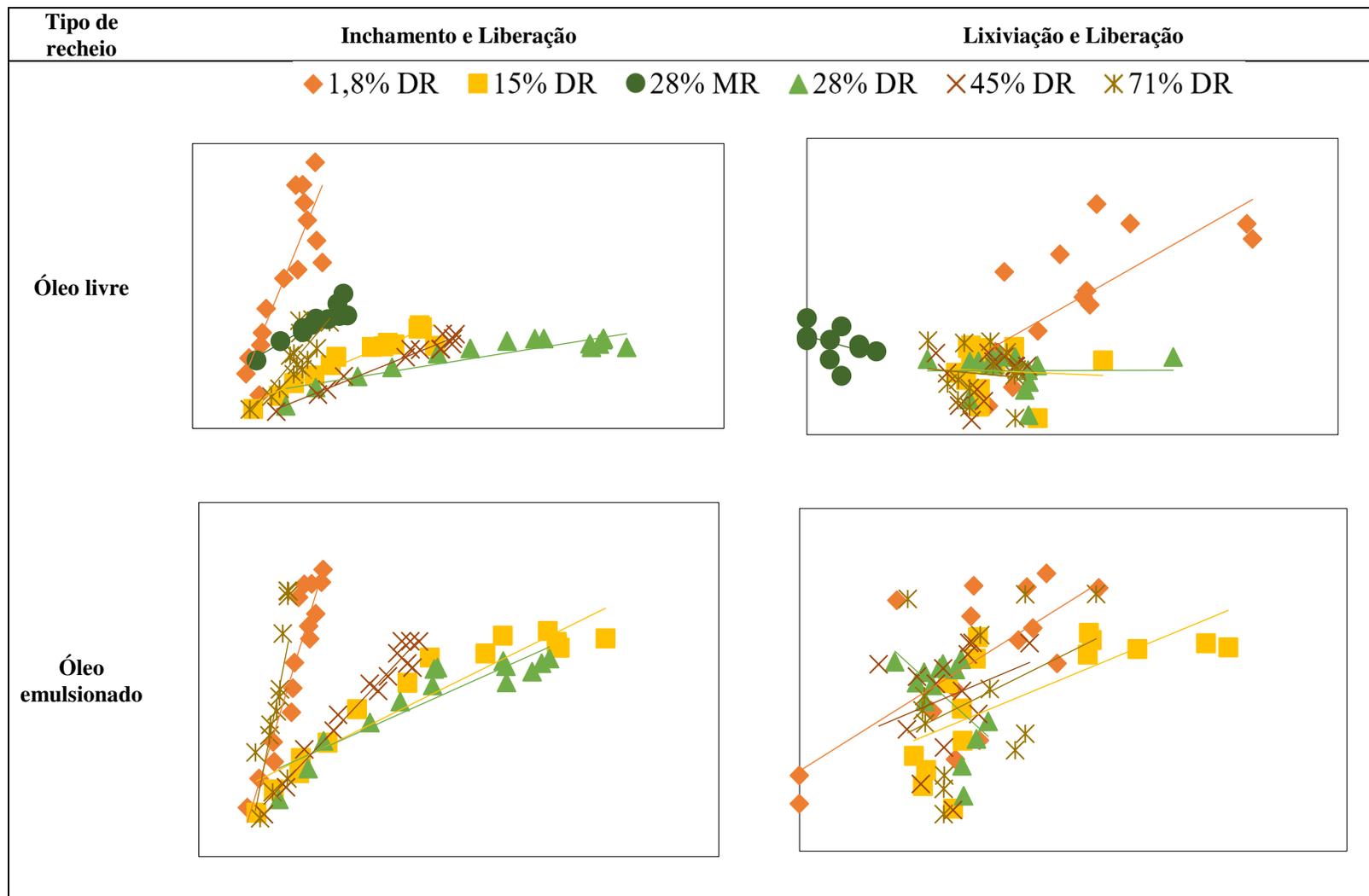


Figura 44: Correlações entre as variáveis inchamento/liberação e lixiviação/liberação para as partículas produzidas por extrusão termoplástica com diferentes teores de amilose, tipos de recheio e extrusores [Mono-roasca (MR) e Dupla-roasca (DR)]

A Figura 45 apresenta um exemplo da correlação entre as variáveis estudadas (inchamento, liberação e lixiviação) da partícula com 15% de amilose. Graficamente é possível verificar que a liberação e o inchamento se sobrepõem, principalmente nas primeiras horas de imersão em água, ao contrário da lixiviação, o que corrobora os dados da Tabela 17. Isto implica dizer que a cinética de inchamento da partícula é um mecanismo que pode ser fortemente utilizado para prever a liberação de óleo da partícula. Salienta-se a importância de realizar a modelagem matemática de liberação de óleo das diferentes partículas e verificar qual modelo se ajusta melhor aos dados experimentais e, devido à correlação positiva e linear aqui observada, que inclua a variação do diâmetro da partícula devido a absorção de água e lixiviação de sólidos ao longo do tempo.

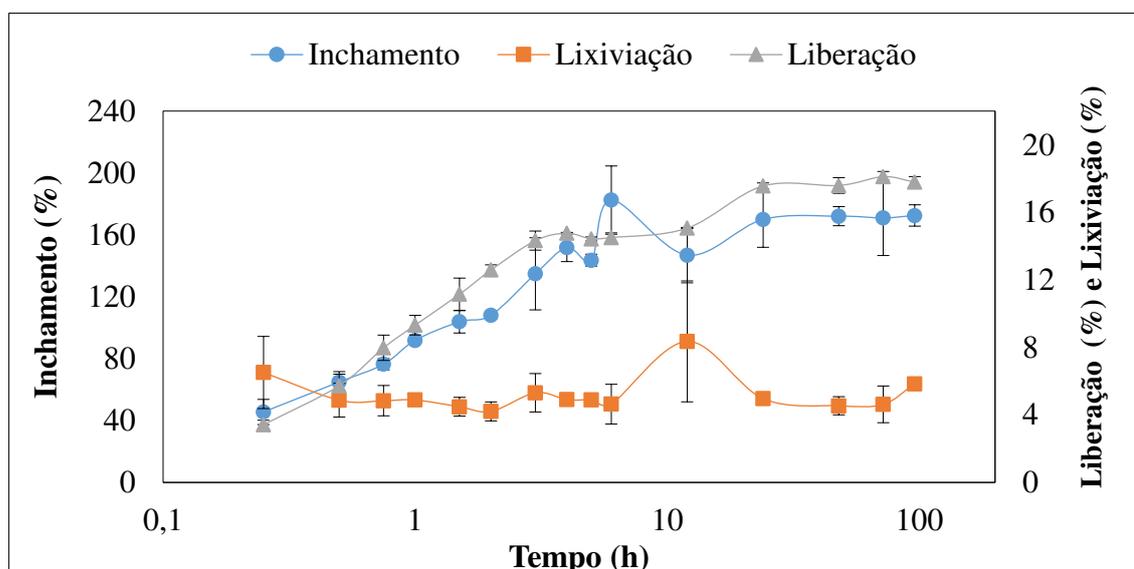


Figura 45: Comparação das cinéticas de inchamento, liberação de óleo e lixiviação das partículas produzidas por extrusão termoplástica com óleo de tomilho livre com 15% de amilose em extrusor dupla-rosca.

5.3.1.14. Modelagem matemática

5.3.1.14.1. Modelagem da liberação de óleo

A transferência de massa do composto ativo depende de inúmeros aspectos (Tabela 7), sendo que dependendo do tipo de formulação, diferentes comportamentos de liberação foram obtidos, uma vez que cada partícula pode ter apresentado uma acomodação matricial distinta, resultando em diferentes perfis de liberação. Os casos envolvidos na transferência de massa

podem ser classificados e são definidos pelo valor do expoente n , que caracteriza os mecanismos envolvidos na liberação, dos modelos Exponencial (Equação 24) e de Weibull (Equação 25). Os casos são:

➤ Caso I ou difusão Fickiana: a taxa de difusão é muito menor que a de relaxamento da matriz polimérica. Os sistemas que seguem esse tipo de mecanismo são descritos pelo parâmetro coeficiente de difusão e apresentam o parâmetro exponencial $n = 0,5$ (DASH et al., 2010; TALÓN et al., 2017);

➤ Caso II ou difusão *quasi*-Fickiana: a velocidade de difusão é muito maior do que o processo de relaxamento da matriz polimérica e apresentam $n < 0,5$ [classificação de Talón et al. (2017)] e $n = 0,89$ [classificação de Dash et al. (2010)]. Este tipo de mecanismo está envolvido com estresses e transição de estado em polímeros vítreos hidrofílicos, que incham em água (PRAJAPATI et al., 2012);

➤ Super Caso II: mais de um mecanismo pode estar envolvido na cinética de liberação, isto é, ocorre a contribuição simultânea de processos como difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica, e $n > 0,89$ (DASH et al., 2010; PRAJAPATI et al., 2012);

➤ Caso III ou difusão não-Fickiana ou anômalo: ocorre quando as taxas de difusão e de relaxamento são comparáveis, isto é, tanto a difusão do composto ativo na matriz hidratada quanto a lixiviação modulam a liberação (LAMOUDI; CHAUMEIL; DAOUD, 2016) e apresentam $n > 0,5$ [classificação de Talón et al. (2017)] $0,45 < n < 0,89$ [classificação de Dash et al. (2010)].

Sendo assim, de acordo com os valores de n para o modelo Exponencial apresentados na Tabela 18, todas as partículas são classificadas em *quasi*-Fickianas segundo Talón et al. (2017), pois $n < 0,5$ e o mecanismo envolvido na liberação seria o inchamento. Para o modelo de Weibull, a classificação dos mecanismos das formulações seriam: quase-Fickianas para as partículas com 75% de amilose pois $n < 0,5$ de acordo com Talón et al. (2017), super Caso II para 15% de amilose com óleo emulsionado pois $n > 0,89$ (contribuição simultânea da difusão, lixiviação e inchamento) e não-Fickiano para as demais formulações (a difusão do composto ativo na matriz inchada e a lixiviação modulam a liberação) de acordo com a classificação proposta por Dash et al. (2010).

Independentemente da formulação, as partículas com 28% de amilose não puderam ser ajustadas pelo modelo de Weibull, provavelmente porque apresentaram uma liberação linear e crescente nos primeiros minutos de imersão em água e depois uma redução de liberação nas horas seguintes (Figura 42) ou porque atingiram o equilíbrio de liberação (platô) em menor tempo comparando-se com as demais formulações. Isto pode ter ocorrido devido à forte influência do mecanismo de inchamento para esta formulação, sendo necessário estudar de forma mais profunda um modelo que considere a variação do tamanho da partícula ao longo do tempo e verificar a sua adequação aos dados experimentais. Alguns modelos matemáticos que fazem essa consideração estão disponíveis na literatura (ACHENIE; PAVURALA, 2017; BOUKLAS; HUANG, 2012; GANJI; VASHEGHANI-FARAHANI; VASHEGHANI-FARAHANI, 2010; RADU et al., 2002; SWEIJEN; VAN DUIJN; HASSANIZADEH, 2017).

Formulações com 1,8% de amilose apresentaram altos valores de D_{AB} , indicando que a velocidade de liberação de OET é maior. Apesar disto, o sistema particulado não conseguiu manter a liberação constante após 24 h (menor proteção do composto ativo) e é primordial verificar se isto infere em melhor atividade biológica como será discutido na seção 5.3.2.1. O D_{AB} foi mínimo para as formulações com maiores teores de amilose (apresentaram inchamento pouco expressivo conforme Figura 34) e um maior detalhamento acerca da correlação entre inchamento e difusividade será discutido na seção 5.3.1.14.3.

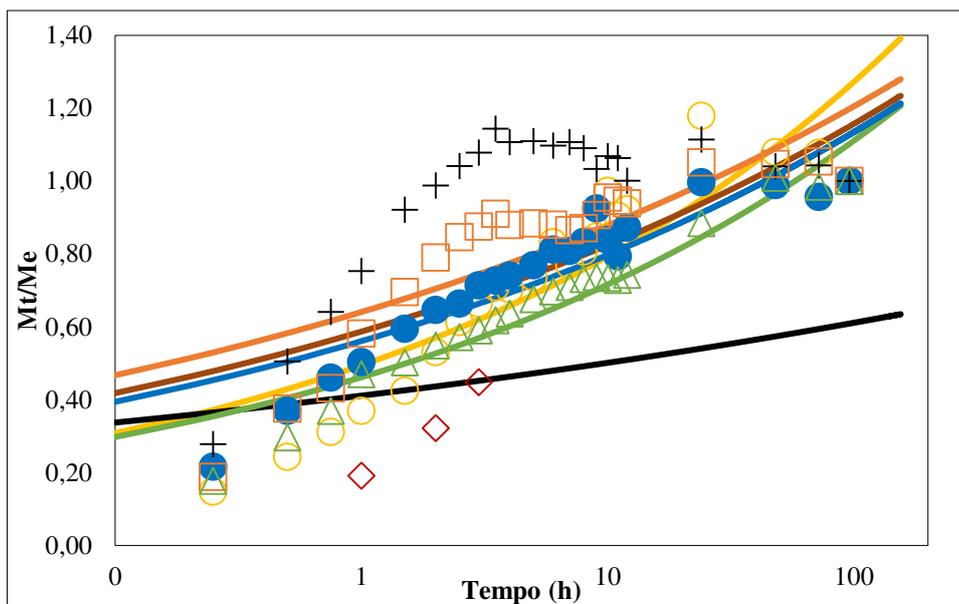
Tabela 18: Parâmetros da modelagem da liberação de óleo de tomilho das partículas obtidas por extrusão termoplástica com dois tipos de extrusores (MR – mono-roscas e DR – dupla-roscas), dois tipos de recheio e diferentes teores de amilose

Tipo de recheio	Teor de amilose (%)	Extrusor	Modelo Exponencial				Modelo de Weibull				Modelo Difusional		
			k (h ⁻¹)	n	SSR	R ²	k (h ⁻¹)	n	SSR	R ²	D _{AB} *10 ¹² (m ² s ⁻¹)	SSR	R ²
Óleo livre	1,8	DR	0,49	0,21	0,36	0,80	0,33	0,71	0,07	0,96	0,31	0,23	0,96
	15	DR	0,59	0,15	0,25	0,75	0,54	0,54	0,06	0,94	0,20	0,13	0,91
	28	MR	0,56	0,15	0,17	0,82		NS			0,12	0,22	0,94
	28	DR	0,41	0,09	5,97	0,40		NS			0,65	0,63	0,80
	45	DR	0,64	0,14	0,35	0,69	0,74	0,70	0,06	0,94	0,25	0,19	0,90
	71	DR	0,46	0,19	0,08	0,92	0,24	0,44	0,02	0,97	0,04	0,24	0,95
Óleo emulsionado	1,8	DR	0,57	0,17	0,42	0,72	0,46	0,79	0,01	0,99	0,31	0,41	0,93
	15	DR	0,64	0,15	0,59	0,62	0,63	0,96	0,03	0,98	0,40	0,43	0,91
	28	DR	0,84	0,09	0,56	0,46		NS			0,72	0,61	0,88
	45	DR	0,58	0,15	0,26	0,76	0,52	0,60	0,02	0,98	0,17	0,22	0,93
	71	DR	0,38	0,24	0,06	0,95	0,15	0,49	0,02	0,98	0,05	0,11	0,97

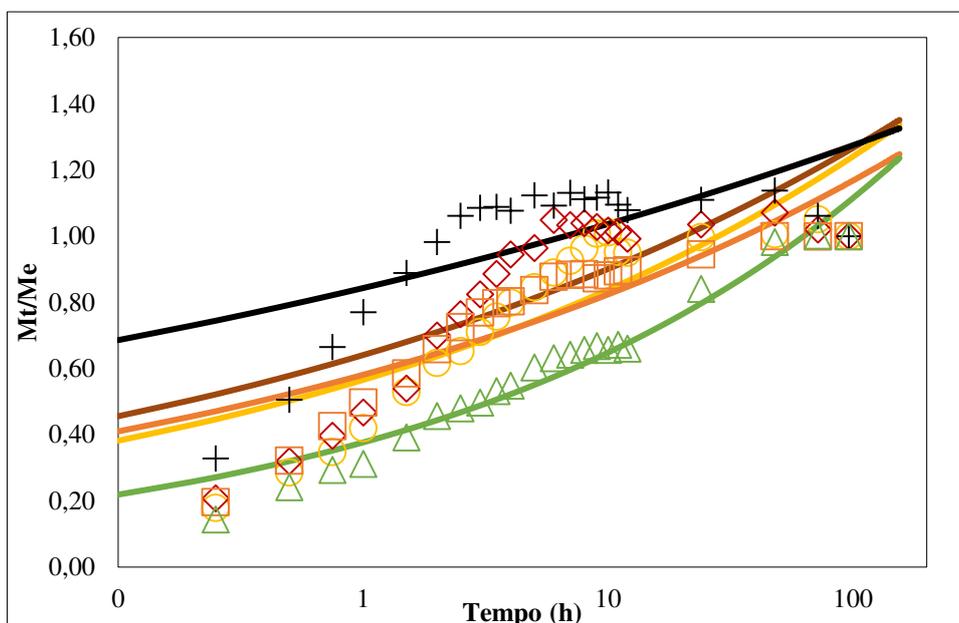
k : constante cinética que incorpora características estruturais e geométricas da partícula; n : expoente de liberação; SSR : soma dos quadrados dos resíduos; D_{AB} : coeficiente de difusão de óleo de tomilho em água; R^2 : correlação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo. NS: dados não suficientes para aplicar o modelo (erros matemáticos).

Os gráficos das modelagens apresentadas na Tabela 18 podem ser consultados na Figura 46 para o modelo Exponencial, na Figura 47 para o modelo Difusional e na Figura 48 para o modelo de Weibull.

○ 1,8% DR ◇ 15% DR ● 28% MR + 28% DR □ 45% DR △ 71% DR



A



B

Figura 46: Relação entre os dados experimentais e o modelo Exponencial da liberação de óleo das partículas obtidas por extrusão termoplásticas em função do tipo de recheio (com óleo livre – A e com óleo emulsionado - B), teor de amilose e tipo de extrusor [Mono-roscas (MR) e Dupla-roscas (DR)]

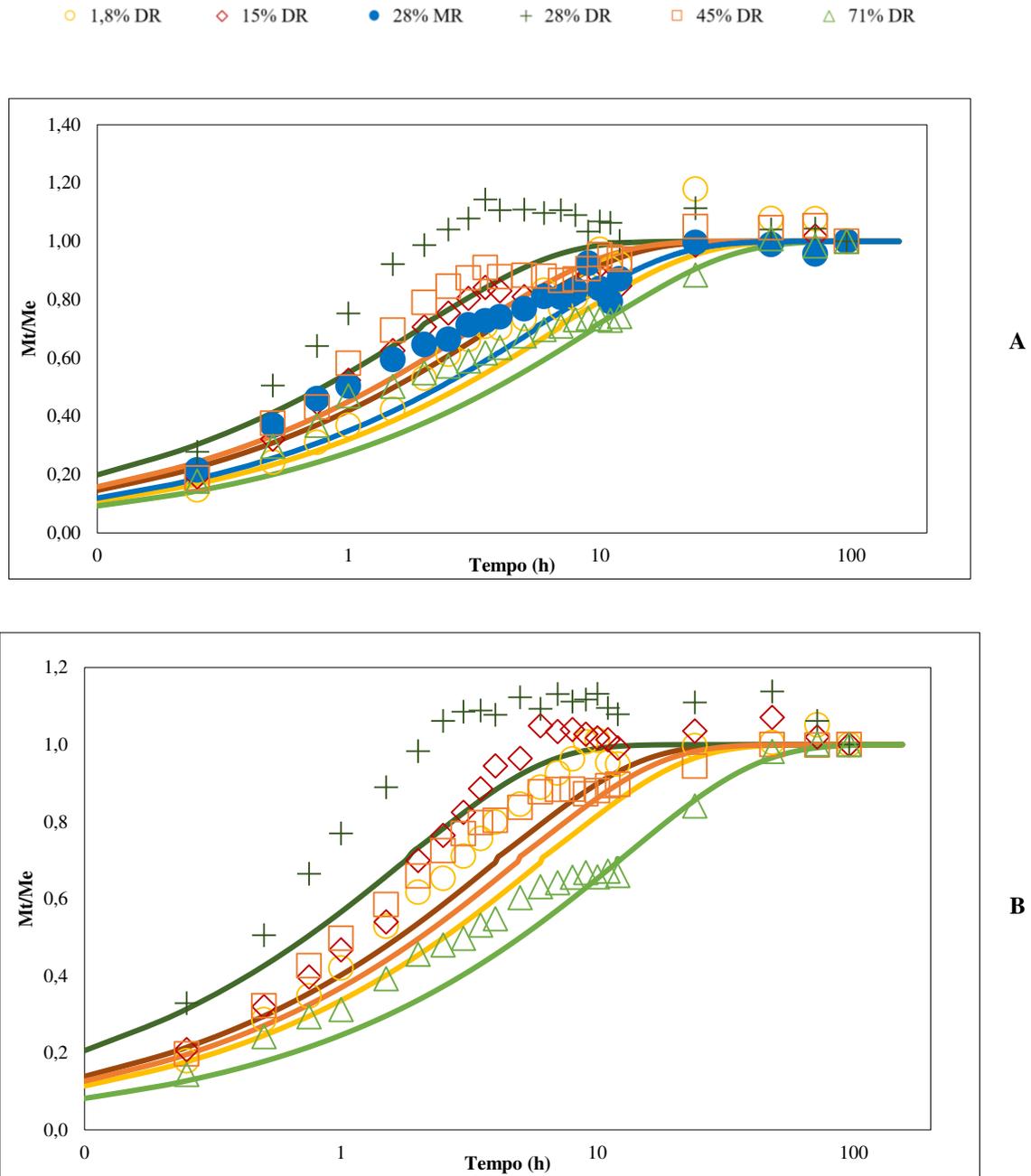


Figura 47: Relação entre os dados experimentais e o modelo Difusional da liberação de óleo das partículas obtidas por extrusão termoplásticas em função do tipo de recheio, teor de amilose e tipo de extrusor [Mono-roscas (MR) e Dupla-roscas (DR)]

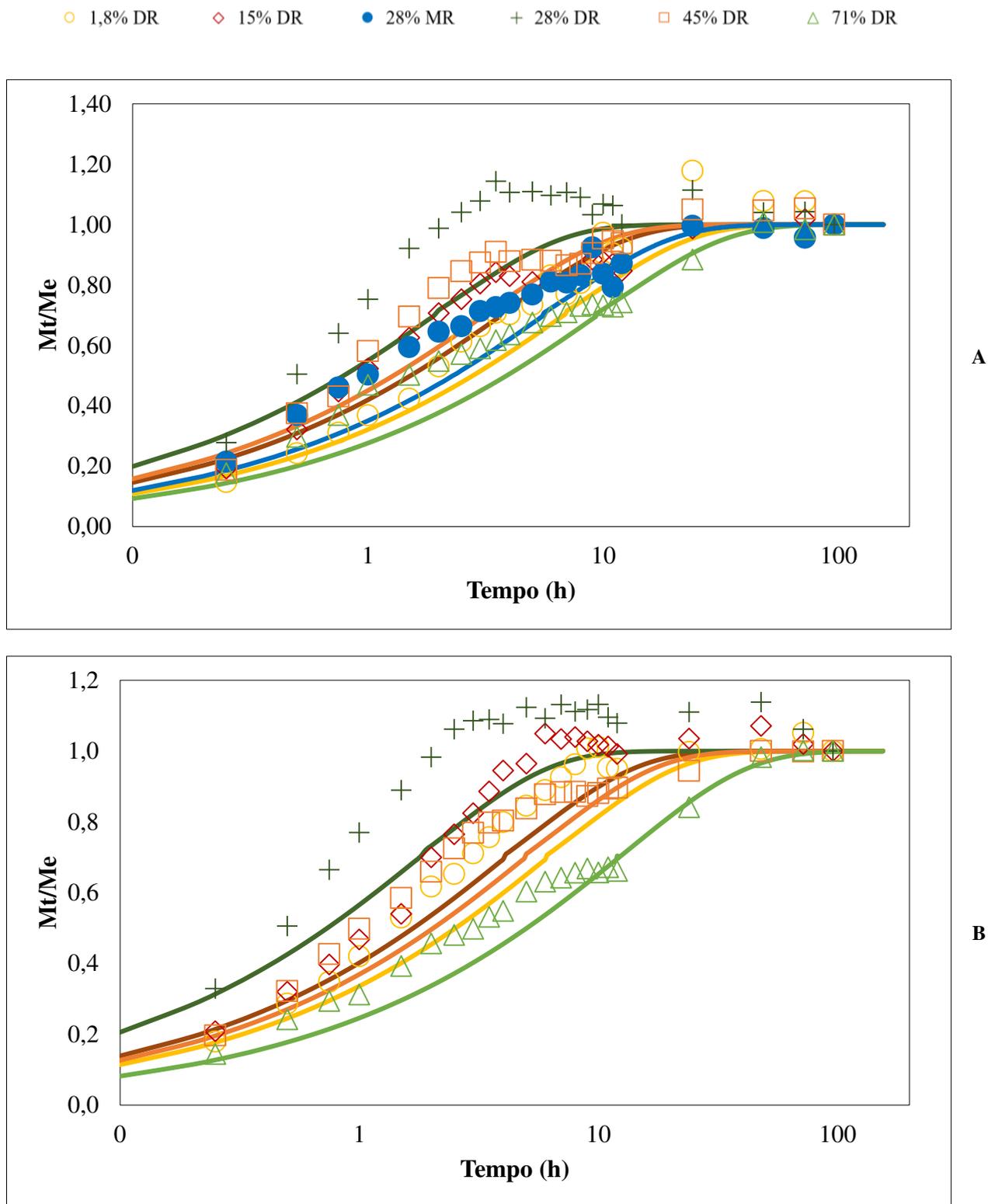


Figura 48: Relação entre os dados experimentais e o modelo de Weibull da liberação de óleo das partículas obtidas por extrusão termoplástica em função do tipo de recheio (com óleo livre – A e com óleo emulsionado - B), teor de amilose e tipo de extrusor [Mono-roscas (MR) e Dupla-roscas (DR)]

Apesar das formulações com 28% de amilose não terem apresentado bom ajuste aos modelos matemáticos de um modo geral, para as partículas com 71% de amilose, independentemente do tipo de recheio, houve menor influência do mecanismo de inchamento e os três modelos avaliados apresentaram bom ajuste aos dados experimentais (Figura 49). Mas os coeficientes de difusão foram os menores também, indicando uma liberação mais lenta do OET. Este resultado também pode influenciar na atividade biológica, pois como as larvas podem se tornar pupa e, conseqüentemente, mosquitos transmissores de arboviroses, é ideal que o tempo de ação da partícula seja de no máximo 48 h ou que a liberação seja mantida pelo maior período possível, como em caso de contato prévio da partícula com a água e posterior oviposição (efeito residual). Mas, isso não impede que esta formulação seja utilizada para outras aplicações, onde uma liberação mais lenta seja desejável.

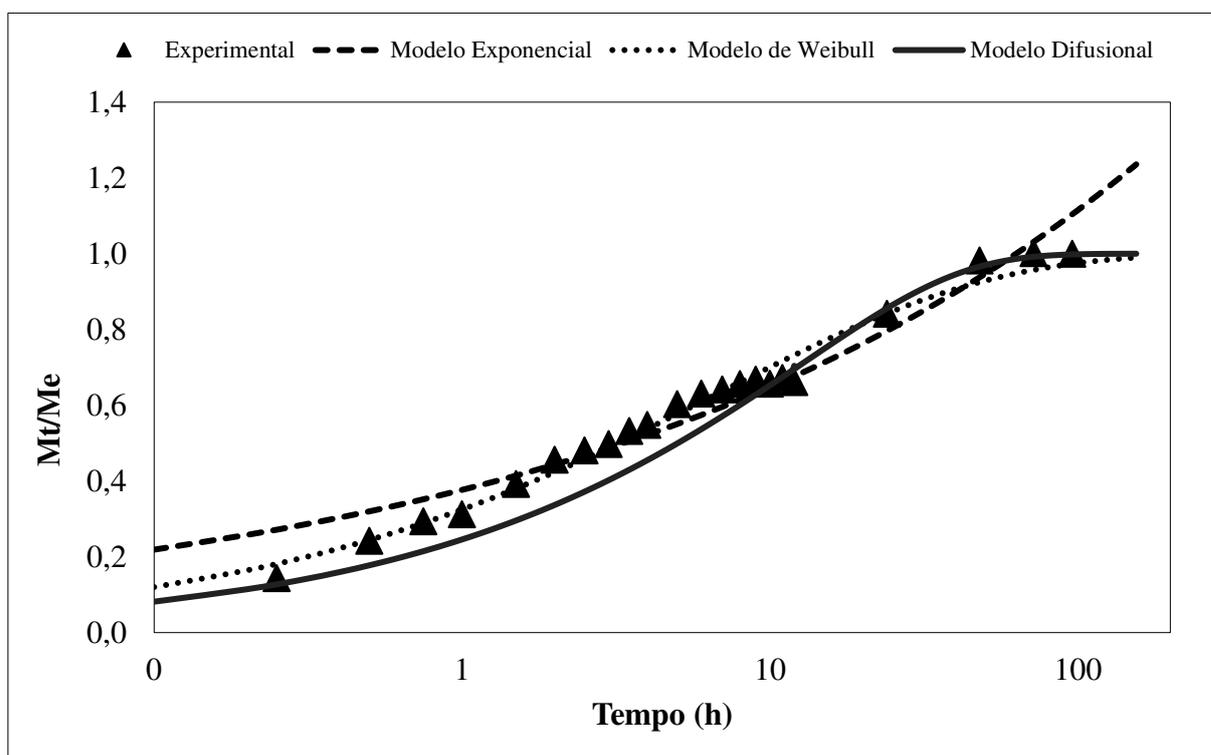


Figura 49: Adequação de diferentes modelos matemáticos aplicados na liberação da partícula obtida em extrusor dupla-rosca contendo óleo de tomilho emulsionado e 71% de amilose

Na Figura 50 é possível verificar a relação entre menor dimensão da partícula e os valores das constantes dos modelos Exponencial e de Weibull em função do teor de amilose. Conclui-se que não há uma relação linear das constantes k e n com a dimensão das partículas.

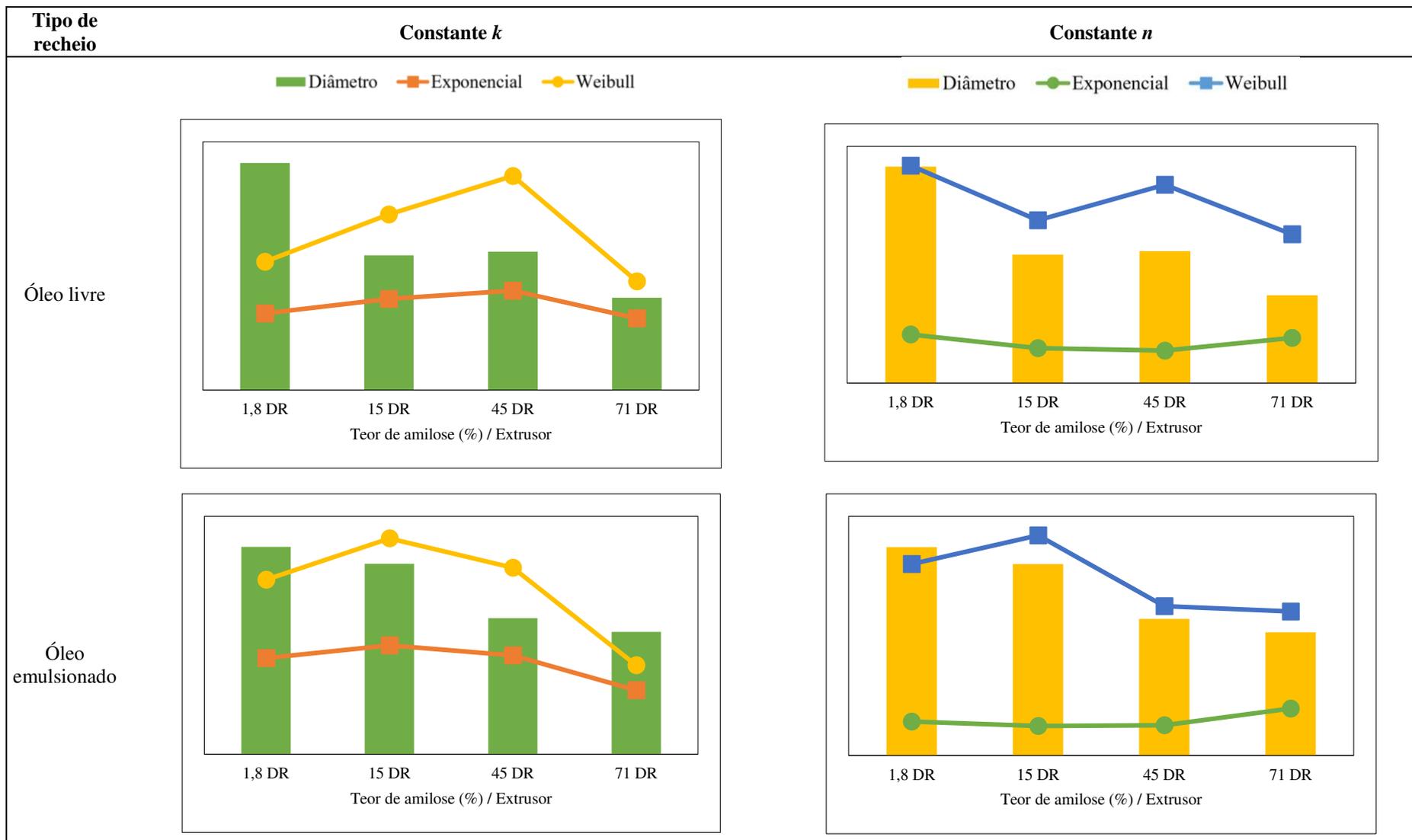


Figura 50: Relação entre as constantes k e n dos modelos Exponencial e de Weibull com a menor dimensão das partículas obtidas extrusor mono-rosca (MR) e dupla-rosca (DR)

Não foi possível encontrar na literatura um sistema parecido com o desenvolvido nesta tese. Contudo, filmes biodegradáveis ou outros tipos de partículas contendo óleo de tomilho ou timol incorporados já tiveram sua modelagem de liberação estudadas, em diferentes solventes, temperaturas e os principais resultados são discutidos a seguir. Dados sobre modelagem de sistemas totalmente diferentes podem ser consultados na seção 3.2.4.

Nanotubos contendo OET para evitar a contaminação microbiana de tomates apresentaram os seguintes parâmetros para o modelo exponencial em diferentes temperaturas de ar como meio de liberação: $0,034 < k < 0,341$ (unidade de tempo não descrita) e $0,59 < n < 0,80$, indicando transporte não-Fickiano (LEE; SEO; PARK, 2017). Filmes de amido de ervilha e de quitosana contendo extrato de tomilho apresentaram os seguintes parâmetros do modelo Exponencial em água à temperatura ambiente: $0,35 < k < 0,84 \text{ h}^{-1}$ e $0,055 < n < 0,111$, indicando transporte quasi-Fickiano e super transporte do Caso II, provavelmente devido à solubilização parcial do filme no solvente, o que pode influenciar na liberação de tomilho (TALÓN et al., 2017). Resinas antibacterianas contendo timol em formato de discos foram avaliadas quanto ao seu inchamento e liberação em diferentes solventes e, em água pura como meio de liberação, as resinas apresentaram o segundo menor inchamento, a menor liberação de timol e os seguintes valores em função do modelo aplicado: $k = 0,1296$ e $n = 0,256$ para o modelo exponencial e $k = 0,1315$ e $n = 0,311$ para o modelo de Weibull (PILATI et al., 2013), não tendo sido apresentada a unidade de k . Filmes antimicrobianos de poli(ácido láctico) com fibras de *kenaf* em soluções aquosas de etanol sob diferentes temperaturas apresentou os coeficientes difusivos: $0,29 \cdot 10^{-12} < D_{AB} < 10,05 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ a partir do modelo difusional (TAWAKKAL; CRAN; BIGGER, 2016).

Em síntese, os dados encontrados para os extrusados contendo OET estão de acordo com os dados da literatura (LEE; SEO; PARK, 2017; PILATI et al., 2013; TALÓN et al., 2017; TAWAKKAL; CRAN; BIGGER, 2016) e variaram da seguinte forma: $0,377 < k < 0,843 \text{ h}^{-1}$ e $0,09 < n < 0,24$ para o modelo Exponencial; $0,15 < k < 0,63 \text{ h}^{-1}$ e $0,44 < n < 0,96$ para o modelo de Weibull; $0,05 \cdot 10^{-12} < D_{AB} < 0,72 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ para o modelo Difusional. Como mencionado anteriormente, a variação é influenciada pelo tipo de sistema, formato, dimensão e mecanismos de liberação.

5.3.1.14.2. Modelagem do inchamento e da lixiviação

Como o modelo de Weibull foi o que apresentou os melhores ajustes para a liberação de OET (maiores valores de R^2 e menores valores de SSR) conforme a Tabela 18, ele também foi aplicado para modelar as cinéticas de inchamento e de lixiviação, inclusive das partículas sem recheio. Os resultados podem ser consultados na Tabela 19 e na Figura 51 para a modelagem do inchamento e na Figura 52 para a modelagem da lixiviação.

Devido ao comportamento com oscilações entre máximos e mínimos das cinéticas de lixiviação das partículas, o modelo de Weibull não ajustou a maioria dos dados adequadamente. Por outro lado, Machado et al. (1998) conseguiram encontrar um bom ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais de absorção de água e perda de sólidos de cereais matinais de milho e de manteiga de amendoim imersos em água. Eles verificaram também uma correlação inversamente proporcional entre o aumento da temperatura da água e a constante k do modelo de Weibull (parâmetro de velocidade), indicando que o inchamento e a lixiviação demoram menos para atingir o equilíbrio quanto maior a temperatura da água.

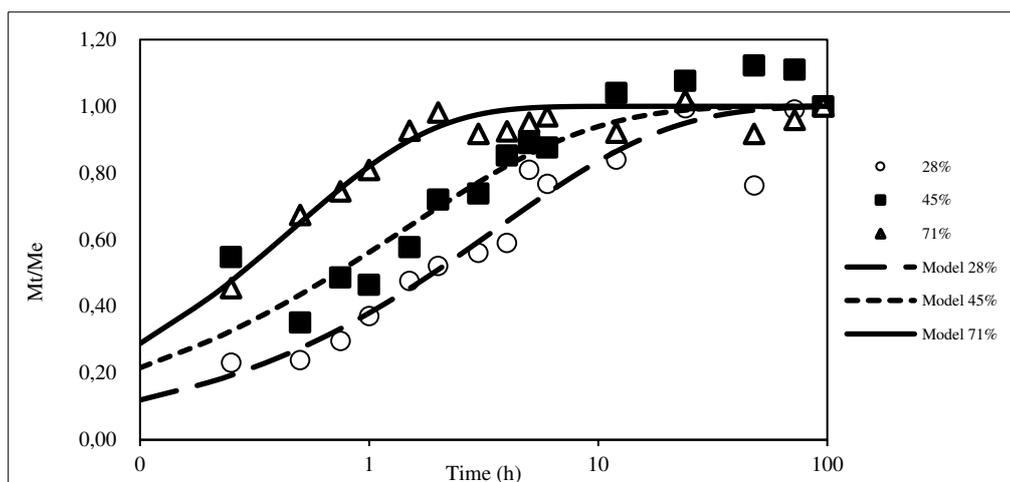
Da mesma forma que aconteceu na modelagem da liberação do óleo, não foi possível modelar o inchamento e a lixiviação de algumas formulações com o modelo testado devido a erros matemáticos, sendo necessário buscar aplicar um modelo que considere a variação do diâmetro da partícula ao longo do tempo.

Para o presente estudo, foi verificada a correlação entre as constantes k e n do modelo de Weibull e a menor dimensão das partículas como mostra a Figura 53. Da mesma forma como foi para a liberação de óleo, não foi possível verificar uma correlação proporcional entre tais variáveis. Porém, uma correlação entre as constantes da modelagem da liberação e do inchamento apresentaram correlações interessantes como será discutido no item a seguir.

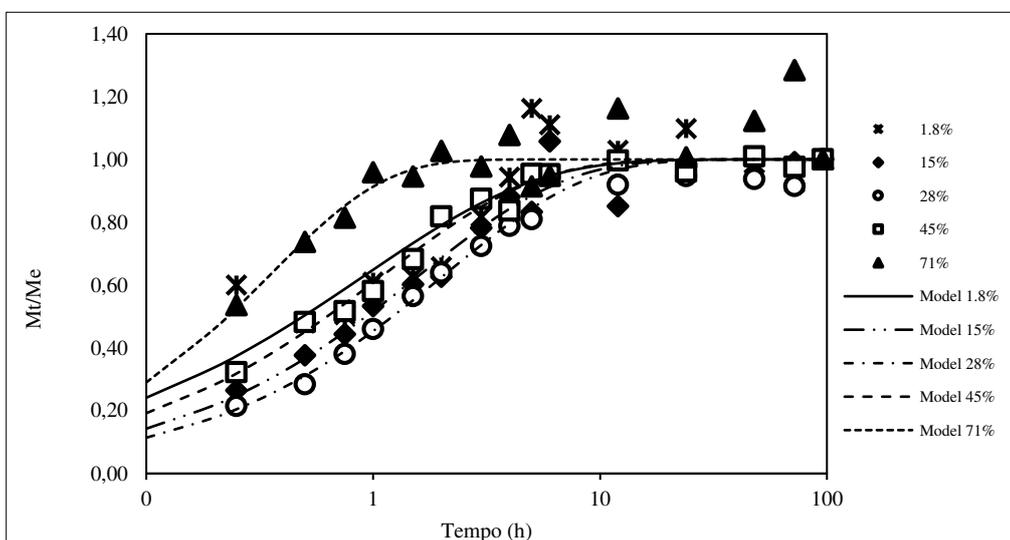
Tabela 19: Parâmetros da modelagem da liberação de óleo de tomilho das partículas obtidas por extrusão termoplástica com dois tipos de extrusores (MR – mono-roscas e DR – dupla-roscas), dois tipos de recheio e diferentes teores de amilose

Tipo de recheio	Teor de amilose (%)	Extrusor	Inchamento				Lixiviação			
			k (h ⁻¹)	n	SSR	R^2	k (h ⁻¹)	n	SSR	R^2
Sem recheio	28	MR	0,26	1,27	0,05	0,94	0,09	1,35	0,04	0,94
	28	DR	0,28	0,58	0,08	0,93	0,06	0,48	0,27	0,76
	45	DR	0,70	0,53	0,12	0,89	0,27	0,86	0,65	0,81
	71	DR	2,15	0,70	0,03	0,94	0,58	2,38	12,50	0,26
Óleo livre	1,8	DR	1,08	0,58	0,19	0,76	0,14	0,25	0,13	0,74
	15	DR	0,62	0,67	0,05	0,95		NS		
	28	MR	0,42	0,77	0,02	0,96		NS		
	28	DR	0,49	0,70	0,02	0,98		NS		
	45	DR	0,90	0,64	0,01	0,98		NS		
Óleo emulsionado	71	DR	2,85	0,85	0,14	0,73		NS		
	1,8	DR	1,39	0,60	0,05	0,91	0,85	1,32	0,85	0,60
	15	DR	0,30	0,88	0,04	0,98	0,09	0,38	0,15	0,82
	28	DR	0,75	0,74	0,07	0,96		NS		
	45	DR	0,77	0,70	0,04	0,97	0,38	0,09	0,29	0,15
	71	DR		NS			1,51	0,08	1,07	0,03

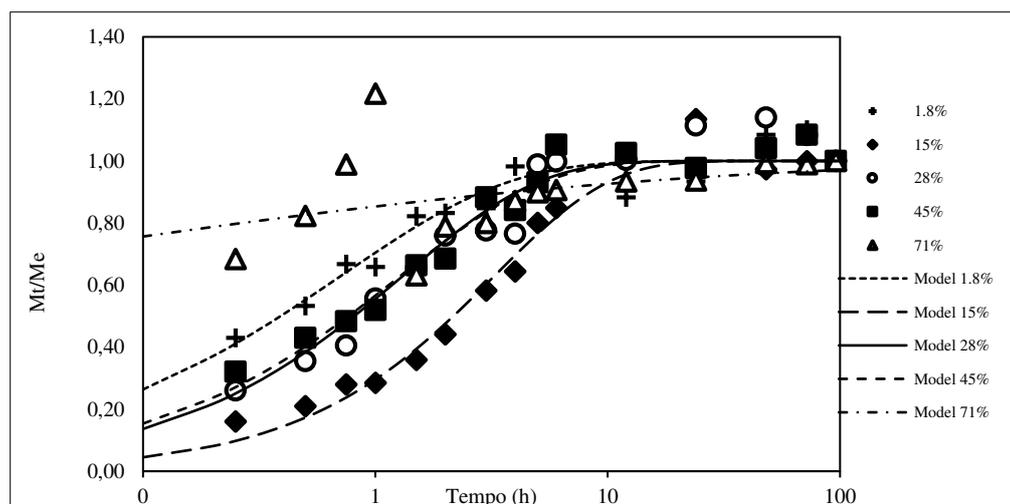
k : constante cinética que incorpora características estruturais e geométricas da partícula; n : parâmetro de velocidade; SSR : soma dos quadrados dos resíduos; R^2 : correlação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo. NS: dados não suficientes para aplicar o modelo (erros matemáticos).



A

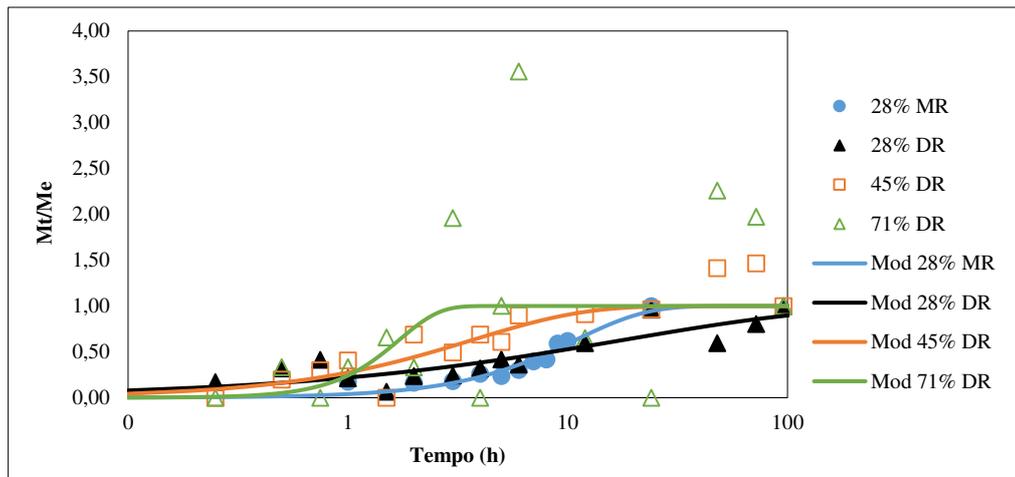


B

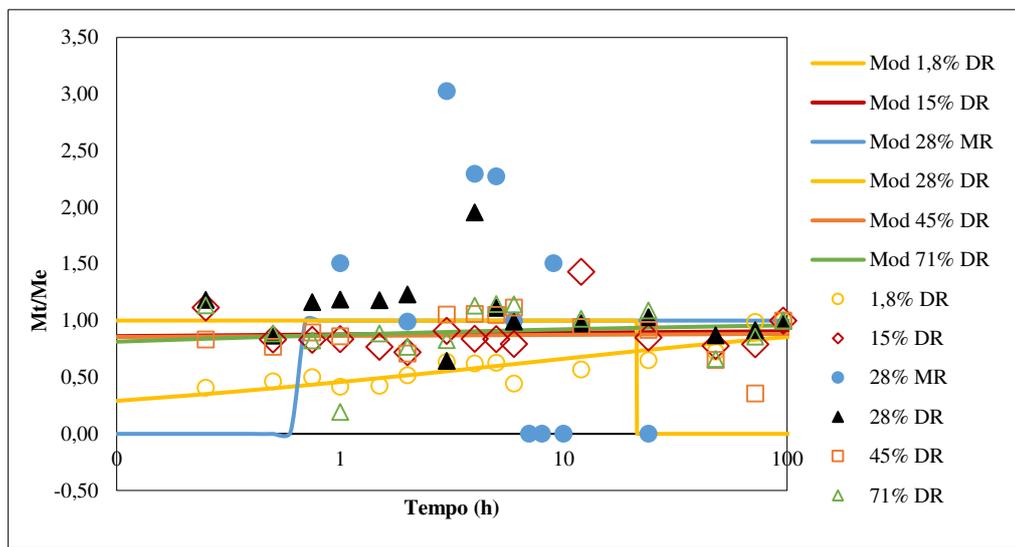


C

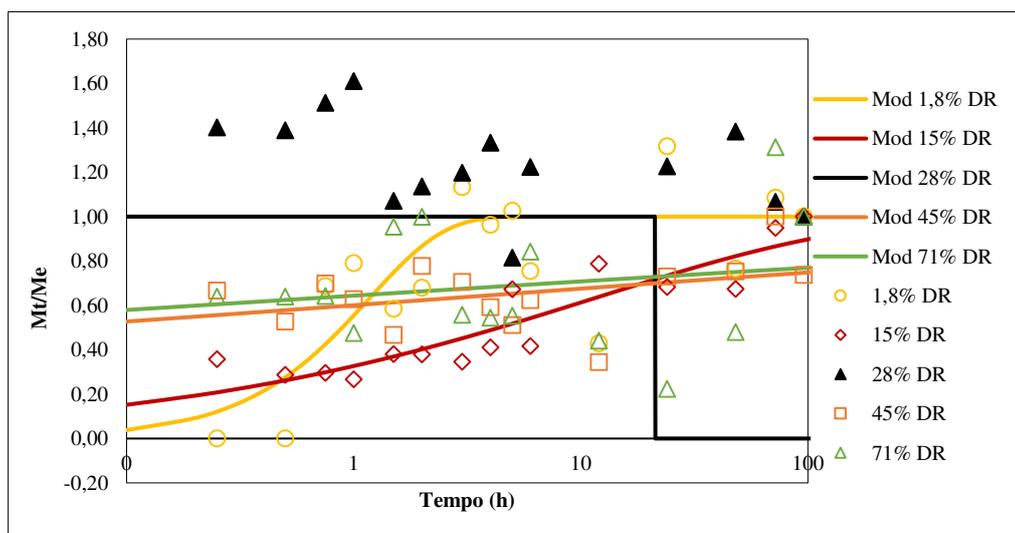
Figura 51: Relação entre os dados experimentais e o modelo de Weibull do inchamento das partículas obtidas por extrusão termoplástica em função do tipo de recheio (sem recheio – A, com óleo livre – B e com óleo emulsionado - C), teor de amilose e tipo de extrusor [Mono-rosca (MR) e Dupla-rosca (DR)]



A



B



C

Figura 52: Relação entre os dados experimentais e o modelo de Weibull da lixiviação das partículas obtidas por extrusão termoplásticas em função do tipo de recheio, teor de amilose e tipo de extrusor [Mono-rosca (MR) e Dupla-rosca (DR)]

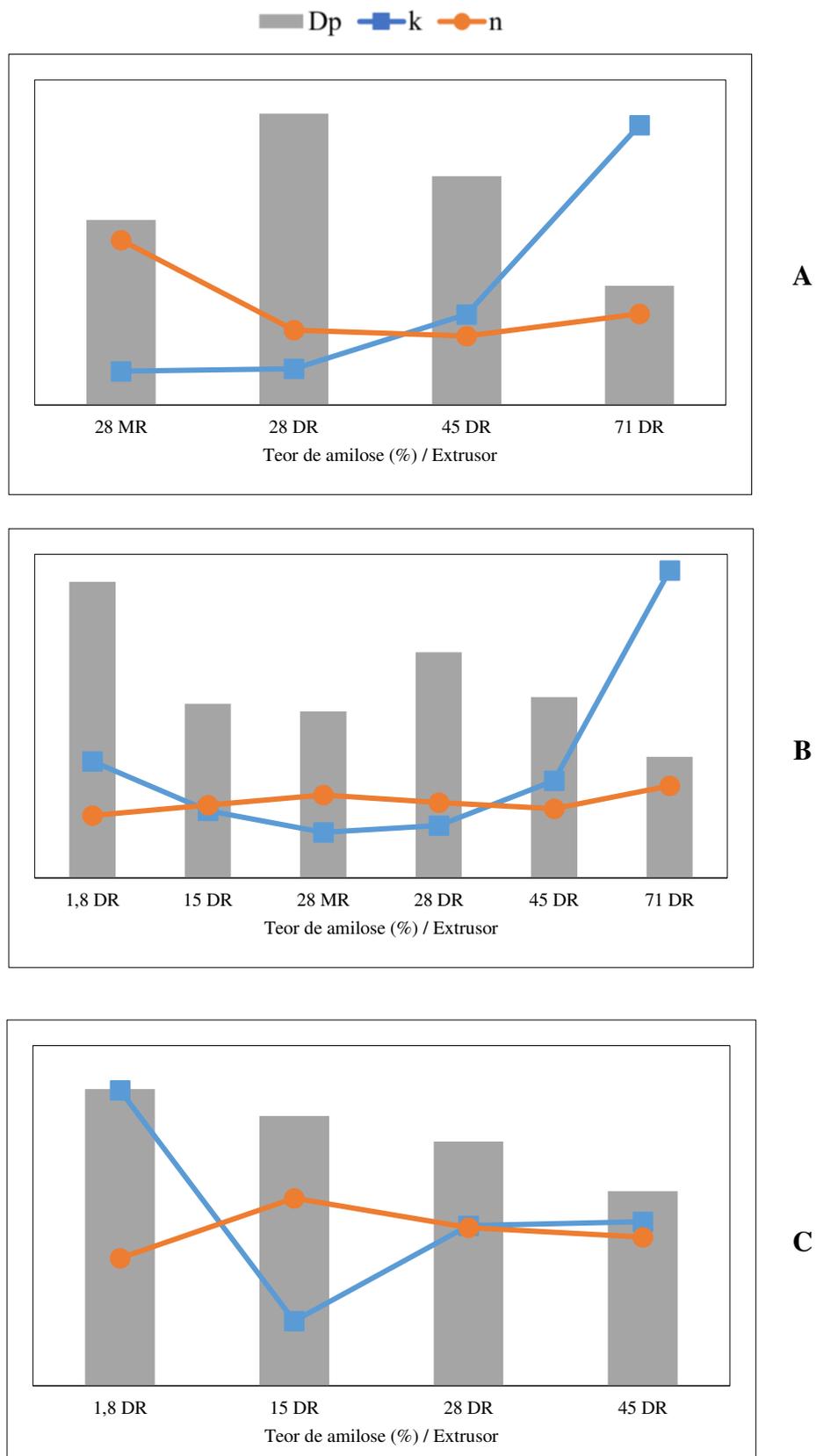


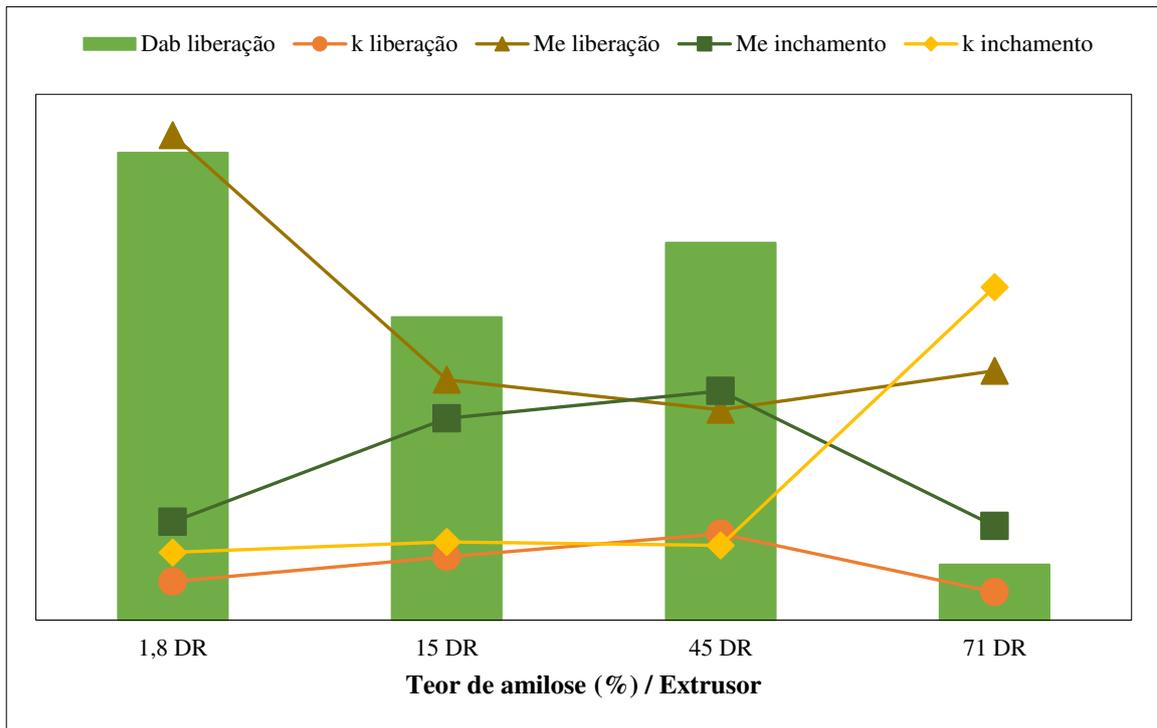
Figura 53: Relação entre os dados experimentais e o modelo de Weibull do inchamento das partículas obtidas por extrusão termoplástica em função do tipo de recheio (sem recheio – A, com óleo livre – B e com óleo emulsionado - C), teor de amilose e tipo de extrusor [Monorrosca (MR) e Dupla-rosca (DR)]

5.3.1.14.3. Correlação entre os parâmetros da modelagem da liberação de óleo e do inchamento

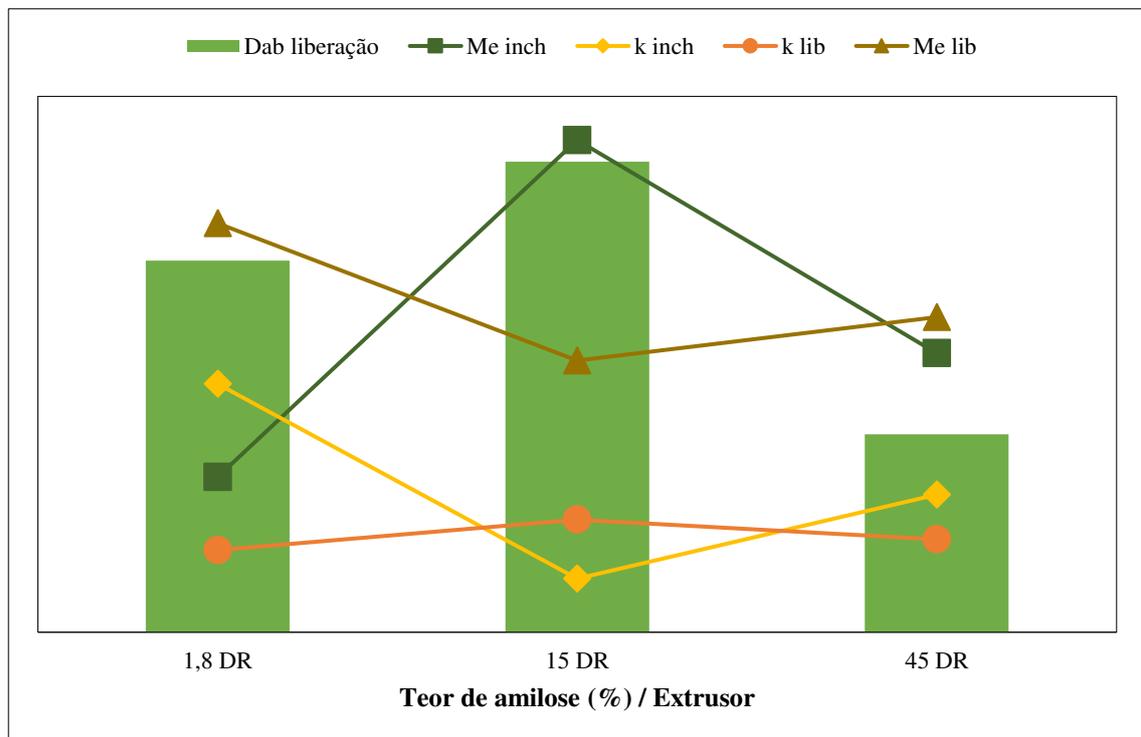
Na Figura 54 é possível verificar as tendências das constantes k e n do modelo de Weibull e da difusividade obtida a partir do modelo Difusional para a modelagem da liberação de óleo e do inchamento das partículas com diferentes teores de amilose e tipos de recheio.

Verifica-se que quanto maior o valor de k (seja de liberação ou de inchamento), menor o tempo para o equilíbrio ser atingido. Para as partículas com óleo livre (Figura 54A), quanto maior o coeficiente de difusão (D_{AB}), maior a quantidade de óleo liberada no equilíbrio ($Me_{liberação}$) e menor o inchamento no equilíbrio ($Me_{inchamento}$). O $k_{inchamento}$ apresenta comportamento inversamente proporcional ao $Me_{inchamento}$ em função do teor de amilose, como era esperado de acordo com Equação 25. O $Me_{inchamento}$ é proporcional ao $k_{liberação}$, como foi previamente correlacionado no item 5.3.1.13, indicando que o mecanismo de inchamento influencia fortemente a liberação de OET. Por sua vez, o D_{AB} é proporcional ao $k_{liberação}$, pois quanto menor o valor de k , menor o tempo para atingir o equilíbrio; o D_{AB} é proporcional ao $Me_{inchamento}$, pois quanto maior o inchamento, mais rápida é a difusão do óleo.

Para as partículas com óleo emulsionado (Figura 54B), quanto maior a D_{AB} , menor é $Me_{liberação}$ e maior é $Me_{inchamento}$. O $k_{inchamento}$ é inversamente proporcional ao $Me_{inchamento}$.



A



B

Figura 54: Relações entre a quantidade de óleo liberada no equilíbrio (Me liberação), isto é, em $t = 96$ h, inchamento no equilíbrio (Me inchamento), constante k do modelo de Weibull e difusividade do óleo de tomilho em água (D_{ab}) obtida pelo modelo difusional para partículas obtidas em extrusor dupla-roscas (DR) por extrusão termoplástica com diferentes teores de amilose, com óleo livre (A) e com óleo emulsionado (B).

5.3.2. Caracterização biológica

5.3.2.1. Atividade contra larvas em estágio mais avançado (L3)

Na Tabela 20 é possível verificar a atividade biológica de todas as partículas produzidas em dois tempos de contato diferentes com as larvas. De modo geral, as partículas com óleo de tomilho emulsionado apresentaram menor atividade larvicida em relação às partículas produzidas com o óleo livre. Nas primeiras 24 h, a mortalidade máxima foi ao redor de 30%, enquanto que nas 48 h seguintes, a mortalidade máxima estava ao redor de 80%. Para este tipo de recheio, os teores de amilose que proporcionaram melhores resultados foram 28 e 45%. A formulação com 45% de amilose apresentou correlação de Pearson positiva e muito forte entre inchamento e liberação (Tabela 17).

Tabela 20: Atividade larvicida das partículas produzidas por extrusão termoplástica com amido com diferentes teores de amilose em dois extrusores distintos [Mono-roasca (MR) e Dupla-roasca (DR)] contra larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockfeller estágio L3

Tipo de recheio	Teor de amilose (%)	Extrusor	Mortalidade (%) em função do tempo de contato	
			24 h	48 h
Óleo livre	1,8	DR	23,0 ± 10,4 ^{def B}	77,0 ± 16,6 ^{abc A}
	15	DR	86,0 ± 13,1 ^{a A}	100,0 ± 0,6 ^{a A}
	28	MR	50,0 ± 13,6 ^{bcd B}	85,0 ± 2,5 ^{ab A}
	28	DR	81,0 ± 11,4 ^{ab A}	97,0 ± 2,3 ^{a A}
	45	DR	73,0 ± 9,1 ^{ab B}	95,0 ± 4,1 ^{a A}
	71	DR	45,0 ± 11,4 ^{cde B}	88,0 ± 1,1 ^{ab A}
Óleo emulsionado	1,8	DR	14,0 ± 8,4 ^{ef B}	57,0 ± 4,1 ^{cd A}
	15	DR	12,0 ± 4,1 ^{f B}	47,0 ± 14,3 ^{d A}
	28	DR	32,0 ± 16,1 ^{def B}	82 ± 1 ^{ab A}
	45	DR	34,0 ± 8,1 ^{def B}	82,0 ± 7,2 ^{ab A}
	71	DR	19,0 ± 11,4 ^{def B}	68,0 ± 13,3 ^{bcd A}

Letras iguais maiúsculas na mesma linha indicam que as médias não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de significância em relação ao tempo de contato; Letras iguais minúsculas na mesma coluna indicam que as médias não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de significância em relação às diferentes amostras.

Comparando os diferentes tipos de processamento, as partículas com 28% de amilose produzidas com óleo livre no extrusor dupla-roasca apresentaram maior atividade larvicida nas primeiras 24 h (Tabela 20), mas igual estatisticamente às partículas produzidas no extrusor

mono-rosca. Entretanto, as últimas não diferiram significativamente de amostras com baixa mortalidade, podendo ser considerada inferior. Também não houve diferença significativa entre as duas formulações após 48 h de contato. Isso pode ter ocorrido devido ao menor inchamento e a menor lixiviação das partículas produzidas no extrusor mono-rosca (item 5.3.1.6), promovidas por diferentes teores de umidade, grau de gelatinização e distribuição do composto ativo no polímero adquiridas devido às diferentes condições de processamento.

O aumento do tempo de contato permitiu maior atividade larvicida para todas as partículas, pois o OET precisa de um determinado tempo para sair da partícula, se dissolver na água e agir sobre larva (item 5.3.1.12). Contudo, apenas duas amostras não apresentaram diferença significativa entre os tempos de contato (Tabela 20), foram elas: 15 e 28% de teor de amilose com óleo livre produzida em dupla-rosca. Isto porque nas primeiras 24 h a eficiência larvicida é atingida, não sendo necessário esperar 48 h para ter a eficiência máxima como para as demais amostras. Isto é importante do ponto de vista biológico, pois quanto antes a larva for eliminada, menores são as chances de atingir a fase adulta e se tornar um vetor de arboviroses.

A partícula com 15% de teor de amilose e óleo livre como recheio foi a única amostra na qual nenhuma larva permaneceu viva após 48 h (Tabela 20) e isso é muito importante, pois evita a seleção de larvas resistentes ao composto natural. Relembrando ainda, esta formulação apresentou alta *EE* (Tabela 16), cinética de inchamento intermediária (Figura 39A), cinética de liberação intermediária e constante (Figura 42A) e forte correlação entre as variáveis inchamento e liberação (Tabela 17). Sendo assim, ela foi considerada a melhor formulação obtida e selecionada para os testes biológicos seguintes.

A partícula com 1,8% de amilose apresentou a maior liberação dentre as amostras com óleo livre (Figura 42A), bem como a maior lixiviação (Figura 35B), entretanto o óleo liberado não foi capaz de eliminar as larvas em sua totalidade (Tabela 20), pois ele foi menos protegido e pode ter volatilizado do sistema, sendo pequeno o tempo de ação. Enquanto isso, a partícula com 71% de amilose com óleo livre liberou ~ 15% de óleo em 12 h e depois ~22% em 48 h e este aumento não proporcionou melhor atividade larvicida, pelo contrário, ela foi tardia, pois após 24 h, apenas 19% das larvas haviam sido eliminadas (Tabela 20).

Sendo assim, é necessário fazer uma analogia entre atividade larvicida e a liberação de óleo das partículas entre os diferentes tipos de recheio em função do teor de amilose, como mostra a Figura 55. É fato que as partículas com óleo de tomilho livre apresentaram maior

atividade larvicida do que as partículas com óleo emulsionado, provavelmente devido ao maior teor de amilose que o Capsul proporcionou às formulações (ver item 4.3.3), de modo que outros tipos de agentes emulsificantes também biodegradáveis poderiam apresentar melhores resultados. Contudo, a informação principal apresentada é que a maior liberação de óleo não indica maior atividade biológica. Isto pode ser observado principalmente para as partículas com 28% de amilose produzidas no extrusor mono-rosca e as partículas com 1,8% de amilose produzidas no extrusor dupla-rosca com óleo livre e com óleo emulsionado. Isto significa que as condições de processamento, teor de amilose e tipo de recheio estão exercendo forte influência na atividade biológica das partículas e o importante é que: a formulação mantenha a liberação de óleo constante e de forma controlada; proteja o óleo da maneira mais eficaz possível. Essas duas condições foram atingidas pela formulação com 15% de amilose e óleo livre como recheio. Isso corrobora também pela escolha desta como a melhor formulação.

A partícula com 15% de amilose, a melhor formulação, resultou em liberação de óleo igual a 18%. Isto significa que o óleo sofre pequena partição para a fase aquosa, representando um potencial incremental superior a 80% para a liberação em água após uma maior exposição e/ou diluição do sistema. Este resultado é relevante, pois indica que a matriz pode manter o óleo por mais tempo e liberá-lo em quantidade suficiente para matar as larvas por longo período, como será apresentado no teste de efeito residual da partícula (item 4.4.2.4). Além disso, outro dado interessante é que ela foi a única que eliminou 100% das larvas em 48 h, apresentando concentração letal igual a $31 \mu\text{g mL}^{-1}$ (calculada conforme a Equação 28), isto é, três vezes menor que a concentração letal do óleo não encapsulado (CL_{99} igual a $94 \mu\text{g mL}^{-1}$ conforme a Tabela 10). Ao mesmo tempo, a concentração de óleo liberada da partícula é muito inferior daquela considerada tóxica para mamíferos: a concentração de timol, principal metabólito do óleo de tomilho, considerada tóxica para camundongos é de 1800 mg kg^{-1} (KOUL; WALIA; DHALIWAL, 2008).

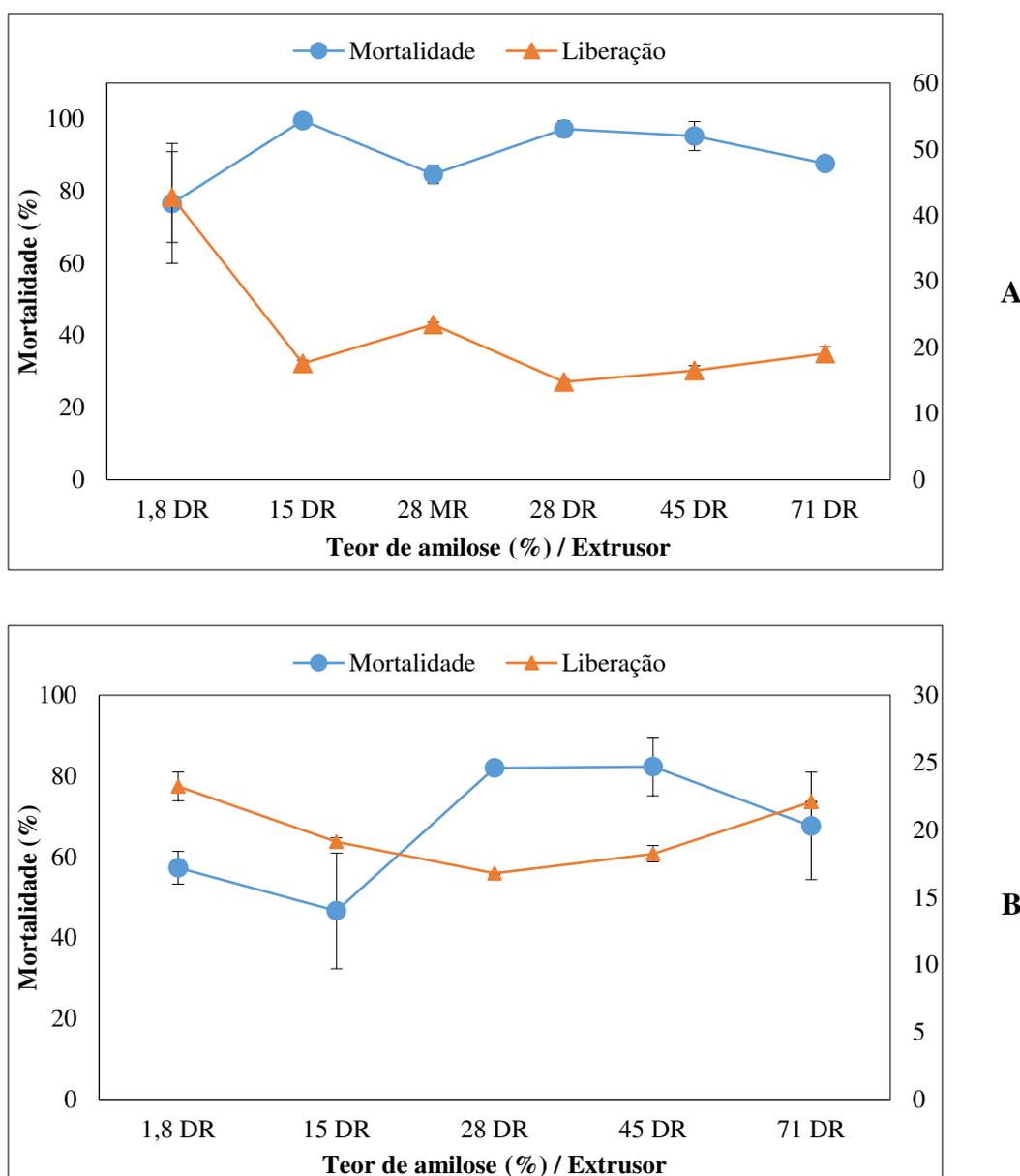


Figura 55: Comparação da atividade larvicida após 48 h e liberação de óleo das partículas produzidas por extrusão termoplástica com diferentes teores de amilose e tipos de recheio após 48 h de contato

5.3.2.2. Atividade contra larvas recém-eclodidas (L1)

Na Tabela 21 é possível verificar a atividade larvicida da melhor formulação de partículas contra larvas recém-eclodidas. A taxa de eclosão não diferiu significativamente entre a amostra e o controle. Isto infere dizer que as partículas não impedem a eclosão das larvas. Entretanto, no tratamento controle, nenhuma larva morreu, mas com a presença das partículas, as larvas morreram. Em resumo, os ovos ao entrarem em contato com água nas condições ótimas

(alimento, pH, temperatura, pressão, luminosidade, modo estático), as larvas eclodem, mas morrem em até 48 h na presença das partículas.

Tabela 21: Percentual de larvas eclodidas a partir de ovos de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller e atividade larvicida da partícula obtida com 15% de amilose com óleo livre como recheio obtida em extrusor dupla-rosca contra larvas em estágio L1

Amostra	Ecloração (%)	Mortalidade (%)
Controle	73,6 ± 6,9 ^a	0,0 ± 0,0 ^b
Partícula	64,0 ± 7,0 ^a	99,8 ± 0,3 ^a

Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de significância

Estes resultados são muito relevantes, pois mostram a aplicabilidade do produto: pensando em um recipiente seco, em caso a mosquito fêmea deposite seus ovos, caso chova (objeto exposto a céu aberto) ou alguém coloque água intencionalmente (vaso de planta), as partículas serão eficientes em eliminar todas as larvas L1 que eclodem dos ovos, ou, caso já exista água parada com larvas L3 no recipiente, as partículas também serão capazes de eliminar todas as larvas. Além disso, os ovos podem manter sua vitalidade durante meses em ambiente seco e as partículas também. Com a adição de água ao recipiente contendo os ovos, haverá eclosão, mas seguida de morte de todas as larvas.

Outra grande vantagem, pensando ainda na aplicabilidade, é a possibilidade de comercializar e aplicar as partículas sólidas à domicílio com o auxílio de agentes de saúde ou indivíduos comuns que encontrem focos em áreas urbanas ou rurais de maneira simples, eficaz e com quantidade ínfima de partícula (500 mg a cada 100 mL de água), o que não seria tão simples com o óleo de tomilho em sua forma livre (líquido). Como as partículas incham ao longo do tempo, é possível que o agente de saúde ou a população em geral visualize as partículas em tamanho maior mais fácil de ser removido do recipiente ou simplesmente retire as partículas e faça a reposição com novas partículas. O estudo do efeito residual será apresentado na seção 5.3.2.4.

5.3.2.3. Atividade contra larvas de população resistente (L3)

A atividade larvicida da melhor formulação contra larvas resistentes é apresentada na Tabela 22. Para ambas as populações, não houve diferença significativa entre os tempos de contato entre partículas e larvas. Além disso, as partículas mantiveram a eficiência contra a população resistente a inseticidas. Desta forma, as partículas podem ser aplicadas com a certeza de que as larvas, sejam elas resistentes ou não, serão eliminadas.

Tabela 22: Atividade larvicida das partículas com óleo de tomilho livre e 15% de amilose produzidas em extrusor dupla-rosca contra diferentes linhagens de *Aedes aegypti* em estágio L3

População	Mortalidade (%) em função do tempo de contato	
	24 h	48 h
	Resistente ¹	79,0 ± 14,0 ^a
Rockfeller ²	86,0 ± 13,0 ^a	100 ± 0,6 ^a

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ao nível de 95% de confiança

¹ Média de dois bioensaios (n = 100) realizados em dias diferentes

² Média de três bioensaios (n = 100) realizados em dias diferentes

5.3.2.4. Efeito residual

O efeito residual da melhor formulação pode ser observado na Figura 56. Ao comparar as partículas na mesma concentração da CL₉₉ do OET não encapsulado (94 µg mL⁻¹), é nítido o aumento da proteção do OET promovida pela microencapsulação, pois as partículas mantiveram a total mortalidade larval até o 11 ° dia e inferior a 50% apenas no 17 ° dia, enquanto que o OET não encapsulado no 3 ° dia já tinha sua eficácia reduzida (< 20% de mortalidade). Este resultado indica que as partículas podem ser utilizadas por até 11 dias e a mortalidade será mantida, sem selecionar larvas resistentes (sobreviventes).

Ao comparar os tratamentos com partículas na mesma concentração da CL₉₉ das partículas (31 µg mL⁻¹), observa-se que mesmo em concentração menor do que concentração do tratamento com OET não encapsulado, a eficiência é superior para as partículas. Isto significa que o sistema protege o OET e libera o ativo gradualmente, sendo mais eficaz. Ao comparar a variação do volume para a mesma concentração, tem-se que para volume reduzido,

a mortalidade foi mantida por mais tempo (100% até 7 ° dia), pois a concentração de ativo aumentou devido à remoção de água. Ao contrário, para o tratamento com volume aumentado, houve diluição do ativo e a mortalidade decresceu mais rapidamente, mantendo 100% de mortalidade apenas até o 5 ° dia. Nenhuma mortalidade foi observada no tratamento controle.

A seguir serão relatados alguns exemplos de efeito residual de sistemas particulados encontrados na literatura.

O efeito residual de partículas de gelificadas contendo o larvicida sintético DDVP (fosfato de 2,2-diclorovinildimetil) apresentou apenas 70% de mortalidade no 1° dia e gradualmente diminuiu para 50% no 7 ° dia (PAULA; PAULA; BEZERRA, 2006a). Por outro lado, partículas de gelificadas contendo o larvicida sintético temefós manteve 100% da mortalidade durante 7 dias, mas a eficiência diminuiu gradativamente para 60% e manteve o efeito residual por até 6 meses (BADAWY et al., 2015). Partículas gelificadas contendo o larvicida sintético imidacloprida produzidas com diferentes concentrações de materiais de parede e aquelas com menores concentrações de alginato proporcionaram maior efeito residual (80% em 5 dias), mas não houve diferença entre os tratamentos com 20 mg de partículas e o larvicida não encapsulado após 96 h (LIM; AHMAD, 2017), ao contrário dos resultados apresentados nesta tese. Atenta-se ao fato de que a não eliminação de 100% das larvas pode levar à de seleção de larvas resistentes.

Schwartz et al. produziu dois sistemas diferentes de liberação controlada com larvicidas sintéticos com a utilização de surfactante. Um sistema continha piriproxifen e as partículas eram porosas, flutuavam na superfície da água, a liberação de ativo foi entre 10 – 80% entre 100 – 120 dias, entretanto a atividade larvicida das partículas, tampouco o efeito residual, foram avaliadas (SCHWARTZ et al., 2003a). Outro sistema continha ciromazina e foi produzido por extrusão, com o intuito de produzir partículas densas e as mesmas sedimentaram na água, 80 – 100% do ativo foi liberado entre 2 – 21 dias (SCHWARTZ et al., 2003b) e a melhor formulação eliminou uma grande quantidade de larvas de *Cx. pipiens* apenas após 8 dias (SCHWARTZ et al., 2001).

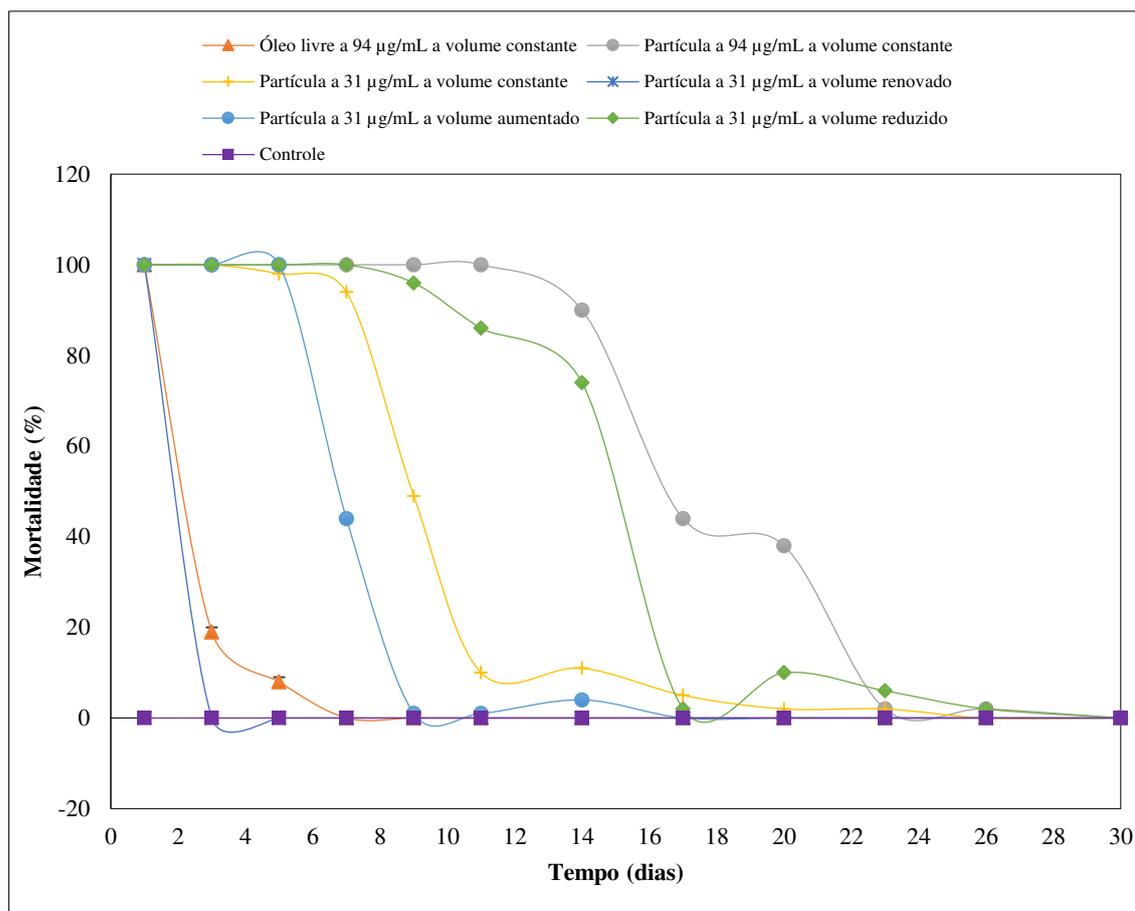


Figura 56: Efeito residual contra larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller em estágio L3 do óleo de tomilho não encapsulado e da partícula com 15% de amilose e óleo livre como recheio produzida em extrusor dupla-rosca, com variação ou manutenção do volume da solução e diferentes concentrações

Kanis et al. (2012) produziram partículas de óleorresina de copaíba com dois polímeros: um natural (acetato de celulose) e outro sintético [PEMA - poli (acrilato de etileno-metila)]. A óleorresina não encapsulada apresentou CL_{50} igual a 48 mg L^{-1} , enquanto que as partículas apresentaram CL_{50} entre $42 - 140 \text{ mg L}^{-1}$, sendo as menores CL_{50} obtidas com o polímero natural. Apesar das atividades larvicidas terem sido semelhantes, a microencapsulação preveniu a separação de fases (óleo/água). Além disso, o acetato de celulose como material de parede melhorou a liberação de óleorresina e, conseqüentemente, aumentou a mortalidade larval, mas as partículas com o polímero natural apresentaram efeito residual semelhante à óleorresina não encapsulada e ambas mantiveram 100% de mortalidade até o 5º dia. Isso infere dizer que o uso de sistemas controlados precisa ser cuidadosamente avaliado, pois nem todos eles darão o efeito positivo desejado em relação à eficácia do larvicida.

6. CONCLUSÃO

Na presente tese foi possível desenvolver um sistema particulado biodegradável para liberar controladamente óleo essencial de tomilho como larvicida natural contra *Ae. aegypti*. A microencapsulação foi eficiente, pois mesmo tendo sido aplicada temperatura de 100°C durante a extrusão, as partículas apresentaram entre 48 a 69% de eficiência de encapsulação e a sua atividade biológica foi preservada. Foi verificado que a liberação do óleo de dentro da partícula é dependente do grau de hidratação e de lixiviação da formulação (condições operacionais do extrusor, teor de amilose e tipo de recheio). A liberação de óleo de tomilho foi fortemente correlacionada ao mecanismo de inchamento e que maior liberação não significou maior mortalidade larval. A formulação com 15% de amilose e óleo de tomilho livre como recheio produzida em extrusor dupla-rosca se destacou entre todas produzidas em relação à capacidade de liberar controladamente, proteger mais o composto ativo e de eliminar 100% das larvas. Ela também foi eficaz contra larvas recém-eclodidas e larvas de população resistente a inseticida. O sistema particulado apresentou uma concentração letal três vezes menor e manteve a mortalidade 10 dias a mais, ambos comparados ao óleo de tomilho não encapsulado.

As partículas são ideais para aplicação em ambientes externos como recipientes armazenados/descartados de maneira incorreta expostos ao acúmulo de água (pneus, copos) e em ambientes internos (vasos de plantas e ralos de banheiro desprotegidos). Como a lixiviação do amido na água é relativamente pequena, não há maior preocupação com a poluição da mesma com o teor de sólidos perdidos, principalmente pensando no tipo de recipiente ideal para aplicação das partículas. O sistema particulado pode ter outras aplicações mais amplas contra outros organismos (microrganismos, insetos, larvas de mosquitos de outras espécies). Como o amido e o óleo essencial de tomilho têm aplicação em alimentos, de acordo com adaptações no processamento e testes de toxicidade, as partículas poderiam ter sua aplicação estendida para a área alimentícia, como condimento ou aromatizante. Outras aplicações do sistema carreador desenvolvido, também após adaptações na formulação, seriam: desinfetante e aromatizante em sistemas de refrigeração, veículo para fármacos na aquicultura, herbicidas para aplicação em solos, substâncias promotoras de crescimento de plantas, dentre outras aplicações.

7. REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. **Journal of Economic Entomology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 265–267, 1925.

ABIPLAST. **Esquema do processo de transformação por extrusão**. 2019. Disponível em: <http://file.abiplast.org.br/download/links/links2014/apresentacao_sobre_transformacao_vf.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2019.

ABMILHO. **Exportação de milho no Brasil - 2017/2018**. 2019. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/estatisticas/producao-mundial>>. Acesso em: 1 fev. 2019.

ABREU, F. O. M. S. et al. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 1277–1282, 2012.

ABURTO, L. C.; TAVARES, D. Q.; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 45–48, 1998.

ACHENIE, L. E. K.; PAVURALA, N. Modelling of drug release from a polymer matrix system. **Novel Approaches in Drug Designing & Development**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 1–10, 2017.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th. ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.

ALI, E. O. M. et al. Antifungal activity of nano emulsions of neem and citronella oils against phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 108, p. 379–387, 2017.

ALOUANI, A.; REHIMI, N.; SOLTANI, N. Larvicidal activity of a neem tree extract (azadirachtin) against mosquito larvae in the Republic of Algeria. **Jordan Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2009.

AMARAL, L. J. D. et al. Obtenção de amidos termoplásticos para a extrusão de pós cerâmicos. **Polímeros**, [s. l.], v. 26, p. 60–67, 2016.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. **Revista**

do Instituto Adolfo Lutz, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ANJALI, C. H. et al. Formulation of water-dispersible nanopermethrin for larvicidal applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 73, n. 8, p. 1932–1936, 2010.

ARAUJO, A. F. O. et al. Larvicidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their antagonistic effects with temephos in resistant populations of *Aedes aegypti*. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, [s. l.], v. 111, n. 7, p. 443, 2016.

ASCHERI, D. P. R.; MARQUEZ, M. O. M.; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: seleção de material de parede. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 23, n. suplementar, p. 1–6, 2003.

ASPREA, M. et al. Thyme essential oil loaded in nanococheates: encapsulation efficiency, in vitro release study and antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 77, p. 497–502, 2017.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, [s. l.], p. 89–97, 2005.

BADAWY, M. E. I. et al. Larvicidal activity of temephos released from new chitosan/alginate/gelatin capsules against *Culex pipiens*. **International Journal of Mosquito Research**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 45–55, 2015.

BARBOSA, A. F. et al. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 26, p. 128–133, 2016.

BARRETO, M. B. et al. Constituintes químicos voláteis e não-voláteis de *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 893–897, 2009.

BENELLI, G. et al. Larvicidal and ovideterrent properties of neem oil and fractions against the filariasis vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): a bioactivity survey across production sites. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 114, p. 227–236, 2015.

BENELLI, G. et al. The recent outbreaks of zika virus: mosquito control faces a further

challenge. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 253–258, 2016.

BENELLI, G.; PAVELA, R. Beyond mosquitoes—Essential oil toxicity and repellency against bloodsucking insects. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 117, p. 382–392, 2018.

BHAN, S.; MOHAN, L.; SRIVASTAVA, C. N. Relative larvicidal potentiality of nano-encapsulated temephos and imidacloprid against *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 787–791, 2014.

BHATNAGAR, S.; HANNA, M. A. Amylose-lipid complex formation during single-screw extrusion of various corn starches'. **Cereal Chemistry Journal**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 582–587, 1994.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. Amido. In: **Química do processamento de alimentos**. São Paulo: Varela, 1992. p. 152.

BOUKLAS, N.; HUANG, R. Swelling kinetics of polymer gels: comparison of linear and nonlinear theories. **Soft Matter**, [s. l.], v. 8, p. 8194–8203, 2012.

BRAGA, I. A. et al. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 199–203, 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

BRASIL, M. da S. **Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* (LIRAA) Nacional 2015**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/03/LIRAA-NACIONAL-2015-Vers--o-II.pdf>>. Acesso em: 19 out. 2018.

BRASIL, M. da S. **Distrito Federal inicia teste da vacina contra dengue**. 2016. Disponível em: <<http://combateaedes.saude.gov.br/pt/noticias/897-distrito-federal-inicia-teste-da-vacina-contradengue>>. Acesso em: 19 out. 2018.

BRASIL, M. da S. **Informe especial febre amarela no Brasil nº 01/2017**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/18/Informe-especial-COES->

FA.pdf>. Acesso em: 19 out. 2018a.

BRASIL, M. da S. **Boletim epidemiológico V. 48, nº 20, 2017. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 25, 2017.** [s.l: s.n.].

BRASIL, M. da S. **Boletim Epidemiológico volume 48, nº 3 de 2017. Monitoramento dos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/06/2017-002-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-v--rus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-52--2016.pdf>>. Acesso em: 19 out. 2018c.

BRASIL, M. da S. **Informe nº 02. Monitoramento do período sazonal da febre amarela no Brasil 2017/2018.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/21/af-informe-febre-amarela-2c.pdf>>. Acesso em: 19 out. 2018a.

BRASIL, M. da S. Boletim epidemiológico volume 49, Nº 40, outubro de 2018. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 36 de 2018. [s. l.], v. 49, 2018. b. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/BE-N---40-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-v--rus-Zika-at---a-Semana-Epidemiol--gica-SE-36-de-2018.pdf>>. Acesso em: 19 out. 2018.

BRASIL, M. da S. **Boletim epidemiológico volume 50 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus zika até a semana epidemiológica 52 de 2018.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>>. Acesso em: 29 mar. 2019.

CAMPELO, L. **Planta amazônica jambu tem 433 patentes espalhadas pelo mundo.** 2018. Disponível em: <<https://www.brasildefato.com.br/2018/06/20/a-planta-amazonica-jambu-tem-433-patentes-espalhadas-pelo-mundo/>>.

CAMPOS, E. V. R. et al. Polysaccharides as safer release systems for agrochemicals.

Agronomy for Sustainable Development, [s. l.], v. 35, p. 47–66, 2015.

CANTO, E. L. **O que é coeficiente de partição?** 2016. Disponível em: <http://professorcanto.com.br/boletins_qui/055.pdf>.

CARR, M. E.; WING, R. E.; DOANE, W. M. Encapsulation of atrazine within a starch matrix by extrusion processing. **Cereal**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 262–266, 1991.

CARVALHO, A. F. U. et al. Activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 98, n. 4, p. 569–571, 2003.

CARVALHO, S. S. et al. Efeito inseticida sistêmico de nanoformulações à base de nim sobre *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B em tomateiro. **Fitossanidade**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 298–306, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.0404>>

CARVALHO, A. V. et al. Caracterização tecnológica de extrusados de terceira geração à base de farinhas de mandioca e pupunha. **Ciência e Agrotecnologia**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 995–1003, 2010.

CARVALHO, A. V. et al. Processamento e caracterização de snack extrudado a partir de farinhas de quirera de arroz e de bandinha de feijão. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 72–83, 2012.

CASTRO, D. S. B. et al. Larvicidal activity of essential oil of *Peumus boldus* Molina and its ascaridole-enriched fraction against *Culex quinquefasciatus*. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 171, p. 84–90, 2016.

CHANDRAMOHAN, B. et al. Neem by-products in the fight against mosquito-borne diseases: biotoxicity of neem cake fractions towards the rural malaria vector *Anopheles culicifacies* (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 472–476, 2016. a.

CHANDRAMOHAN, B. et al. Characterization and mosquitocidal potential of neem cake-synthesized silver nanoparticles: genotoxicity and impact on predation efficiency of mosquito natural enemies. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 115, n. 3, p. 1015–1025, 2016. b.

CHANG, Y. K.; SCHMIELE, M.; MARTÍNEZ-BUSTOS, F. Alterações físico-químicas do alimento durante o processo de extrusão. In: I Congresso Internacional sobre Nutrição de Animais de Estimação. VIII Simpósio sobre Nutrição se Animais Dse Estimação 2010, Campinas. **Anais...** Campinas

CORRADINI, E. et al. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 268–273, 2005.

COSTA-DA-SILVA, A. L. et al. Glytube: a conical tube and parafilm M-based method as a simplified device to artificially blood-feed the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **PLoS One**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2013.

COSTA, J. G. M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 304–309, 2005.

CRUZ, P. B. et al. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthal on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 228, p. 137–143, 2016.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Starch. In: **Fennema's food chemistry**. Fourth ed. [s.l.] : CRC Press Book, 1996.

DASH, S. et al. Kinect modeling on drug release from controlled controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 945–954, 2009.

DIAS, A. M. A. et al. Spilanthal from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 61, p. 62–70, 2012.

DOANE, W. M. Encapsulation of pesticides in starch by extrusion. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 1, p. 83–87, 1993.

DUA, V. K. et al. Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 8, n. 124, p. 1–6, 2009.

DUARTE, J. L. et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 25, p. 189–192, 2015.

EL-AKHAL, F. et al. Larvicidal activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum majorana* (Lamiaceae) against of the malaria vector *Anopheles labranchiae* (Diptera: Culicidae). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 372–376, 2016.

FARIAS, C. V. T. **Efeito das características estruturais do amido no metabolismo e crescimento do pacu *Piaractus mesopotamicus***. 2017. Universidade Estadual Paulista, [s. l.], 2017.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. *Acmella oleracea* (L .) R . K . Jansen (Asteraceae) - Jambu. **Revista Fitos**, [s. l.], v. 5, p. 83–91, 2010.

FELLOWS, P. J. Extrusão. In: **Tecnologia do Processamento de alimentos: princípios e prática**. Segunda ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FERREIRA, P. M. P. et al. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 207–216, 2009.

FERREIRA, S. G. et al. An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 456, p. 190–196, 2015.

FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 115–146, 2009.

FORIM, M. R. et al. Uso de CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de nim: reprodutibilidade da ação inseticida. **Química Nova**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 1082–1087, 2010.

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

Journal of Agricultural and Food Chemistry, [s. l.], v. 61, p. 9131–9139, 2013.

FREITAS-BLANCO, V. S. et al. Development and evaluation of a novel mucoadhesive film containing *Acmella oleracea* extract for oral mucosa topical anesthesia. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 1–18, 2016.

GALVÃO, J. G. et al. β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: an alternative to control *Aedes aegypti* larvae. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 608, p. 14–19, 2015.

GANJI, F.; VASHEGHANI-FARAHANI, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Theoretical description of hydrogel swelling: a review. **iranian Polymer Journal**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 375–398, 2010.

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

GARCIA, J. C. et al. Aspectos Econômicos da Produção e Utilização do Milho. **Embrapa**, [s. l.], v. Circular T, 2006.

GASMI, H. et al. Importance of PLGA microparticle swelling for the control of prilocaine release. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 30, p. 123–132, 2015.

GERIS, R. et al. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 25–28, 2008.

GHIMERAY, A. K. et al. Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in *Azadirachta indica* A. Juss grown in foothills of Nepal. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 8, n. 13, p. 3084–3091, 2009.

GOMES, P. R. B. et al. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *Zingiber officinale* Roscoe (Gengibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 597–604, 2016.

GONÇALVES, N. D. et al. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. **Food Research International**, [s. l.], v. 96, p. 154–160,

2017.

GONZÁLEZ-SELIGRA, P. et al. Influence of extrusion process conditions on starch film morphology. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 84, p. 520–528, 2017.

GOOGLE. **Uma química irresistível: o amido**. 2011. Disponível em: <<http://umaquimicairresistivel.blogspot.com/2011/06/o-amido.html>>. Acesso em: 1 fev. 2019.

GROSSO, C. et al. Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles: comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 33, p. 2211–2218, 2010.

GUARDA, C. et al. Atividade larvívica de produtos naturais e avaliação da susceptibilidade ao insetívica temefós no controle do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Interciencia**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 243–247, 2016.

GUEVARA-BRÉTON, N. A.; JIMÉNEZ-MUNGUÍA, T. Encapsulación: técnicas y aplicaciones en la industria alimentaria. **Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos**, [s. l.], v. 2, p. 36–49, 2008.

GUISSONI, A. C. P. et al. Atividade larvívica de *Anacardium occidentale* como alternativa ao controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Rattus norvegicus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicináis**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 363–367, 2013.

HAN, Y. et al. Larvívica activity of lansiumamide B from the seeds of *Clausena lansium* against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, [s. l.], v. 112, n. 2, p. 511–516, 2013.

HISMATH, I.; WAN AINDA, W. M.; HO, C. M. Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (*Azadirachta indica*) leaves. **International Food Research Journal**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 931–939, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Procedimentos e determinações gerais. In: ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Eds.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020.

INVESTOR SQUARE. **Neem Tree Investments in Brazil – Why is it a Profitable**

Commodity? 2014. Disponível em: <<https://investor-square.com/investment-news/neem-tree-investments-brazil-profitable-commodity/>>. Acesso em: 1 fev. 2019.

JACOBSON, M. The synthesis of N-isobutyl-trans-4-trans-6-decadienamide and the structure of spilanthol. **Pellitorine Isomers**, [s. l.], v. 78, p. 5084–5087, 1956.

JAKIEMIU, E. A. R. et al. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 683–688, 2010.

KADIR, H. A. et al. Toxicity and electrophysiological effects of *Spilanthes acmella* Murr. extracts on *Periplaneta americana* L. **Pesticides Science**, [s. l.], v. 25, p. 329–335, 1989.

KAMARAJ, C. et al. Novel and environmental friendly approach; Impact of Neem (*Azadirachta indica*) gum nano formulation (NGNF) on *Helicoverpa armigera* (Hub.) and *Spodoptera litura* (Fab.). **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 107, p. 59–69, 2018.

KANIS, L. A. et al. Larvicidal activity of *Copaifera* sp. (Leguminosae) oleoresin microcapsules against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 110, n. 3, p. 1173–1178, 2012.

KAWADA, J.; MARCHESSAULT, R. H. Solid state NMR and X-ray studies on amylose complexes with small organic molecules. **Starch/Stärke**, [s. l.], v. 56, p. 13–19, 2004.

KHALILI, S. Z. et al. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 60, p. 502–508, 2015.

KIM, J. R.; SHARMA, S. Acaricidal activities of clove bud oil and red thyme oil using microencapsulation against HDMs. **Journal of Microencapsulation**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 82–91, 2011.

KISHORE, N. et al. A review on natural products with mosquitosidal potentials. **Research Signpost**, [s. l.], v. 37/661, n. 2, p. 335–365, 2011.

KNIO, K. M. et al. Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. **Bioresource Technology**, [s. l.],

v. 99, n. 4, p. 763–768, 2008.

KOŠAR, M.; DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected *Lamiaceae* species. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 91, n. 3, p. 525–533, 2005.

KOUL, O.; WALIA, S.; DHALIWAL, G. S. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. **Biopesticides International**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 63–89, 2008.

KUNII, D.; LEVENSPIEL, O. Fluidization and mapping of regimes. In: **Fluidization engineering**. Second ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1991. p. 491.

LA CORTE, R. et al. Variation in temephos resistance in field populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the state of Sergipe, Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 284–290, 2018.

LAI, L. S.; KOKINI, J. L. Physicochemical changes and rheological properties of starch during extrusion. (A review). **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 251–266, 1991.

LAMOUDI, L.; CHAUMEIL, J. C.; DAOUD, K. Swelling, erosion and drug release characteristics of sodium diclofenac from heterogeneous matrix tablets. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 31, p. 93–100, 2016.

LEE, M. H.; SEO, H.; PARK, H. J. Thyme oil encapsulated in halloysite nanotubes for antimicrobial packaging system. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 922–932, 2017.

LIM, G. P.; AHMAD, M. S. Development of Ca-alginate-chitosan microcapsules for encapsulation and controlled release of imidacloprid to control dengue outbreaks. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [s. l.], v. 56, p. 382–393, 2017.

LIMA, T. C. et al. Oxime derivatives with larvicidal activity against *Aedes aegypti* L. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 114, n. 8, p. 2883–2891, 2015. Disponível em: <www.>

LIU, X. C. et al. Evaluation of larvicidal activity of the essential oil of *Allium macrostemon* Bunge and its selected major constituent compounds against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 7, n. 184, p. 1–5, 2014.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada : polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

LÓPEZ, L. A. P. et al. Essential oils from *Zanthoxylum fagara* Wild Lime, *Ruta chalepensis* L. and *Thymus vulgaris* L.: composition and activity against *Aedes aegypti* larvae. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 1911–1915, 2015.

MACHADO, M. D. . et al. Kinetics of moisture uptake and soluble-solids loss by puffed breakfast cereals immersed in water. **International Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 33, p. 225–237, 1998.

MACIEL, M. V. et al. Atividade inseticida in vitro do óleo de sementes de nim sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 7–11, 2010.

MARCET, I. et al. Production and characterisation of biodegradable PLA nanoparticles loaded with thymol to improve its antimicrobial effect. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 239, p. 26–32, 2018.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 210, p. 402–414, 2016.

MARCOMINI, A. M. et al. Atividade inseticida de extratos vegetais e do óleo de nim sobre adultos de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera, Tenebrionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 409–416, 2009.

MASSEBO, F. et al. Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles arabiensis* Patton and *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) in Ethiopia. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 8, n. 17, p. 4183–4188, 2009.

MATTOS, B. D.; ROJAS, O. J.; MAGALHÃES, W. L. E. Biogenic silica nanoparticles loaded with neem bark extract as green, slow-release biocide. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 142, p. 4206–4213, 2017.

MESQUITA, A. L. M.; SOUSA, A. B. O.; INNECCO, R. Efeito de um inseticida natural à base

de jambu no controle do pulgão-das-brássicas em repolho. **Comunicado Técnico Online Embrapa 162**, [s. l.], p. 1–3, 2010.

MIKALOUSKI, F. B. S. et al. Influência da granulometria da matéria-prima na expansão de extrusados de milho. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 28–32, 2014.

MORDUE, A. J. L.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 615–632, 2000.

MOREIRA, A. S. N. et al. Larvicidal activity of *Ramalina usnea* lichen against *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 530–532, 2016.

NALINA, T.; RAHIM, Z. H. A. The crude aqueous extract of *Piper betle* L. and its antibacterial effect towards *Streptococcus mutans*. **American Journal of Biotechnology and Biochemistry**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 10–15, 2007.

NASCIMENTO, A. M. D. et al. Repellency and larvicidal activity of essential oils from *Xylopi* *laevigata*, *Xylopi* *frutescens*, *Lippia pedunculosa*, and their individual compounds against *Aedes aegypti* Linnaeus. **Neotropical Entomology**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 223–230, 2016.

NATHAN, S. S.; KALAIIVANI, K.; MURUGAN, K. Effects of neem limonoids on the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica**, [s. l.], v. 96, p. 47–55, 2005.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 372–378, 2010.

NICOLETTI, M. et al. Neem cake: chemical composition and larvicidal activity on Asian tiger mosquito. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. 205–213, 2012.

NUESSLI, J. et al. Characterization of amylose-flavour complexes by DSC and X-ray diffraction. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 27–34, 1997.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M. et al. Development of a larvicidal nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* vogel oil. **PLoS ONE**, [s. l.], p. 1–16, 2016. a.

OLIVEIRA, G. L. et al. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 85, n. 4, p. 1227–1234, 2013.

OLIVEIRA, L. C. et al. Physical characteristics, nutritional quality, and antioxidant potential of extrudates produced with polished rice and whole red bean flours. **Cereal Chemistry Journal**, [s. l.], v. 94, n. 1, p. 74–81, 2017.

OLIVEIRA, P. R. et al. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. **Microscopy Research and Technique**, [s. l.], v. 79, n. 8, p. 744–753, 2016. b.

ORDÓÑEZ, J. A. Capítulo 12. Operações de transformação. In: **Tecnologia de Alimentos, vol. 1**. Porto Alegre: Artmed, 2005. a. p. 294.

ORDÓÑEZ, J. A. Capítulo 5. Carboidratos. In: **Tecnologia de Alimentos, vol. 1**. Porto Alegre: Artmed, 2005. b. p. 294.

PANDEY, V. et al. Strong larvicidal activity of three species of *Spilanthes* (Akarkara) against malaria (*Anopheles stephensi* Liston, *Anopheles culicifacies*, species C) and filaria vector (*Culex quinquefasciatus* Say). **Parasitology Research**, [s. l.], v. 102, p. 171–174, 2007.

PANT, M. et al. Encapsulation of neem and karanja oil mixture for synergistic as well as larvicidal activity for mosquito control. **Journal of Scientific & Industrial Research**, [s. l.], v. 71, p. 348–352, 2012.

PAULA, H. C. B. et al. *Lippia sidoides* essential oil encapsulation by angico gum/chitosan nanoparticles. **Journal of Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 2359–2366, 2010. a.

PAULA, H. C. B. et al. Esferas (beads) de alginato como agente encapsulante de óleo de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. **Polímeros**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 112–120, 2010. b.

PAULA, H. C. B. et al. Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 173–178, 2011.

PAULA, H. C. B. et al. Protective effect of cashew gum nanoparticles on natural larvicide from *Moringa oleifera* seeds. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 124, p. 1778–1784, 2012. a.

PAULA, H. C. B. et al. Alginate/cashew gum floating bead as a matrix for larvicide release. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1421–1427, 2012. b.

PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M.; BEZERRA, S. K. F. Swelling and release kinetics of larvicide-containing chitosan/cashew gum beads. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 395–400, 2006. a.

PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M.; BEZERRA, S. K. F. Swelling and release kinetics of larvicide-containing chitosan/cashew gum beads. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 395–400, 2006. b.

PAVELA, R. Lethal and sublethal effects of thyme oil (*Thymus vulgaris* L.) on the house fly (*Musca domestica* Lin.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 346–356, 2007.

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

PAVELA, R. Encapsulation - a convenient way to extend the persistence of the effect of eco-friendly mosquito larvicides. **Current Organic Chemistry**, [s. l.], v. 20, n. 25, p. 2674–2680, 2016.

PAVELA, R.; VRCHOTOVÁ, N.; TŘÍSKA, J. Mosquitocidal activities of thyme oils (*Thymus vulgaris* L.) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, [s. l.], v. 105, n. 5, p. 1365–1370, 2009.

PEREIRA, A. V. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de jurema preta e neen sobre amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em búfalas. **Arquivo do Instituto Biológico**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 341–346, 2009. a.

PEREIRA, A. V. et al. Efeito ovicida e larvicida do extrato de *Azadirachta indica* sobre mosquito *Aedes aegypti*. **Agropecuária Técnica**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 107–111, 2009. b.

- PILATI, F. et al. Designing of antibacterial plastics: thymol release from photocured thymol-doped acrylic resins. **Journal of Materials Science**, [s. l.], v. 48, n. 12, p. 4378–4386, 2013.
- PINTO, C. C. C. et al. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Croton jacobinensis* Baill. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 122–127, 2016.
- PRABHU, K. et al. Larvicidal and repellent potential of *Moringa oleifera* against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 124–129, 2011.
- PRAJAPATI, S. K. et al. Formulation and evaluation of once daily sustained release matrix tablet of verapamil hydrochloride. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 16–24, 2012.
- PRATES, H. T.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. Atividade de extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 437–439, 2003.
- PROENCA-MODENA, J. L. et al. Zika virus: lessons learned in Brazil. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 20, n. 11–12, p. 661–669, 2018.
- PROPHIRO, J. S. et al. Estudo comparativo do efeito larvicida de extratos de frutos verdes e maduros de *Melia azedarach* L. (Sapindales: Meliaceae) em *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **BioAssay**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 1–5, 2008.
- PUBCHEM. **Solubility section**. 2019. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 27 mar. 2019.
- PUTSEYS, J. A.; LAMBERTS, L.; DELCOUR, J. A. Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. **Journal of Cereal Science**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 238–247, 2010.
- QUELLET, C.; TASCHI, M.; UBBINK, J. B. **Mixing of matrix ingredients emulsification of active ingredients processing of matrix mixing of emulsion with matrix extruding through die**, US 2001/0008635 A1, 2001.
-

- RADU, F. A. et al. Modeling of drug release from collagen matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 91, n. 4, p. 964–972, 2002.
- RAO, T. M.; RAO, B. G.; RAO, Y. V. Antioxidant activity of *Spilanthes acmella* extracts. **International Journal of Phytopharmacology**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 216–220, 2012.
- RAVAL, A.; PARIKH, J.; ENGINEER, C. Mechanism of controlled release kinetics from medical devices. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 211–225, 2010.
- REHMAN, J. U.; ALI, A.; KHAN, I. A. Plant based products: use and development as repellents against mosquitoes: a review. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 95, p. 65–74, 2014.
- REIFSTECK, B. M.; JEON, I. J. Retention of volatile flavors in confection by extrusion processing. **Food Reviews International**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 435–452, 2000.
- RÍOS, N.; STASHENKO, E. E.; DUQUE, J. E. Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 307–311, 2017.
- ROBY, M. H. H. et al. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops & Products**, [s. l.], v. 43, p. 827–831, 2013.
- RODRIGUES, E. C. R. et al. Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 699–705, 2014.
- ROMÃO, N. F. et al. Análise fitoquímica e potencial antioxidante do extrato das flores de *Spilanthes acmella*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 23–32, 2015.
- ROTA, M. C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, [s. l.], v. 19, p. 681–687, 2008.
- ROY, A.; BAJPAI, J.; BAJPAI, A. K. Dynamics of controlled release of chlorpyrifos from
-

swelling and eroding biopolymeric microspheres of calcium alginate and starch. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 222–231, 2009.

ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 191–201, 2006.

SANTANA, H. T. et al. Essential oils of leaves of *Piper* species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 105–111, 2015.

SANTOS, A. H. et al. Controle de criadouros dos vetores de dengue e da febre amarela urbana na cidade de Goiânia, com participação popular. **Revista de Patologia Tropical**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 231–241, 1999.

SANTOS, H. M. M. et al. Obtenção de pellets por extrusão e esferonização farmacêutica. Parte I. Avaliação das variáveis tecnológicas e de formulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 455–470, 2004.

SANTOS, S. R. L. et al. Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1049–1054, 2010.

SANTOS, T. P. R. et al. Spray-drying and extrusion processes: effects on morphology and physicochemical characteristics of starches isolated from *Peruvian carrot* and cassava. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 118, n. Part A, p. 1346–1353, 2018.

SARAF, D. K.; DIXIT, V. K. *Spilanthes acmella* Murr.: study on its extract spilanthol as larvicidal compound. **Asian Journal of Experimental Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 9–19, 2002.

SAUNDERS, J.; IZYDORCZYK, M.; LEVIN, D. B. Limitations and challenges for wheat-based bioethanol production. In: BERNARDES, M. A. D. S. (Ed.). **Economic Effects of Biofuel Production**. [s.l.] : IntechOpen, 2011.

SCACCHETTI, F. A. P.; PINTO, E.; SOARES, G. M. B. Functionalization and

characterization of cotton with phase change materials and thyme oil encapsulated in beta-cyclodextrins. **Progress in Organic Coatings**, [s. l.], v. 107, p. 64–74, 2017.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review on Entomology**, [s. l.], v. 35, p. 271–297, 1990.

SCHWARTZ, L. et al. Controlled-release system for the insect growth regulator cyromazine. **Clean Prod Processes**, [s. l.], v. 3, p. 49–54, 2001.

SCHWARTZ, L. et al. Controlled-release systems for the insect growth regulator pyriproxyfen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 20, p. 5985–5989, 2003. a.

SCHWARTZ, L. et al. Controlled-release systems for the delivery of cyromazine into water surface. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 20, p. 5972–5976, 2003. b.

SHARMA, A. et al. Insecticidal toxicity of spilanthol from *Spilanthes acmella* Murr. against *Plutella xylostella* L. **American Journal of Plant Sciences**, [s. l.], v. 3, p. 1568–1572, 2012.

SHARMA, M. et al. Sodium caseinate stabilized clove oil nanoemulsion: physicochemical properties. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 212, p. 38–46, 2017.

SHIRALIPOUR, R.; ZARGAR, B.; PARHAM, H. Temephos removal from water samples by silver modified zero-valent iron nanoparticles. **Jundishapur Journal of Health Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–8, 2015.

SHUTTERSTOCK. **Google pictures for life cycle of mosquito *Aedes aegypti***. 2019. Disponível em: <<https://www.shutterstock.com/image-vector/nature-aedes-aegypti-mosquito-stilt-life-369343772>>. Acesso em: 1 fev. 2019.

SILAPANUNTAKUL, S. et al. Efficacy of thai neem oil against *Aedes aegypti* (L.) larvae. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 410–415, 2016.

SILVA, W. J. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 99, p. 3251–3255, 2008.

SIMAS, N. K. et al. Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) R . K . Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*. **Phytochemistry Letters**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 67–72, 2013.

SINGHVI, G.; SINGH, M. Review: In-vitro drug release characterization models. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, [s. l.], v. II, n. I, p. 77–84, 2011.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.

SOARES-JÚNIOR, M. S.; CALIARI, M.; CHANG, Y. K. Substituição do farelo de soja por farelo integral em rações extrusadas para aqüicultura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 29–37, 2004.

SOBEL, R.; VERSIC, R.; GAONKAR, A. G. Introduction to microencapsulation and controlled delivery in foods. In: GAONKAR, A. et al. (Eds.). **Microencapsulation in the food industry - a practical implementation guide**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 590.

SOEJARTO, D. D. **Common Thyme (*Thymus vulgaris* L.)**. 2007. Disponível em: <<http://pharmacy63.cade.uic.edu/pharmacy/garden/viewPlant.asp?plantID=60>>.

SOLIMAN, E. A. et al. Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and in vitro evaluation of antifungal activity. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, [s. l.], v. 03, n. 01, p. 48–55, 2013.

SOTELO-BOYÁS, M. et al. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 103, p. 409–414, 2017.

STULL, D. R. Vapor pressure of pure substances. Organic and inorganic compounds. **Industrial & Engineering Chemistry**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 517–540, 1947. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie50448a022>>. Acesso em: 26 mar. 2019.

SWEEDMAN, M. C. et al. Structure and physicochemical properties of octenyl succinic

anhydride modified starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 905–920, 2013.

SWEIJEN, T.; VAN DUIJN, C. J.; HASSANIZADEH, S. M. A model for diffusion of water into a swelling particle with a free boundary: application to a super absorbent polymer particle. **Chemical Engineering Science**, [s. l.], v. 172, p. 407–413, 2017.

SYSTEM, T. I. **Physical propperties of spilanthol**. 2019. Disponível em: <<http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1116321.html#tophyp>>. Acesso em: 27 mar. 2019.

SZETO, S. Y.; WAN, M. T. Hydrolysis of azadirachtin in buffered and natural waters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 44, p. 1160–1163, 1996.

TACKENBERG, M. W.; KLEINEBUDDE, P. Encapsulation of liquids via extrusion - A review. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 21, n. 40, p. 5815–5828, 2015.

TAKEUCHI, K. P.; SABADINI, E.; CUNHA, R. L. Análise das propriedades mecânicas de cereais matinais com diferentes fontes de amido durante o processo de absorção de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 78–85, 2005.

TALÓN, E. et al. Release of polyphenols from starch-chitosan based films containing thyme extract. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 175, p. 122–130, 2017.

TAWAKKAL, I. S. M. A.; CRAN, M. J.; BIGGER, S. W. Release of thymol from poly (lactic acid)-based antimicrobial films containing kenaf fibres as natural filler. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 66, p. 629–637, 2016.

THACHIL, M. T.; CHOUKSEY, M. K.; GUDIPATI, V. Amylose-lipid complex formation during extrusion cooking: effect of added lipid type and amylose level on corn-based puffed snacks. **International Journal of Food Science & Technology**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 309–316, 2014.

TOHIDI, B.; RAHIMMALEK, M.; ARZANI, A. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 220, p. 153–161, 2017.

TRIFKOVIĆ, K. et al. Chitosan crosslinked microparticles with encapsulated polyphenols: water sorption and release properties. **Journal of Biomaterials Applications**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 618–631, 2015.

TRIMNELL, D. et al. Encapsulation of EPTC in starch by twin-screw extrusion. **Starch/Stärke**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 146–151, 1991.

TRINDADE, R. C. P. et al. Extrato metanólico da amêndoa da semente de nim e a mortalidade de ovos e lagartas da traça-do-tomateiro. **Scientia Agricola**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 407–413, 2000.

VATANDOOST, H.; VAZIRI, V. M. Larvicidal activity of a neem tree extract (Neemarin) against mosquito larvae in the Islamic Republic of Iran. **Eastern Mediterranean Health Journal**, [s. l.], v. 10, n. 4/5, p. 573–581, 2004.

VENTURA, C. V. et al. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **The Lancet**, [s. l.], v. 387, p. 228, 2016.

VIACAVA, G. E. et al. Effect of free and microencapsulated thyme essential oil on quality attributes of minimally processed lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 145, p. 125–133, 2018.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 390–400, 2003.

VIRTUAL COMPUTATIONAL CHEMISTRY LABORATORY. **Partition coefficient**. 2017. Disponível em: <<http://www.vcclab.org/web/alogps/>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

VOLLHARDT, J.; MANZO, R. P.; MALKAN, N. **Process for producing solid anhydrous composition, and pharmaceutical and cosmetic products comprising same**, US006045823A, 2000.

VOLPE, V. et al. Use of sunflower seed fried oil as an ecofriendly plasticizer for starch and application of this thermoplastic starch as a filler for PLA. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 122, n. September 2017, p. 545–552, 2018.

WEBER, F. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de

amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 748–753, 2009.

WIDAWATI, M.; DHEWANTARA, P. W. Slow-released micro-encapsulated Piper betle L. oil as an alternative biolarvicide for *Aedes aegypti* Linn. In: Second International Conference of the Indonesian Chemical Society 2013, **Anais...** [s.l: s.n.]

WIDAWATI, M.; RIANDI, M. U. The effectiveness of Citronella (*Cymbopogonnardus* L.) microcapsules as larvicides against *Aedes aegypti* larvae. In: International Seminar Integrated Vector Management, UNDIP 2013, **Anais...** [s.l: s.n.]

WING, R. E. et al. Comparison of steam injection cooking versus twin-screw extrusion of pearl cornstarch for encapsulation of chloroacetanilide herbicides. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 16, p. 261–278, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. 2005. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69101/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?sequence=1>. Acesso em: 11 dez. 2018.

YANG, Q. et al. Effect of soybean lecithn in the properties of thermoplastic starch plasticized by extrusion processing. **Current Topics in Nutraceutical Research**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 221–230, 2015.

YILMAZ, G. et al. Encapsulation of sunflower oil in starch matrices via extrusion: effect of the interfacial properties and processing conditions on the formation of dispersed phase morphologies. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 45, p. 403–410, 2001.

ZAHRAN, H. E. M.; ABDELGALEIL, S. A. M. Insecticidal and developmental inhibitory properties of monoterpenes on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, [s. l.], v. 14, p. 46–51, 2011.

ZHU, J. et al. Adult repellency and larvicidal activity of five plant essential oils against mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 515–22, 2006.

ZIMMERMAN, M.; SNOW, B. A closer look at carbohydrates. In: **An introduction to**

nutrition. v. 1 ed. [s.l.] : Lardbucket, 2012.

8. ANEXOS

8.1. SUGESTÕES PARA OUTROS TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos posteriores, seria interessante continuar o estudo do desenvolvimento de carreadores biodegradáveis de baixo custo de acordo com as seguintes possibilidades:

- Realizar a atividade larvicida do extrato de neem obtido a partir das suas sementes, a fim de obter maior concentração de azadiractina; em seguida, verificar a estabilidade da azadiractina por quantificação por cromatografia líquida antes de avaliar a sua atividade biológica, pois este metabólito pode ter degradado devido ao longo da vida útil do extrato, pela ação do calor, oxigênio, luz ou da água;
 - Verificar a atividade larvicida de um composto hidrofílico com a hipótese de ter maior afinidade pelo meio aquoso e se difundir mais facilmente, visto que o neem com menor coeficiente de partição dentre os larvicidas testados não apresentou eficiência. Em caso de êxito, microencapsular com os mesmos parâmetros da melhor formulação (15% de amilose com óleo essencial de tomilho livre), para enfim comparar os desempenhos físico-químicos e biológicos das partículas produzidas com o composto;
 - Reduzir a quantidade de óleo de tomilho livre para 3% para a melhor formulação e verificar a manutenção da eficiência larvicida das partículas;
 - Avaliar a atividade larvicida das partículas com menor quantidade de partículas no teste e verificar a manutenção da eficiência larvicida das partículas;
 - De acordo com a revisão de literatura, o óleo essencial da casca de laranja apresenta boa atividade larvicida, o que aliado ao fato da matéria-prima estar sendo reaproveitada, o coeficiente de partição do metabólito limoneno ser inferior ao do timol, seria interessante utilizá-lo como substituto ao óleo essencial de tomilho na microencapsulação com a melhor formulação. Se os resultados forem positivos, testar também a mistura entre os dois óleos essenciais em diferentes proporções e verificar o possível efeito sinérgico e/ou potencializador da mistura;
 - Variar os parâmetros operacionais durante a microencapsulação, tais como velocidade da rosca, temperatura e pressão no extrusor dupla-rosca;
 - Fazer a análise de viabilidade econômica da produção industrial da melhor formulação;
-

- Desenvolver ou aplicar um modelo matemático para a liberação de óleo que considere a alteração do tamanho da partícula ao longo do tempo para mais (inchamento) e para menos (lixiviação) e verificar a sua adequação aos dados experimentais;
- Registrar as cinéticas de inchamento, lixiviação e liberação com fotografias tiradas em microscópio para aferir a variação individual de tamanho;
- Avaliar a toxicidade das partículas frente a outros organismos aquáticos;
- Testar outros agentes emulsificantes para melhorar a interação do óleo de tomilho no meio aquoso, como lecitina por exemplo, e avaliar a atividade larvicida do óleo emulsionado antes de utilizá-lo como material de recheio na microencapsulação;
- Determinar a quantidade de óleo na superfície das partículas referente à análise de eficiência de encapsulação;
- Determinar a atividade de água para confirmar a estabilidade das partículas;
- Definir a vida útil das partículas, tanto para fins de armazenamento/comercialização, como para acompanhar o efeito protetor do sistema ao óleo essencial de tomilho, por análise de calorimetria exploratória diferencial por exemplo;
- Realizar a análise de microscopia eletrônica de varredura das partículas após sua fratura, mediante congelamento prévio, para comparar as estruturas superficial e interna;
- Tentar quantificar a lixiviação de sólidos das partículas por variação da absorbância da solução além da variação em massa.

8.2. CADASTRO DA PESQUISA NO SISGEM

A pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado sob o número #ADE6C93 em agosto de 2018.

8.3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Na Tabela 23 são apresentadas as principais atividades realizadas durante a execução do Doutorado. O título da qualificação de área era “Avaliação da atividade larvicida contra *Aedes aegypti* do extrato de jambu (*Acmella oleraceae*) livre e encapsulado”. Com a evolução do

projeto, o título foi alterado na qualificação geral para “Investigação da produção de carreadores biodegradáveis para veicular larvicida natural contra *Aedes aegypti*” e foi mantido para a defesa.

Tabela 23: Cronograma de execução do Doutorado

Atividade	Ano	2016				2017				2018				2019			
	Meses	01 a 03	04 a 06	07 a 09	10 a 12	01 a 03	04 a 06	07 a 09	10 a 12	01 a 03	04 a 06	07 a 09	10 a 12	01 a 03	04 a 06	07 a 09	
Disciplinas obrigatórias e optativas		x	x	x	x			x	x								
Revisão bibliográfica				x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Parte experimental				x	x	x	x	x	x	x	x	x					
Avaliação de projetos de iniciação científica					x				x						x		
Qualificação de área					x												
Publicações de resumos em eventos científicos									x			x	x	x			
Participação no Programa Ciência e Arte nas Férias						x						x					
Estágio docência								x	x	x	x	x	x				
Depósito de pedido de patente								x	x								
Qualificação geral												x					
Publicações de artigos científicos													x	x	x	x	
Defesa do Doutorado																x	

8.3.1. Participação em eventos científicos

Participante e monitora da sessão de pôster do *1st International Congress on Bioactive Compounds and 2nd International Workshop on Bioactive Compounds*, Campinas, 2018.

Participante do XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, São Paulo, 2018.

Participante do III Congresso Óleos e gorduras – *International Meeting on Fats na Oils*, Campinas, 2018.

Participante do 12º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2017.

Ouvinte da mesa redonda: o Agropolo Campinas-Brasil e a inovação na produção de alimentos, 2016.

Avaliadora de trabalhos de iniciação científica no XXV Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP, Campinas, 2017.

Avaliadora de trabalhos de iniciação científica na área Tecnológicas no XXIV Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP, Campinas, 2016.

8.3.2. Estágio em docência

Participação no Programa de Estágio em Docência (PED, Grupo C) bolsista na disciplina Projeto Industrial em 2018/2 do curso de Engenharia de Alimentos da UNICAMP sob supervisão da Profa. Dra. Miriam Hubinger.

Participação no Programa de Estágio em Docência (PED, Grupo C) voluntário na disciplina Termodinâmica em 2018/1 do curso de Engenharia de Alimentos da UNICAMP sob supervisão do Prof. Dr. Julian Martinez.

Participação no Programa de Estágio em Docência (PED, Grupo C) voluntário na disciplina Operações Unitárias II em 2017/2 do curso de Engenharia de Alimentos da UNICAMP sob supervisão do Prof. Dr. Julian Martinez.

8.3.3. Monitoria

Monitora do Projeto CAF - Ciência e Arte nas Férias 2018. Projeto intitulado Avaliação das partículas produzidas por diferentes técnicas de encapsulação (gotejamento e *jet cutter*) para imobilização de lipase em microgéis de alginato de sódio. Orientação da Profa. Dra. Ana Silvia Prata e apoio de outros colaboradores e monitores do Laboratório de Inovação de Alimentos (LINA/FEA/Unicamp). Participaram deste projeto três jovens de ensino médio da rede pública de ensino de Campinas.

Colaboradora no XV CAF - Ciência e Arte nas Férias 2017. Projeto intitulado Visão Geral de técnicas de encapsulação e vida prática em laboratório. Orientação da Profa. Dra. Ana Silvia

Prata e apoio de outros colaboradores e monitores do Laboratório de Inovação de Alimentos (LINA/FEA/Unicamp). Participaram deste projeto dois jovens de ensino médio da rede pública de ensino de Campinas.

8.3.4. Inscrição em prêmios

A presente tese foi inscrita no Prêmio Péter Murányi 2018 – Saúde, com indicação da Diretoria da FEA/UNICAMP e no Prêmio Jovem Cientista 2018.

8.4. PUBLICAÇÕES

8.4.1. Resumos

MAIA, J. D.; PAREDES, C.M.; TRIGO, J. R.; CLERICI, M. T. P. S.; SCHMIELE, M.; LA CORTE, R.; RODRIGUES, R. A. F.; MARTINEZ, J.; UBBINK, J.; PRATA, A. S. Production of biodegradable particles with thyme essential oil. Apresentação de pôster no 12º Congresso Latino-Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, 2017.

MAIA, J. D.; PAREDES, C.M.; TRIGO, J. R.; CLERICI, M. T. P. S.; SCHMIELE, M.; LA CORTE, R.; RODRIGUES, R. A. F.; MARTINEZ, J.; UBBINK, J.; PRATA, A. S. Biodegradable carriers for the controlled release of actives against *Aedes aegypti*. Apresentação oral (por J. Ubbink) de resumo simples no 7th International Symposium on Delivery of Functionality in Complex Food Systems, Nova Zelândia, 2017.

MAIA, J. D.; PAREDES, C.M.; CLERICI, M. T. P. S.; SCHMIELE, M.; MARTINEZ, J.; UBBINK, J.; PRATA, A. S. Biodegradable starch matrices as renewable and sustainable delivery systems. Apresentação oral (por A.S. Prata) de resumo simples no 5th International ISEKI_Food Conference, Stuttgart, 2018.

MAIA, J. D.; PAREDES, C.M.; RODRIGUES, R. A. F.; LA CORTE, R.; UBBINK, J.; TRIGO, J. R.; SCHMIELE, M.; CLERICI, M. T. P. S.; MARTINEZ, J.; PRATA, A. S. Avaliação biológica de óleos comerciais e extratos naturais de tomilho, neem e jambu. Apresentação de pôster (por J.D. Maia) de resumo simples no III Congresso Óleos e gorduras – International Meeting on Fats na Oils, Campinas, 2018.

MAIA, J. D.; PAREDES, C.M.; MARTINEZ, J.; UBBINK, J.; PRATA, A. S. Mecanismos de liberação de óleo essencial de tomilho em sistema carreador biodegradável. Apresentação oral (por J.D. Maia) de resumo expandido no XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, São Paulo, 2018.

MAIA, J. D.; GONÇALVES, N. D.; LA CORTE, R.; DUARTE, M. C. T.; DERLAMELINA, C.; RODRIGUES, R. A. F.; PRATA, A. S. Biological activities of thyme essential oil free and microencapsulated by thermoplastic extrusion and complex coacervation. Apresentação de pôster (por J.D. Maia) de resumo simples no 1st International Congress on Bioactive Compounds and 2nd International Workshop on Bioactive Compounds, Campinas, 2018.

8.4.2. Patente

MAIA, J. D.; PAREDES, C.M.; UBBINK, J.; PRATA, A. S. Partícula biodegradável e uso. BR 10 2017 026411 4, 2017.

8.4.3. Artigos científicos

MAIA, J. D.; LA CORTE, R.; MARTINEZ, J.; UBBINK, J.; PRATA, A. S. Improved activity of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) against *Aedes aegypti* larvae using a biodegradable controlled release system. Aceito em 2019 pela Industrial Crops and Products e está em fase de edição.

MAIA, J. D.; SCHMIELE, M.; MARTINEZ, J.; UBBINK, J.; PRATA, A. S. Production of biodegradable particles for controlled release applications. Part I. Effect of starch composition and processing conditions on swelling and leaching. Será submetido ao Journal of Applied Polymer Science.

MAIA, J. D.; LA CORTE, R.; MARTINEZ, J.; UBBINK, J.; PRATA, A. S. Production of biodegradable particles for controlled release applications. Part II. Effect of starch composition and processing conditions on oil release and biological activity. Será submetido ao Journal of Applied Polymer Science.

MAIA, J. D.; GONÇALVES, N. D.; LA CORTE, R.; DUARTE, M. C. T.; DERLAMELINA, C.; RODRIGUES, R. A. F.; PRATA, A. S. Biological activities of thyme essential oil free and microencapsulated by thermoplastic extrusion and complex coacervation. Será submetido ao Journal of Microencapsulation.
