



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - RENORBIO

MILENA ALENCAR ESMERALDO

**BIOPRODUTOS DERIVADOS DE BIOMASSA VEGETAL NO COMBATE AO
MOSQUITO TRANSMISSOR DA DENGUE - *Aedes aegypti***

FORTALEZA

2016

MILENA ALENCAR ESMERALDO

BIOPRODUTOS DERIVADOS DE BIOMASSA VEGETAL NO COMBATE AO
MOSQUITO TRANSMISSOR DA DENGUE - *Aedes Aegypti*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Elaine Mazzetto.

FORTALEZA

2016



DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Data: 24/08/2016
Aluno(a): MILENA ALENCAR ESMERALDO
Orientadora: .Selma Elaine Mazzetto

AVALIAÇÃO
Aprovado ou Reprovado

Profa. Dra. Selma Elaine Mazzetto
Presidente

 - APROVADA

Prof. Dr. Diego Lomonaco Vasconcelos de
oliveira
Examinador

 - APROVADA

Profa. Dra. Maria Izabel Gallão
Examinadora



Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto
Examinador



Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine
Examinador

 - APROVADA

SITUAÇÃO
Aprovado ou Reprovado

APROVADA

Local: Departamento de Química Orgânica e Inorgânica - Sala 01 - Bloco 940 -
Campus do Pici - UFC

***Aos meus amados pais, Neyde e Paulo, pelo amor incondicional,
apoio, dedicação, exemplo e esforços sem limites que sempre
tiveram por mim.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Dom da vida, sabedoria, pela família, por ser meu grande mentor.

Aos queridos irmãos (André e Maria Pia), pelo carinho, amizade e incentivos constantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu irmão Tiago (*in memoriam*) por todo apoio, amizade, carinho, cuidados e também incentivos sempre dados enquanto estivemos juntos em sua jornada.

Aos sobrinhos amados: João Paulo, Pedro Lucas e Maria Júlia.

Ao meu noivo, André Garcez, obrigada pelo amor, companheirismo, apoio, amizade, paciência e dedicação.

Aos tios-pais Assis Leite e Cristina Barreto por todo o amor, apoio, carinho e atenção desde minha infância e sempre que aqui precisei.

À professora Dr^a. Selma Elaine Mazzetto, querida orientadora, sou grata por todo o apoio, orientação, dedicação, conselhos, em todos os momentos desde o meu início na pesquisa. Agradeço a amizade sincera e confiança durante todo nosso convívio científico.

À minha amiga Iracema Mariano, obrigada pelo apoio, colaboração e amizade.

Aos colegas de pesquisa do LPT (Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos), do qual faço parte, agradeço por todos os momentos de convívio e aprendizagem que compartilhamos.

À professora Dr^a. Maria Izabel Gallão, pelo carinho com que sempre me recebeu, pela parceria e colaboração nos estudos de citoquímica.

Ao pesquisador Dr. Gustavo Saavedra (EMBRAPA - CE) pela parceria e colaboração dispensadas durante as etapas de secagem por atomização no Spray Dryer.

À professora Dr^a. Nágila Ricardo agradeço a colaboração.

À professora Dr^a. Ana Angélica Mathias Macêdo pela parceria, colaboração, incentivo constante e amizade.

Aos *bioamigos* queridos do doutorado RENORBIO, obrigada pela amizade e pelos momentos inesquecíveis que tivemos nessa jornada.

A você André Leandro, agradeço a parceria, companhia, colaboração e, principalmente, pela amizade e carinho durante toda essa caminhada e que será para sempre.

Às queridas amigas Cláudia Oliveira, Eriplane Cruz e Gracyelle Arraes e Rafaela Gonçalves, pelo apoio constante, amizade, conselhos e por todos os momentos adoráveis que já compartilhamos.

Ao NUVET – Núcleo de Controle de Vetores e Endemias do Estado do Ceará - agradeço a todos da equipe pela parceria e contribuição na realização dos ensaios de laboratório e campo.

À Central Analítica – UFC pela realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Programa de Pós-Graduação RENORBIO - Rede Nordestina de Biotecnologia e ao Departamento do Curso de Química Orgânica e Inorgânica pela oportunidade de obtenção do grau de Doutora.

A todos os colegas e professores que participaram da minha jornada acadêmica.

Às amigas Adna Girão e Natália Lima que muito me ajudaram.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP - pela bolsa concedida.

À Universidade Federal do Ceará.

Meus agradecimentos.

“ Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados”.
(Mahatma Gandhi)

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal transmissor responsável pela disseminação de doenças como Febre Chikungunya, Zika e Dengue. Na ausência de uma vacina eficaz para todos os tipos de afecções transmitidas, o controle ainda é realizado por meio da eliminação dos criadouros potenciais dos mosquitos através da aplicação de larvicidas e inseticidas durante o período de transmissão. No tocante aos inseticidas, os mais usados estão se tornando obsoletos devido ao surgimento de linhagens de mosquitos resistentes. Dentro deste contexto, este trabalho tem como proposta a obtenção, caracterização e aplicação de bioprodutos para o controle das larvas e ovos do mosquito *Aedes aegypti*, a partir principalmente de biomassa vegetal, mais precisamente o Líquido da casca da castanha de caju natural e técnico, os constituintes cardanol, cardol, atuando como material de núcleo e galactomananas oriundas de endospermas de sementes da espécie *Adenanthera pavonina L.* como material encapsulante. Os bioprodutos encapsulados, obtidos através de secagem por atomização em Spray Dryer, foram caracterizados estruturalmente por espectroscopia de Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV, Termogravimetria - TG, Espalhamento de Luz Dinâmico - DLS e através dos perfis cinéticos de liberação *in vivo* e *in vitro*. Ensaio biológicos com larvas de 3º estágio do mosquito *Aedes aegypti* foram realizados em diferentes concentrações (10 – 20 – 40 – 80 – 100 - 200 – 400 -800 – 1000) ppm dos bioprodutos. Em concentrações acima de 200 ppm todos os bioprodutos apresentaram índices de mortalidade acima de 80%, principalmente observado para o LCC natural, sendo este percentual considerado satisfatório para larvicidas pela Organização Mundial de Saúde - OMS. Ensaio biológicos de atividade de oviposição e ovicida no intervalo de concentrações (200 - 500 – 800) ppm também foram realizados apresentando percentuais de repelência à oviposição acima de 60 % bem como baixos índices de eclosão dos ovos e crescimento das larvas. Esses resultados trazem boas perspectivas quanto à utilização destes bioprodutos no combate/controlar ao mosquito *Aedes aegypti* sugerindo potenciais aplicações nos preceitos da Química Verde.

Palavras-chave: Galactomanana; Microesferas; *Aedes aegypti*; Atividade larvicida e ovicida, LCC.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the main vector responsible for the spread of diseases like Chikungunya Fever, Zika and Dengue. Due to the absence of an effective vaccine for all kinds of diseases, the control is still accomplished through the elimination of *potential mosquito breeding grounds* by applying larvicides during the period of transmission. Regarding to pesticides, the most used are becoming obsolete due to the emergence of resistant strains of mosquitoes. Given this context, this study aimed at obtaining, characterizing and testing bioproducts to selective control of larvae and eggs of *Aedes aegypti*, adding value to the plant biomass, more precisely the Cashew Nut Shell Liquid technical and natural and constituents cardanol, cardol acting as core material and galactomannans derived of the endosperm of seeds of *Adenanthera pavonina L.* species as encapsulant. Encapsulated bioproducts, obtained by spray drying Spray Dryer, were characterized by spectroscopy Scanning Electron Microscopy - SEM, Thermogravimetric analysis - TG, Dynamic Light Scattering - DLS and through the kinetic profiles of release *in vivo* and *in vitro*. Laboratory bioassays were performed with larvae of the 3rd stage *Aedes aegypti* mosquito at different concentrations (10 - 20 - 40 – 80 -100 – 200 - 400 - 800 - 1000) ppm of bioproducts. Above 200 ppm concentration all bioproducts showed mortality rates above 80%, mainly noted for LCC natural, and the percentage considered acceptable by the World Health Organization - WHO to larvicides. Biological assays oviposition and ovicidal activity in the concentration range (200 - 500 - 800) ppm were also performed showing percentage repellence oviposition above 60% and low rates of hatching eggs and larvae growth. These results bring good prospects regarding the use of bioproducts in combat / control the mosquito *Aedes aegypti* suggesting potential applications in the precepts of Green Chemistry.

Keywords: Galactomannan; Microspheres; *Aedes aegypti*; Larvicidal and ovicidal activity, CNSL.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Áreas vulneráveis da dispersão da Dengue em todo o planeta. | 21 |
| Figura 2 - Casos de dengue notificados no Brasil em 2013 a janeiro de 2014..... | 22 |
| Figura 3 - Gráfico da evolução da dengue no Ceará em 30 anos. | 23 |
| Figura 4 - Fases do desenvolvimento do mosquito <i>Aedes aegypti</i> | 24 |
| Figura 5 - Compostos organossintéticos utilizados como pesticidas..... | 28 |
| Figura 6 - Estruturas química dos compostos utilizados como IGRs. | 31 |
| Figura 7 - Estrutura geral das galactomananas e suas principais unidades | 33 |
| Figura 8 - Árvores (a) e sementes (b) da espécie <i>Adenantha pavonina L.</i> | 35 |
| Figura 9 - Representação da estrutura dos tipos de micropartículas: sistema reservatório ou microcápsula (a) e matricial ou microesfera (b)..... | 37 |
| Figura 10 - O Cajueiro (a) e o caju dividido em pedúnculo e castanha (b)..... | 39 |
| Figura 11 - Seção transversal da castanha de caju. | 39 |
| Figura 12 - Líquido da casca da castanha de caju – LCC..... | 40 |
| Figura 13 - Principais constituintes fenólicos do LCC. | 41 |
| Figura 14 - Reação de descarboxilação do ácido anacárdico. | 41 |
| Figura 15 - Fluxograma das etapas de obtenção da galactomanana..... | 47 |
| Figura 16 - Fluxograma do procedimento de obtenção dos bioprodutos | 48 |
| Figura 17 - Iscas utilizadas nos ensaios de oviposição (a) e gaiola de criação de mosquitos (b)..... | 51 |
| Figura 18 - Cartelas contendo ovos obtidos nos ensaios de oviposição. | 52 |
| Figura 19 - Espectro de massa obtido para o cardol..... | 58 |
| Figura 20 - Espectro de RMN ¹ H para o cardol. | 59 |
| Figura 21 - Espectro de massa para o cardanol..... | 59 |
| Figura 22 - Espectro de RMN ¹ H para o cardanol. | 60 |
| Figura 23 - Espectro de RMN ¹ H do LCC natural..... | 61 |
| Figura 24 - Espectro de RMN ¹ H do LCC técnico. | 62 |
| Figura 25 - (a) Semente de <i>Adenantha pavonina L.</i> ; (b) Corte de seção transversal apresentando as estruturas internas; (c) semente após reação com o PAS, destacando a intensa coloração do endosperma (EN) e (d) semente corada com XP destacando a presença de proteínas citoplasmáticas - Barras: 100 µm | 65 |
| Figura 26 – Espectro de RMN do Hidrogênio - ¹ H da galactomanana de <i>Adenantha pavonina L.</i> para obtenção da razão Gal/Man..... | 66 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 27 - Espectro de RMN Carbono - ^{13}C da galactomanana da <i>Adenantha pavonina</i> L. para obtenção da razão Man/Gal..... | 67 |
| Figura 28 - Espectro na região do infravermelho para a galactomanana natural..... | 69 |
| Figura 29 - Fotomicrografia das microesferas de galactomanana <i>Adenantha pavonina</i> L. produzidas após secagem por atomização..... | 70 |
| Figura 30 - Fotomicrografias dos bioprodutos produzidos após encapsulação. Concentração galactomanana/material de núcleo (2:1). cardanol (A), LCC natural (B), cardol (C) e LCC técnico (D). | 71 |
| Figura 31 - Fotomicrografias da morfologia externa dos bioprodutos produzidos após encapsulação. Concentração galactomanana/material de núcleo (4:1). LCC natural (A), cardanol (B), cardol (C), LCC técnico (D)..... | 73 |
| Figura 32 - Curvas de TG dos bioprodutos estudados..... | 74 |
| Figura 33 - DTG da galactomanana e dos bioprodutos a 10 °C/min em atmosfera inerte de N_2 | 75 |
| Figura 34 – Gráfico da comparação dos perfis de liberação em água dos bioprodutos LCC natural, LCC técnico e Cardol. | 80 |
| Figura 35 - Gráfico do número de larvas mortas após a ação larvicida dos bioprodutos..... | 85 |
| Figura 36 - Fotos de larvas do 3º estágio do <i>Aedes aegypti</i> após a ação dos bioprodutos: Controle (a), cardanol (b); LCC natural (c); cardol (d) e LCC técnico (e). | 89 |
| Figura 37 - Fotos após a oviposição: isca controle (galactomanana + maltodrextina) (a) e iscas contendo os bioprodutos nas concentrações avaliadas (b). | 91 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Resultados de CL ₅₀ para os constituintes do LCC sobre larvas do <i>Aedes aegypti</i> | 42 |
| Tabela 2 - Principais bandas no infravermelho com as correspondentes vibrações para galactomanana de <i>Adenantha pavonina L.</i> | 69 |
| Tabela 3 - Parâmetros de estabilidade térmica das amostras estudadas. | 76 |
| Tabela 4 - Valores obtidos do tamanho de partícula e Potencial Zeta dos bioprodutos e galactomanana..... | 77 |
| Tabela 5 - Resultados obtidos no estudo cinético e Eficiência de Encapsulamento (EE) para os bioprodutos..... | 79 |
| Tabela 6 - CL ₅₀ para o LCC e seus derivados antes da encapsulação. | 83 |
| Tabela 7 - Resultados de mortalidade de larvas e CL ₅₀ obtidos nos ensaios de laboratório para os bioprodutos encapsulados..... | 84 |
| Tabela 8 - Resultados da avaliação da atividade larvicida dos bioprodutos nos ensaios realizados <i>sem troca</i> de água..... | 87 |
| Tabela 9 - Resultados da avaliação da atividade larvicida dos bioprodutos nos ensaios realizados <i>com troca</i> de água..... | 88 |
| Tabela 10 - Ensaio de atividade de oviposição os para os bioprodutos em função das concentrações e E.R (Eficiência de Repelência)..... | 92 |
| Tabela 11 - Resultados da atividade ovicida dos bioprodutos para diferentes concentrações..... | 94 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC Amêndoa de Castanha de caju

AP *Adenhantera pavonina* L.

ASTM American Society for Testing and Materials

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AT Azul de Toluidina

Bti *Bacillus thuringiensis var israelensis*

CCD Cromatografia de Camada Delgada

CG/EM Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massa

CENAUREM Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento

CNSL Cashew Nut Shell Liquid

DCSA Dengue com sinais de alarme

DENV - Dengue Vírus Sorotipo

DG Dengue grave

EAC Escola de Agronomia do Ceará

ECDC European Centers for Disease Control and Prevention

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FIEC Federação das Indústrias do Estado do Ceará

FUNASA Fundação Nacional de Saúde

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGR Insect Growth Regulator

IOC Instituto Oswaldo Cruz

IUPAC União Internacional de Química Pura e Aplicada

LCC Líquido da Casca da Castanha de caju

G/M razão entre Galactose: Manose

MEV Micrografia Eletrônica de Varredura

MS Ministério da Saúde

NUVET Núcleo de Controle de Vetores e Endemias da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará

OMS Organização Mundial da Saúde

PA Padrão Analítico

PAS Periodic Acid Shift

TGA Thermogravimetric Analysis

SINAN Sistema de Informação de Agravo de Notificação

SINDCAJU Sindicato das Indústrias de Beneficiamento de Castanha de caju e Amêndoas Vegetais do Estado do Ceará

SSE (Sesa) Secretaria de Saúde do Estado do Ceará

SVS Secretaria de Vigilância Sanitária

UBV Ultra Baixo Volume

UFC Universidade Federal do Ceará

XP Xylidine Ponceau

WHO World Health Organization

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 19 |
| 2.1. Dengue | 19 |
| 2.1.1. Epidemiologia da Dengue..... | 20 |
| 2.1.2. Vetor da dengue - <i>Aedes aegypti</i> | 24 |
| 2.1.3. O combate ao <i>Aedes aegypti</i> | 26 |
| 2.2. Pesticidas..... | 27 |
| 2.2.1. Classificação..... | 27 |
| 2.2.2. Inseticidas alternativos..... | 30 |
| 2.3. Biomassa Vegetal | 32 |
| 2.3.1. Galactomananas..... | 32 |
| 2.3.2. Aplicações das galactomananas | 35 |
| 2.3.3. Galactomananas e a microencapsulação..... | 36 |
| 2.4. Caju e Líquido da casca da castanha de caju – LCC..... | 38 |
| 3. OBJETIVOS | 44 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 44 |
| 3.2. Objetivos específicos | 44 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 45 |
| 4.1. Material | 45 |
| 4.2. Métodos | 45 |
| 4.2.1. Extração do LCC natural..... | 45 |
| 4.2.2. Separação do cardanol a partir do LCC técnico | 45 |
| 4.2.3. Separação do cardol a partir do LCC técnico | 46 |
| 4.2.4. Extração da galactomanana | 46 |
| 4.2.5. Preparação dos bioprodutos..... | 47 |
| 4.2.6. Ensaio da Atividade larvicida (pré - encapsulação)..... | 48 |
| 4.2.7. Ensaio da Atividade larvicida (após - encapsulação)..... | 49 |
| 4.2.8. Ensaio simulado de campo da atividade larvicida | 50 |
| 4.2.9. Ensaio da atividade de oviposição | 50 |
| 4.3.0. Ensaio da atividade ovicida..... | 52 |
| 5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO | 53 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1. Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) | 53 |
| 5.2. Microscopia Óptica..... | 53 |
| 5.3. Termogravimetria (TGA) | 53 |
| 5.4. Espectroscopia no Infravermelho (IV) | 55 |
| 5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 55 |
| 5.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H (RMN)..... | 55 |
| 5.7. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) | 56 |
| 5.8. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)..... | 56 |
| 5.9. Espectroscopia do Ultravioleta - Visível (UV-Vis)..... | 56 |
| 5.9.1. Curvas padrão | 56 |
| 5.9.2. Estudo cinético da liberação de óleo <i>in vitro</i> | 57 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 58 |
| 6.1. Isolamento do cardol..... | 58 |
| 6.2. Isolamento do cardanol..... | 59 |
| 6.3. Isolamento do LCC natural | 61 |
| 6.4. Caracterização da galactomanana..... | 63 |
| 6.4.2. Análise estrutural da galactomanana pura..... | 65 |
| 6.4.3. Espectroscopia no Infravermelho - galactomanana | 68 |
| 6.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura - galactomanana | 70 |
| 6.5. Caracterização dos Bioprodutos Encapsulados..... | 71 |
| 6.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura | 71 |
| 6.5.2. Termogravimétrica | 74 |
| 6.5.3. Dinamic Light Scatering - DLS e Potencial Zeta | 77 |
| 6.5.4. Estudo cinético da liberação dos bioprodutos em meio aquoso. | 79 |
| 6.6. Ensaio de laboratório da atividade larvicida sobre o <i>Aedes aegypti</i> (antes da encapsulação)..... | 82 |
| 6.6.1 Ensaio de laboratório da atividade larvicida sobre <i>Aedes aegypti</i> (após encapsulação) | 84 |
| 6.6.2. Ensaio simulado de campo da atividade larvicida dos produtos encapsulados..... | 86 |
| 6.6.3 Ensaio da atividade de oviposição | 90 |
| 6.6.4. Avaliação da atividade ovicida sobre a eclosão de ovos <i>Aedes aegypti</i> ...93 | |
| 7. CONCLUSÃO..... | 97 |

| | |
|------------------|-----|
| REFERÊNCIAS..... | 98 |
| GLOSSÁRIO | 117 |

1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor responsável pela transmissão de doenças virais como Febre Chikungunya, Zika e Dengue. Entre as doenças transmitidas, a dengue é a mais grave, e por isso, ocupa uma posição de destaque entre as grandes preocupações na saúde pública dos países tropicais e subtropicais (DUPONT *et al.*, 2012, BENELLI, 2015). O agente etiológico da dengue é um arbovírus, do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*. São conhecidos quatro tipos imunológicos do vírus sendo designados: Dengue Vírus Sorotipo - DENV: Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4 (WHO, 2012).

Diante da falta de uma vacina eficiente para todos os tipos de doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti*, o seu controle ainda é a única forma de intervenção e combate, sendo realizado através da eliminação dos criadouros potenciais, da aplicação de larvicidas em depósitos de água para consumo e do uso de inseticidas para combater as formas adultas durante os períodos de transmissão (KONISHI, 2011; GUPTA; REDDY, 2013).

Considerando a grave situação no Brasil em decorrência do aumento dos casos de epidemias de Dengue e Zika e conscientes da prática de uma química ambientalmente correta e menos poluente, o presente estudo se justificou pela proposta de obtenção, caracterização e aplicação de bioprodutos com atividade larvicida e ovicida contra o mosquito *Aedes aegypti* a partir de biomassa vegetal (fonte renovável e biodegradável) mais especificamente o Líquido da casca da castanha de caju – LCC (natural e técnico) e os constituintes cardanol e cardol, atuando como materiais de núcleos e polissacarídeos naturais denominados galactomananas, extraídos de endospermas da espécie vegetal *Adenantha pavonina L.*, atuando como material encapsulante.

Sabendo-se que a Biotecnologia consta de “qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica” (BRASIL DECRETO Nº 6.041, 2007), os novos bioprodutos gerados atenderam a vertente tecnológica esperada mostrando boa atividade larvicida e ovicida contra o mosquito *Aedes aegypti* bem como estão de acordo com dois dos Princípios da Química Verde, entre eles, a *Síntese de Produtos Menos Perigosos* e o *Uso de Fontes de Matéria-Prima Renováveis*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Dengue

A dengue é uma doença infecciosa febril aguda considerada como a mais importante arbovirose que afeta o homem, constituindo um grave problema de saúde pública no mundo. Cerca de 3,6 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco, principalmente a população urbana (GLUBER, 2011). Essas áreas estão concentradas, sobretudo nos países de clima tropical e subtropical, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, seu principal transmissor.

O agente etiológico da dengue é um arbovírus, pertencente ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*. As primeiras notificações do vírus da dengue ocorreram no final do século XVIII com epidemias quase simultâneas: no ano de 1779, em Jacarta, Indonésia, Cairo, Egito, e, em 1780, na cidade da Filadélfia, Pensilvânia, nos Estados Unidos (CLETON *et al.*, 2012).

A transmissão da dengue para o ser humano se faz através da picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* durante a captação de sangue (hematofagia), que é necessária para completar o processo de amadurecimento dos ovos (SCOTT; TAKKEN, 2012; DELATTE; DESVARS; BOUETARD, 2010). Desde que o sangue do hospedeiro esteja infectado, o mosquito estará apto a transmitir o vírus após 8 a 12 dias sendo este intervalo considerado como o período de incubação ou transmissão extrínseco. Esta condição permanece até o final de sua vida (6 a 8 semanas).

O período de transmissibilidade intrínseco ocorre no hospedeiro enquanto houver a presença do vírus no sangue (período de viremia), que começa um dia antes do aparecimento da febre e vai até o 6º dia da doença. Não há transmissão por contato direto de um doente ou de suas secreções com pessoas saudáveis, nem por intermédio de água ou alimento contaminado (GUBLER, 2011; MS, 2013; SVS, 2014).

O quadro clínico da dengue envolve sintomas como febre, enxaqueca, dor retro-orbital, fraqueza, perda de apetite; vômitos e diarreia moderada. Às vezes aparecem manchas vermelhas no corpo. A febre dura cerca de cinco dias, com melhora progressiva dos sintomas em 10 dias. As formas da dengue com sinais de alarme (DCSA) e a dengue grave (DG) são caracterizadas por dor abdominal

intensa e contínua; vômitos persistentes; sangramento de mucosas; choque devido ao extravasamento grave de plasma e comprometimento grave dos órgãos (BHATT; GETHING; BRADY, 2013). Cada vez que uma pessoa é infectada por um dos tipos, ela adquire imunidade permanente a ele e imunidade parcial e temporária contra os demais.

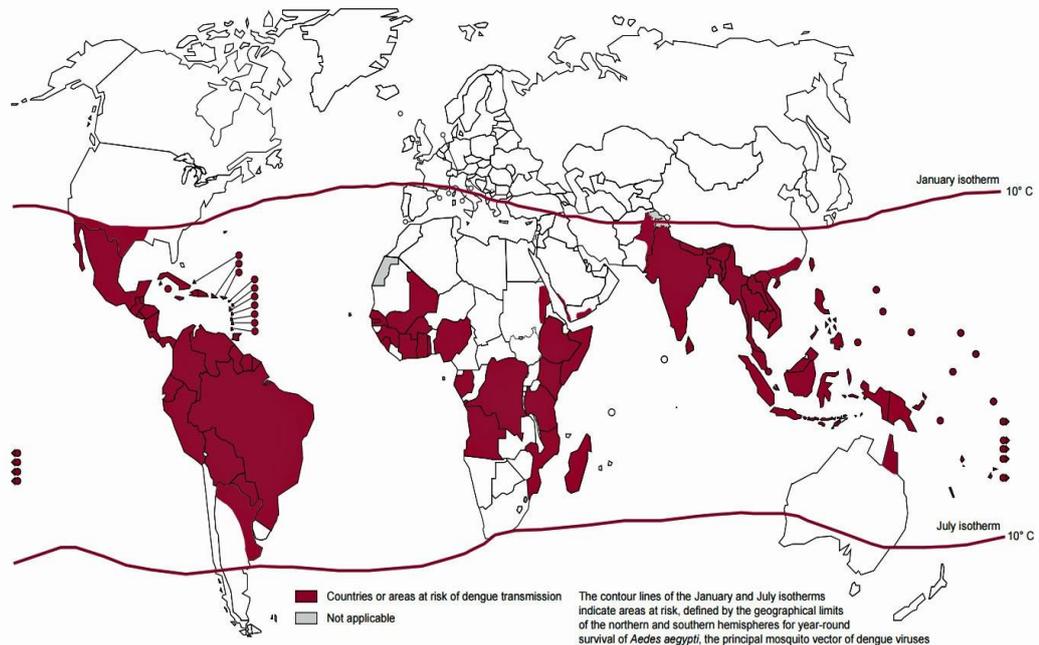
2.1.1. Epidemiologia da Dengue

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento de casos de dengue no Brasil e no mundo. As razões para essa reemergência ainda não são totalmente entendidas, mas o fenômeno está claramente relacionado com o crescente aumento da densidade populacional e com os processos de urbanização que ocorreram nos últimos 50 anos (WU *et al.*, 2010; ECDC 2010/2011).

Além disso, as cidades cresceram de forma desordenada, sem infraestrutura adequada, com precário serviço de saneamento básico, principalmente no que se refere ao abastecimento de água e à coleta de lixo. O aumento da produção de recipientes plásticos descartáveis proporcionou o crescimento do número de criadouros potenciais, ampliando a densidade populacional do mosquito. O crescente fluxo de pessoas que transitam pelas diversas áreas e países propiciou também a expansão da dengue para áreas indenes (BHATT; GETHING; BRADY, 2013).

A Figura 1 mostra o mapa mundial da dispersão da dengue, destacando os países da América Central, da América do Sul, da África e da Ásia incluídos entre as regiões tropicais e subtropicais sob risco de ocorrência de transmissão da infecção pelo vírus.

Figura 1 - Áreas vulneráveis da dispersão da Dengue em todo o planeta.



Fonte: WHO (2015)

A existência de mais de um sorotipo denominados sorotipo 1 e sorotipo 2 ocorreu por volta da década de 1940. Os sorotipos 3 e 4 foram isolados durante epidemias nas Filipinas, em 1956 (ALEN; SCHOLS, 2012). A partir de então, o complexo dengue passou a ser formado por quatro sorotipos, atualmente designados Dengue Vírus Sorotipo – DENV: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, todos causadores dos mesmos sintomas.

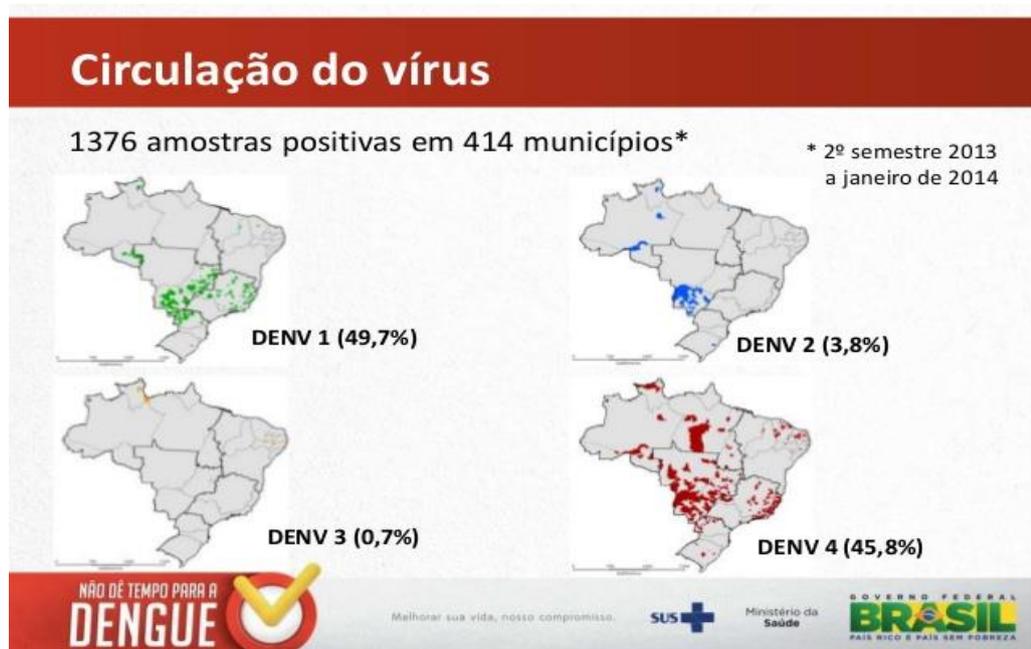
Embora existam relatos da doença desde meados do século XIX e início do século XX, no Brasil, a circulação do vírus da dengue só foi comprovada laboratorialmente no início da década de 1980, mais precisamente em 1982, quando foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4, em Boa Vista (RR) ficando o país sem notificação de casos até o ano de 1986 quando o vírus DENV-1 foi reintroduzido e isolado no Estado do Rio de Janeiro (RJ), causando epidemia e dispersão para diversas regiões do Brasil (MS, 2010).

No início de 1990, com o aumento da transmissão de DENV-1 e introdução de DENV-2, também no estado do RJ foi confirmado o primeiro caso de dengue hemorrágico e o aparecimento de formas graves em outras regiões foi igualmente registrado (MS, 2010). Em janeiro de 2001 foi isolado o DENV-3 no município de Nova Iguaçu (RJ). Já no ano de 2010, o DENV-4 foi isolado a partir de

casos detectados no estado de Roraima e no Amazonas, tendo também sido isolado em janeiro de 2011, no Pará (SOUZA *et al.*, 2011).

No segundo semestre de 2013 a janeiro de 2014 foram confirmados no país 483.516 casos da doença, tendo sido identificada a presença dos vírus nas 1.376 amostras analisadas (Figura 2). De acordo com o Ministério da Saúde (MS, 2014) nos 414 municípios investigados foram diagnosticados 226 casos de intensidade grave e 3.026 casos com sinais de alarme, resultando em 119 óbitos, com prevalência de DENV-1 (49,7%), seguidos pelo DENV-4 (45,8%) e DENV-2 (3,8%)

Figura 2 - Casos de dengue notificados no Brasil em 2013 a janeiro de 2014.

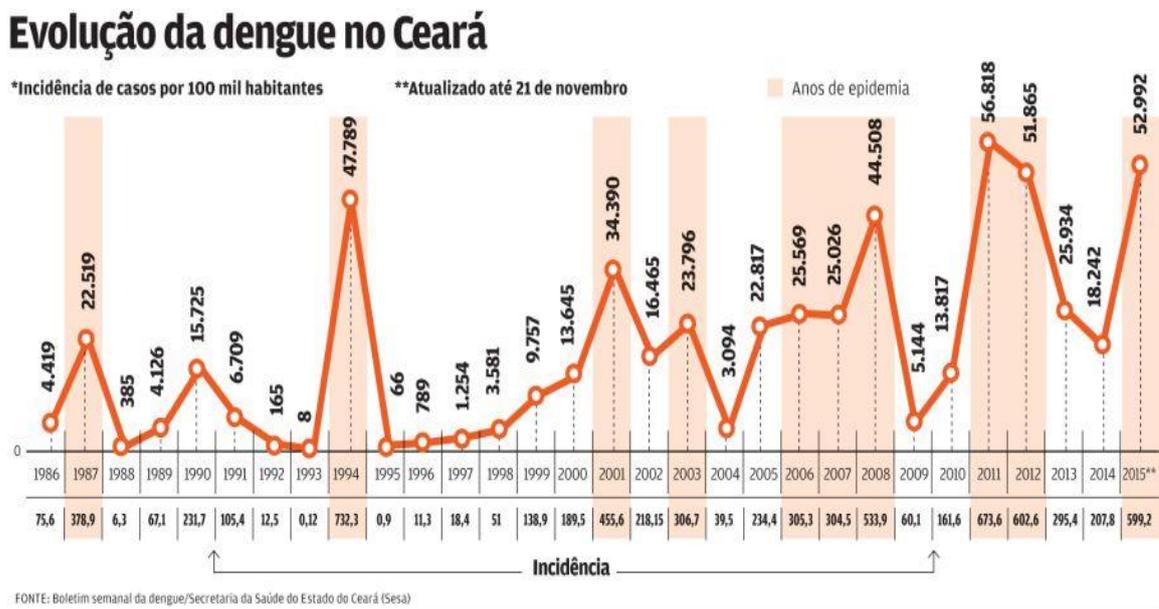


Fonte: MS (2014)

No Ceará, há casos de dengue notificados desde 1986, quando foi isolado o sorotipo DENV-1. Nesses últimos 30 anos a dengue se manifestou de forma endêmica, com o registro de, pelo menos, sete epidemias nos anos de 1987, 1994, 2001, 2008, 2011, 2012 e 2015. Destacam-se as epidemias de 1994, pela confirmação dos primeiros casos hemorrágicos devido à circulação do sorotipo DENV-2; a de 2002 com o isolamento do sorotipo DENV-3, a de 2008 acarretando no maior número de casos graves e a do ano de 2011 com o isolamento do sorotipo DENV- 4 e pelo maior número de casos clássicos confirmados (Figura 3) (Sesa, 2015).

Em média, houve notificação de casos em 120 municípios cearenses e transmissão em 84 destes. Desde 2011 circulam três sorotipos virais (DENV-1, DENV-3 e DENV-4) onde se registrou a sua presença em 87,5% do território cearense e a sua transmissão em 96% dos municípios (LIMA; FONSECA; ALBUQUERQUE, 2013).

Figura 3 - Gráfico da evolução da dengue no Ceará em 30 anos.



Fonte: Boletim semanal da dengue/ Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (Sesa, 2015).

No ano de 2014, foram notificados 41.684 casos de dengue em 183 municípios (99,5%). Destes, 18.243 casos foram confirmados em 146 municípios (79,3%). Foram notificados 308 casos graves (74 óbitos), 223 casos de Dengue com sinais de alarme (DCSA), e 66 casos (53 óbitos) de Dengue grave (DG).

Detectou-se um aumento de 50,0% dos casos graves em comparação a 2013 e uma redução de 35,0% dos óbitos comparados ao mesmo período. Dos casos graves, o interior foi responsável por 53,8% de DCSA e 62,0% de DG. A circulação dos sorotipos DENV-1, DENV-3 e DENV-4, aliada a problemas na assistência médica prestada aos pacientes e à exposição a diferentes sorotipos virais, contribuíram para um aumento nas formas graves da dengue (Sesa, 2015).

Em 2015, foram notificados 847 casos graves no Ceará. Destes, 93,1% (789/847) foram confirmados. Do total de casos graves, 84,3% (665/789) foram de DCSA e 15,7% (124/789) de DG. O município de Fortaleza, isoladamente,

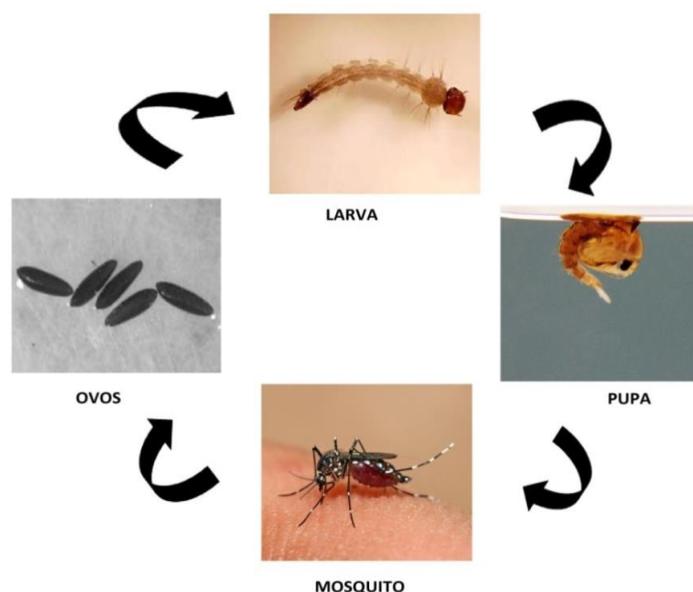
concentrou o maior percentual de DCSA 70,6% e de DG 51,0% entre os municípios cearenses. Até a semana epidemiológica - SE 39 (04/01/2015 à 03/10/2015), foram isolados três sorotipos em 231 amostras. Destas 97,0% foi de DENV-1 e 1,5% (DENV-3) e 1,5% para o DENV-4 (Sesa, 2015).

2.1.2 Vetor da dengue - *Aedes aegypti*

Aedes aegypti do grego *aēdēs*, “odioso”, e do latim *ægypt* “do Egípto”, é a nomenclatura taxonômica de acordo com Linnaeus, 1762, para o popularmente conhecido “mosquito da dengue” (FERREIRA, 1986). Esta espécie de mosquito mede menos de 1 cm e é facilmente identificada pelas manchas brancas presentes no corpo, cabeça e pernas. Foi disseminada por todo o continente americano, pelo próprio homem, através do transporte dos ovos, das larvas e até mesmo do mosquito adulto em navios, aviões e veículos terrestres (FRANCIS; ALEXANDER, 2014).

O *Aedes aegypti* tem seu desenvolvimento através de metamorfose completa (holometabolismo), que compreende uma fase aquática representada por: ovo, larva (dividida em quatro estágios) e pupa e a fase aérea representada pelo mosquito adulto (MURRAY; QUAM; WILDER, 2013) (Figura 4).

Figura 4 - Fases do desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: Elaborado pela autora

No mundo moderno, o *Aedes aegypti* adaptou-se facilmente às áreas urbanas e vive, preferencialmente, dentro das casas ou perto delas, onde encontra as melhores condições para a sua reprodução: sangue humano e depósitos com água. Quase toda coleção de água limpa e parada dentro de caixas d' água, cisternas, latas, pneus, tampas de garrafas, cacos de vidro e vasos de plantas funciona como criadouro potencial para a sua proliferação (FRANCIS; ALEXANDER, 2014).

Os processos de oviposição ocorrem nas paredes dos recipientes, após o repasto sanguíneo, podendo acontecer em diferentes intervalos de tempo, dando ao *Aedes aegypti* maiores chances de sobreviver às adversidades do meio ambiente. A resistência à desidratação e a possibilidade da dispersão passiva são adaptações do mosquito que favorecem sua expansão e dificultam seu controle. Foram observados ovos dessecados com até 450 dias evoluírem e quando colocados na água eclodirem após 30 min de imersão (DUPONT *et al.*, 2012).

No Brasil, a história do mosquito *Aedes aegypti* provavelmente se iniciou com as embarcações negreiras na época da colonização em meados do século XIX (MS, 2010). A partir da reintrodução no início da década de 1980, sua expansão tomou dimensões assustadoras, e, nos últimos 30 anos, contribuiu para o aumento da dengue em 24 unidades federadas do país com ocorrência da circulação dos tipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (COSTA; VOLOCH; SCHRAGO, 2012).

No Ceará, os focos do *Aedes aegypti* foram totalmente eliminados no ano de 1950, em virtude de um amplo programa de erradicação da febre amarela nas Américas (CUNHA *et al.*, 1998). Após a erradicação da doença, o mosquito só foi reintroduzido no estado em 1984, no município de Aquiraz, de onde se disseminou e, desde então não foi mais possível erradicá-lo do território cearense (Sesa, 2015).

Além da dengue o mosquito *Aedes aegypti* também é transmissor de doenças como Zika vírus e a Febre Chikungunya. Embora estas doenças apresentem sintomas mais brandos que os da dengue, a infecção pelo Zika vírus, em mulheres gestantes, têm sido de grande preocupação para os órgãos de saúde pública devido à sua associação ao aumento do número de casos de microcefalia (PORTAL DA SAÚDE, 2016).

2.1.3. O combate ao *Aedes aegypti*

Em dezembro de 2015, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa autorizou o registro para a comercialização no Brasil da vacina *Dengvaxia* produzida pela empresa francesa Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. Em estudos clínicos que envolveu quase 21 mil voluntários da América Latina e Caribe, a vacina apresentou uma eficácia global de 65,6% confirmada contra os 4 sorotipos da dengue na população acima dos nove anos de idade. A eficácia nessa população foi de 58,4% contra o sorotipo 1, 47,1% contra o sorotipo 2, 73,6% contra o sorotipo 3 e de 83,2% contra o sorotipo 4. A eficácia geral verificada foi de 80,8% proporcionando assim proteção maior para casos mais severos de dengue (PORTAL ANVISA, 2015).

No Brasil, o Instituto Butantan em parceria com o Instituto Nacional da Saúde (NIH, na sigla em inglês) dos Estados Unidos também estão desenvolvendo uma vacina contra a dengue que seja totalmente eficaz contra os 4 subtipos da dengue, sendo designada para três faixas etárias: 2 a 6 anos, 7 a 17 anos e 18 a 59 anos.

No início do mês de dezembro de 2015 a ANVISA autorizou o início da 3ª fase da pesquisa, que envolve testes em humanos. Essa fase, porém, é a mais demorada: pois envolve análise clínica antes, durante e depois da aplicação, e a participação de aproximadamente 17 mil voluntários em todo o país. A estimativa, é que sendo positivos os resultados, a vacina esteja liberada até 2017 para as campanhas de vacinação da rede pública (INSTITUTO BUTANTAN, 2015; PORTAL ANVISA, 2015).

Embora os resultados para a comercialização das vacinas sejam promissores, vale destacar que as mesmas não protegem contra os vírus Chikungunya e Zika e desta forma, o combate direto ao *Aedes aegypti*, através da eliminação dos seus criadouros potenciais, ainda é a melhor forma de intervenção e controle de doenças. Outros tipos de controle bastante utilizados e de maneira interligada nas campanhas de combate ao mosquito são o controle ambiental, social, biológico e químico.

O **controle ambiental** ou **controle físico** consiste em medidas ordenadas visando eliminar os criadouros do vetor através de métodos como: tratamento de resíduos sólidos e medidas de saneamento básico a fim de evitar o

depósito dos ovos e o desenvolvimento das larvas do mosquito (SVS, 2014; FUNASA, 2012). Em associação a este, o **controle social** é hoje em dia uma das medidas mais importantes para o sucesso das ações, permitindo que a sociedade participe no combate à dengue (FUNASA, 2012).

O **controle biológico** consiste na utilização de animais predadores ou parasitas, como os peixes larvófagos (Bettas) e bactérias (*Bacillus thuringiensis var israelensis* (Bti), *Bacillus sphaericus* e *Wolbachia pipientis*) (CAVALCANTI *et al.*, 2007; MACÍAS *et al.*, 2008).

O **controle químico** consiste em utilizar pesticidas, compostos químicos que apresentam resultados em um curto período de tempo conhecidos como organosintéticos, divididos em diversas classes: os organoclorados, organofosforados, carbamatos e os piretróides. Os reguladores de crescimento e os hormônios sintéticos (formulações de diflubenzuron, pyriproxyfen e novaluron) também se enquadram nesta categoria de controle (SVS, 2014; FUNASA, 2012).

A nebulização Ultra Baixo Volume (UBV) ou fumacê está entre os tipos de controle químico utilizado no combate à dengue. Os inseticidas utilizados são espalhados pelas máquinas de nebulização, matando os insetos adultos enquanto estão voando, nos períodos da manhã e da tarde. O fumacê não é aplicado indiscriminadamente e deve ser utilizado somente quando existe a transmissão da doença em surtos ou epidemias. Desse modo, a nebulização pode ser considerada um recurso extremo, porque é utilizada num momento de alta transmissão, quando as ações preventivas de combate à dengue falharam ou não foram devidamente adotadas (FUNASA, 2012).

2.2. Pesticidas

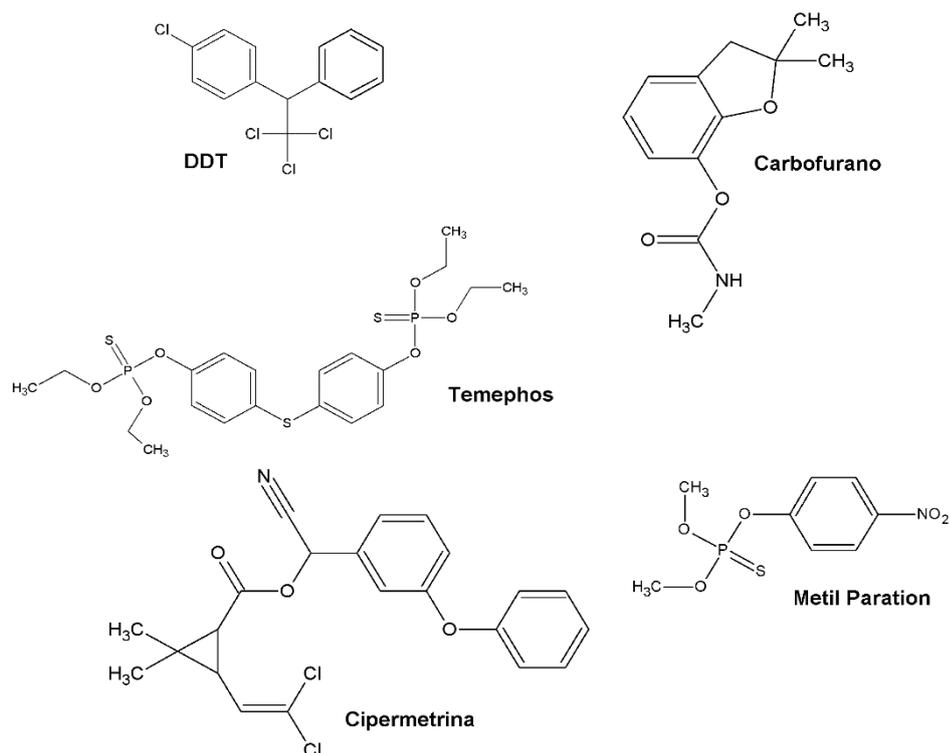
2.2.1. Classificação

Os pesticidas são substâncias ou mistura de substâncias utilizadas durante a produção, colheita ou armazenamento de alimentos. São compostos bioativos capazes de prevenir, combater ou destruir espécies indesejáveis que possam interferir na produção, no processamento e no armazenamento de alimentos e produtos agrícolas em geral. Esta definição também compreende substâncias utilizadas no combate a insetos domésticos ou quaisquer agentes preventivos a vetores de doenças (HOLLAND, 1996).

Existem registros de diferentes substâncias utilizadas como pesticidas desde a Antiguidade, tais como piretro, composto de origem natural. A partir da década de 30, o aumento da produção agrícola e, principalmente, as diversidades de culturas impuseram a utilização de outras substâncias com melhor poder pesticida. Um grande número de substâncias foi formulado especialmente para o uso na agricultura, entre elas, o pesticida DDT [1,1,1-tricloro-2-bis-(p-clorofenila) etano] que foi desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial (WHO, 2006).

Os pesticidas compreendem uma larga variedade de substâncias químicas com diferentes grupos funcionais e, conseqüentemente, com diferentes modos de ação. Algumas classes químicas são compostas por organoclorados (DDT), carbamatos (carbofurano), organofosforados (Temephos, Metil paration), piretróides (cipermetrina) (CAMPOS; ANDRADE, 2001; LUNA *et al.*, 2004) (Figura 5).

Figura 5 - Compostos organossintéticos utilizados como pesticidas.



Fonte: Elaborado pela autora

Os pesticidas organoclorados são compostos orgânicos de estruturas cíclicas, nas quais um ou vários átomos de hidrogênio são substituídos por cloro. São bastante lipofílicos e altamente resistentes aos mecanismos de decomposição dos sistemas biológicos, o que faz com que permaneçam no meio ambiente, sendo

os compostos mais persistentes já fabricados. Os organoclorados apresentam propriedades inseticidas. Entre os mais importantes destacam-se: hexaclorocicloexano, DDT e os Ciclodienos Aldrin, Dieldrin (FLORES *et al.*, 2004).

Os pesticidas carbamatos são utilizados como inseticidas e herbicidas. Estes compostos são sais ou ésteres do ácido carbônico, com substituição dos hidrogênios hidroxílicos e amínicos por átomos, grupos funcionais ou radicais, muito instáveis em condições neutras e alcalinas, à temperatura ambiente. O carbaril e carbofurano estão entre os principais representantes da classe dos carbamatos. Em geral, os carbamatos são inibidores da enzima acetilcolinesterase (WHO, 2006).

Os pesticidas piretróides foram originalmente obtidos a partir de compostos de origem natural, tais como piretro, nicotina e ácido crisantêmico. Apesar de possuírem uma toxicidade menor que a maioria das outras classes de pesticidas, podem apresentar uma longa persistência em ambientes fechados, uma vez que são freqüentemente utilizados como inseticidas domésticos. Estes compostos são mais eficientes e seguros, pois são seletivos e não apresentam toxicidade para mamíferos. São largamente empregados em diversos tipos de culturas no controle de insetos, podendo ser eventuais contaminantes em alimentos (SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

Os pesticidas organofosforados são amplamente utilizados como inseticidas, herbicidas para o controle de pragas e reguladores do crescimento das plantas. O mecanismo de ação para os organofosforados se processa através da ação enzimática. Estes compostos atuam como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), inibindo a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina. O acúmulo de acetilcolina causa uma série de distúrbios neurotóxicos, provocando a morte do inseto. Este processo de inibição da acetilcolinesterase ocorre através de uma reação de fosforilação do grupo hidroxila (OH) da porção serina da enzima com o composto organofosforado. A ligação O-P formada é altamente estável, impossibilitando, dessa forma, que a enzima se ligue à acetilcolina (YU, 2008).

Em mamíferos, estes efeitos caracterizam-se principalmente por lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios. Estes últimos são decorrentes do aumento das secreções brônquicas e da bradicardia, bem como de depressão do sistema nervoso central,

sendo as principais causas de morbidade e mortalidade por tais produtos (DILLON; MATHEY; NIXON, 1997; QUIN, 2000).

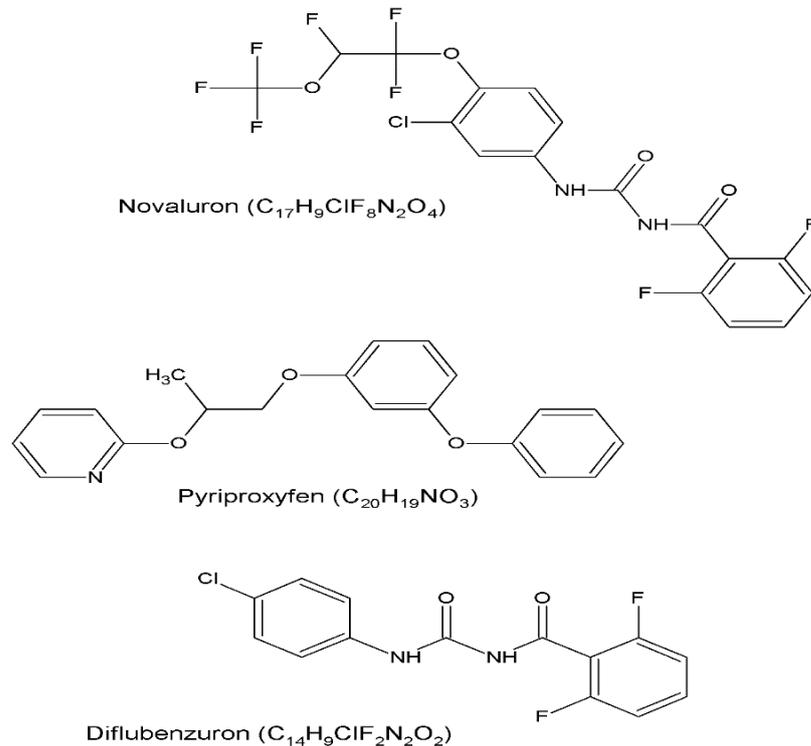
Apesar de mostrarem resultados eficientes, o uso repetido desses compostos químicos tem destruído o sistema biológico natural, provocando efeitos indesejados a organismos não-alvos e problemas à saúde humana. Braga e colaboradores (2004), apresentaram um estudo sobre a resistência do *Aedes aegypti* ao temephos que foi o principal inseticida utilizado nas últimas duas décadas, porém após ter sido detectada a resistência do vetor a esse larvicida, a partir de 2013 foi recomendada por especialistas a interrupção do seu uso. Neste mesmo ano foram utilizados os seguintes produtos para o controle larvário o diflubenzuron e o novaluron sendo substituídos em 2014 pelo pyriproxyfen todos esses inseticidas classificados como Reguladores de Crescimento de Insetos.

2.2.2. Inseticidas alternativos

Os Reguladores do Crescimento de Insetos ou na nomenclatura internacional Insect Growth Regulators (IGRs) fazem parte de uma nova geração de compostos que agem interferindo no processo normal de crescimento dos insetos. Se um inseto ainda imaturo entrar em contato com um IGR, ele não sofrerá a próxima muda. São comparativamente mais seguros, mais seletivos, de baixa toxicidade para mamíferos e organismos não-alvo e praticamente específicos contra artrópodes (WHO, 2006; DELATTE *et al.*, 2008).

Muitos desses compostos vêm sendo utilizados na agricultura e incluem produtos químicos com modos de ação tais como o análogo do hormônio juvenil, entre eles, por exemplo, o pyriproxyfen, e os inibidores da síntese de quitina, como o diflubenzuron e novaluron (GALLO, 2002; SIHUINCHA, *et al.*, 2005) (Figura 6)

Figura 6 - Estruturas químicas dos compostos utilizados como IGRs.



Fonte: Elaborado pela autora

O pyriproxyfen é um IGR que imita os hormônios juvenis dos insetos, que são, por isso, denominados juvenóides de alta estabilidade e de longo efeito residual no ambiente. Esse larvicida pertence ao grupo químico éter piridiloxipropílico tendo como mecanismo de ação a inibição do desenvolvimento das características adultas do inseto (por exemplo, asas, maturação dos órgãos reprodutivos e genitália externa), mantendo-o com aspecto "imaturo" (ninfá ou larva). Esse produto tem pouco efeito sobre a mortalidade de larvas e sua atuação é mais eficaz em pupas e na inibição de emergência do adulto (SOIN *et al.*, 2010). É recomendado para o controle de pulgas, moscas e insetos resistentes a outros grupos químicos. São produtos de baixíssima toxicidade aos mamíferos e sem ação acumulativa

O mais conhecido entre os reguladores de crescimento é o composto diflubenzuron classificado como um inibidor da síntese de quitina. Estes produtos afetam a produção química da camada interna do inseto impedindo-o de produzir uma nova pele causando desta forma a morte pela incapacidade de gerar uma nova cutícula adequadamente.

2.3. Biomassa Vegetal

Um grande número de diferentes espécies de plantas tem se mostrado capaz de causar efeitos letais sobre insetos (LÓPEZ; FERNANDEZ-BOLAÑOS; GIL, 2005). A aplicação de substâncias extraídas de plantas, com atividade inseticida, tem muitas vantagens quando comparado aos sintéticos: os inseticidas naturais são obtidos de recursos renováveis e são rapidamente degradáveis; o desenvolvimento da resistência dos insetos a essas substâncias, compostas da associação de vários princípios ativos, é um processo lento; além de possuírem fácil obtenção e baixo custo de produção (ROEL, 2001; RAKSHIT; SUDIP; ROBERT, 2015; GOVINDARAJAN *et al.*, 2013).

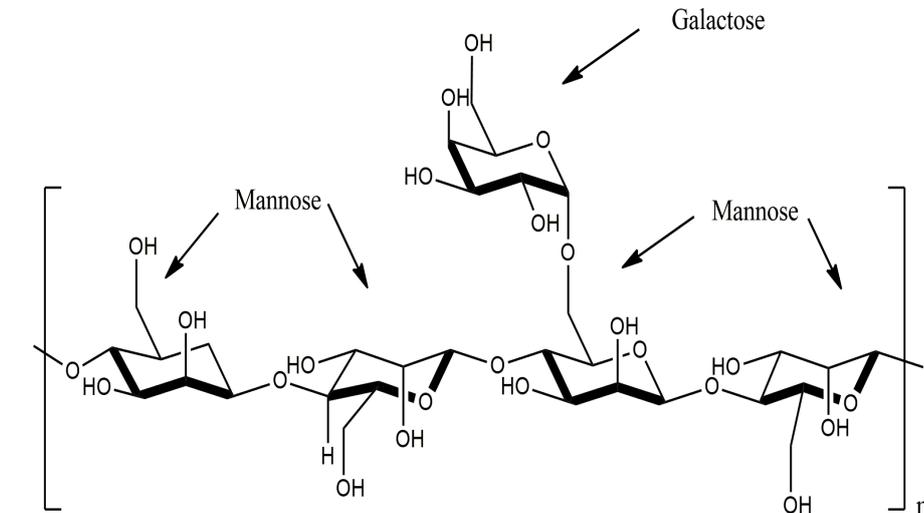
Muitos produtos utilizados pela sociedade têm como fonte a diversidade da flora brasileira. Alimentos e seus aditivos, óleos naturais e essenciais, medicamentos, fibras, cosméticos, produtos químicos e biocombustíveis, são alguns exemplos. Diversas são as classes de compostos químicos que podem ser extraídos de espécies vegetais. Uma delas é representada pelos polissacarídeos (BURITI, 2014; CERQUEIRA *et al.*, 2011; JIAN, 2014; PRAJAPAT *et al.*, 2013).

2.3.1. Galactomananas

De acordo com Bento (2013), galactomananas é a denominação dada a polissacarídeos neutros de reserva energética, extraídos geralmente do endosperma das sementes de diferentes espécies da família *Leguminosae*. A estrutura desses polímeros naturais é composta por uma longa cadeia de manose com ramificações simples de galactose.

As longas cadeias de D-manose estão unidas por meio de ligações β (1-4) e conferem rigidez à sua formação. As ramificações de D-galactose estão unidas à cadeia principal por ligações de oxigênio do tipo α (1-6), direcionando as ligações de hidrogênio das cadeias de manose para a água envolvente e não para as cadeias vizinhas de manose, favorecendo, desta forma, a solubilização do polímero em água (PRAJAPATI *et al.*, 2013; THOMBRE; GIDE, 2013) (Figura 7).

Figura 7 - Estrutura geral das galactomananas e suas principais unidades



Fonte: Elaborado pela autora

O teor e a distribuição das unidades α -D-galactose dependem da origem e da espécie de leguminosa e das técnicas de extração utilizadas para a sua obtenção. Seu papel na planta também está relacionado com a manutenção e a regulação da água durante a germinação, com as propriedades físico-químicas e com a sua interação entre si e outros polissacarídeos, além da proteção contra predadores (POLLARD; FISCHER, 2006; BARAK; MUDGIL, 2014; PRAJAPATI *et al.*, 2013). Durante a germinação, esses polissacarídeos são catabolizados para fornecer energia e esqueletos de carbono para o crescimento da planta.

A razão Manose/Galactose (M/G) apresenta variações da relação entre tamanho e estrutura de galactomananas de mesma espécie ou espécies diferentes, *Ceratonia siliqua* (M/G 3.1:1) (VENDRUSCOLO *et al.*, 2009), *Dimorphandra gardneriana* (M/G 1.84:1) (CUNHA *et al.*, 2009), *Caesalpinia pulcherrima* (M/G 2.8:1) (AZERO; ANDRADE, 2002), *Cássia javanica* (M/G 3.23:1), *Mesquite seed gum* (M/G 1:1:1) (RODRIGUES *et al.*, 2016), *Adenantha pavonina* L. (M/G 1:35:1) (CERQUEIRA *et al.*, 2009), e este fator caracteriza suas propriedades funcionais em dispersões aquosas proporcionando assim um aumento na viscosidade de soluções contendo Galactomananas, tornando este polímero um bom espessante (BHATIA; GUPTA; SONI, 2014; ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).

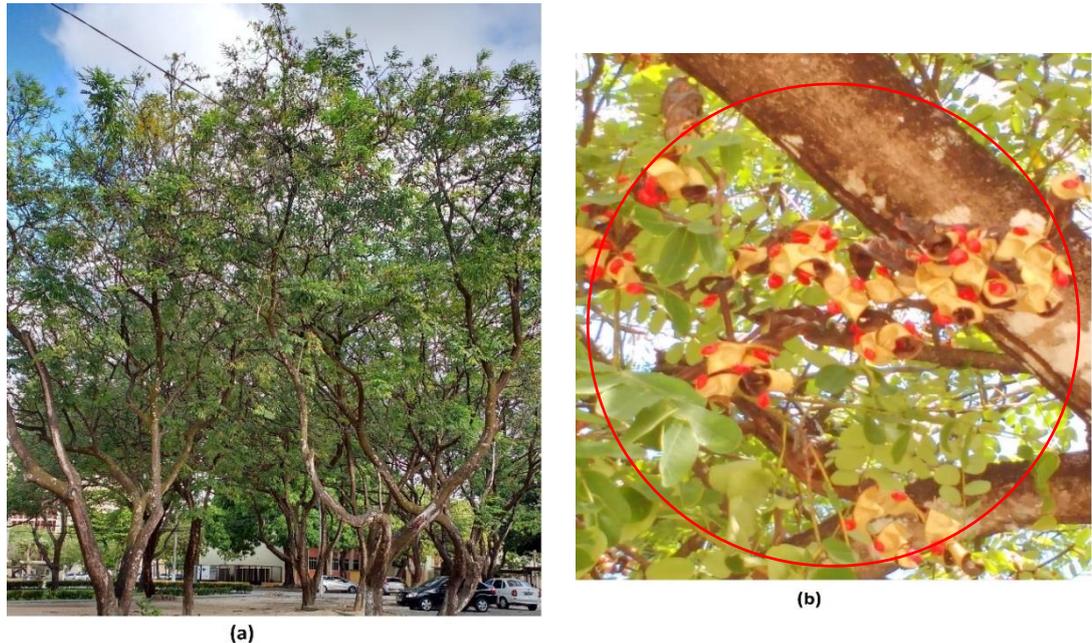
Galactomananas oriundas de sementes leguminosas têm sido bastante estudadas. Entre as diferentes espécies de sementes leguminosas presentes nos

ecossistemas brasileiros, este trabalho avaliou galactomananas extraídas de sementes da espécie *Adenanthera pavonina* L.

Adenanthera pavonina L. (Figura 8a), pertence à família *Fabaceae* (Leguminosae) e subfamília *Mimosoideae*. A presença das espécies desta subfamília se dá nas regiões da América do Sul e Central, África e Austrália (LORENZI, 2009, LOPES *et al.*, 2009). Cerca de 80,0% das espécies ocorrem no Brasil, entre as quais se destacam a *Mimosa scabrella*, presente nos estados do sudeste e sul, (LOPES *et al.*, 2009) e a *Adenanthera pavonina* L. bastante adaptada e largamente distribuída nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e Região Nordeste (Ceará e Bahia) (CÔRREA, 1978).

As árvores da *Adenanthera pavonina* L. conseguem atingir cerca de 10 a 20 m de altura. Entre as suas características, destacam-se a madeira de boa qualidade bastante utilizada para a construção e suas folhagens com textura fina, floração e frutificação o ano todo, permitindo desta forma seu cultivo e plantação em ruas, parques e jardins de residências (FONSECA; PEREZ, 2003; KHARE, 2007).

As sementes desta espécie, (Figura 8b), são popularmente chamadas de falso pau brasil, olho de pavão e carolina. As mesmas têm ganhado espaço no mercado do artesanato, dos corantes e das bijuterias e seu cozimento bem como da madeira permite a sua utilização para fins medicinais, devido a seus efeitos antiinflamatórios e analgésicos no tratamento de infecções pulmonares (FONSECA; PEREZ, 2003; KISSMANN, 2008).

Figura 8 - Árvores (a) e sementes (b) da espécie *Adenanthera pavonina* L.

Fonte: Elaborado pela autora

2.3.2. Aplicações das galactomananas

Atualmente, as indústrias exigem a introdução de fontes alternativas de polissacarídeos e, neste contexto, é fundamental a busca por fontes renováveis de espécies vegetais de fácil acesso, abundância e baixo custo. A maioria dos estudos desenvolvidos com galactomananas visa, principalmente, o interesse comercial com vasta aplicação em diversas áreas da indústria, com destaque para os setores petroquímico, alimentício (espessantes, estabilizantes e filmes), produção de cosméticos, têxtil, mineração, fabricação de explosivos, assim como veículo de liberação de fármacos e propriedades dielétricas de cerâmicas de hidroxiapatita (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005; POLLARD; FISHER, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2010; GIANCONE *et al.*, 2011; MAZZETO; SOMBRA; MACÊDO, 2013).

As propriedades físico-químicas das galactomananas são vantajosas tanto para a saúde do organismo humano como para o uso industrial. Devido a tais propriedades, as galactomananas são utilizadas comercialmente em alimentos como espessantes e agentes geleificantes por melhorarem a retenção de água, alterarem parâmetros de congelamento e, principalmente, por aumentarem a viscosidade de alimentos e produtos (THOMBRE; GIDE, 2013; PAWAR; LALITHA, 2014).

Segundo Sumathi e colaboradores (2002), as vantagens da utilização de biopolímeros em processos biológicos estão relacionadas às características de estabilidade térmica, biocompatibilidade, alta capacidade de encapsulação e liberação do fármaco de forma prolongada.

2.3.3. Galactomananas e a microencapsulação

As primeiras pesquisas no campo da microencapsulação foram conduzidas na década de 30, pela empresa norte-americana National Cash Register Co, de Dayton. O pesquisador da NCR, Barret K. Green descobriu e desenvolveu o sistema de formação de microesferas através do processo de coacervação. A primeira aplicação comercial ocorreu em 1954, revolucionando o mundo dos negócios administrativos, ao originar o papel de cópia sem carbono (NITIKA *et al.*, 2012 WEINBRECK; MINOR, 2004; SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000).

No ano de 1993, as microesferas foram descritas como embalagens extremamente pequenas, compostas por um polímero como material de parede e um material ativo chamado de núcleo (ARSHADY, 1993). De acordo com Ezhilarasi e colaboradores (2013), a técnica de microencapsulação permite a agregação de substâncias a uma formulação alimentícia, tornando-se uma fonte de ingredientes totalmente novos com propriedades únicas como, por exemplo, a diminuição da velocidade de evaporação ou de transferência do material de núcleo para o meio; a melhoria da manipulação do material encapsulado e o disfarce das características de sabor e odor desagradáveis.

O material a ser encapsulado, é chamado de recheio ou núcleo, e o material que forma a cápsula, encapsulante ou cobertura. As cápsulas podem ser classificadas por tamanho em 3 categorias, macro (>5000 μm), micro (0,2-5000 μm) e nanocápsulas (<0,2 μm) (GIBBS, 1999; GOUIN, 2004). Em termos de arquitetura, as microesferas podem ser divididas em dois grupos (Figura 9): aquelas nas quais o núcleo é nitidamente localizado na região central, circundado por um filme definido e contínuo do material de parede também conhecido como sistema reservatório (microcápsula propriamente dita) (Figura 9a) e aquelas onde o núcleo é uniformemente disperso em uma matriz - sistema matricial (microesferas) (Figura 9b) (DEPYPERE, 2003)

Figura 9 - Representação da estrutura dos tipos de micropartículas: sistema reservatório ou microcápsula (a) e matricial ou microesfera (b).



Fonte: www.ital.sp.gov.br

Um dos principais fatores que influenciam a estabilidade de compostos encapsulados é a natureza do material encapsulante (ROSENBERG; KOPELMAN; TALMON, 1990; MURILLO-MARTÍNEZ *et al.*, 2011). A escolha deve levar em consideração uma série de fatores: propriedades físicas e químicas do núcleo (porosidade, solubilidade etc.) e de parede (baixa viscosidade a altas concentrações de sólidos, baixa higroscopicidade, propriedades mecânicas, transição vítrea, capacidade de formação de filme, compatibilidade com o núcleo, baixo custo e mecanismo de controle) (BRAZEL, 1999; MATALANIS; JONES; MCCLEMENTS, 2011; RATCLIFFE; WILLIAMS; EVANS, 2013).

A escolha por polissacarídeos como potencial material encapsulante, deve-se à sua excelente solubilidade, à baixa viscosidade, às boas propriedades emulsificantes, ao sabor suave e à alta estabilidade oxidativa, bem como à sua maior disponibilidade (STIJNMAN; BODNAR; HANS TROMP, 2011; ZAMANI; PRABHAKARAN; RAMAKRISHNA, 2013).

Entre as diversas técnicas de preparação de micropartículas, podemos citar: Spray drying (secagem em atomização); Spray chilling (nebulização em corrente de ar frio); Spray cooling, co-cristalização, liofilização e coacervação. A atomização por Spray Dryer é uma das técnicas mais antigas de encapsulação, tendo sido usada na década de 1930 para preparar os primeiros compostos de sabor encapsulados (BAKHHI *et al.*, 2013; PÉREZ *et al.*, 2013). O material a ser encapsulado, geralmente hidrofóbico, é emulsificado em uma solução aquosa ou dispersão do material encapsulante, e a emulsão resultante é bombeada através de

um atomizador para uma câmara a alta temperatura (ACEITUNO-MEDINA *et al.*, 2013).

À medida que as partículas são lançadas no interior da câmara, elas tomam a forma esférica, com a fase oleosa “empacotada” no interior da fase aquosa. Em contato com o ar aquecido, a água se evapora rapidamente da cápsula. A alta relação área de superfície/volume das partículas promove uma rápida evaporação da água. Com isso, o tempo de exposição das partículas ao calor é curto (poucos segundos), e a temperatura do núcleo não ultrapassa os 100 °C, o que reduz a ocorrência de alterações indesejáveis em compostos termossensíveis (CAL; SOLLOHUB, 2010; PEIGHAMBARDUST; TALFTI; HESARI, 2011).

As cápsulas (na forma de pó) produzidas por atomização são geralmente do tipo matricial, com o núcleo distribuído na forma de micropartículas, geralmente menores que 100 µm, na matriz seca do material encapsulante. Os mecanismos de liberação do núcleo geralmente estão associados à atomização pela ação de solventes e/ou por difusão (GHARSALLOUI, 2007; CAL; SOLLOHUB, 2010; WEINBRECK; MINOR, 2004).

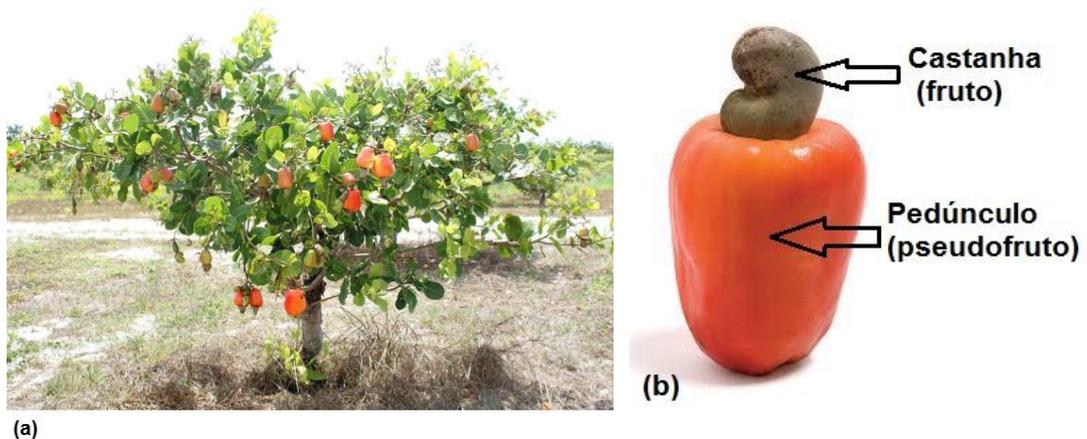
Fatores como, por exemplo, viscosidade da emulsão; peso molecular dos compostos voláteis; concentração dos compostos; tipo e massa molecular do encapsulante; velocidade do ar de secagem e temperatura de secagem afetam na retenção de voláteis influenciando desta forma no menor tempo necessário para a formação das cápsulas (BAKHHI *et al.*, 2013; PÉREZ *et al.*, 2013).

2.4. Caju e Líquido da casca da castanha de caju – LCC.

O cajueiro, planta tropical nativa do Brasil, de aparência exótica, troncos tortuosos, localizada em sua grande maioria no litoral nordestino, pertence à família Anacardiaceae, gênero *Anacardium* e nome científico *Anacardium occidentale* L. (FRANÇA, 1988; LIMA, 1988) (Figura 10a). Tem sido utilizado como uma excelente fonte medicinal e, como principais aplicações, podemos citar o uso como analgésico e diurético e como produto eficaz no combate a problemas respiratórios tais como bronquite (PELL, 2004). As folhas novas, após cozimento, podem ser colocadas sobre feridas promovendo a cicatrização (MAZZETTO; LOMONACO; MELLE, 2009).

O caju (Figura 10b) origina-se da palavra tupi *acaju*, que quer dizer "noz que se produz" (FRANÇA, 1988). Na verdade, trata-se do pseudofruto, cientificamente denominado de pedúnculo floral, com coloração variante entre o amarelo e o vermelho, suculento e rico em vitamina C e ferro. Após o processamento do caju na indústria, são preparados sucos, doces e bebidas não alcoólicas, como a cajuína (EMBRAPA, 2015). O caju é constituído de duas partes: o pseudofruto, e o verdadeiro fruto, a castanha de caju.

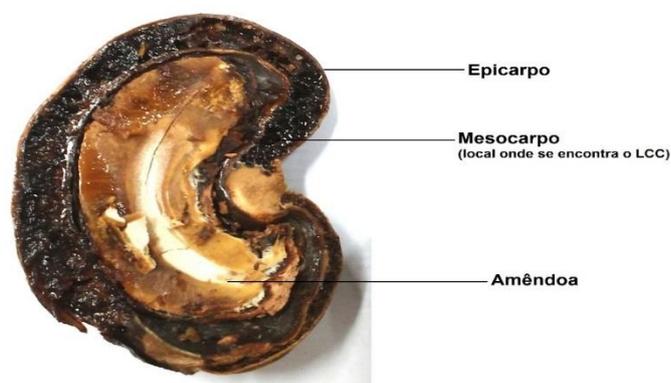
Figura 10 - O Cajueiro (a) e o caju dividido em pedúnculo e castanha (b).



Fonte: Elaborado pela autora

A castanha de caju é o principal produto comercial do cajueiro. Tem a forma de rim (reniforme) e seu peso pode variar de 3 a 32 g. Suas partes estão subdivididas em casca (epicarpo), mesocarpo e amêndoa (parte comestível do fruto) (LIMA, 1988) (Figura 11).

Figura 11 - Seção transversal da castanha de caju.

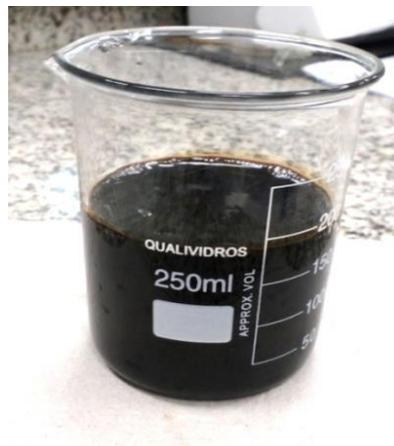


Fonte: Elaborado pela autora

A amêndoa compreende aproximadamente 25% do peso da castanha de caju e é rica em fibras, proteínas, minerais (magnésio, ferro, cobre e zinco), vitaminas K, carboidratos, fósforo, sódio e aminoácidos (Sindicaju, 2016).

No mesocarpo está contido um líquido escuro, de coloração preta, cáustico e inflamável, de características vesicantes chamado de Líquido da casca da castanha de caju - LCC ou Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) na nomenclatura internacional (Figura 12). Sua finalidade é proteger a amêndoa de predadores preservando o seu poder germinativo (LIMA, 1988).

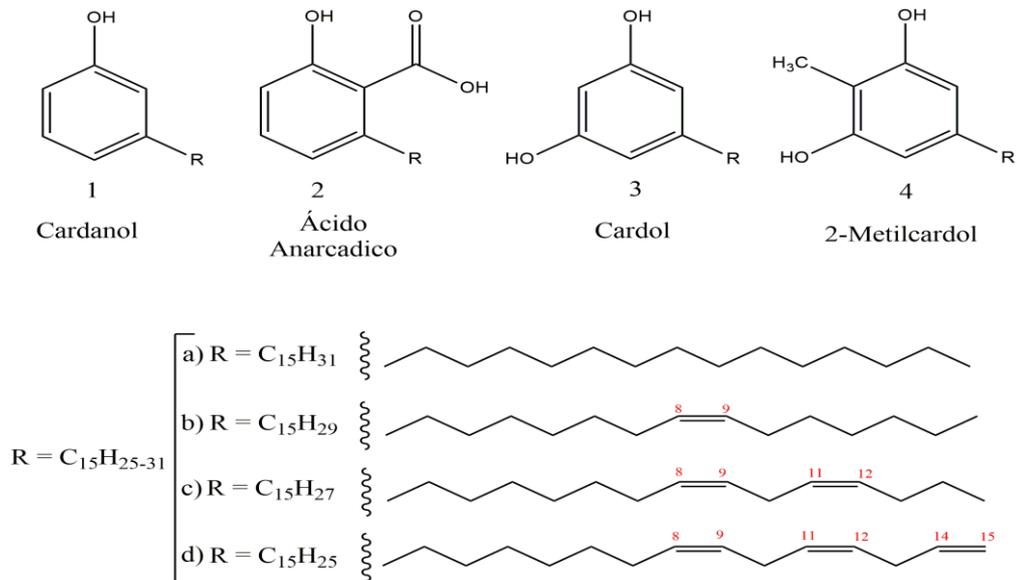
Figura 12 - Líquido da casca da castanha de caju – LCC.



Fonte: Elaborado pela autora

O LCC natural é uma das fontes vegetais mais ricas em lipídeos fenólicos insaturados, dentre os quais se destacam: ácido anacárdico (60-65% em peso), cardol (15-20% em peso), cardanol (10% em peso) além de traços de 2-metil-cardol (5%) (MAZZETTO; LOMONACO; MELLE, 2009). Os fenóis que constituem o LCC são substituídos no anel aromático e possuem em comum uma cadeia lateral alifática pentadecilênica (15 átomos de carbono), com diferentes graus de insaturação, que podem variar de 0 a 3 (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2005) (Figura 13). Essa cadeia insaturada permanece nos constituintes do LCC comercial ou técnico, obtido como subproduto do processamento industrial das amêndoas de castanha de caju.

Figura 13 - Principais constituintes fenólicos do LCC.

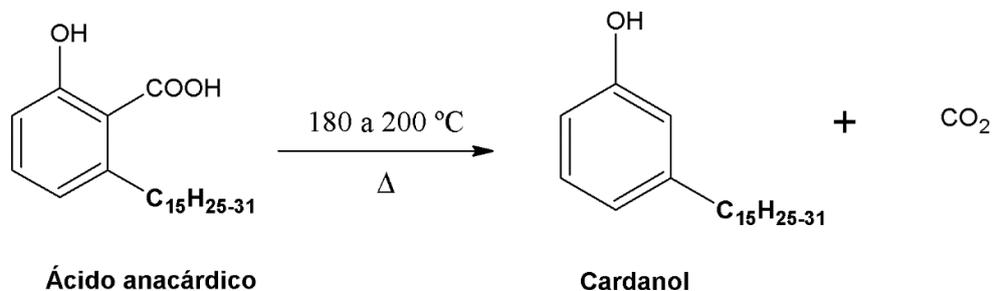


Fonte: Elaborado pela autora

O LCC pode ser obtido por diferentes processos: extração a frio (prensas), extração por solvente (KUMAR *et al.*, 2002) e pelo processo a óleo quente (*hot oil process*) um processo térmico onde o próprio LCC quente é utilizado como meio para aquecer as castanhas naturais em temperaturas de aproximadamente 180 °C.

Devido à sua termolabilidade em altas temperaturas (180 a 200 °C), o ácido anarcádico sofre descarboxilação durante o processamento térmico da castanha convertendo-se totalmente a cardanol (Figura 14). Esta reação de descarboxilação é irreversível tornando, desta forma, o cardanol o constituinte majoritário do LCC técnico (GEDAM; SAMPATHKUMARAM, 1986).

Figura 14 - Reação de descarboxilação do ácido anarcádico.



Fonte: Elaborado pela autora

O processamento industrial da castanha de caju tem por princípio a obtenção das amêndoas para fins alimentícios e nutricionais gerando como subproduto o LCC técnico. Devido à sua classificação como uma matéria-prima natural renovável e de baixo custo, o LCC e seus componentes têm sido utilizados em várias pesquisas científicas como base para o desenvolvimento de produtos ambientalmente corretos e menos poluentes (BALGUDE; SABNIS, 2014).

Entre esses estudos, destaca-se a aplicação dos componentes do LCC como antioxidantes (AMORATI *et al.*, 2011, MAIA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2006) e como material de partida para fabricação de tintas, vernizes, resinas sintéticas, esmaltes e anticorrosivos para aplicação em navios e submarinos. Como verniz, apresenta grande resistência, elasticidade, excelente brilho e boas propriedades adesivas. (CAVALCANTE; CANTO, 2012).

Polímeros do LCC quando comparados com as resinas fenólicas convencionais, apresentam grande flexibilidade devido ao efeito da sua longa cadeia alifática. Esta cadeia lateral transmite uma natureza hidrofóbica para o polímero, conferindo-lhe uma alta resistência à água, exposição ao ar e modificações climáticas (SILVA, 2014; MAZZETTO; LOMONACO; MELLE, 2009). Por manter suas características sob grande atrito, estes polímeros se tornam aditivos essenciais na formulação da maioria dos revestimentos internos de freios de veículos apresentando, como principais características: resistência ao calor e corrente elétrica.

Lomonaco e colaboradores (2009), verificaram importantes resultados com relação aos valores de CL₅₀ apresentados para os derivados do LCC técnico quando avaliada a sua atividade larvicida sobre o *Aedes aegypti* (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados de CL₅₀ para os constituintes do LCC sobre larvas do *Aedes aegypti*

| Amostra | CL₅₀ (ppm) |
|-----------------------------|------------------------------|
| <i>LCC técnico</i> | 51,04 ± 0,62 |
| <i>Cardanol</i> | 32,89 ± 0,25 |
| <i>Cardol</i> | 14,20 ± 0,62 |
| <i>Cardanol hidrogenado</i> | 68,18 ± 0,50 |

Fonte: Lomonaco (2009).

As amostras do LCC e seus derivados (cardanol e cardol insaturados) bem como cardanol hidrogenado, apresentaram resultados de CL₅₀ abaixo de 100 ppm após atuarem sobre larvas do *Aedes aegypti*. De acordo com Chang e colaboradores (2008), compostos que apresentam valores de CL₅₀ < 100 ppm são considerados ativos e constituem-se fortes candidatos a atuar como larvicidas.

No ranking da produção mundial de castanha de caju, o Brasil ocupa a quinta colocação, abaixo de Costa do Marfim, Índia, Nigéria e Vietnã. De acordo com o Sindicato das Indústrias de beneficiamento de castanha de caju e Amêndoas Vegetais do Estado do Ceará - Sindicaju (2013), no Brasil a maior área cultivada de castanha de caju se concentra na região nordeste, com aproximadamente 700 mil hectares distribuídos nos estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Maranhão e Bahia, proporcionando uma safra anual de castanhas de caju em torno de 320 mil toneladas.

O Ceará detém cerca de 70% das indústrias de beneficiamento da castanha instaladas na região nordeste sendo o estado com a maior produção da castanha de caju, seguido por Rio Grande do Norte e Piauí. A agroindústria processadora de castanha de caju no estado do Ceará emprega cerca de 20 mil pessoas, além de proporcionar 280 mil postos de trabalho no campo.

Entretanto, mesmo com os altos investimentos na produção das amêndoas, existe um alto grau de competitividade entre os principais países exportadores: Vietnã, Nigéria e Índia, o que acarreta redução do preço das amêndoas além do fato desses países concorrentes disporem de mão de obra de baixo custo. A Índia detém uma das maiores produções e emprega um processo manual com alto desempenho, sem produção do LCC; enquanto que no Brasil o processamento é semi automático, com menor desempenho e geração de uma grande quantidade de LCC como subproduto.

Com base nas estruturas químicas dos grupos funcionais presentes nos larvicidas tradicionais e considerando as potencialidades do LCC, este projeto buscou desenvolver bioprodutos, através da utilização de fontes renováveis de matéria prima, para aplicação larvicida e ovicida contra o mosquito *Aedes aegypti*. A técnica de microencapsulação proporcionou uma melhor eficiência e prolongamento do tempo de ação destes bioprodutos a partir de liberação controlada do material ativo para o meio aquoso.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Preparar novos produtos a partir da utilização de biomassa vegetal mais especificamente o Líquido da casca da castanha de caju - LCC (natural e técnico), os constituintes, cardol, cardanol, e sementes de *Adenantha pavonina L.*, para aplicação como ovicidas e larvicidas contra o mosquito *Aedes aegypti*.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar a galactomanana a partir de sementes da espécie *Adenantha pavonina L.* e caracterizar estruturalmente através das técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H), Infravermelho (IV); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Isolar e purificar os constituintes fenólicos do LCC técnico (cardol e cardanol) e o LCC natural, caracterizando-os por meio das técnicas de Cromatografia Gasosa e Espectro de Massa (CG/EM), RMN ^1H ;
- Obter os bioprodutos, na forma de microesferas, a partir de secagem por atomização em Spray Dryer e os caracterizar por meio das técnicas Termogravimétrica (TG), MEV, Dynamic Light Scattering (DLS);
- Avaliar o potencial larvicida e ovicida dos bioprodutos contra larvas e ovos do mosquito *Aedes aegypti* através de ensaios em laboratório e comparar os resultados obtidos com os dados da literatura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

As sementes de *Adenhantera pavonina* foram coletadas na UFC, Campus do Pici, (Fortaleza, CE), no período de junho a agosto de 2012. A exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra – EAC da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob n° 32.639. O LCC técnico empregado nos experimentos foi gentilmente cedido pela Empresa Amêndoas do Brasil Ltda. O LCC natural foi obtido no Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos - LPT.

4.2. Métodos

4.2.1. Extração do LCC natural

Castanhas de caju foram primeiramente bisseccionadas, as amêndoas removidas e, em seguida, suas cascas ($\pm 90,0$ g) foram transferidas para um béquer de 2 L. Uma quantidade de 1 L de acetato de etila foi adicionada e as castanhas imersas foram aquecidas à temperatura de 75 °C por 3 h. Após esse período, o extrato obtido foi então filtrado em funil comum e papel filtro para remoção de resíduos provenientes das cascas. Após filtração, o extrato resultante foi concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, obtendo-se uma massa final de LCC natural de aproximadamente 31,0 g (Rendimento de 34%).

4.2.2. Separação do cardanol a partir do LCC técnico

O cardanol foi separado baseado no método proposto por Kumar e colaboradores (2002), com algumas modificações descritas a seguir: a não utilização do carvão ativado na fase orgânica e a não filtração em sílica gel celite. Em um béquer (1 L) 100 g de LCC técnico foram dissolvidos em 320 mL de metanol, com adição posterior de 200 mL de NH₄OH 25%. A mistura foi submetida à agitação magnética durante 45 min para a desprotonação do cardol. Passado esse período, a solução resultante foi transferida para um funil de separação (1 L) e após 24 h de repouso se realizou o processo de separação das fases orgânica e aquosa utilizando hexano (2 x 400 mL) como solvente extrator. O cardol remanescente foi

removido da fase orgânica com solução NaOH 1,5% (3x100 mL) e depois da primeira lavagem o sistema permaneceu em repouso por 8 h. Após novas lavagens a observação da remoção total foi acompanhada por Cromatografia de Camada Delgada – CCD. A fase orgânica obtida foi tratada com uma solução de HCl 10% (100 mL) por aproximadamente 1 h para restabelecer a protonação do cardanol. Após esse tempo, procedeu-se a lavagem utilizando água destilada (2 x 200 mL) e após nova separação, a fase orgânica contendo o cardanol foi seca utilizando Na₂SO₄ para remoção da água remanescente. A solução resultante foi filtrada em papel filtro, concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se aproximadamente 48,5 g de cardanol (Rendimento de 48,5%).

4.2.3. Separação do cardol a partir do LCC técnico

O cardol obtido a partir do LCC técnico seguiu a mesma metodologia utilizada por Lomonaco e colaboradores (2009), a partir da técnica de cromatografia em coluna, visto que foi a técnica que proporcionou os melhores rendimentos de cardol, comparados aos rendimentos obtidos por (KUMAR *et al.*, 2002). Para a separação do cardol, 45 g de LCC técnico foram previamente pesados e transferidos para uma coluna cromatográfica de especificações 60 cm altura x 6 cm de diâmetro, utilizando como fase fixa sílica gel. Para a fase móvel utilizou-se misturas de solventes hexano : acetato de etila, em grau crescente de polaridade na proporção (90:10 e 70:30), respectivamente. Após a separação, as frações (25 - 32) contendo o cardol, depois de analisadas por CCD, foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório, obtendo-se uma recuperação de 4,75 g (15,03 mmol) de um produto escuro e viscoso (Rendimento de 10,5%). A pureza do cardol foi confirmada por CG/EM.

4.2.4. Extração da galactomanana

Para a obtenção da galactomanana, sementes de *Adenantha pavonina* L. (250 g) foram aquecidas (70 – 80 °C) em 1 L de água destilada por 40 min, seguido de intumescimento durante 24 h. Passado esse período, os endospermas foram manualmente separados retirando-se os tegumentos. Uma vez obtidos, utilizou-se acetona para a secagem dos endospermas durante um período de 5 a 7 dias e, quando secos, os endospermas foram triturados em liquidificador industrial

(Metvisa) e seus grãos foram selecionados em peneira Mech (ASTM 150 μm) (Figura 15).

Figura 15 - Fluxograma das etapas de obtenção da galactomanana



Fonte: Elaborado pela autora

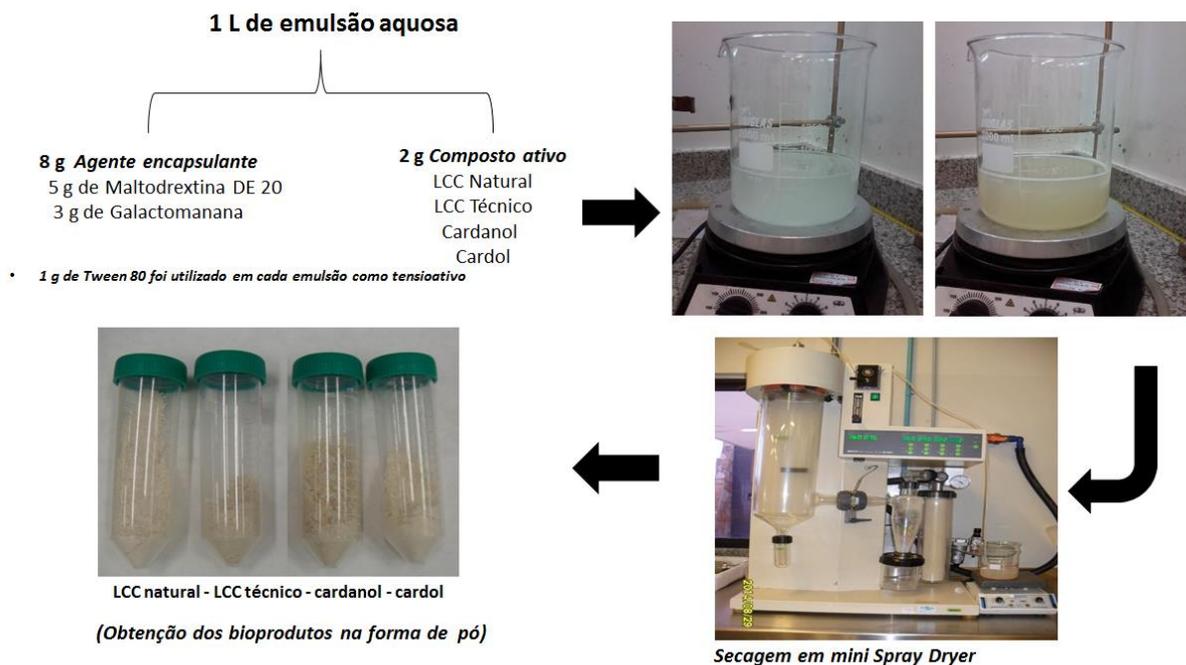
4.2.5. Preparação dos bioprodutos

Para a obtenção dos bioprodutos, inicialmente preparou-se uma solução aquosa de 1 L do material encapsulante. Este trabalho utilizou a combinação de materiais encapsulantes a partir de galactomanana (3,0 g) em adição à maltodextrina DE 20 (5,0 g) com o intuito de aumentar a eficiência de encapsulação. A mistura foi colocada para aquecer a 60 °C por 10 min. Cada emulsão foi preparada pela adição individual de 2 g do material de núcleo aqui utilizados: LCC natural, LCC técnico, cardol e cardanol, mantendo em todas as formulações a razão 4:1 entre o material encapsulante e o material de núcleo.

Para favorecer a homogeneização do meio, em cada mistura utilizou-se Tween 80 (1,0 g) como agente tensioativo. As emulsões permaneceram sob aquecimento de 60 °C por um tempo de 50 min. Após preparadas, as emulsões foram conduzidas ao atomizador. A secagem das amostras foi realizada no

Laboratório de Processos Agroindustriais da Embrapa onde se utilizou um mini *Spray Dryer* de bancada, modelo BUCHI-B290 condições de (Inlet: 158 – 162 °C; Outlet: 75 – 85 °C) regime de fluxo com corrente 1 m.s⁻¹. A Figura 16 apresenta o fluxograma das etapas realizadas para a obtenção dos bioprodutos.

Figura 16 - Fluxograma do procedimento de obtenção dos bioprodutos



Fonte: Elaborado pela autora

4.2.6. Ensaios da Atividade larvicida (pré - encapsulação)

Os ensaios de atividade larvicida foram realizados no Núcleo de Controle de Vetores e Endemias (NUVET), Orgão da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Para avaliar a atividade larvicida dos compostos LCC técnico, LCC natural, cardol e cardanol, bioensaios de dose - resposta foram realizados, em triplicata, no intervalo de concentrações (2, 4, 10, 20, 40, 100) ppm a fim de se estabelecer as concentrações letais necessárias para causar mortalidade à metade das larvas expostas aos bioprodutos (CL₅₀).

Inicialmente soluções estoques de cada bioproduto foram preparadas utilizando 20 mg solubilizados em 10 mL de DMSO e a quantidade desejada para cada concentração foi obtida destas soluções com auxílio de uma pipeta analítica e então solubilizadas em DMSO (dimetilsufóxido) até volume final de 0,5 mL. Cada

amostra foi transferida para copos descartáveis de 100 mL, completando com 49,5 mL de água destilada totalizando o volume de 50 mL.

Em cada copo adicionou-se 30 larvas do 3º estágio de *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller) eclodidas em água potável em temperatura entre 25 – 27 °C e umidade entre 50 - 70%. Ensaios de controle foram realizados com 30 larvas colocadas em um copo descartável, utilizando 0,5 mL DMSO e 49,5 mL de água destilada. A leitura de mortalidade foi realizada 24 h após adição das mesmas e foram consideradas mortas todas as larvas que não apresentaram nenhum movimento após serem perturbadas. A análise de Probit - Finney foi utilizada para a estimativa da CL₅₀, utilizando-se o programa da BioStat versão 2009. Os testes larvicidas foram realizados de acordo com as recomendações do protocolo da WHO (WHO 2006).

4.2.7. Ensaios da Atividade larvicida (após - encapsulação)

Os ensaios para a avaliação da atividade larvicida após a encapsulação dos compostos LCC técnico, LCC natural, cardol e cardanol, também foram realizados no NUVET. Os bioensaios de dose - resposta foram realizados, em triplicata, no intervalo de concentrações (10, 20, 40, 80, 100, 200, 400, 800 e 1000) ppm, a fim de se estabelecer as concentrações letais CL₅₀.

Soluções estoques de 2 g/L de cada composto encapsulado foram preparadas e as quantidades necessárias para cada concentração desejada foram retiradas com auxílio de pipetas e provetas graduadas. As amostras foram transferidas para copos descartáveis de 100 mL, completando-se com água destilada até volume final de 50 mL.

Em cada copo adicionou-se 30 larvas do 3º estágio de *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller) mantendo as mesmas condições dos ensaios anteriores. Os ensaios de controle foram realizados utilizando solução aquosa 2% de galactomana pura nas mesmas concentrações. A leitura de mortalidade das larvas foi realizada em períodos de 24, 48 e 72 h sendo consideradas mortas todas as larvas que não apresentaram nenhum movimento após serem perturbadas. A análise de Probit - Finney foi novamente utilizada para a estimativa da CL₅₀, utilizando-se o programa da BioStat versão 2009. Os testes larvicidas foram realizados de acordo com as recomendações do protocolo da WHO (WHO, 2006).

4.2.8. Ensaios simulados de campo da atividade larvicida

A avaliação da atividade larvicida dos bioprodutos em condições simuladas de campo foi realizada nas dependências do NUVET durante os meses de abril a julho de 2015. Para a efetivação dos ensaios, 20 recipientes plásticos, com capacidade para 30 L de água, foram tratados, identificados com o nome dos bioprodutos e distribuídos em área externa sombreada.

Os bioprodutos foram aplicados nas quantidades de 2,0 e 4,0 g e em cada recipiente foram adicionados 20 L de água, mantendo desta forma, as concentrações em 100 e 200 ppm. Cada depósito, testes e controle utilizando apenas galactomanana, recebeu 40 larvas de terceiro estágio. Os recipientes plásticos foram mantidos tampados com uma capa de nylon durante o período de avaliação. A atividade larvicida dos bioprodutos foi acompanhada durante 8 dias com leitura e contagem das larvas mortas/vivas a cada 24 h.

Os ensaios simulados de campo foram realizados com o objetivo de observar o efeito residual e permanência da ação dos bioprodutos sobre as larvas e para isso, após 4 dias, realizou-se a troca de água em cada recipiente retirando-se 5 L, seguida de uma nova reposição na mesma quantidade.

4.2.9. Ensaios da atividade de oviposição

Ensaios biológicos para verificação da atividade ovicida foram realizados nas concentrações (200, 500 e 800) ppm. Para investigar o efeito de oviposição e contagem do número de ovos depositados, iscas plásticas foram recobertas em fitas de papel filtro 5 cm de largura x 10 cm de comprimento e soluções de cada bioprodutos, nas concentrações desejadas, foram adicionadas deixando o volume final em 100 mL. Para controle positivo, utilizou-se uma isca envolvida apenas com papel filtro e solução aquosa 10% de galactomanana, (Figura 17a).

Figura 17 - Iscas utilizadas nos ensaios de oviposição (a) e gaiola de criação de mosquitos (b).



Fonte: Elaborado pela autora

Um dia após a alimentação sanguínea, 250 mosquitos fêmeas (em média) da cepa Rockefeller foram selecionados e transferidos para uma gaiola de criação de medidas 40,0 cm de altura x 40,0 cm de largura x 40,0 cm (Figura 17b) onde também foram colocadas as iscas. O processo de oviposição foi realizado em sala climatizada à temperatura de 26 ± 2 °C, umidade relativa de 80 ± 5 °C, durante 4 dias.

Após o processo de oviposição, as cartelas obtidas foram retiradas dos copos e dispostas em bandejas durante um dia para que pudessem secar. Em cada cartela a contagem dos ovos foi realizada através de lupa óptica (modelo Olympus SZ51) e a Eficiência de Repelência (ER%) foi calculada com base na equação de (RAJKUMA; JEBANESAN, 2009) (Equação 1).

$$ER\% = \frac{NC - NT}{NC} \times 100 \quad (1)$$

Fonte: Elaborado pela autora

Onde: ER = Eficiência de repelência; NC = Número de ovos obtidos nas iscas controle, NT = número de ovos obtidos nas iscas com os bioprodutos tratados.

4.3.0. Ensaios da atividade ovicida

Para a avaliação da atividade ovicida dos bioprodutos utilizou-se as cartelas obtidas nos ensaios de oviposição (Figura 18). De cada cartela foram selecionados em média 150 ovos aptos para eclosão, ou seja, aqueles sem nenhuma anormalidade estrutural externa ou dessecamento. Estes foram colocados em bandejas (45 x 20 x 10) cm, submersos em 1 L de água desclorada e para alimentação utilizou-se ração para peixes (1,0 g). O controle positivo foi realizado com (1,0 g) de galactomanana pura como fonte de alimentação. Após 72 h, foi verificada a taxa de eclodibilidade dos ovos e contagem do número de larvas crescidas bem como a taxa de mortalidade para os ovos não eclodidos. A análise percentual para a quantidade total de ovos postos para eclodir (QT) pela taxa de eclosão (TE) (Equação 2), seguiu as metodologias de Chenniappan e Kadarkarai (2008), Elango e colaboradores (2009) e Wan Fatma Zuharah e colaboradores (2015b).

$$\% \text{ de Mortalidade de ovos} = \frac{QT - TE}{QT} \times 100 \quad (2)$$

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 18 - Cartelas contendo ovos obtidos nos ensaios de oviposição.



Fonte: Elaborado pela autora

5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

5.1. Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

Os cromatogramas - CG/EM foram obtidos no LPT para verificação da pureza do cardol e cardanol. Utilizou-se um cromatógrafo CG-MS-QP 2010 (Shimadzu), equipado com uma coluna DB-5. O volume injetado de cada amostra foi de aproximadamente 1 µL e gás Hélio foi utilizado como arraste.

5.2. Microscopia Óptica

O estudo citoquímico das sementes de *Adenantha pavonina* L. L. foi realizado no Laboratório de Biologia Celular Vegetal - UFC sob a orientação da professora Dra. Maria Izabel Gallão. A análise experimental seguiu os procedimentos descritos por Gallão e colaboradores (2007), utilizando sementes de *Adenantha pavonina* L. que foram fixadas com 4% de paraformaldeído em 0,1 M, tampão fosfato, pH 7,2 e 1% de glutaraldeído, durante 24 h à temperatura ambiente. A desidratação do material foi realizada em uma série de etanol (10% a 90%). Após incorporação em resina, os blocos de tecido foram seccionados a 5 µm sobre um micrótomo SLEE (Alemanha). Duas diferentes reações histoquímicas foram realizadas: Primeiramente Xylidine Ponceau (XP), pH 2,5, foi utilizado como corante metacromático para detectar concentração de proteínas no citoplasma das células cotiledonares. E em segundo, o reagente Periodic Acid Schiff (PAS) em reação citoquímica com o ácido periódico de Schiff foi empregado para a detecção de polissacarídeos neutros. As secções obtidas dessa coloração foram observadas em microscópio óptico.

5.3. Termogravimetria (TGA)

Para a avaliação da estabilidade térmica da galactomanana e dos bioprodutos encapsulados utilizou-se um analisador térmico Mettler Toledo TGA /SDTA 851, sob atmosfera inerte de N₂, com fluxo de 50 mL/min, sob uma faixa de temperatura de 10–650 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min e massa de amostra de 10 mg.

5.4. Espectroscopia no Infravermelho (IV)

O espectro vibracional na região do Infravermelho para a galactomanana, foi obtido no LPT, utilizando um espectrofotômetro, Perkin Elmer FT-IR/NIR Spectrometer, Modelo Frontier, na região de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando-se pastilhas de KBr na proporção de 1% de amostra. Para a análise foram utilizados 20 scans.

5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os aspectos estruturais das microesferas foram obtidos na Central Analítica – UFC através de um Microscópio Eletrônico de varredura com energia dispersiva de raios-X, MEV e ETD Inspect - F50 operando em 10 - 20 kV de voltagem. As amostras foram fixadas diretamente em “stubs” de alumínio de 12 mm de diâmetro e, em seguida, submetidas à metalização (pulverização) com uma fina camada de ouro 20 nm em um Sputter Coater Q150T ES. Após a metalização, as amostras foram observadas com ampliações de 5000 a 11000 vezes.

5.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em espectrômetros BRUKER, modelo Avance DPX-300, pertencente ao CENAUREMN vinculado ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, operando na frequência 300 MHz. Para dissolução da amostra utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3) e padrão interno TMS (Tetra metil silano).

A espectroscopia de RMN para análise da estrutura da galactomanana da *Adenantha pavonina L.* os espectros foram obtidos em um equipamento Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleos de ^1H e ^{13}C) e equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”), localizado no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN) da Embrapa Agroindústria Tropical. As amostras foram preparadas dissolvendo-se aproximadamente 7 mg da Galactomanana em 600 μL de água deuterada. Em seguida, espectro unidimensional de ^1H foi realizado a 80 °C com um tempo de espera entre cada aquisição de 2 s, aquisição de 64 transientes em uma janela espectral de 16 ppm e 32k de número de pontos.

O espectro unidimensional de ^{13}C foi realizado a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ com um tempo de espera entre cada aquisição de 1 s, aquisição de 20 transientes em uma janela espectral de de 251.1 ppm e 32k de número de pontos.

5.7. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O tamanho de partícula (DLS), Índice de Polidispersibilidade e Potencial Zeta foram determinados por meio de espectroscopia de correlação de fótons, utilizando um analisador Zetasizer Nano ZS90 da Malvern Instruments. Para estabelecer as medidas de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das vesículas, as amostras foram diluídas em água e as dispersões foram determinadas à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ com ângulo de espalhamento de $90\text{ }^{\circ}\text{C}$

5.8. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).

A determinação da massa molar da galactomanana foi realizada por em um instrumento Shimadzu *LC-10AD* com detector de índice de refração RID-10A a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi preparada uma solução de 0,1% da goma em água e em seguida foi filtrada com membrana *Milipore* de porosidade $0,45\text{ }\mu\text{m}$. A análise foi realizada utilizando uma coluna *Ultrahydrogel linear* $7,8 \times 300\text{ mm}$, fase móvel de NaNO_3 $0,1\text{ mol L}^{-1}$, fluxo de $0,5\text{ mL min}^{-1}$. O volume injetado da amostra foi de $20\text{ }\mu\text{L}$. A curva padrão para determinação da massa molar foi construída utilizando-se padrões de pululana com intervalo de massas molares de 10^3 a 10^7 g/mol .

5.9. Espectroscopia do Ultravioleta - Visível (UV-Vis)

5.9.1. Curvas padrão

As soluções estoque dos bioprodutos foram preparadas em água nas concentrações de 200 mg/100 mL ($2,0\text{ mg/mL}$) e 400 mg/100 mL ($4,0\text{ mg/mL}$) somente para o LCC técnico. Diferentes alíquotas destas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e os volumes completados com água destilada a fim de obter soluções de diferentes concentrações ($0,1$, $0,5$, $1,0$, $1,5$, $2,0\text{ mg/mL}$ para os bioprodutos cardol e LCC natural) e ($0,5$, $1,0$, $2,0$, $3,0$, $4,0\text{ mg/mL}$ para o LCC técnico). As absorvâncias das soluções foram determinadas por

Espectrometria na região UV-Vis em 274 e 295 nm usando água como branco. A partir das curvas de calibração foram obtidas as equações de regressão linear, os valores das absorvâncias e as concentrações dos compostos ativos.

5.9.2. Estudo cinético da liberação de óleo *in vitro*

O perfil cinético de liberação foi realizado apenas para os bioprodutos LCC natural, LCC técnico e cardol e determinado em triplicata através de Espectroscopia na região do UV-Vis, calculando-se a concentração de óleo presente através das curvas de calibração pré-estabelecidas. Para o preparo de cada solução, 20 mg do bioproduto (LCC natural e cardol) e 40 mg (LCC técnico) foram pesados em um béquer e adicionou-se 10 mL de água destilada. O sistema foi mantido em temperatura entre 23 e 25 °C, sob agitação magnética e após intervalos de tempo pré-estabelecidos retirava-se uma alíquota e analisava-se por Espectroscopia a concentração de óleo liberado.

A partir da quantificação dos óleos obtidos nos estudos de cinética, a eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada através da razão entre a quantidade de óleo determinada (QOD) nas microesferas (bioproduto) pela quantidade de óleo adicionada (QOA) no preparo das emulsões – Equação 3.

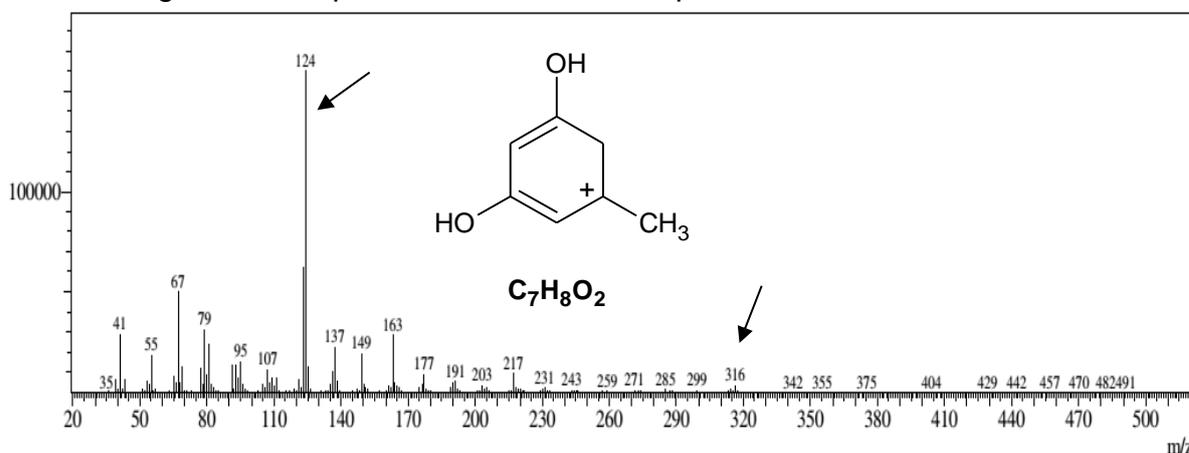
$$EE (\%) = \left(\frac{QOD}{QOA} \right) \times 100 \quad (3)$$

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Isolamento do cardol

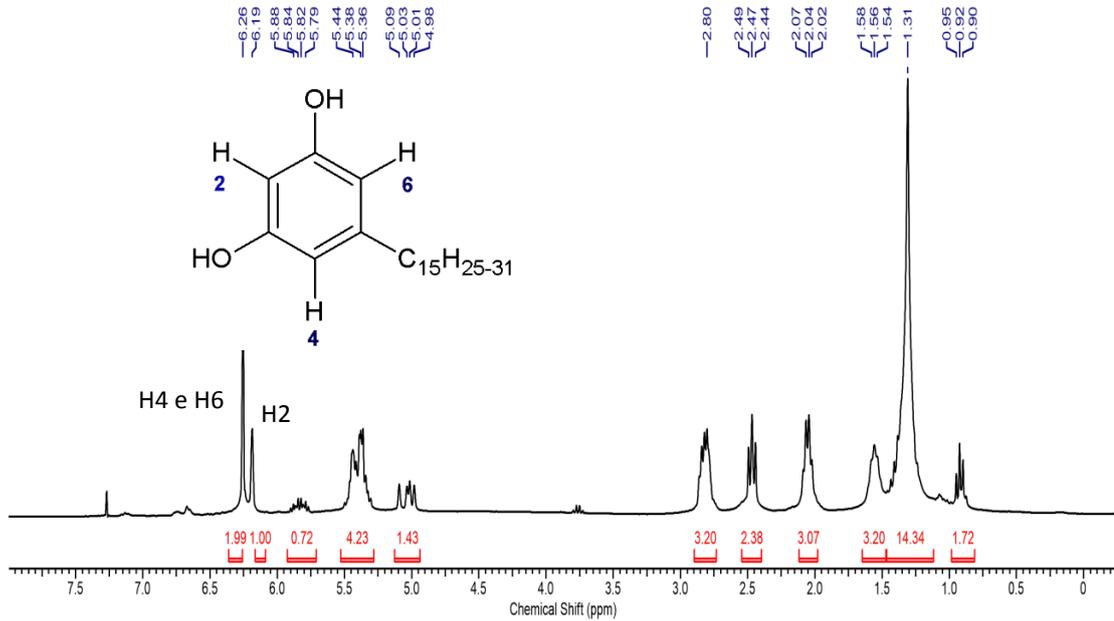
Depois de isolado em coluna, o cardol foi caracterizado através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. O espectro obtido (Figura 19) permitiu comprovar a purificação do material isolado, apresentando como pico de maior m/z igual a 316 correspondente ao cardol di-insaturado bem como mostrou a presença do íon m/z igual a 124 (estrutura em detalhe) como o íon mais estável característico da fragmentação do cardol.

Figura 19 - Espectro de massa obtido para o cardol



Fonte: Elaborado pela autora

Através da análise do espectro de RMN 1H , Figura 20, foi possível verificar as absorções na região entre 6,26 e 6,19 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos. O sinal em 6,26 ppm refere-se aos átomos de hidrogênio 4 e 6 e um singleto menos intenso em 6,19 ppm refere-se ao hidrogênio 2. Os sinais observados entre 4,98 e 5,44 ppm são referentes aos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos insaturados da cadeia. Observou-se também um tripleto no intervalo entre 2,44 e 2,49 ppm referente aos hidrogênios metilênicos ligados diretamente ao anel aromático. Um sinal intenso em 1,31 ppm foi caracterizado como os hidrogênios metilênicos da cadeia lateral e um tripleto no intervalo entre 0,90 e 0,95 ppm é referente aos átomos de hidrogênio do grupo metila terminal. Os principais sinais observados no espectro estão de acordo com os resultados mostrados por Lomonaco e colaboradores (2009) também para o cardol.

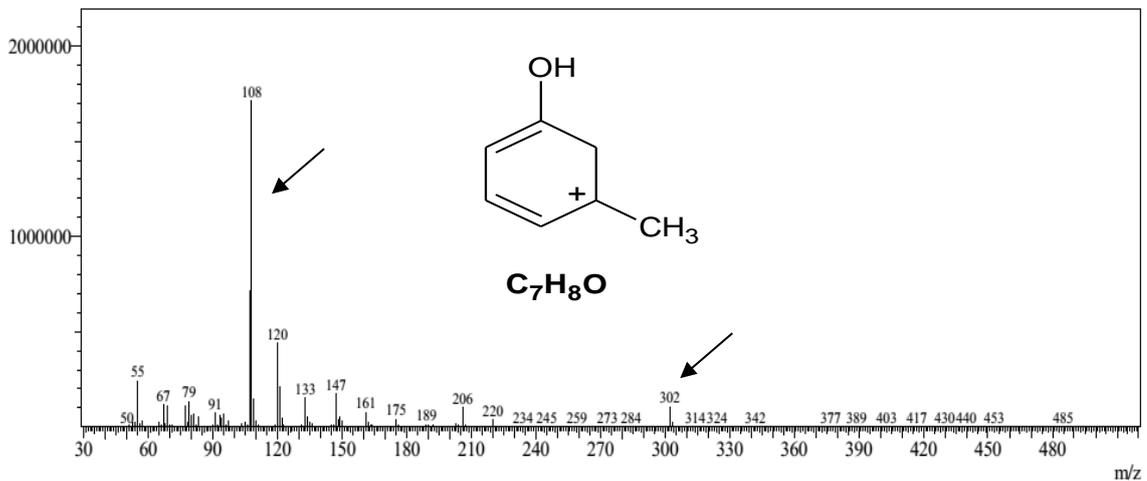
Figura 20 - Espectro de RMN ^1H para o cardol.

Fonte: Elaborado pela autora

6.2. Isolamento do cardanol

Após obtenção e purificação, o cardanol foi analisado através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. O espectro obtido, Figura 21, apresentou um pico de m/z igual a 302 correspondente ao cardanol monoinsaturado, bem como a presença do pico m/z em 108 (estrutura em detalhe) correspondente ao íon molecular mais estável após a fragmentação do cardanol.

Figura 21 - Espectro de massa para o cardanol.

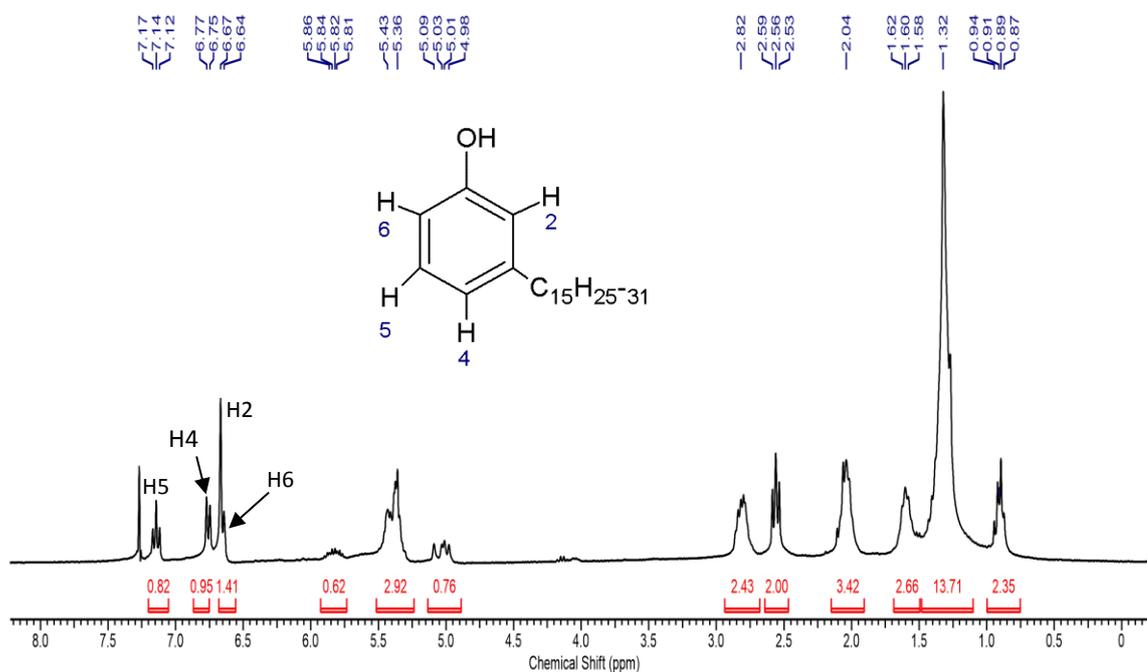


Fonte: Elaborado pela autora

O espectro de RMN ^1H , Figura 22, apresenta as principais absorções para os hidrogênios aromáticos entre 6,64 a 7,14 ppm correspondente aos hidrogênios 2, 4, 5 e 6. O tripleto em 7,14 ppm foi atribuído ao hidrogênio 5, o dubleto em 6,77 ppm é referente a hidrogênio 4, o singlete em 6,67 ppm é referente ao hidrogênio 2 e um dubleto sobreposto em 6,64 ppm referente ao hidrogênio 6.

Entre 4,98 a 5,86 ppm verificou-se os sinais referentes aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral. Observou-se também a presença do multiplete em 2,82 ppm atribuído aos hidrogênios metilênicos situados entre os átomos de carbono sp^2 da cadeia lateral; um multiplete entre 2,53 e 2,59 ppm referente aos hidrogênios metilênicos ligados diretamente ao anel benzênico; o sinal em 1,32 ppm referente aos hidrogênios metilênicos da cadeia lateral e um tripleto na região entre 0,87 e 0,91 ppm está relacionado aos hidrogênios do grupo metila terminal. Os resultados observados para as principais absorções do cardanol estão de acordo com os obtidos por Jie Chen e colaboradores (2016).

Figura 22 - Espectro de RMN ^1H para o cardanol.



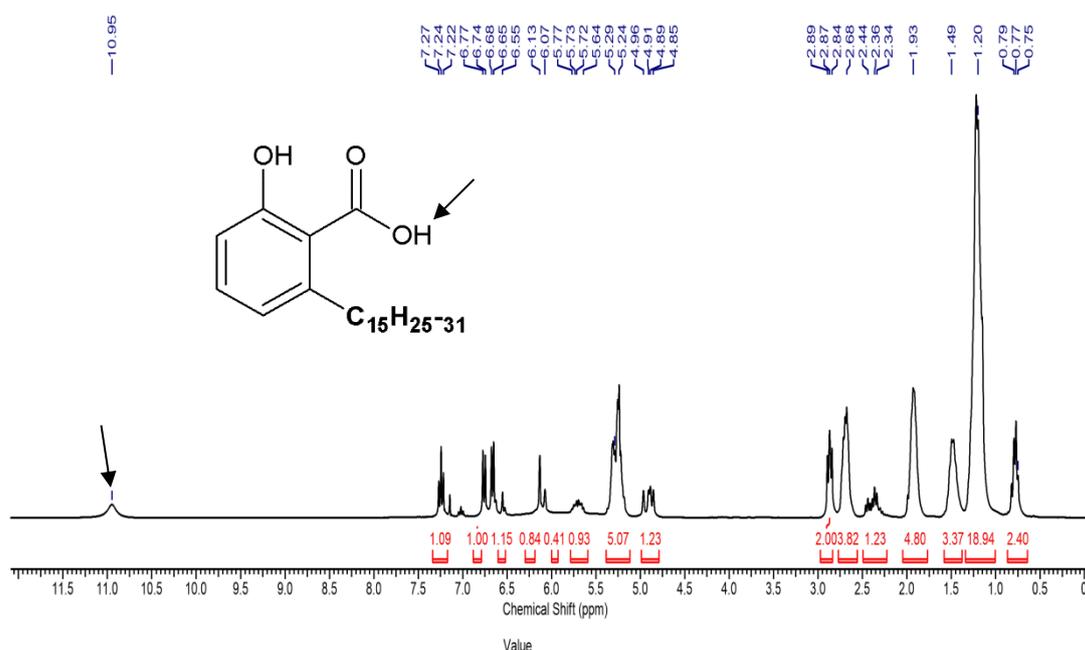
Fonte: Elaborado pela autora

6.3. Isolamento do LCC natural

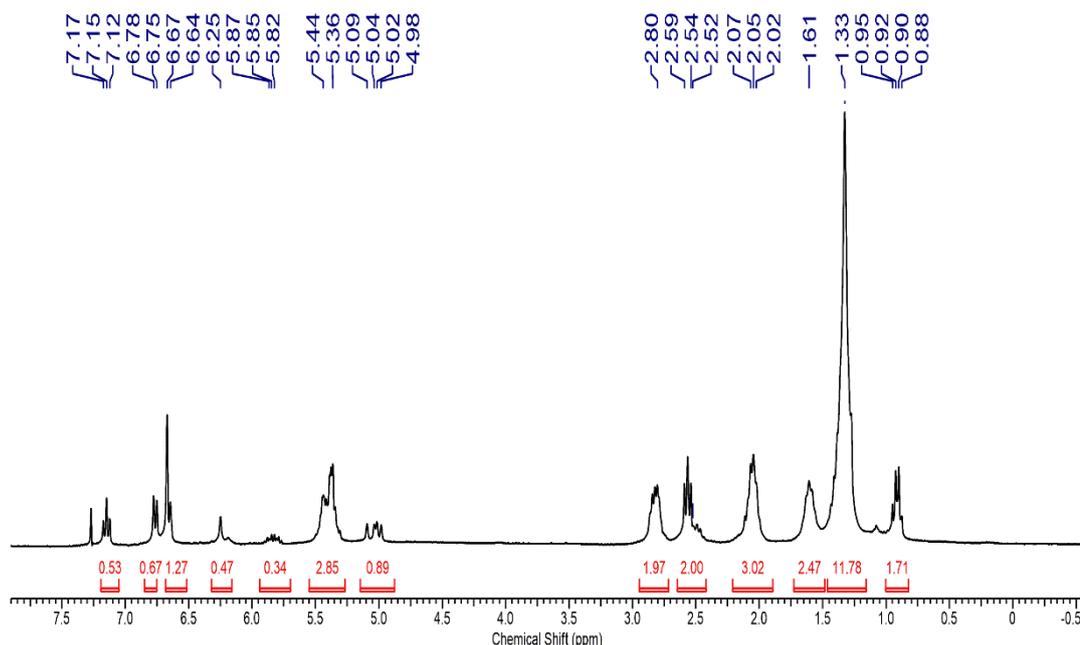
A Figura 23 apresenta o espectro de RMN ^1H do LCC natural. O LCC natural é constituído por uma mistura de meta alquenil fenóis substituídos que diferem no grau de insaturação da cadeia lateral e tem por maior constituinte o ácido anacárdico (60-65%) seguido de cardol (15-20%), cardanol (10%), além de 2-metil-cardol (5%) (MAZZETTO; LOMONACO; MELLE, 2009).

O maior indicativo da obtenção do LCC natural é o surgimento do sinal em 10,95 ppm (sinal ausente no LCC técnico - Figura 24) característico de hidrogênio ácido. Os sinais na região entre 6,65 e 7,27 ppm correspondem aos hidrogênios aromáticos. Os multipletos observados na região entre 2,89 e 2,87 ppm foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos ligados diretamente ao anel benzênico. Verificou-se ainda um sinal em 1,20 ppm referente aos hidrogênios metilênicos da cadeia lateral e um triplete sobreposto em 0,75 e 0,79 ppm referente aos hidrogênios dos grupos metilas terminal. O triplete na região entre 4,85 e 4,91 foi atribuído aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral.

Figura 23 - Espectro de RMN ^1H do LCC natural



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 24 - Espectro de RMN ^1H do LCC técnico.

Fonte: Elaborado pela autora

O espectro de RMN ^1H para o LCC técnico, Figura 24, apresenta os principais sinais para os hidrogênios aromáticos entre 6,64 a 7,17 ppm correspondente aos hidrogênios aromáticos. Entre 4,98 a 5,87 ppm verificou-se os sinais referentes aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral. Observou-se também a presença do multiplete em 2,80 ppm atribuído aos hidrogênios metilênicos situados entre os átomos de carbono sp^2 da cadeia lateral; um multiplete entre 2,52 e 2,59 ppm referente aos hidrogênios metilênicos ligados diretamente ao anel benzênico; o sinal em 1,33 ppm referente aos hidrogênios metilênicos da cadeia lateral e um tripleto na região entre 0,88 e 0,95 ppm está relacionado aos hidrogênios do grupo metila terminal. Os resultados observados para o LCC técnico estão coerentes aos sinais obtidos no espectro do cardanol, já que este é o maior constituinte, bem como a ausência do sinal para hidrogênio ácido.

6.4. Caracterização da galactomanana.

Entre os diferentes métodos utilizados para a obtenção de galactomananas de espécies leguminosas podemos ter: a extração à quente e a precipitação em etanol. A presente pesquisa utilizou a extração à quente que também utilizada por Cerqueira e colaboradores (2009) e Rui Guo e colaboradores (2016).

Para obtenção de galactomanana a partir dos endospermas extraídos, soluções aquosas foram preparadas e postas sob aquecimento à 80 °C. A extração ocorreu a partir de 150 g de endospermas para 1 L de água destilada, sob aquecimento por um período de 2 h e agitação constante, até a obtenção de uma solução viscosa. As soluções resultantes, após filtração à vácuo em malha nylon 5µm, foram conduzidas à secagem por atomização em um mini *Spray Dryer* para a obtenção do material em pó. Os baixos rendimentos obtidos (abaixo de 5%) inviabilizou a escolha de obtenção da galactomanana através desta metodologia.

Por esta razão, utilizou-se uma nova metodologia a partir da secagem / desidratação dos endospermas em acetona durante 7 dias. Os endospermas depois de secos precisaram passar por trituração para a obtenção de um material na forma de pó e embora esta metodologia não tenha proporcionado um grau de pureza ao material obtido foi a que apresentou os melhores rendimentos 25% em média.

Os rendimentos de galactomanana obtidos através da secagem em acetona mostraram-se compatíveis com os rendimentos (após processos de extração) observados na literatura para outras sementes leguminosas: *Caesalpinia ferrea* 14,0% (SOUZA *et al.*, 2010), *Adenantha pavonina L.* 17,11%, *Gleditsia triacanthos*, 24,73% (CERQUEIRA *et al.*, 2009), *Gleditsia macracantha*, 21,7% (RAKHMANBERDYEVA; SHASHKOV, 2005); *Trigonella foenumgraecum*, 22,6% (BRUMMER; CUI; WANG, 2003); *Cassia javanica*, 26,0 % (ANDRADE *et al.*, 1999).

A massa molar da galactomanana de *Adenantha pavonina L.* determinada pelo cromatógrafo de permeação em gel foi de $2,53 \times 10^6$ g mol⁻¹, um valor próximo ao encontrado na literatura por Cerqueira e colaboradores (2009), para a *Adenantha pavonina L.* $1,81 \times 10^6$ g/mol e $6,4 \times 10^5$ g/mol, para galactomanana da espécie *Caelsaphinia férrea* por Souza e colaboradores (2010) e *Dimorphandra guardeneriana* $3,9 \times 10^7$ por Andrade e colaboradores (2009).

Os diferentes valores de massa molar média entre as galactomananas observados entre as várias espécies são influenciados pelos processos de extração, purificação, pré-tratamento à altas temperaturas (que leva à degradação das cadeias poliméricas formadoras da sua estrutura) bem como com a razão M/G e a distribuição das unidades de manose e galactose que influenciam também nos valores de viscosidade intrínseca.

6.4.1. Citoquímica - galactomanana

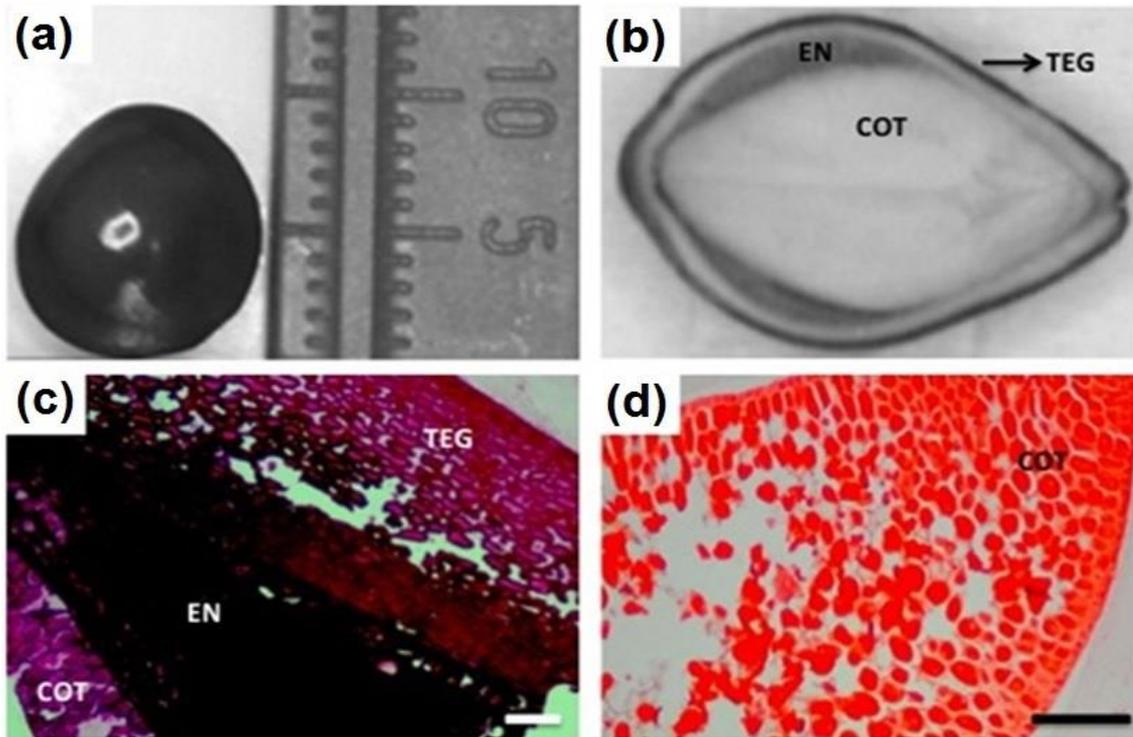
Uma representação da semente de *Adenantha pavonina L.* pode ser observada na (Figura 25a) e seu corte transversal mostrando a estrutura interna tegumento (TEG) e cotilédone (COT) bem definidos (Figura 25b). Características semelhantes também foram encontradas por Gallão e colaboradores (2013) em sementes da espécie leguminosa *Caesalpinia ferrea*.

Na (Figura 25c) observou-se na região do endosperma (EN) uma intensa coloração após reação com o Ácido Periódico de Schiff (PAS) confirmando a presença de polissacarídeos. O método PAS é bastante utilizado para detectar a presença de polissacarídeos neutros nas paredes celulares de células vegetais e a identificação ocorre através da oxidação dos grupos hidroxilas (OH) dos carbonos adjacentes pelo ácido periódico (HIO_4), formando dois radicais aldeídicos.

Em um segundo momento, esses radicais se ligam ao reativo de Schiff, o qual é uma solução incolor. Esse corante, apresenta cor púrpura e, sob a ação do anidrido sulfuroso, tem o seu grupo cromofórico alterado, originando uma solução sem cor. Essas moléculas incolores ligam-se aos grupos carbonila (formados pela oxidação das hidroxilas), restabelecendo assim, a região cromofórica do corante (CORTELAZZO; VIDAL; MELLO; 1983; VIDAL, 1987).

A semente de *Adenantha pavonina L.* após coloração com o corante Xylidine Ponceau (XP) (Figura 25d), apresentou intensidade da coloração (cor alaranjada) na região do cotilédone, em virtude da maior concentração de proteínas no citoplasma das células cotiledonares. O XP é um corante, que apresenta dois radicais sulfato. Em pH 2,5, as proteínas podem ser visualizadas, pois neste pH seus grupos amino estão protonados e se ligam eletrostaticamente ao XP, que por sua vez, apresenta seus radicais sulfato desprotonados (CORTELAZZO; VIDAL, 1991).

Figura 25 - (a) Semente de *Adenantha pavonina* L.; (b) Corte de seção transversal apresentando as estruturas internas; (c) semente após reação com o PAS, destacando a intensa coloração do endosperma (EN) e (d) semente corada com XP destacando a presença de proteínas citoplasmáticas - Barras: 100 μ m

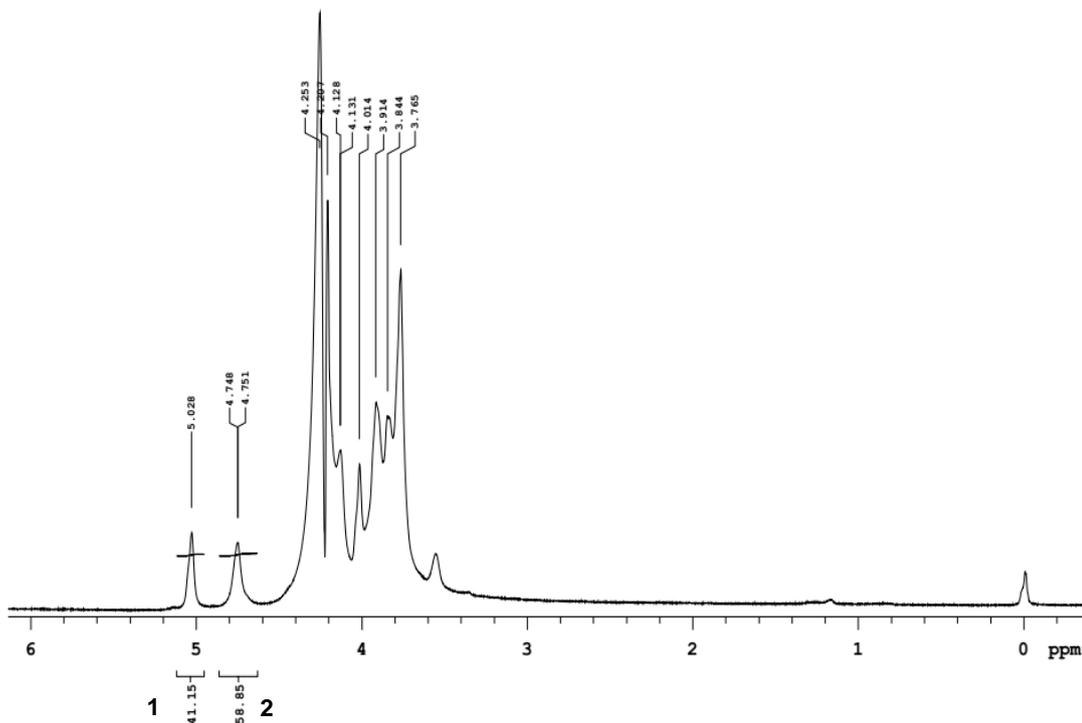


Fonte: Elaborado pela autora

6.4.2. Análise estrutural da galactomanana pura.

O espectro de RMN ^1H para a galactomanana (Figura 26), mostra a atribuição dos deslocamentos químicos para obter a razão Gal/Man a partir da integração na região anomérica. A partir da análise do espectro, foi possível observar dois deslocamentos bem resolvidos em campo mais baixo ($\delta = 5,02$ ppm e $\delta = 4,75$ ppm), um referente aos hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos das unidades monossacarídicas de α -D-galactopiranosose (1) e outro referente aos hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos das unidades monossacarídicas de β -D-manopiranosose (2), respectivamente. Os valores de integração obtidos (41,15 e 558,85), proporcionou uma razão Gal/Man de 1.00 :1,42 e esta razão mostrou-se equivalente aos resultados obtidos por Cerqueira e colaboradores (2009) para Man/Gal de 1.35:1,0, também para a espécie *Adenantha pavonina* L..

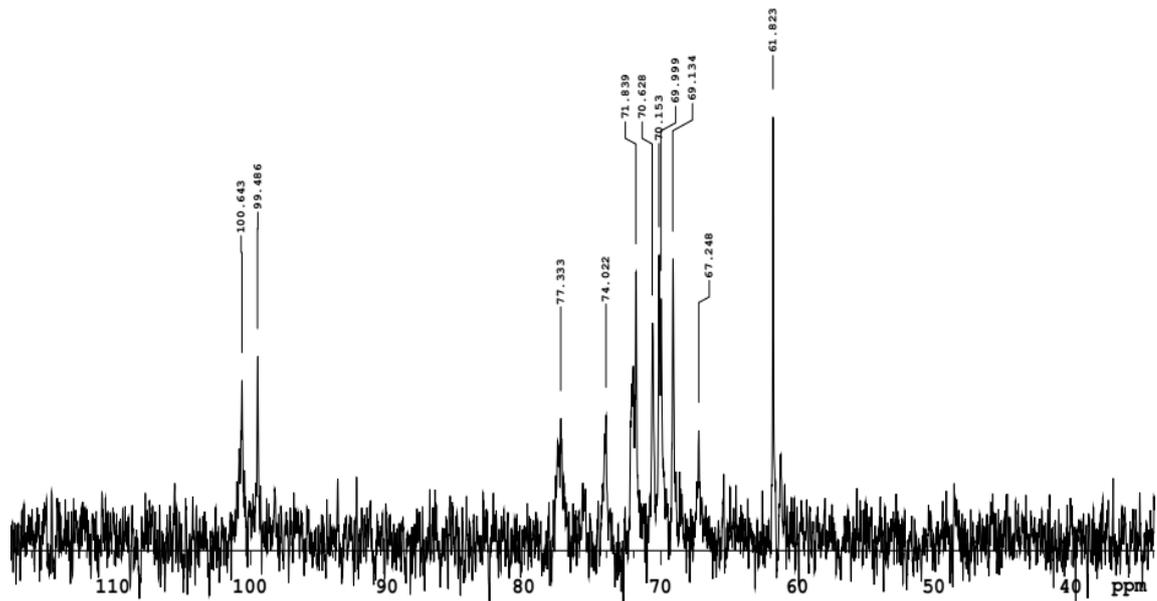
Figura 26 – Espectro de RMN do Hidrogênio - ^1H da galactomanana de *Adenantha pavonina L.* para obtenção da razão Gal/Man.



Fonte: Elaborado pela autora

A razão G/M da galactomanana também foi determinada através do espectro ^{13}C a partir dos diferentes desvios químicos para os átomos de carbono anoméricos. A região anomérica RMN ^{13}C ($\delta = 90 - 110$) mostrou dois sinais, os quais foram atribuídos como C -1 de α -D-galactose na ($\delta = 100.65$) e C -1 de β -D-manose no ($\delta = 99.486$) resultando em uma razão G/M de 1.00/1.013. Os sinais de H2/C2 (4.01/70.6 ppm), H3/C3 (3.84/72.0 ppm), H4/C4 (3.91/77.3 ppm) e H5/C5 (3.83/74.0 ppm) correspondem às unidades monossacarídicas α -D-galactopiranoose, enquanto os sinais H2/C2 (3.76/69.1 ppm), H3/C3 (4.13/70.15 ppm), H4/C4 (4.12/70.0 ppm) e H5/C5 (4.20/71.83 ppm) foram atribuídos às unidades β -D-manopiranoose (Figura 26 e Figura 27). O sinal em 61.82 ppm foi atribuído ao C6 de unidades α -D-galactopiranoose não substituídos, enquanto que em 67.1 ppm foi associado ao C6 de unidades β -D-manopiranoose substituídas por unidades α -D-galactopiranoose. As regiões espectrais dos átomos de carbono anoméricos estão coerentes com os dados encontrados na literatura por Cerqueira e colaboradores para galactomananas da espécie *Adenantha pavonina L.* (2009) e Albuquerque e colaboradores (2014) para galactomananas da espécie *Cassia grandis*

Figura 27 - Espectro de RMN Carbono - ^{13}C da galactomanana da *Adenantha pavonina* L. para obtenção da razão Man/Gal.



Fonte: Elaborado pela autora

A razão G/M das galactomananas, ou seja, a distribuição das unidades α -D-galactose nas cadeias de D-manose, depende da origem e da espécie de leguminosa e das técnicas de extração utilizadas para a sua obtenção, possuindo, desta forma, diferentes relações que pode variar de 1,0 a 5,0 (PETKOWICZ *et al.*, 1999). Esta razão exibe fundamental importância na solubilidade desses polissacarídeos em soluções aquosas.

De acordo com Sierakowski e colaboradores (2000), ocorre uma tendência ao aumento da solubilidade em água com o aumento de unidades de galactose na cadeia principal direcionando as ligações de hidrogênio das cadeias de manose para a água envolvente e não para as cadeias vizinhas de manose, favorecendo, desta forma, a solubilização do polímero em água bem como o aumento na viscosidade deste polímero (LARIZADOU; BILIADERIS; IZYDORCZYK, 2000; SECOUARD; GRISEL; MALHIAC, 2007; PRAJAPATI *et al.*, 2013).

As principais espécies leguminosas estudadas e sua respectivas razão M/G são dadas a seguir: *Ceratonia siliqua* (M/G 3.1:1) (VENDRUSCOLO *et al.*, 2009); *Dimorphandra gardneriana* (M/G 1.84:1) (CUNHA *et al.*, 2009), *Caesalpinia pulcherrima* (M/G 3.23:1 e *Cássia javanica* (M/G 2.8:1) (AZERO; ANDRADE, 2002),

Caesalpinia férrea (M/G 2.65:1) (GALLÃO *et al.*, 2013), *Caesalpinia ferrea* var *Ferrea* (M/G 2.1:1.0) (SOUZA *et al.*, 2010), *Mesquite seed gum* (M/G 1.1:1) (RODRIGUES *et al.*, 2016).

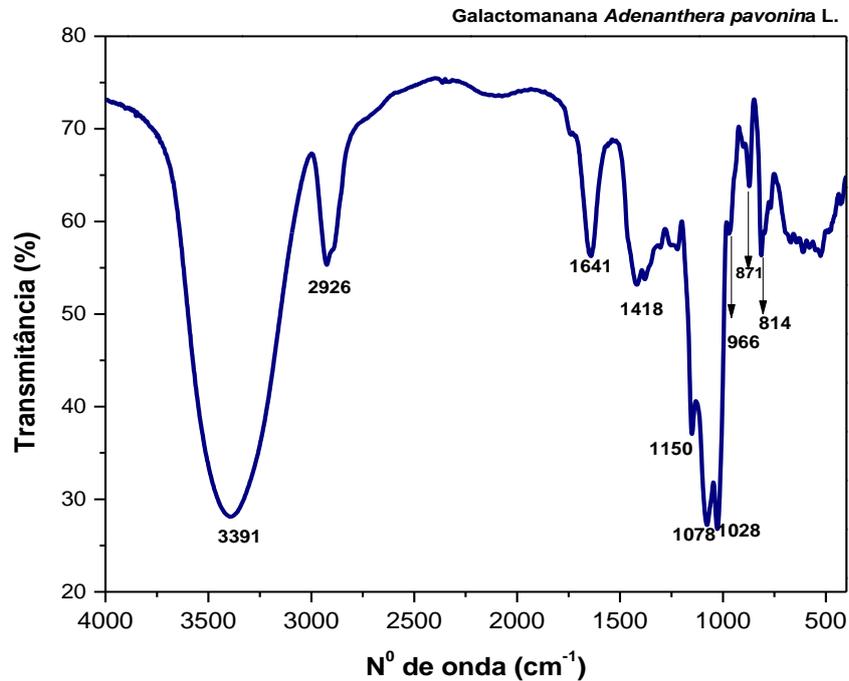
6.4.3. Espectroscopia no Infravermelho - galactomanana

A Figura 28 mostra o espectro no infravermelho da galactomanana de *Adenantha pavonina* L. e as principais bandas de absorções (Tabela 2) sendo as atribuições em 814 e 871 cm^{-1} relacionadas à presença de unidades α -D-galactopiranosose e β -D-mannopiranosose, respectivamente.

A banda em 966 cm^{-1} é típica de deformação axial ($\delta = \text{C-OH}$) no C-4 das unidades de manose. A banda observada em 1150 cm^{-1} foi atribuída à vibração de estiramento da ligação ($\delta = \text{C-O}$), assim como as em 1028 e 1078 cm^{-1} foram atribuídas à deformação axial de ligações ($\delta = \text{C-O}$), correspondentes ao anel piranosídico. A banda de absorção em 2926 cm^{-1} é indicativa da presença de grupo alifático C-H. O alongamento da banda em 3391 cm^{-1} é correspondente à presença de grupos O-H de alcoóis da estrutura dos polissacarídeos.

Os resultados das atribuições no infravermelho estão em concordância aos obtidos para galactomanana de sementes de *Adenantha pavonina* L. por Cerqueira e colaboradores (2011) e galactomananas de outras espécies leguminosas: *Cyamopsis tetragonolobus* L. (SUMEDHA *et al.*, 2015), polissacarídeos extraídos de Cogumelos florais (WANG *et al.*, 2015), *Eremurus anisopterus* (HU *et al.*, 2011), *Ceratonia siliqua* (VENDRUSCOLO, *et al.*, 2009) e *Dimorphandra gardneriana* (CUNHA, *et al.*, 2009).

Figura 28 - Espectro na região do infravermelho para a galactomanana natural.



Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 2 - Principais bandas no infravermelho com as correspondentes vibrações para galactomanana de *Adenantha pavonina* L.

| Nº Onda (cm ⁻¹) | Vibração |
|-----------------------------|-------------------------------------------|
| 3391 | V O-H |
| 2926 | V C-H |
| 1150 | δ C-O |
| 1028 e 1078 | Bandas características de polissacarídeos |
| 966 | δ C-OH no C-4 |
| 871 | β -D-mannopirranose |
| 814 | α -D-galactopirranose |

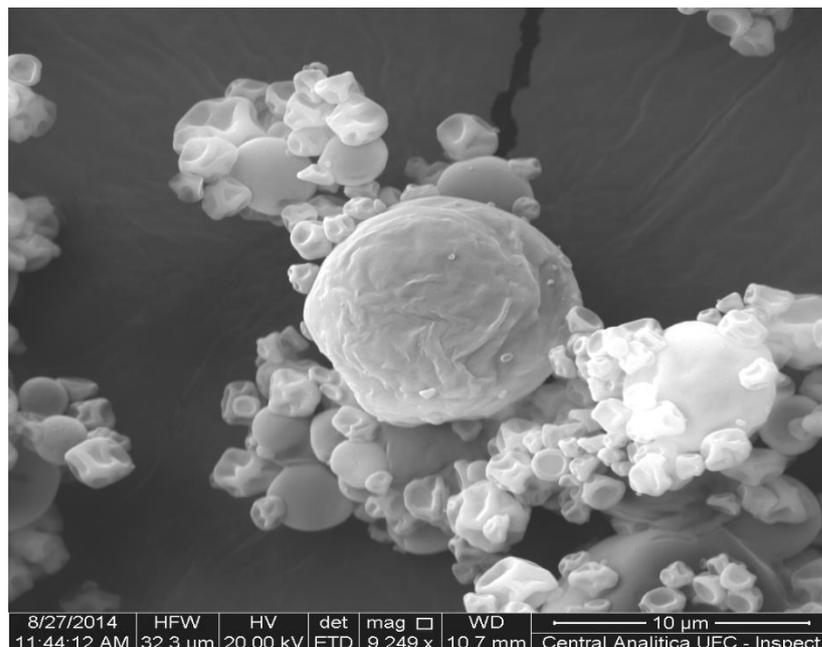
Fonte: Elaborado pela autora

6.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura - galactomanana

As microesferas de galactomanana pura obtidas na secagem por atomização foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 29). A morfologia externa dessas microesferas revelou-se áspera, esférica, irregular e com a presença de cavidades e apresentaram um diâmetro médio que variou de 0,55 para 3,35 μm . Tais características têm sido associadas às características das microesferas e também ao processo de secagem. As superfícies externas das gotículas pulverizadas na câmara, ao entrar em contato direto com o ar quente, pode sofrer novos rearranjos das cadeias poliméricas constituintes da galactomanana. Após o encapsulamento e com a adição de material de núcleo não foi observada a presença de cavidades obtendo-se assim microesferas mais esféricas, regulares e menos rugosas.

Estes resultados corroboram com os de Casanova e colaboradores (2016) quando utilizou quitosana modificada encapsulando ácido rosmarínico através de atomização bem como com os trabalhos de outros autores no estudo do encapsulamento de extratos a partir de biopolímeros naturais como material de parede (ESTEVINHO *et al.*, 2014; HARRIS *et al.*, 2011).

Figura 29 - Fotomicrografia das microesferas de galactomanana *Adenantha pavonina* L. produzidas após secagem por atomização.



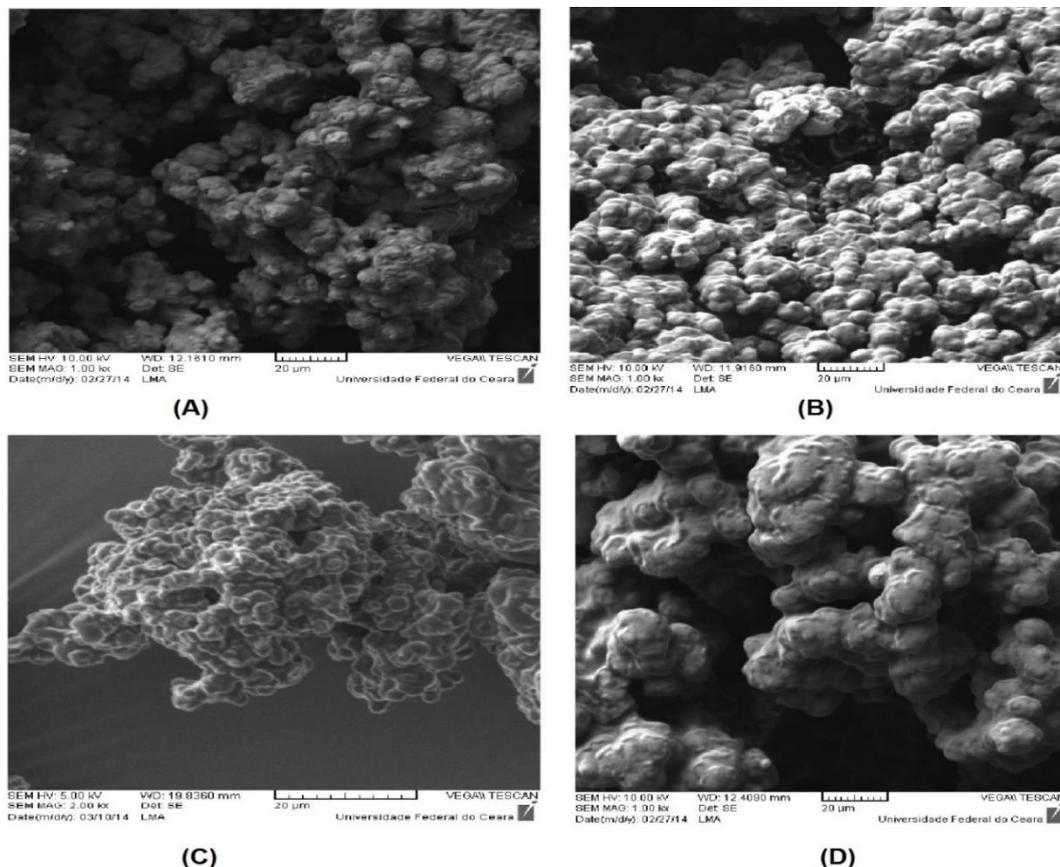
Fonte: Elaborado pela autora

6.5. Caracterização dos Bioprodutos encapsulados.

6.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 30 apresenta as fotomicrografias externas de MEV dos pós produzidos após a secagem de emulsões aquosas quando a concentração entre o material de parede e o material de núcleo foi estabelecida em 2:1. As imagens após encapsulação dos bioprodutos cardanol Fig.30 (A), LCC natural Fig.30 (B), cardol Fig.30 (C) e LCC técnico Fig.30 (D) mostraram um agrupamento das microesferas. Tal comportamento foi observado para todos os pós produzidos o que nos levou a concluir que em concentrações mais baixas de material de parede, como na proporção utilizada, ocorreu a diminuição da difusão do material de núcleo no interior das gotículas de polímeros, aumentando o seu teor na superfície resultando desta forma em uma menor eficiência de encapsulação.

Figura 30 - Fotomicrografias dos bioprodutos produzidos após encapsulação. Concentração galactomanana/material de núcleo (2:1). cardanol (A), LCC natural (B), cardol (C) e LCC técnico (D).



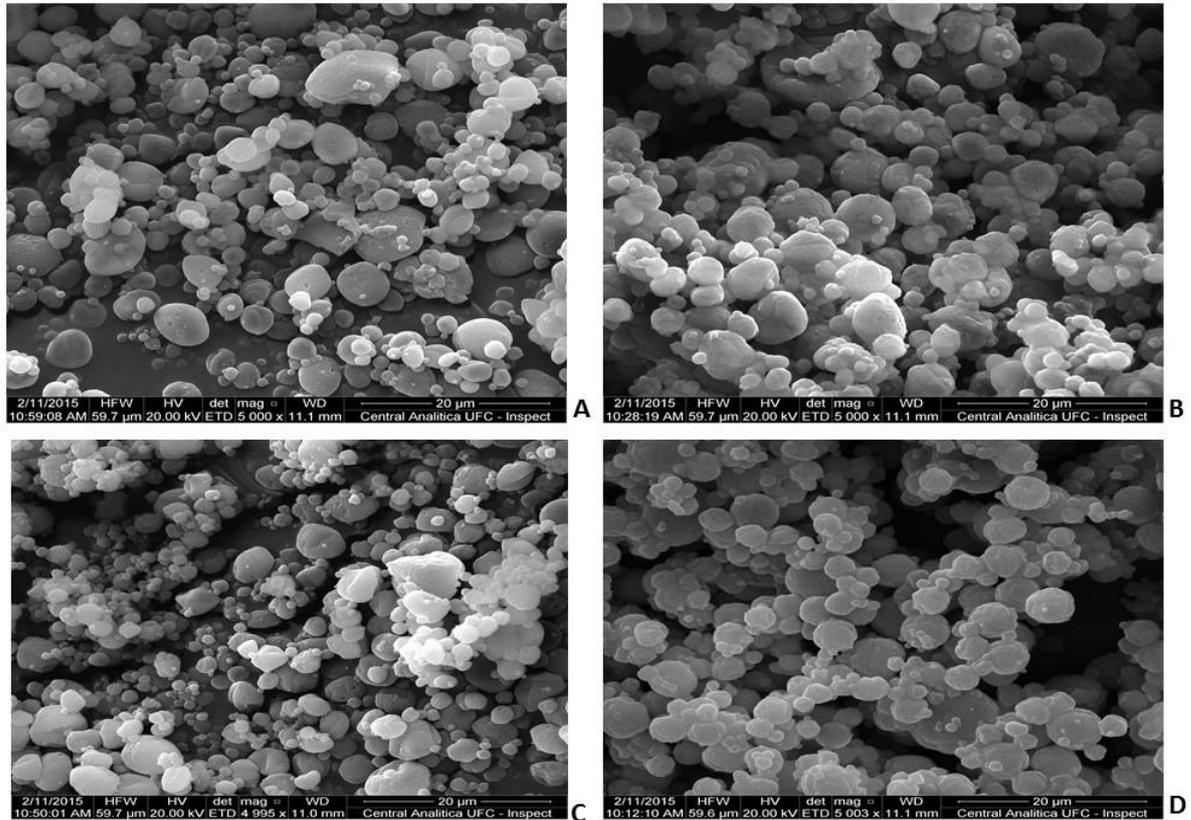
Fonte: Elaborado pela autora

Outro fator que influenciou na baixa eficiência de encapsulamento foi a utilização de apenas um tipo de material de parede. Estudos realizados por Tonon e colaboradores (2011) e Soottitantawat e colaboradores (2005), mostraram que a combinação e utilização de vários materiais de parede no preparo das emulsões além de favorecer o aumento da concentração destes em relação às quantidades de material de núcleo determinam também a eficiência de encapsulação. As condições de secagem também é um parâmetro importante para a obtenção das micropartículas. Fernandes e colaboradores (2008), verificaram que temperaturas a partir de 160 °C são as mais indicadas para os processos de obtenção de materiais secos por pulverização.

Com intuito de melhorar a eficiência e os rendimentos de material encapsulado, novas emulsões aquosas foram preparadas a partir da combinação de material de parede empregando desta vez 3 g de galactomanana e 5 g de maltodextrina totalizando (8 g) e aumentando a quantidade de material de núcleo para 2 g estabelecendo a proporção entre esses materiais em 4:1. O material de parede escolhido (maltodextrina) para combinação com a galactomanana deveu-se às suas características de boa solubilidade em água, baixa viscosidade em altas concentrações, estabilidade na emulsão, baixa higroscopicidade. Em combinação esses dois materiais de parede favoreceram uma melhor proteção ao produto encapsulado, gerando microcápsulas com estruturas mais esféricas, definidas e não aglomeradas (Figura 31)

A goma arábica que é constituída de polissacarídeos naturais entre eles a D-galactose, L-arabinose, L-ramnose também foi utilizada em diferentes concentrações 25% e 50% m/v para reter substâncias voláteis, como timol, através de atomização para aplicação na indústria alimentícia (VAIDYA *et al*, 2006). A razão de material de parede de 4:1 também foi utilizada por Carneiro e colaboradores (2013) com o objetivo de avaliar o potencial da combinação de maltodextrina com diferentes materiais de parede na microencapsulação do óleo de linhaça através de secagem por pulverização, a fim de maximizar a eficiência de encapsulação e minimizar a oxidação de lípidos.

Figura 31 - Fotomicrografias da morfologia externa dos bioprodutos produzidos após encapsulação. Concentração galactomanana/material de núcleo (4:1). LCC natural (A), cardanol (B), cardol (C), LCC técnico (D)



Fonte: Elaborado pela autora

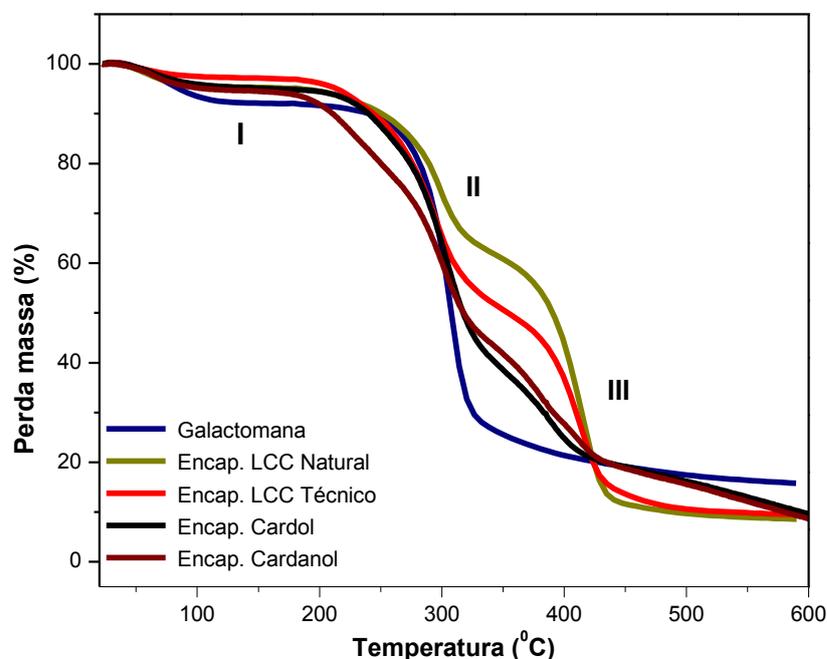
Após a combinação de material de parede o diâmetro médio de todas as microesferas obtidas após os processos de atomização LCC natural (Figura 31A), cardanol (Figura 31B), cardol (Figura 31C), LCC técnico (Figura 31D), variou na ordem de (1,68 mm a 4,75 mm), (2,33 mm a 5,03 mm), (1,54 mm a 4,50 mm) e (1,35 mm a 4,28 mm) respectivamente e estes tamanhos são característicos de microesferas típicas da secagem por atomização (TONON *et al.*, 2011). De acordo com García (2013), o aumento da viscosidade das emulsões, que ocorre pela adição de agentes espessantes, melhora a retenção da fase aquosa em óleo. Este melhoramento reduz a velocidade de sedimentação das partículas, resultando em uma melhor estabilização e evitando a coalescência permitindo assim, uma melhor formação de pó.

6.5.2. Termogravimetria

As análises termogravimétricas foram realizadas com o objetivo de estudar o padrão de decomposição e a estabilidade térmica. As curvas termogravimétricas e as DTG da galactomanana e dos bioprodutos LCC natural, LCC técnico, cardol e cardanol estão apresentados nas Figura 32 e Figura 33, respectivamente.

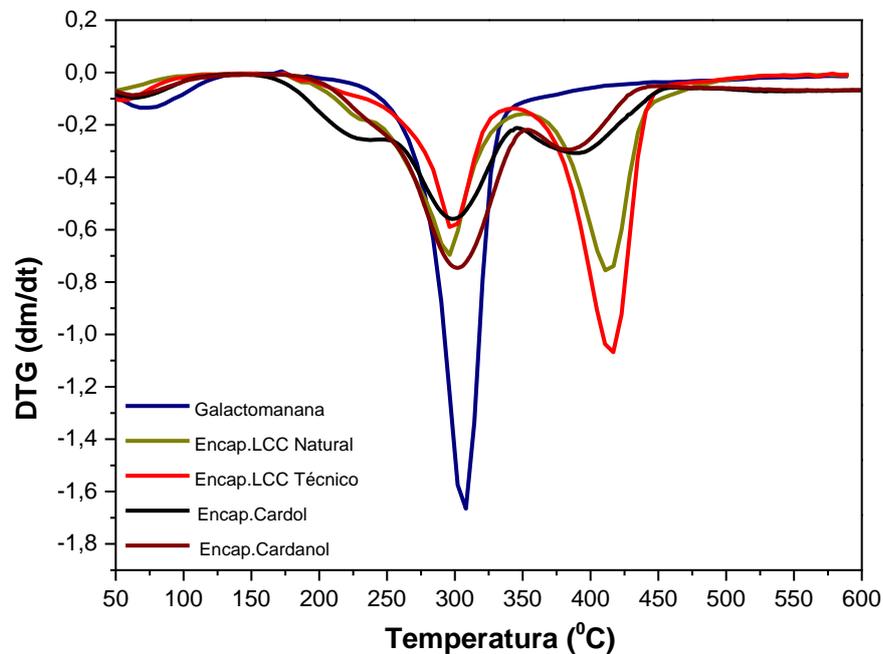
Todas as amostras apresentaram um evento inicial, evento (I), de perda de massa variando entre 8 a 12% no intervalo de temperatura de (135-150 °C). correspondente à perda de umidade absorvida pela galactomanana e bioprodutos. Resultados de perda de massa entre 10 a 16% e 11 a 14 % correspondente a absorção de água em galactomananas de sementes leguminosas, também foi observado para as espécies *Prosopis pallida*, *Mimosa scabrella* e goma guar investigadas por Chaires-martínez e colaboradores (2008), Vendruscolo e colaboradores (2009) e Cunha e colaboradores (2009) respectivamente.

Figura 32 - Curvas de TG dos bioprodutos estudados.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 33 - DTG da galactomanana e dos bioprodutos a 10 °C/min em atmosfera inerte de N₂.



Fonte: Elaborado pela autora

A curva de estabilidade térmica da galactomanana para o (evento II), (Figura 32), mostra a perda de massa ocorrendo no intervalo de temperatura entre 226-320 °C e sua curva diferencial, DTG, observada na Figura 33 apresentou máxima variação de massa a 312 °C relativa à temperatura de degradação total da galactomanana. A quantidade final de cinzas observada em 600 °C foi de 15,77%. Os resultados termogravimétricos para a galactomanana de *Adenantha pavonina* L. estão coerentes com os obtidos por Macêdo e colaboradores (2010).

Para os bioprodutos encapsulados, foram observados mais dois eventos térmicos, considerados eventos (II e III) (Figura 32) e DTG (Figura 33), resultantes da perda de massa correspondente à decomposição destes. Os processos térmicos mostraram perdas de massa em intervalos de temperatura que variou entre 210 – 340 °C para o segundo evento e 330 – 533 °C para o terceiro evento correspondendo à decomposição final dos bioprodutos. O conteúdo final de cinzas variou entre 8,58 – 9,63% também observados na temperatura de 600 °C. Os

parâmetros termogravimétricos observados para a Galactomanana e os bioprodutos estão ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros de estabilidade térmica das amostras estudadas.

| Amostras | T (°C) nos eventos | | | Umidade (%) | Resíduos (%) em 600 °C |
|----------------------|--------------------|---------|---------|-------------|------------------------|
| | I | II | III | | |
| Galactomanana | 135 | 226-328 | ----- | 11,76 | 15,77 |
| LCC natural | 142 | 238-327 | 359-441 | 10,36 | 8,56 |
| LCC técnico | 149 | 217-330 | 379- | 9,75 | 9,44 |
| Cardol | 445 150 | 218-333 | 330- | 8,5 | 9,63 |
| Cardanol | 533 150 | 209-335 | 344- | 8,0 | 8,58 |
| | 511 | | | | |

Fonte: Elaborado pela autora

Os resultados obtidos sugerem que os bioprodutos encapsulados, embora com maior perda de massa global, mostraram uma melhor estabilidade térmica de decomposição em relação ao agente encapsulante (galactomanana).

Microesferas obtidas de galactomananas de sementes da espécie *Delonix regia* e a avaliação do seu potencial como encapsulante do ácido L-ascórbico (AA) através de atomização foram investigados por Souza e colaboradores (2015). A análise de TGA das microesferas obtidas nesses experimentos apresentou um comportamento térmico compatível com os bioprodutos aqui estudados mostrando diferenças na estabilidade térmica da galactomanana após o encapsulamento com o ácido ascórbico (AA).

6.5.3. Dinamic Light Scatering - DLS e Potencial Zeta

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma técnica utilizada para medição do raio hidrodinâmico de partículas baseada no movimento Browniano. Pela relação entre a velocidade de movimentação da partícula e a intensidade e mudança de frequência da luz espalhada (efeito Doppler) é possível mensurar tanto o raio quanto a distribuição estatística das partículas (BERNE; PECORA, 2000). O aumento dos raios das partículas em solução observados para a galactomanana (82,90 d.nm) em comparação aos raios dos bioprodutos com adição dos compostos fenólicos LCC natural (237,5 d.nm), LCC técnico (264,2 d nm), cardanol (195,86 d.nm), cardol (198,42 d.nm) se justifica pela adição destes após a encapsulação – Tabela 4.

Tabela 4 - Valores obtidos do tamanho de partícula e Potencial Zeta dos bioprodutos e galactomanana.

| Amostras | Raio da partícula (d.nm) | PDI | Potencial Zeta (mV) |
|-----------------------|--------------------------|-------|---------------------|
| Galactomananab | 82,90±0,77 | 0,419 | -13,0±5,66 |
| Cardol | 198,42±0.85 | 0,435 | -31,6±4,75 |
| Cardanol | 195,86±1,9 | 0,420 | -32,9±5,25 |
| LCC natural | 237,5±2,3 | 0,420 | -39,8±5,58 |
| LCC técnico | 264,2±2,55 | 0,337 | -33,6±4,80 |

Fonte: Elaborado pela autora

A polidispersão, ou índice de polidispersividade, indica a distribuição média do tamanho das nanopartículas em uma solução. Os valores de polidispersividade PI observados (média de 0,337 a 0,453) para os compostos estudados mostraram uma homogeneidade. Estes valores são desejados para manter a estabilidade da dispersão coloidal sem a formação de micropartículas ou precipitados. As dispersões coloidais preparadas não apresentaram precipitados mesmo após um mês de armazenamento.

O potencial zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, e é um dos parâmetros fundamentais que, afetam a estabilidade de soluções. Quanto maior o potencial zeta (valor medido

em módulo) mais provável que a suspensão seja estável pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera as forças de van der Waals, as quais promovem agregação (Zeta Potential Using Laser Doppler Electrophoresis).

Sabe-se que o pH influencia nas interações entre as partículas coagulantes e a água na formação de espécies hidrolisadas. No presente estudo não ocorreu verificação do pH, porém todas as medidas do Potencial Zeta foram realizadas utilizando suspensões diluídas em água ultrapura, na proporção 1:10, e portanto, contendo baixos teores de analito na solução que pudessem interferir na análise. O potencial zeta observado para a suspensão contendo apenas a galactomanana foi medido em $|-13 \text{ mV}|$. Os valores de potencial zeta observados para os bioprodutos tiveram um aumento significativo e variou, em módulo, de 31,6 a 39,8 mV e de acordo com a literatura (HU *et al.*, 2005; HAYATI, *et al.*, 2009, DICKINSON, 2003; DESPLANQUES *et al.*, 2012) estes valores demonstram que ocorreu uma estabilidade das partículas em solução proporcionada pelo aumento das cargas negativas formadas sobre suas superfícies resultando no aumento das forças repulsivas o que evitou a sua aglomeração.

Partículas coloidais com cargas de mesma natureza (+/-) tendem a repelir-se entre si impedindo a aproximação entre as mesmas por conta das forças de repulsão e quanto maior o tamanho ou volume hidrodinâmico das micelas suspensas, maior o efeito da repulsão fazendo com que permaneçam afastadas estabilizando a sua homogeneização na suspensão ou no meio.

Os valores de potencial zeta (Tabela 4) mostraram que os polímeros de longas cadeias (galactomanana) sem a adição dos componentes fenólicos são estruturas de menor tamanho diâmetro de partícula (DP) de 82,90 d.nm favoreceu a coalescência, resultante também da contribuição da atração da sua carga superficial de natureza oposta às cargas entre as partículas do meio favorecendo a aproximação dessas partículas e sua aglomeração. O aumento das cargas na superfície das partículas com a adição dos produtos oleosos influenciou no potencial zeta aumentando a repulsão entre as partículas e evitando a coalescência ajudando desta forma, na manutenção destas em solução estabilizando o sistema.

6.5.4. Estudo cinético da liberação dos bioprodutos em meio aquoso.

A Tabela 5 apresenta as taxas (mg/mL) de liberação *in vitro*, em função do tempo, dos materiais de núcleo LCC natural, LCC técnico e cardol a partir dos produtos encapsulados e a Figura 34 expressa essas taxas através da quantidade liberada em (%). Todos os bioprodutos analisados LCC natural, LCC técnico e cardol, mostraram perfis de liberação semelhantes nos intervalos de tempo estudados com 52,75%, 46,4%, 53,25% no T₀, 92,75%, 80,5%, 82,5% e 95,5%, 81,25%, 83,5% respectivamente para os tempos T₃₀ e T₆₀.

Tabela 5 - Resultados obtidos no estudo cinético e Eficiência de Encapsulamento (EE) para os bioprodutos.

| Tempo (em min) de liberação do óleo | LCC natural Quant. em mg/mL | LCC técnico Quant. em mg/mL | Cardol Quant. em mg/mL |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| T ₀ | 0,211 (±0,001) | 0,371(±0,004) | 0,213 (±0,004) |
| T ₁₀ | 0,301 (±0,001) | 0,631 (±0,003) | 0,312 (±0,001) |
| T ₂₀ | 0,352 (±0,001) | 0,640 (±0,002) | 0,323 (±0,001) |
| T ₃₀ | 0,371 (±0,002) | 0,644 (±0,002) | 0,330 (±0,002) |
| T₆₀ | 0,382 (±0,002) | 0,650 (±0,002) | 0,334 (±0,002) |
| EE (%) | 95,5 | 81.25 | 83,5 |

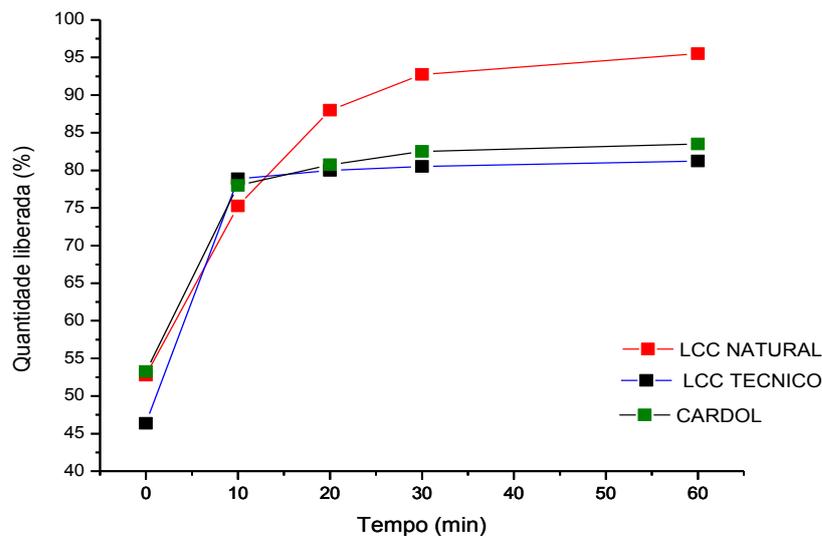
Fonte: Elaborado pela autora

Uma vez que as condições experimentais como temperatura, concentração dos compostos encapsulados e pH do meio foram mantidas constantes, pôde-se afirmar que o principal mecanismo envolvido na liberação dos materiais de núcleos LCC natural, LCC técnico e cardol, para o meio externo deve-se às características de solubilidade em meio aquoso do material encapsulante influenciando desta forma numa rápida liberação logo nos primeiros tempos de análise. Os perfis de liberação dos componentes ativos com percentuais acima de 80% e estabilidade após uma hora (tempo T₆₀) são satisfatórios para a aplicação larvicida destes bioprodutos nos ensaios de liberação *in vivo*.

Biopolímeros tais como a quitosana, amido, celulose, dextrano, alginato, carboidratos são os materiais de encapsulamento com maior interesse para aplicações como cosméticos, inseticidas, sistemas de liberação de drogas, indústria alimentícia e farmacêutica (CASANOVA; ESTEVINHO; SANTOS, 2016; PRAJATAPI

et al., 2013; BHATIA; GUPTA; SONI, 2014). E entre estes biopolímeros, as galactomananas são as que apresentam um grande potencial para a utilização em sistemas de liberação controlada em meio aquoso por conta de suas propriedades de solubilidade além de formar emulsões estáveis.

Figura 34 – Gráfico da comparação dos perfis de liberação em água dos bioprodutos LCC natural, LCC técnico e Cardol.



Fonte: Elaborado pela autora

Oliveira e colaboradores (2014), preparou nanopartículas contendo a combinação dos biopolímeros alginato (ALG) e goma do cajueiro (GC) atuando como material de parede encapsulando o óleo essencial *Lippia sidoides* visando o emprego destas nanopartículas como larvicidas para combate do *Aedes aegypti*. Também foi realizado o estudo através dos perfis de cinética de liberação de óleo *in vitro* para as diferentes proporções ALG:CG utilizadas e estes perfis foram mais rápidos quando ocorreu o aumento da quantidade de goma de cajueiro na proporção ALG:CG 1:1 para ALG:CG 1:3.

Esta diferença na velocidade de liberação deve-se ao maior caráter hidrofílico característico da goma de cajueiro quando comparado ao do alginato maximizando desta forma a dissolução do material de parede em solução. Além disso, o perfil de liberação de óleo revelou que a utilização de alginato em sinergia com a goma de caju para encapsulamento óleo *Lippia sidoides* apresentou-se como

um sistema de entrega potencial com taxas de liberação sob medida e Eficiência de Encapsulamento acima de 55%.

Os perfis de liberação dos núcleos através da dissolução do material de parede podem também ser justificados pelas propriedades das micropartículas obtidas que foi do tipo matricial (microesferas propriamente ditas) e não microcápsulas ou sistemas reservatório onde o núcleo é mantido internamente até o momento da liberação. As cápsulas produzidas por atomização são geralmente do tipo matricial, com o núcleo distribuído na forma de micropartículas na matriz seca do material encapsulante o que permite o contato direto com o solvente, neste caso a água, facilitando desta forma uma melhor dissolução e liberação (FRASCARELI *et al.*, 2012).

As micrografias eletrônicas das microesferas obtidas exibiram estruturas mais esféricas, menos porosa e mais lisas comparadas às microesferas antes da adição do material de núcleo e tais modificações sugerem que ocorreu a incorporação ou retenção do material de núcleo na matriz polimérica.

Apesar do encapsulamento ser uma técnica importante para a avaliação dos processos de liberação controlada do núcleo, outros fatores como melhorar o manuseio da amostra, preservar as características do núcleo e reduzir as interações deste com fatores ambientais externos bem como melhorar a solubilidade de substâncias hidrofóbicas foram aqui consideradas.

A partir dos estudos de liberação, a Eficiência de Encapsulamento (EE) – (Equação 3 – Pag.55) foi calculada através da razão entre a Quantidade de Óleo Determinada (QOD) nos ensaios de liberação pela Quantidade de Óleo Adicionada (QOA) à emulsão de origem a qual mostrou como melhor proporção de encapsulamento a razão 4:1 material de parede: material de núcleo respectivamente.

Os resultados de EE (%) obtidos para o LCC natural 95,5%, LCC técnico 81,25% e Cardol 83,5% - Tabela 5, mostraram que a proporção utilizando 20% do material de núcleo e 80% do material de parede foi satisfatória levando a uma boa retenção de óleo na matriz polimérica. Sabe-se que a eficiência de retenção dos materiais de núcleo durante os processos de formação das microesferas está diretamente ligada à estabilidade das emulsões de secagem, à proporção e interação com o material de parede e à combinação entre estes. Quanto maior o conteúdo de sólidos maior será a eficiência de retenção e encapsulamento (KAUR;

SHARMA; GULERI, 2013). Os resultados obtidos são de grande importância para aplicação proposta neste trabalho que é ação destas bioprodutos como agentes larvicidas e ovicidas no combate ao *Aedes aegypti*.

6.6. Ensaios de laboratório da atividade larvicida sobre o *Aedes aegypti* (antes da encapsulação).

Na busca por controle químico alternativo contra o *Aedes aegypti*, muitas pesquisas são desenvolvidas no intuito de se descobrir novas substâncias de origem vegetal com atividade pesticida (inseticida ou larvicida). O potencial de ação exercido pelas biomoléculas no controle de vetores de doenças endêmicas é justificado pela complexidade de sua composição química, pela diminuição do desenvolvimento da evolução da resistência por parte dos insetos, por serem biodegradáveis, pelos mínimos efeitos colaterais sobre organismos não-alvo, bem como menor toxicidade para o meio ambiente (LOPEZ *et al.*, 2005); (BENELLI *et al.*, 2013); (PAVELA, 2014) e (KHAN *et al.*, 2016).

Entre estas plantas, a família Anacardiaceae, em especial as espécies *Pistacia terebinthus* L. (CETIN; YANIKOGLU; CILEK, 2011), *Spondias purpurea* L. (LIMA *et al.*, 2011), se destacaram pelas atividades biológicas de seus extratos e metabólitos como larvicidas contra o *Aedes aegypti*. Estudos realizados por Lomonaco e colaboradores (2009) demonstraram que o LCC técnico e seus derivados, substâncias pertencentes à espécie *Anacardium occidentale* L., também se mostraram ativos para atuarem como agentes larvicidas contra o *Aedes aegypti*.

Considerando estes resultados, e com base nas características fenólicas do LCC natural, LCC técnico e os constituintes (cardol, cardanol), no presente estudo foi avaliada a atividade larvicida antes e após encapsulação em galactomanana. Os resultados obtidos nos ensaios larvicidas estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6 - CL₅₀ para o LCC e seus derivados antes da encapsulação.

| Produto | CL₅₀ (ppm) |
|----------------------------|------------------------------|
| LCC técnico | 57,28 ± 0,53 |
| LCC natural | 15,00 ± 0,11 |
| Cardol insaturado | 9,93 ± 0,13 |
| Cardanol insaturado | 22,10 ± 0,05 |

Fonte: Elaborado pela autora

Através da Tabela 6 pôde-se observar as CL₅₀ ideais para causar efeito tóxico sobre as larvas do *Aedes aegypti*. A avaliação da atividade larvicida exercida pelos produtos estudados mostrou bons resultados na faixa de concentração entre (0,1% a 1,0% m/v) correspondente às concentrações, (CL₅₀), de 10 a 100 ppm. Nenhum dos produtos apresentou atividade tóxica sobre as larvas em concentrações abaixo de 10 ppm.

A atividade tóxica para o bioproduto LCC natural com concentração CL₅₀ = 15,00 ppm, foi maior que o observado para o LCC técnico CL₅₀ = 57,28 ppm para um mesmo número de larvas estudadas. Ambos LCC natural e LCC técnico possuem os mesmos constituintes lipídicos diferenciando-se apenas no grau de composição (%). Porém, o melhor efeito observado, pode ser justificado pela presença do ácido anacárdico, componente majoritário do LCC natural, bastante estudado e conhecido pelas suas propriedades antisséptica, antibactericida e vermífugida (MAZZETTO; LOMONACO; MELLE, 2009).

As atividades antioxidante e larvicida do LCC natural e seus constituintes também foram estudadas por Oliveira e colaboradores (2011), onde demonstrou em seus experimentos o constituinte ácido anacárdico (CL₅₀ = 12,40 ppm), seguido de cardol (CL₅₀ = 10,22) ppm e cardanol (CL₅₀ = 14,45) ppm como agentes no controle do *Aedes aegypti*. Os resultados aqui alcançados mostraram-se compatíveis e dentro do mesmo intervalo de concentração letal.

Com o objetivo de diminuir a resistência por parte dos mosquitos e poder contribuir com novos mecanismos de ação eficiente sobre as larvas, os bioprodutos aqui sintetizados mostraram-se bastante satisfatórios e com concentrações letais CL₅₀ abaixo de 100 ppm. Estes valores de concentração estão de acordo com os

índices preconizados pela OMS como sendo satisfatórios para o uso em água potável e consumo (WHO, 2006).

6.6.1 Ensaios de laboratório da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* (após encapsulação)

Ensaios de laboratório para a avaliação da atividade larvicida dos bioprodutos (cardanol, cardol, LCC natural, LCC técnico), após encapsulação, também foram realizados no NUVET. A faixa de concentração variou entre (10, 20, 40, 80, 100 ppm) e (200, 400, 800, 1000 ppm) a fim de se estabelecer as concentrações letais (CL₅₀) ideais para causar mortalidade ou toxicidade à metade das larvas expostas aos bioprodutos.

A leitura de mortalidade das larvas foi realizada em intervalos de 24, 48 e 72 horas, período preciso para a observação da liberação e atividade tóxica dos bioprodutos. Os dados obtidos estão dados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados de mortalidade de larvas e CL₅₀ obtidos nos ensaios de laboratório para os bioprodutos encapsulados.

| Bioprodutos | Nº. de larvas mortas | | | Nº. de larvas mortas | | | | CL ₅₀ |
|---------------------------|----------------------|----|-----|----------------------|-----|-----|------|------------------|
| | 07 | 08 | 12 | 16 | 20 | 27 | 30 | |
| LCC Natural | 07 | 08 | 12 | 16 | 20 | 27 | 30 | 197,5 |
| LCC técnico | 04 | 06 | 10 | 12 | 16 | 21 | 26 | 282,1 |
| Cardol | 06 | 06 | 11 | 14 | 18 | 23 | 27 | 219,9 |
| Cardanol | 03 | 08 | 09 | 11 | 15 | 19 | 25 | 316,8 |
| Concentração (ppm) | 40 | 80 | 100 | 200 | 400 | 800 | 1000 | |

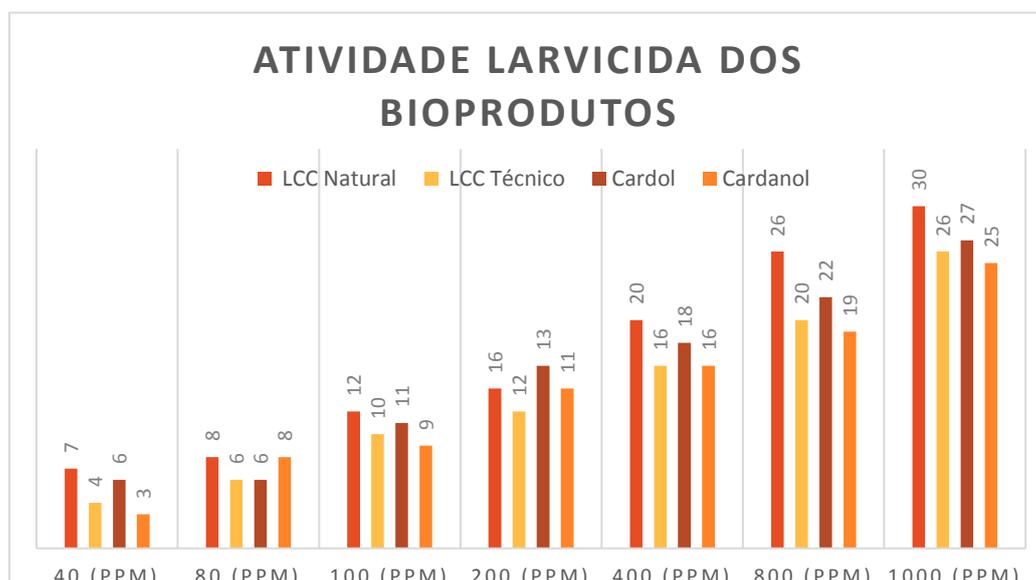
Fonte: Elaborado pela autora

A Tabela 7 apresenta os resultados do número de larvas mortas após exposição aos bioprodutos encapsulados. Os mesmos resultados obtidos em análise percentual mostraram-se acima de 35% a partir da concentração de 200 ppm para todos os bioprodutos estudados. Não foi observada mortalidade efetiva nas concentrações abaixo de 100 ppm. Através dos resultados da eficiência de encapsulamento (Tabela 5), foi possível calcular o % de material de núcleo contido

no interior das microesferas e para o composto LCC natural esse valor foi de (19,1%), cardol (16,7%) e para o LCC Técnico (16,25%) todos menores do que o percentual de 20% teoricamente calculado. A partir de 200 ppm têm-se o equivalente a (38,2 - 32,5 - 33,4 ppm) de cada material de núcleo respectivamente. A partir da Tabela 6 observa-se que o intervalo das concentrações (CL₅₀) antes do encapsulamento ocorreu entre 57,28 ppm para o LCC técnico, 22,10 ppm para o cardanol, 15,00 ppm para o LCC natural e 9,93 ppm para o cardol o que justificou a maior mortalidade observada a partir de 200 ppm. Os resultados de mortalidade das larvas foram maiores para os bioprodutos LCC natural e cardol seguidos dos bioprodutos LCC técnico e cardanol com percentuais % de mortalidade entre (52 e 40) - (44 e 48%) e (65 e 51) - (51 - 59%) observado para as concentrações 200 e 400 ppm respectivamente.

Ensaio de controle foram feitos apenas com galactomanana e maltodrexina mantendo as mesmas concentrações não ocorrendo nenhuma mortalidade de larvas. Sabe-se que a atividade larvívica de materiais encapsulados está associada à sua capacidade de liberação a partir do material de parede e à sua solubilidade no meio aquoso. Os resultados avaliados no estudo cinético de liberação controlada são coerentes com os resultados de mortalidade obtidos para os bioprodutos confirmando desta forma que a boa atividade larvívica deveu-se à boa solubilidade dos produtos encapsulados no meio aquoso.

Figura 35 - Gráfico do número de larvas mortas após a ação larvívica dos bioprodutos.



Fonte: Elaborado pela autora

Ensaio de controle positivo, nas mesmas condições, também foram realizados com o composto pyriproxyfen que é o IGR atualmente utilizado pela Secretaria de Saúde nas campanhas de controle e combate a dengue no país. Por ser um regulador de crescimento, análogo ao hormônio juvenil, sua ação é mais eficaz sobre as pupas impedindo-as que se tornem adultas (KHAN *et al*, 2016; SOIN *et al.*, 2010). Desta forma, os melhores resultados só foram obtidos após 72 h com mortalidade das larvas de 37% observada na concentração de 400 ppm, 50% para 800 ppm e mortalidade máxima de 71% para 1000 ppm. A CL₅₀ obtida foi de 511 ppm.

Após 5 dias, observou-se mortalidade acima de 80% em todos os testes com os bioprodutos, confirmando a atividade larvicida aqui proposta e tornando estes novos bioprodutos uma alternativa para o controle de larvas do *Aedes aegypti*.

6.6.2. Ensaio simulado de campo da atividade larvicida dos produtos encapsulados

Os ensaios simulados de campo sem a troca de água mostraram um alto percentual (%) de mortalidade para as larvas dos recipientes contendo os bioprodutos cardol (85%), LCC natural (100%), cardanol (65%) e mortalidade de (37.5%) para o LCC técnico (Tabela 8). Após a aplicação dos bioprodutos observou-se que durante os primeiros 5 dias as larvas não alcançaram o estágio de pupa, o que seria esperado considerando o ciclo natural de crescimento para larvas em 3º estágio. Após uma semana, pôde-se observar o maior número de larvas vivas apenas nos ensaios dos recipientes contendo o LCC técnico (média de 25 larvas) e mortalidade 100% para o LCC natural, resultados estes também observados nos ensaios de laboratório para ambos os bioprodutos.

Não houve emergência de pupas em nenhum dos recipientes expostos aos bioprodutos (Tabela 8), o que seria esperado acontecer considerando o ciclo natural de crescimento para larvas em 3º estágio e estes resultados confirmaram de fato a eficiente atividade larvicida dos bioprodutos.

Tabela 8 - Resultados da avaliação da atividade larvicida dos bioprodutos nos ensaios realizados *sem troca* de água.

| Produtos (200 mg/Litro) | Ocorrência de pupas (após 8 dias) | Mortalidade das larvas (após 8 dias) |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| LCC natural | <i>Sem pupas</i> | 100% (40) |
| LCC técnico | <i>Sem pupas</i> | 37.5% (13-15) |
| Cardanol | <i>Sem pupas</i> | 65% (20-26) |
| Cardol | <i>Sem pupas</i> | 85% (32-34) |
| CONTROLE | | |
| <i>Galactomanana + Maltodrextina</i> | 87.5% (35 pupas) após 4 dias | 0% |
| <i>Pyriproxyfen 0,5G (Sumilarv® 0,5 G)</i> | 30% (12 pupas) após 4 dias | 0% |

Fonte: Elaborado pela autora.

Os ensaios com substituição de água foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito da atividade residual dos bioprodutos em solução e a sua ação larvicida quando em menores concentrações. Desta forma, após 3 dias da adição dos bioprodutos, 5 L (25% do volume total) foram removidos de cada recipiente e a mesma quantidade de água (retirada do abastecimento público) foi readicionada.

A partir do momento da troca das águas nos recipientes, a avaliação da atividade larvicida e a contagem de larvas foram verificadas em períodos de 24 h, durante 5 dias. Observou-se alteração da atividade larvicida em todos os ensaios. Para o cardol, o % de mortalidade decresceu de 85% para 10%, para o LCC natural de 100% para 72,5%, para o cardanol de 65% para 5% e nenhuma mortalidade (0%) para o LCC técnico (Tabela 9). Os resultados obtidos mostraram que a diminuição da concentração ou a ação da atividade residual dos bioprodutos em solução resultou em um menor índice de mortalidade das larvas bem como favoreceu o crescimento das larvas permitindo o seu desenvolvimento para o estágio de pupa.

Porém, mesmo com a emergência de pupas, nenhuma se desenvolveu para a fase alada. Nos ensaios realizados com os controles negativo galactomanana + maltodrextina e com o controle positivo Pyriproxyfen 0,5G a verificação da quantidade de pupas (35) e (12) respectivamente, após 4 dias, proporcionou o

desenvolvimento normal da metamorfose das larvas confirmando desta forma a ação larvicida bioprodutos.

A atividade inibidora de crescimento sobre as pupas geradas comprova a ação dos bioprodutos como inibidores do crescimento já que influenciou no desenvolvimento da metamorfose normal do mosquito.

Tabela 9 - Resultados da avaliação da atividade larvicida dos bioprodutos nos ensaios realizados *com troca* de água.

| Produtos (200 mg/Litro) | Ocorrência de pupas (após 8 dias) | Mortalidade das larvas (após 8 dias) |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| LCC natural | 5% (2 pupas) | 72.5% (29) |
| LCC técnico | 30% (12 pupas) | 0% |
| Cardanol | 5% (5 pupas) | 5% (1-2) |
| Cardol | 7.5% (3 pupas) | 10% (3-5) |
| CONTROLE | | |
| <i>Galactomanana + maltodrextina</i> | 87.5% (35 pupas) após 4 dias | 0% |
| <i>Pyriproxyfen 0,5G (Sumilarv® 0,5 G)</i> | 30% (12 pupas) após 4 dias | 0% |

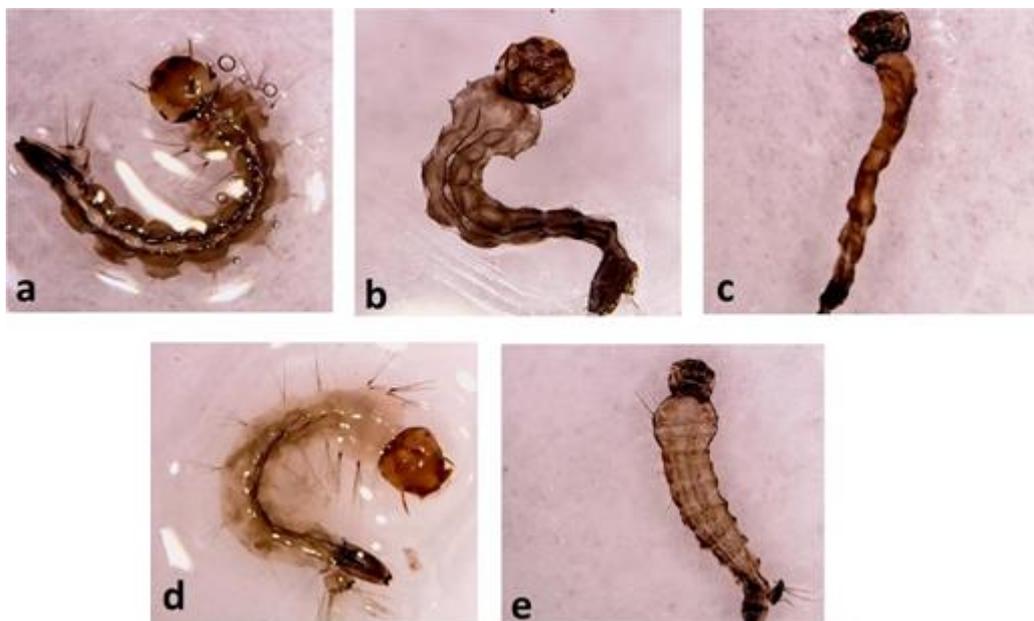
Fonte: Elaborado pela autora

A análise da morfologia externa das larvas resultantes dos ensaios sem troca de água foi realizada com o objetivo de verificar a ação ativa dos bioprodutos sobre estas. Após serem retiradas dos recipientes de origem, as larvas mortas foram cuidadosamente dispostas em lâminas de vidro, identificadas e levadas para leitura em um microscópio (Microscope micrometer 300X). As fotos obtidas estão representadas na Figura 36.

A Figura 36a apresenta a morfologia externa das larvas expostas ao grupo controle (galactomanana + maltodrextina). Através da figura, é possível perceber que ocorreu preservação da estrutura da larva que é dividida em: cabeça, torác e abdômen subdividido em 8 segmentos não sendo observada nenhuma alteração ou danificação.

Para as larvas expostas à ação dos bioprodutos, após 8 dias, todas mostraram alterações nas suas estruturas externas. As principais foram: perda de cerdas, redução na espessura do exoesqueleto observado principalmente para as larvas expostas ao bioproduto LCC natural (Figura 36c), destruição corporal interna para as larvas expostas ao bioprodutos cardanol (Figura 36b), cardol (Figura 36d) e LCC técnico (Figura 36e) e inchaço do tórax observados em todas as larvas.

Figura 36 - Fotos de larvas do 3º estágio do *Aedes aegypti* após a ação dos bioprodutos: Controle (a), cardanol (b); LCC natural (c); cardol (d) e LCC técnico (e).



Fonte: Elaborado pela autora

Os resultados obtidos a partir da análise morfológica externa mostram que a exposição aos bioprodutos influenciou diretamente na modificação da estrutura das larvas (como a perda de cerdas importantes na captação de oxigênio para a sobrevivência), perda da estrutura interna dos segmentos do abdômem, perda de quitina (estrutura importante para a mudança de fase) e deformação corporal são algumas das modificações que conseqüentemente culminaram para a morte das larvas.

As concentrações utilizadas para causar mortalidade nas larvas estão de acordo com os índices preconizados pela OMS como sendo satisfatórios podendo estes bioprodutos encapsulados serem utilizados com potencial biolarvicidas frente às larvas do *Aedes aegypti*.

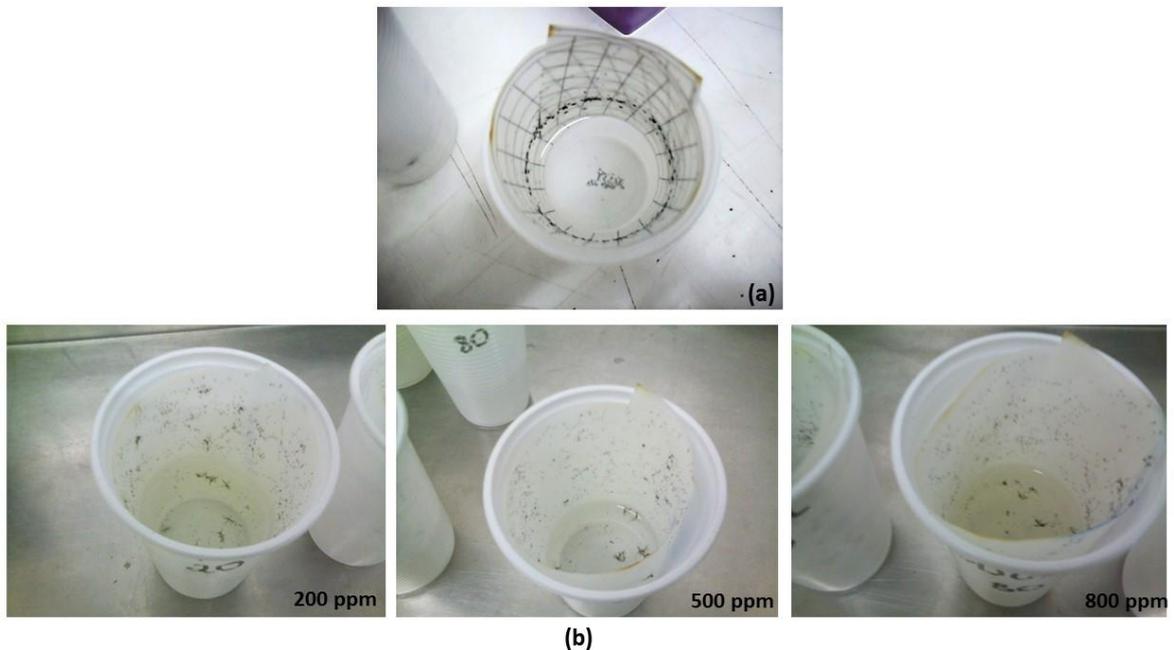
6.6.3 Ensaio da atividade de oviposição

A escolha dos locais de oviposição pelas fêmeas do *Aedes aegypti* envolve a presença de características como sabores e odores que são frequentemente induzidos pelos metabólitos secundários de espécies vegetais, como por exemplo, compostos fenólicos mistos que executam papéis de defesa e proteção à planta (CROTEA; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Outros fatores que influenciam a oviposição estão associados às características visuais como cor e tamanho do recipiente, cor da água e características térmicas (HARRINGTON *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2014; MOHAMAD; ZUHARAH, 2014).

As fêmeas sempre avaliam os locais de postura sendo os mais favoráveis para atrair e estimular a oviposição aqueles que possuem maior superfície e volume de água e presença de nutrientes. O conhecimento dos tipos de locais de oviposição é de fundamental importância para um combate efetivo e controle do desenvolvimento de populações do vetor (OBENAUER; ALLAN; KAUFMAN, 2010; ZETTEL *et al.*, 2013).

Em nossos estudos, após 24 h da alimentação sanguínea, as cartelas (iscas) de oviposição foram colocadas na gaiola de criação e a atividade de oviposição foi observada durante 4 dias. Ocorreu oviposição em todas as iscas, porém a maior quantidade de ovos postos foi observada nas cartelas das iscas controle (solução aquosa 10% de galactomanana + maltodrextina) – (Figura 37a) comparada às quantidades postas nas iscas tratadas com os bioprodutos – (Figura 37b).

Figura 37 - Fotos após a oviposição: isca controle (galactomanana + maltodrextina) (a) e iscas contendo os bioprodutos nas concentrações avaliadas (b).



Fonte: Elaborado pela autora

A Tabela 10 apresenta a quantidade de ovos depositados e contados em cada quadrante escolhido. A cartela controle (galactomanana + maltodrextina) foi utilizada como referência de comparação de oviposição. Selecionou-se uma média de 600 ovos desta cartela e observou-se que a quantidade de oviposição nas demais decresceu com o aumento das concentrações dos bioprodutos principalmente observado para 500 e 800 ppm. Os bioprodutos que apresentaram os maiores valores de Eficiência de Repelência (E.R), foram o LCC natural (45 e 66,6%) e cardol (36,3 e 56,6%) resultado que confirma a atividade mais nociva e tóxica destes como observado anteriormente nos ensaios larvicidas.

Tabela 10 - Ensaio de atividade de oviposição os para os bioprodutos em função das concentrações e E.R (Eficiência de Repelência).

| Bioprodutos | Concentração (ppm) | Número médio de ovos | E.R (%) |
|----------------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------|---------|
| LCC natural | 200 | 500 | 16,6 |
| | 500 | 330 | 45,0 |
| | 800 | 200 | 66,6 |
| LCC técnico | 200 | 540 | 10,0 |
| | 500 | 500 | 16,6 |
| | 800 | 350 | 41,6 |
| Cardanol | 200 | 500 | 16,6 |
| | 500 | 440 | 26,6 |
| | 800 | 320 | 46,6 |
| Cardol | 200 | 500 | 16,6 |
| | 500 | 380 | 36,6 |
| | 800 | 260 | 56,6 |
| Controle (galactomanana + maltodextrina) | | Oviposição normal 600 ovos em média | |

Fonte: Elaborado pela autora.

Sabe-se que os compostos fenólicos estudados se situam na castanha do caju e tem como características odor forte, são cáusticos e vesicantes. Esses fenóis exercem a função de proteger a amêndoa de predadores e insetos bem como preservar o seu poder germinativo (LIMA, 1988). Uma vez que os fatores visuais (tamanho e cor das iscas), temperatura ambiente e umidade foram mantidos sob as mesmas condições, e com base nas características acima mencionadas, entende-se que os fenóis da espécie *Anacardium occidentale*, exerceram uma efetiva ação positiva para deter (repelir) a oviposição, no entanto, os modos de ação destes fenóis ainda não estão totalmente compreendidos, mas diante os bons resultados obtidos, estes bioprodutos podem vir a serem usados para prevenir e combater insetos vetores.

Compostos derivados de espécies da Família Anacardiaceae, *Gluta rengas* e *Melanochyla fasciculiflora* apresentaram atividade de repelir a oviposição e também ovicida (WAN FATMA; ALI YOUSAF, 2015b). Elango e colaboradores da

mesma forma mostraram dupla propriedade de oviposição e ovicida para o extrato em hexano de folhas de *Andrographis lineata*, espécie da Família Acanthaceae, uma planta de origem indígena indiana, para o controle do *Anopheles subpictus* (vetor da malária) mesmo em baixa concentração e curto tempo de exposição

6.6.4. Avaliação da atividade ovicida sobre a eclosão de ovos *Aedes aegypti*

Após a oviposição e secagem das cartelas, os ovos obtidos foram contados com auxílio de um microscópio selecionando-se apenas os que se mostraram aptos à eclosão a partir de características como: dessecamento, brilho e formato. Após contagem e seleção, os ovos foram submersos em bandejas plásticas, adicionando-se um 1 L de água desclorada para a avaliação da eclosão.

A exposição dos ovos às concentrações dos bioprodutos (200 – 500 – 800) ppm induziu diferentes graus de eclosão e mortalidade. Os dados da Tabela 11, mostram que a maior taxa de eclosão, em média de 75%, foi observada para os ovos oriundos das cartelas expostas à concentração de 200 ppm, onde os maiores valores de eclodibilidade ocorreram para os bioprodutos LCC técnico, cardanol e cardol.

Observou-se também que o bioproduto LCC natural apresentou as menores taxas de eclosão (25% e 12,5%) para as concentrações de 500 e 800 ppm respectivamente, seguido do bioproduto cardol, com taxas entre (25% e 20%) nas mesmas concentrações. Os bioprodutos cardanol e LCC técnico mantiveram as taxas dentro de um intervalo de (30 a 37,5%) para 500 ppm e (21 a 30%) para 800 ppm. Estes resultados mostraram que o aumento das concentrações dos bioprodutos interferiu diretamente sobre o processo de eclosão dos ovos e desenvolvimento dos estágios larvais iniciais.

Tabela 11 - Resultados da atividade ovicida dos bioprodutos para diferentes concentrações.

| Bioprodutos | N° de ovos utilizados | N° de ovos eclodidos | | |
|--------------------|-----------------------|----------------------|-----------|------------|
| | | [] 200 | 500 | 800 (ppm) |
| <i>LCC natural</i> | ±120 | ± (70 - 80) | ± (20-30) | ± (5 - 15) |
| <i>LCC técnico</i> | ±130 | ± (100) | ± (40-50) | ± (20-35) |
| <i>Cardanol</i> | ±130 | ± (100) | ± (30-40) | ± (20-25) |
| <i>Cardol</i> | ±130 | ± (100) | ± (20-30) | ± (20-25) |

Fonte: Elaborado pela autora

A atividade ovicida pode ser afetada por diferentes fatores tais como: a idade do ovo, a concentração e o período de exposição aos produtos utilizados no controle destes (TENNYSON, *et al* 2011). As condições de incubação, a absorção de umidade para o desenvolvimento embrionário efetivo também são parâmetros envolvidos nos processos de eclosão dos ovos do *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (BYTTEBIER; De MAJO; FISCHER, 2014; SAIFUR; DIENG; HASSAN, 2010).

Os ovos do *Aedes aegypti* são resistentes e de difícil controle sendo ainda escassos os produtos químicos disponíveis no mercado com ação ovicida para serem utilizados em campanhas de saúde pública. De acordo com Pereira e colaboradores (2006), a rigidez da camada proteica que reveste o ovo (córion) aumenta quando estes ficam mais velhos e esta camada é umas das características responsável pela resistência à desidratação, às temperaturas extremas, à radiação ultravioleta e à tolerância à ação de patógenos e produtos com atividade ovicida, influenciando assim para o controle efetivo do mosquito.

No presente estudo, após os ensaios de eclosão, as cartelas utilizadas foram recolhidas para a avaliação dos ovos que não eclodiram. Estes foram novamente analisados em um microscópio de dessecação. Todos os ovos utilizados tinham tempo de vida médio entre 3 a 5 dias (sendo, portanto, considerados jovens) foram expostos aos mesmos intervalos de tempo (72 h) e às mesmas concentrações dos bioprodutos. Desta forma, tendo mantido as mesmas condições de tempo de exposição, concentrações, temperatura ($27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa de (70 a 80%), a atividade ovicida causada pelos bioprodutos (LCC natural, LCC técnico,

cardol e cardanol) foi a responsável pela inibição da embriogênese e consequentemente mortalidade dos ovos.

A análise mostrou que aqueles submetidos, principalmente às concentrações 500 e 800 ppm, apresentaram morte dos seus embriões. Estes resultados confirmam que a ação dos bioprodutos sobre os ovos interferiu no desenvolvimento dos embriões impedindo o seu amadurecimento, interrompendo dessa forma, a eclosão. Possivelmente, as baixas taxas de incubação resultaram em baixos índices de eclosão quando comparados aos índices de eclosão dos ovos oriundos das iscas contendo apenas água e com processo de incubação normal.

Sabe-se que os processos de alimentação, as trocas gasosas bem como a perda de água por meio de osmose durante o desenvolvimento dos ovos ocorrem através da camada protetora (ELUMALAI *et al.*, 2012). As diferenças observadas nas respostas para incubação podem ter sido devido à elevada quantidade de bioprodutos presente o que restringiu a transferência de água através do córion para dentro dos ovos, aumentando assim a probabilidade de não eclodibilidade.

Resultados de altas taxas de mortalidade também foram observadas por Govindarajan e colaboradores (2011) onde relatou que quando os ovos de *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* foram expostos diretamente a concentrações mais elevadas de compostos bioativos derivados de extratos botânicos, estes ovos tiveram sua embriogênese prejudicada. O tempo de exposição também tem um papel crucial em causar toxicidade, períodos de exposição mais longos também influenciam em uma maior penetração dos compostos através das cascas de ovos, aumentando assim a sua atividade ovicida (GOVINDARAJAN *et al.*, 2011).

Diferenças nos processos de incubação e taxas eclosão de ovos do *Aedes albopictus* foram observadas por Satho e colaboradores (2015) utilizando pó café, em várias concentrações, como substratos tóxicos. As diferentes taxas de incubação foram explicadas pelas modificações nas atividades enzimáticas que ocorreram durante o processo de maturação, escurecimento e endurecimento da camada protetora do ovo – córion. Aqui, não nos detemos a estudar e avaliar esses processos, pois foge ao escopo da pesquisa, porém torna-se um ponto de partida para estudos futuros no entendimento do comportamento das baixas taxas de eclosão.

Sabe-se que os compostos fenólicos estudados se situam na castanha do caju e tem como características odor forte, são cáusticos e vesicantes. Esses fenóis exercem a função de proteger a amêndoa de predadores e insetos bem como preservar o seu poder germinativo (LIMA, 1988). Uma vez que os fatores físicos foram mantidos sob condições de laboratório, especificamente na quantidade de hidratante utilizada, temperatura ambiente, umidade e com base nas características acima mencionadas, entende-se que os fenóis da espécie *Anacardium occidentale*, exerceram uma efetiva ação positiva para deter (repelir) a aproximação da fêmea durante a alimentação, no entanto, os modos de ação destes fenóis ainda não estão totalmente compreendidos, mas diante os bons resultados obtidos estes compostos hidratantes podem vir a serem usados para prevenir e combater insetos vetores.

Com base em repelência, compostos derivados de espécies da Família Anacardiaceae, *Gluta rengas* e *Melanochyla fasciculiflora* apresentaram atividade de repelir a oviposição da fêmea (Wan Fatma *et al.*, 2015b). Elango e colaboradores (2009), da mesma forma mostraram propriedade de oviposição para o extrato em hexano de folhas de *Andrographis lineata*, espécie da Família Acanthaceae, uma planta de origem indígena indiana, para o controle do *Anopheles subpictus* (vetor da malária) mesmo em baixa concentração e curto tempo de exposição

De um modo geral, ação dos bioprodutos quando aplicados em larvas do 3º estágio, retardou o crescimento e desenvolvimento do exoesqueleto (ecdise) destas. Verificou-se também, um bom efeito ovicida resultando em baixas taxas de eclosão, e também em baixos índices de oviposição quando os bioprodutos foram utilizados como fonte de alimentação. O percentual de mortalidade das larvas foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações testadas. Após encapsulamento, os melhores resultados apresentados por todos os bioprodutos foram observados a partir da concentração de 200 ppm.

7. CONCLUSÃO

De forma geral, este projeto de pesquisa teve por principal propósito a obtenção, caracterização e aplicação de bioprodutos a partir da combinação de derivados de biomassa regional, mais precisamente o Líquido da casca da castanha de caju (técnico e natural) e os constituintes, cardol, cardanol, encapsulados em soluções de galactomanana natural derivadas de sementes de *Adenantha pavonina L.* para aplicação larvicidas e ovicidas contra o mosquito transmissor da Dengue, Zika e Chikungunya.

Todos os bioprodutos encapsulados exibiram bom efeito larvicida e ovicida com percentuais de mortalidade de larvas e ovos diretamente proporcionais às concentrações testadas antes e após encapsulamento. Os resultados aqui obtidos indicaram que o uso destes bioprodutos, derivados de biomassa vegetal, podem vir a ser utilizados como potencial larvicidas, ovicidas contra larvas do 3º estágio e ovos da espécie *Aedes aegypti*.

REFERÊNCIAS

- ACEITUNO-MEDINA, M.; LOPEZ-RUBIO, A.; MENDOZA, S.; LAGARON, J. M. **Development of novel ultrathin structures based in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolate through electrospinning.** Food Hydrocolloids, 31, 289–298, 2013.
- ACHAYUTHAKAN, P.; SUPHANTHARIKA, M. **Pasting and rheological properties of waxy corn starch as affected by guar gum and xanthan gum.** Carbohydrate Polymers, 71, 9–17, 2008.
- AGOSTINI-COSTA, T.S.; JALES, K.A.; OLIVEIRA, M.E.B.; GARRUTI, D.S. **Determinação espectrofotométrica de ácido anacárdico em amêndoas de castanhas de caju.** Comunicado Técnico 122, EMBRAPA, Brasília, Maio 2005.
- ALBUQUERQUE, P. B.; BARROS, W.; JR.; SANTOS, G. R.; CORREIA, M. T.; MOURAO, P. A.; TEIXEIRA, J. A. **Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*.** Carbohydrate Polymers, 104, 127 – 134, 2014.
- ALEN M.M.F.; SCHOLS D. **Dengue vírus entry as target for antiviral therapy.** J Trop Med (ID 628475):1-13, 2012.
- AMORATI R.; ATTANASI O.A.; FAVI G, S.; PEDULLIA G.F.; VIGLIANISI C **Amphiphilic antioxidants from Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) waste** Org. Biomol. Chem., 9, 1352–1355, 2011.
- ANDRADE, C. T.; AZERO, E. G.; LUCIANO, L.; GONÇALVES, M. P. **Solution properties of the galactomannan extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with *Locust bean gum*.** International Journal of Biological Macromolecules, 26, 181–185, 1999.
- ARSHADY, R. **Microcapsules for food.** Journal of Microencapsulation, London, v.10, 4, 413-435, 1993.
- ATTANASI, O. A.; FILIPPONE, P. E.; MARIO, G. **IT n. PI 1190278**, 1986.
- AZERO, E.G.; ANDRADE, C.T. **Test procedures for galactomannan purification.** Polymer Testing. 21, 551- 556, 2002.
- BAKHHI, P. K.; NANGREJO, M. R.; STRIDE, E.; EDIRISINGHE, M. **Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospaying for nutraceutical applications.** Food Chemistry, 2013.
- BALGUDE D.; SABNIS A.S. **CNSL: an environment friendly alternative for the modern coating industry** J. Coat. Technol. Res., 11, 169 – 183, 2014.
- BARAK, S.; MUDGIL, D. **Locust bean gum: Processing, properties and food applications – A review.** International Journal of Biological Macromolecules, 66, 74–80, 2014.

BENELLI, G.; FLAMINI, G.; FIORE, G.; CIONI, P.L.; CONTI, B. **Larvicidal and repelente activity of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae) fruits against the filariasis vector *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae).** Parasitol. Res.112, 1155–1161, 2013.

BENELLI G. **Research in mosquito control: current challenges for a brighter future.** Parasitol Res; 114: 2801-5, 2015.

BENTO, J. F. **Diverse patterns of cell wall mannan/galactomannan occurrence in seeds of the Leguminosae.** Carbohydrate Polymers, v. 92, 192 - 199, 2013.

BERNE J.B.; PECORA R. **DLS – With applications to Chemistry, Biology and Physics.** Courier Corporation, p.376, Dover Publications, 2000.

BHATIA, H.; GUPTA, P. K.; SONI, P. L. **Structure of the oligosaccharides isolated from *Prosopis juliflora* (Sw) DC. seed polysaccharide.** Carbohydrate Polymers, 101, 438 – 443, 2014.

BHATT, S.; GETHING, P.W.; BRADY O. J. **The global distribution and burden of dengue.** Nature, 496: 504–07, 2013.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. S.; VALLE, D. ***Aedes aegypti* Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 99, nº 2, 199-203, 2004.

BRAZEL, C.S. **Microencapsulation: offering solutions for the food industry.** Cereal Foods World, v.44, n.6, p.388-393, 1999.

BRASIL. DECRETO Nº 6.041 DE 08 DE FEVEREIRO DE 2007. Institui a **Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, cria o Comitê Nacional de Biotecnologia e dá outras providências.** Brasília: Presidência da República. 2007. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/decreto/d6041.htm> Acesso em: Junho de 2015.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro agosto 2012. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_22_15_42_37_pm_inverno_13_14.pdf> Acesso em janeiro de 2016.

BRUMMER, Y.; CUI, W.; WANG, Q. **Extraction, purification and physico - chemical characterization of *Fenugreek gum*.** Food Hydrocolloids, 17, 229–236, 2003.

BURITI, F. C. A. **Characterisation of partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fibre.** Food Hidrocolloids, v. 35, p. 512-521, 2014.

BYTTEBIER B.; DE MAJO MS.; FISCHER S. **Low temperature hatching response of *Aedes aegypti* eggs: effects of hatching media and storage conditions.** J Med Entomol.;51(1):97–103, 2014.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. **Spray drying technique I: Hardware and Process Parameters.** Journal of pharmaceutical sciences. 99, 575- 586, 2010.

CAMPOS, J.; ANDRADE C.F.S. **Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos.** Rev. Saúde Pública, 35: 232-236, 2001.

CARNEIRO, H.C.F.; TONON R.V.; GROSSO C.R.F.; HUBINGER M. D. **Encapsulation efficiency and oxidative stability of flax seed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials.** Journal of Food Engineering, 115, 443–451, 2013.

CASANOVA F.; ESTEVINHO B.N.; SANTOS L. **Preliminary studies of rosmarinic acid microencapsulation with chitosan and modified chitosan for topical delivery Powder Technology 297 44–49, 2016.**

CAVALCANTE, A. P.; CANTO, L. B. **Uso de Resíduo Industrial a Base de Resina Fenólica como Carga para o Polipropileno.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, 22 (3), 245-252, 2012.

CAVALCANTI, L. P. G.; PONTES, R. J. S.; REGAZZI, A. C. F.; JÚNIOR, F. J. P.; FRUTUOSO, R. L.; SOUSA, E. P.; FILHO, F. F. D.; LIMA, J. W. O. **Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório.** Revista Saúde Publica, São Paulo, 41, nº 4, 638-644, 2007.

CERQUEIRA, M.A.; PINHEIRO, A.C.; SOUZA, B.W.S.; LIMA, A.M.P.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; TEIXEIRA, J.A.; MOREIRA, R.A.; COIMBRA, M.A.; GONÇALVES, M.P.; VICENTE, A.A. **Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources.** Carbohydrate Polymers, 75, 408-414, 2009.

CERQUEIRA, M. A., SOUSA-GALLAGHER, M. J., MACEDO, I., RODRIGUEZ-AGUILERA, R., SOUZA, B. W. S., TEIXEIRA, J. A. **Use of galactomannan edible coating application for prolonging shelf-life of “Regional” cheese.** Journal of Food Engineering, 97, 87 – 94, 2010.

CERQUEIRA, M.A.; SOUZA, B.W.S.; SIMÕES J.; RIBEIRO, C.; TEIXEIRA.; DOMINGUES M.R.; COIMBRA, M.A.; VICENTE, A.A. **Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources.** Carbohydrate Polymers 83, 179–185, 2011.

CETIN, H.; YANIKOGLU, A.; CILEK, J.E. **Larvicidal activity of selected plant hydrodistillate extracts against the house mosquito, *Culex pipiens*, a West Nile virus vector.** Parasitol. Res. 108, 943–948, 2011.

- CHAIRES-MARTÍNEZ, L.; SALAZAR-MONTOYA, J. A.; RAMOS-RAMÍREZ, E. G. **Physicochemical and functional characterization of the galactomannan obtained from mesquite seeds (*Prosopis pallida*)**. European Food Research and Technology, 227, 1669–1676, 2008.
- CHANG, S.T.; CHENG, S.S.; HUANG, C.G.; CHEN, W.J.; KUO, Y.H. **Larvicidal activity of tectoquinone isolated from red heartwood-type *Cryptomeria japonica* against two mosquito species**. Bioresource. Technol. 99, 3617-3622, 2008.
- CHENNIAPPAN K; KADARKARAI M. **Oviposition deterrent, ovicidal and gravid mortality effects of ethanolic extract of *Andrographis paniculata* Nees against the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae)**. Entomol Res; 38(2): 119-25, 2008.
- CLETON N.; KOOPMANS M.; REIMERINK J.; GODEKE G.J.; REUSKEN C. **Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers**. J. Clin Virol. Nov;55(3):191-203, 2012.
- CONTI B.; FLAMINI G.; CIONI P. L.; CECCARINI, L.; MACCHIA, M.; BENELLI, G. **Mosquitocidal essential oils: are they safe against non-target aquatic organisms?** Parasitol Res. 113(1): 251-259, 2014.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.2. p.70,1978.
- CORTELAZZO, A.L.; VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. **Basic fuchsis and the Schiff-aldehyde reaction. Spectral absorption characteristics in solution**. Acta Histochemica., v. 73, p. 121-133, 1983.
- CORTELAZZO, A.L.; VIDAL, B.C. **Soybean seed proteins: detection in situ and mobilization during germination**. Revista Brasileira de Botânica, v. 14, p. 27-34, 1991.
- COSTA, R. L.; VOLOCH, C. M.; SCHRAGO, C. G. **Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes**. Infect Genet Evol. Mar;12(2):309-14 2012.
- COWIE, J. M. G.; ARRIGHI, V. A. **“Polymers: chemistry and physics of modern materials”**, 3rd ed., CRC Press, Boca Raton, 2008.
- CROTEAU R.; KUTCHAN TM.; LEWIS NG. **Natural products (secondary metabolites)**. In: Buchanan B, Grissem W, Jones R, editors. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Biologists; p. 1250-1268, 2000.
- CUNHA, P.R.; PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A.; VIEIRA, I.G.P.; ARRIAGA, A. M.C. **Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute**. Food Hydrocolloids 23, 880–885, 2009.

CUNHA, R.V.; MIAGOSTOVICH, M.P.; PETROLA, Z.; ARAÚJO, E.S.M.; CORTEZ, D. **Retrospective study on dengue in Fortaleza**, State of Ceará, Brazil. Mem. Inst Oswaldo Cruz.; 93(2):155–59, 1998.

DELATTE C H.; C. PAUPY J.S.; DEHECQ, J.; THIRIA, A.B.; FAILLOUX, D. FONTENILLE. **Aedes albopictus, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control**. Parasite, 15 (1), 3–13, 2008.

DELATTE, C. H.; DESVARS, A.; BOUETARD, A. **Blood-feeding behavior of Aedes albopictus, a vector of Chikungunya on La Reunion. Vector Borne Zoonotic Diseases** (10), 249–58, 2010.

DENGUE: **Instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. – v. 3. Ed., rev. - Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2001.

DEPYPERE, F. **Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities**. Applied Biotechnology Food Science Policy, 1, (2), 75-94, 2003.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. **Recent developments in microencapsulation of food ingredients**. *Drying Technology*, London, 23, (7), p.1361-1394, 2005.

DESPLANQUES SÉVERINE.; RENOUE FRÉDÉRIC.; GRISEL MICHEL.; MALHIAC CATHERINE. **Impact of chemical composition of xanthan and acacia gums on the emulsification and stability of oil-in-water emulsions**. *Food Hydrocolloids* 27, 401 e 410, 2012.

DICKINSON, E. **Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems**. *Food Hydrocolloids*, 17, 25 - 39, 2003.

DILLON, K. B.; MATHEY, F.; NIXON, J. F. **Phosphorus. The Carbon Copy**; John Wiley & Sons, ISBN 0-471-97360-2, 1997.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M., **Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue**. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, (5), nº 3, 2002.

DOYLE, J.J.; LUCKOW, M.A. **The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context**. *Plant Physiology* 131, 900-910, 2003.

DOYLE, J.P.; GIANNOULI, P.; MARTIN, E.J.; BROOKS, M.; MORRIS, E.R. **Effect of sugars, galactose content and chain length on freeze-thaw gelation of galactomannans**. *Carbohydrate polymers*, 64, 391-401, 2006.

DUPONT ROUZEYROL, M.D.; CARO, V.; GUILLAUMONT, L.; VAZEILLE, M.; D'ORTENZIO, E.; THIBERGE, J.M. **Chikungunya virus and mosquito vector Aedes aegypti in New Caledonia (South Pacific Region)**. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. 12, 1–6, 2012.

ECDC. **Climate change and communicable diseases in the EU Member States. Handbook for national vulnerability, impact and adaptation assessments.** Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2010.

ECDC. **Consultation on mosquito-borne disease transmission risk in Europe.** Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2011.

ELANGO G; BAGAVAN A; KAMARAJ C. **Oviposition-deterrent, ovicidal, and repellent activities of indigenous plant extracts against *Anopheles Subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae).** Parasitol Res Nov;105(6):1567 - 76,.2009.

ELANGO G; ABDUL RAHUMAN A; BAGAVAN A; KAMARAJ C; ABDUZZAHIR A; RAJKUMAR G. **Studies on effects of indigenous plant extracts on malarial vector, *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae).** Trop Biomed; 27(2): 143-54. 2010.

ELUMALAI K.; DHANASEKARAN S.; ANANDAN A.; KRISHNAPPA K.; GOKULAKRISHNAN J.; ELANGOVA A. **Larvicidal, ovicidal and pupicidal activity of *Eranthemum roseum* (Vahl) R. Br. against malarial vector mosquito, *Anopheles stephensi* (Liston) (Diptera: Culicidae).** Int J Curr Agric Sci; 2: 28-33, 2012.

EMBRAPA, Disponível em: <<http://sistemas de producao.cnptia.embrapa.br/Fontes HTML/Caju/Cultivo do Cajueiro/>> Acesso em outubro de 2015.

ESTEVINHO B.N.; DAMAS A.M.; MARTINS P.; ROCHA F. **Microencapsulation of β -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process.** Food Res. Int.64 134–140, 2014.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. **Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review.** Food and Bioprocess Technology, 6(3), 628–647, 2013.

FERNANDES, L.P.; TURATTI, I.C.C.; LOPES, N.P.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C.; OLIVEIRA, W.P. **Volatile retention and antifungal properties of spray-dried microparticles of *Lippia sidoides* essential oil.** Dry. Technol. 26, 1534–1542, 2008.

FERREIRA, A. B. H. **Novo Dicionário da Língua Portuguesa.** Segunda edição. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, p.1314, 1986.

FLORES A.V.; RIBEIRO J.N.; NEVES A.A.; QUEIROZ E.L.R. **Organoclorados: um problema de saúde pública.** Ambiente & Sociedade; 7(2): 111-124, 2004.

FONSECA, S.; PEREZ, S. **Ação do polietileno glicol na germinação de sementes de *Adenantha pavonina* L. e o uso de poliaminas na atenuação do estresse hídrico sob diferentes temperaturas.** Revista Brasileira de Sementes, 25,1–6, 2003.

FOOD INGREDIENTS BRASIL, Nº 25, 2013. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/319.pdf> > Acesso em: Janeiro de 2016.

FRANÇA, F.M.C. **Produção, Comercialização e Mercado, na Cultura do Cajueiro no Nordeste do Brasil**, p. 405, 1988.

FRANCIS SCHAFFNER.; ALEXANDER MATHIS. **Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future** *The Lancet Infectious Diseases*.(14), Issue 12, 1271–1280. 2014.

FRASCARELI, E.C.; Silva V.M.; Tonon R.V.; Hubinger M.D. **Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying**. *Food and Bioproducts Processing*, v.90, n.3, p.413-424, 2012.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – FUNASA, **Dengue Manual para Pessoal de Combate ao Vetor – Manual de Normas Técnicas**, Brasília, Abril de 2012.

GALLÃO, M.I.; VIEIRA, I.G.P.; MENDES, F.N.P.; SOUZA, A.S.N.; BRITO, E.S. **Reserve mobilisation in mesquite (*Prosopis juliflora*) seed (Leguminosae)**. *J. Sci. Food Agric.* 87, 2012–2018, 2007.

GALLÃO, M. I.; NORMANDO, L .O.; VIEIRA, ÍCARO G.P.; MENDES, F. N.P.; RICARDO, N. M.P.S.; BRITO, E.S. **Morphological, chemical and rheological properties of the main seed polysaccharide from *Caesalpinia férrea* Mart.** *Industrial Crops and Products*, v. 47, p. 58-62, 2013.

GALLO, D. **Entomologia Agrícola. Modo de ação de inseticidas e resistência de insetos a inseticidas**. Piracicaba. FEALQ, cap.11, p. 361-395. 2002.

GEDAM, P.H.; SAMPATHKUMARAN, P.S. *Progress in Organic Coatings*, 14, 115-157, 1986.

GHARSALLOUI. A. **Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview**. *Food Research International*, 40, 1107-1121, 2007.

GIANCONE, T.; TORRIERI, E.; DI PIERRO, P.; CAVELLA, S.; GIOSAFATTO, C. V. L.; MASI, P. **Effect of surface density on the engineering properties of high methoxyl pectin based edible films**. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1228 – 1236, 2011.

GIBBS, B.F. **Encapsulation in the food industry: a review**. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50, 213-224, 1999.

GOUIN, S. **Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends**. *Trends in Food Science and Technology*, London, 15, 7-8, 330-347, 2004.

GOVINDARAJAN, M.; MATHIVANAN T.; ELUMALAI K.; KRISHNAPPA K.; ANANDAN A. **Ovicidal and repellent activities of botanical extracts against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae).** Asian Pac J Trop Biomed 1(1): 43-48, 2011.

GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMAR, R.; RAJESWARY, M.; YOGALAKSHMI, K. **Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae).** Exp. Parasitol. 134, 7–11, 2013.

GUBLER D.J. **Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st century.** Trop Med Health, 39(4 Suppl 1):3 -11, 2011.

GUPTA B.; REDDY B.P.N. **Fight against dengue in India: progresses and challenges.** Parasitol Res. doi:10.1007/s00436-013-3342-2, 2013.

HAYATI, I. N.; MAN, Y. B. C.; TAN, C. P.; AINI, I. N. **Droplet characterization and stability of soybean oil/palm kernel olein O/W emulsions with the presence of selected polysaccharides.** Food Hydrocolloids, 23, 233 - 243, 2009.

HARRINGTON LC.; PONLAWAT A.; EDMAN JD.; SCOTT TW.; VERMEYLEN F. **Influence of container size, location, and time of day on oviposition patterns of the dengue vector, *Aedes aegypti*, in Thailand.** Vector Borne Zoonotic Dis; 8(3): 415 - 423, 2008.

HARRIS H.; LECUMBERRI E.; MATEOS-APARICIO I.; MENGÍBAR M.; HERAS A. **Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*.** Carbohydr. Polym. 84 (2) 803 – 806, 2011.

HEYWOOD, V.H.; BRUMMITT, R.K.; CULHAM, A.; SEBERG, O. **Leguminosae (Fabaceae) In: Flowering Plant Families of the World.** New York, Firefly Books, 185-188, 2007.

HOLLAND P. T. **Pesticides report 36. Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 1996)** Vol. 68, Issue 5, pp. 1167-1193, 1996.

HU, C.; KONG, Q.; YANG, D.; PAN, Y. **Isolation and structural characterization of a novel galactomannan from *Eremurus anisopterus* (Ker. et Kir) Regel roots.** Carbohydrate Polymers, 84, 402- 406, 2011.

INSTITUTO BUTANTAN Disponível em:

<<http://g1.globo.com/bemestar/dengue/noticia/2015/03/vacina-contra-dengue-pode-sair-em-2016-veja-como-estao-pesquisas.html>>, Acesso em abril de 2015.

INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO. Flavors, their encapsulation and release.

Disponível em: < <http://alfa.ist.utl.pt/~fidel/flaves/intro.html>>. Acesso em julho de 2014.

JACKSON, L. S.; LEE, K. **Microencapsulation and Food Industry**. LWT Food Science and Technology, London, 24, (4), 289-297, 1991.

JAFARI, S.M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. **Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying**. Drying Technology 26 (7), 816–835, 2008.

JIAN, H.L. **Characterization of fractional precipitation behavior of galactomannan gums with ethanol and isopropanol**. Food Hydrocolloids, v. 40, p. 115 -121, 2014.

JIE CHEN; ZENG SHE LIU; XIAOYING LI. **Thermal behavior of epoxidized cardanol diethyl phosphate as novel renewable plasticizer for poly (vinyl chloride) / PVC**. Polymer degradation and Stability; 126; 58-64. 2016.

KAUR L.; SHARMA S.; GULERI T. **Microencapsulation: a new era in novel drug delivery**, IJPRBS 2 (2) 456–468, 2013.

KHAN G. Z.; KHAN I.; IMTIAZ A. K.; MUHAMMAD S.; KALIM U. **Evaluation of different formulations of IGRs against *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)** Asian Pac J Trop Biomed 6(6): 485 – 491, 2016.

KHARE CP. **Indian Medicinal Plants - An illustrated Dictionary**. Springer-Verlag; Berlin: 601, 2007.

KISSMANN, C. **Tratamentos para quebra de dormência, temperaturas e substratos na germinação de *Adenanthera pavonina* L.** Ciênc. Agrotec., Lavras, v. 32, n. 2, p. 668 -674, 2008.

KONISHI E. **Issues related to recent dengue vaccine development**. Trop Med Health. doi:10.2149/tmh.2011-S0, 2011.

KUMAR, P.P.; PARAMASHIVAPPA, P. J.; VITHAYATHIL, P.J.; SUBRARAO, P. V.; SRINIVASA, R. A. **Process for isolation of cardanol from technical cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell liquid**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 4705–4708, 2002.

LE MENACH A; MCKENZIE F.E; FLAHAULT A; SMITH D.L. **The unexpected importance of mosquito oviposition behaviour for malaria: non-productive larval habitats can be sources for malaria transmission**. Malar J; 4: 23, 2005.

LIMA, V.P.M.S. **Cultura do Cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza, Banco do Nordeste do Brasil, 1988.

LIMA E.P.; PAIVA M.H.; ARAUJO A.P.; SILVA E.V.; OLIVEIRA L.N, SANTANA A.E.; SANTOS M.A.b **Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara, Brazil**. Parasit Vectors, 2011.

LIMA, M.A.A.; DE OLIVEIRA, F.F.M.; GOMES, G.A.; LAVOR, P.L.; SANTIAGO, G.M.P.; NAGAO-DIAS, A.T.; ARRIAGA, A.M.C.; LEMOS, T.L.G.; CARVALHO, M.G. **Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Afr. J. Biotechnol. 10, 11716–11720, 2011.

LIMA J.B.; ROSA-FREITAS M.G; RODOVALHO C.M; SANTOS F.; LOURENÇO DE-OLIVEIRA R. **Is there an efficient trap or collection method for sampling *Anopheles darlingi* and other malaria vectors that can describe the essential parameters affecting transmission dynamics as effectively as human landing catches? A review.** Mem Inst Oswaldo Cruz 109(5): 685-705, 2014.

LIMA E.P; FONSECA GOULART MO; ALBUQUERQUE MR. **Série Histórica da Dengue e do *Aedes aegypti* no Ceará.** Ver Bras Promoc Saude, Fortaleza, 26(3): 340-348, 2013.

LOMONACO, D.; SANTIAGO, G. M. P.; FERREIRA, Y. S.; ARRIAGA, A. M. C.; MAZZETTO, S. E.; MELE, G.; VASAPOLLO, G. **Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides.** Green Chem, 11, 31-33, 2009.

LOPES, G.C.; MACHADO, F.A.V.; TOLEDO, C.E.M.; SAKURAGUI, C.M.; MELLO, J.C.P. **Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species.** Biochemical Systematics and Ecology, 36, 925–931, 2009.

LÓPEZ, O.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. G.; GIL, M. V. **New trends in pest control: the search for greener insecticides,** Green Chem., v. 7, p.431 – 442, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. v. 2. 368, 2009

LUNA J.E.D.; MARTINS M.F.; ANJOS A.F.; KUWABARA E.F.; NAVARRO-SILVA M.A. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina,** Brasil. Rev. Saúde Pública 38: 842-843, 2004.

MACÊDO A.A.M.; SOMBRA A.S.B.; SILVA C.C.; MELE G; MAZZETTO S.E. **Extraction, Characterization and Electrical Behavior of Galactomannan Polysaccharide Extracted from Seeds of *Adenanthera pavonina* L.** doi:10.1016/j.jbiotec. 2010.09.759.

MACIEL M.A.M.; PINTO A.C.; VEIGA JR V.F.; GRYNBERG N.F.; ECHEVARRIA A. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Quím. Nova 25: 429- 438, 2002.

MACÍAS F.A.; OLIVEROS BASTIDAS A.; MARÍN D.; CARRERA C.; CHINCHILLA N.; MOLINILLO J.M.G. **Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models.** Phytochemistry, 7(1), 179-94, 2008.

MAIA F.J.N.; RIBEIRO V.G.P.; CLEMENTE C.S.; LOMONACO D.; VASCONCELOS P.H.M.; MAZZETTO, S.E. **Thermo-oxidative evaluation of new cardol derivatives as antioxidants for mineral oils.** J. Therm. Anal. Calorim., 109 pp. 1013 – 1018, 2012.

MANANWAR, P.A.; KALE, D.D.; J. Appl. Polym. Sci. 61, 2107, 1996.

MARIMUTHU GOVINDARAJAN.; MOHAN RAJESWARY. **Ovicidal and adulticidal potential of leaf and seed extract of *Albizia lebbek* (L.) Benth. (Family: Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae)** Parasitol Res 114:1949–1961, 2015.

MARTÍNEZ-FEREZ A.; VERNON-CARTER E.J. **Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: rheological, mechanical and water vapour properties.** Food Hydrocoll (25), 577–85, 2011

MATALANIS A.; JONES O.G.; MCCLEMENTS D.J. **Structured biopolymer-based systems for encapsulation, protection and release of lipophilic compounds.** Food Hydrocoll (25), 1865–80, 2011.

MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.; MELLE, G., **Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial.** Quimica. Nova, São Paulo, 32 (3), 732-741, 2009.

MAZZETTO, S.E.; SOMBRA, A.S.B.; MACÊDO, A.A.M. **Influence of the polysaccharide galactomannan on the dielectrical characterization of hydroxyapatite ceramic.** Composites: Part B, (44), 95–99, 2013.

MILFONT J.R.; W.N.; MONTEIRO, E.; DWECK, J. **III Encontro Regional de Polímeros da ABPol Regional leste**, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde divulga novo mapa de infestação pelo mosquito da dengue e lança campanha nacional de combate à doença**, Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11839> Acesso em: Agosto de 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde.** – Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). **Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue: monitoramento até a Semana Epidemiológica (SE)21 de 2014.** Boletim Epidemiológico. Jun 45(10):1-6, 2014.

MIKE SERVICE, **Medical Entomology for Students**, Fourth Edition, Cambridge, 2008.

- MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P.; HAMID, N. S. A.; YUSOF, S. **Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on zeta-potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion.** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 315, 47–56, 2008.
- MOHAMAD N, ZUHARAH WF. **Influence of container design on predation rate of potential biocontrol agent, *Toxorhynchites splendens* (Diptera: Culicidae) against dengue vector.** Trop Biomed; 31(1): 166-173, 2014.
- MORAIS S. M.; SOARES M. C. O. **Antioxidant, larvicidal and anti acetyl cholinesterase activities of Cashew Nut Shell Liquid constituents.** Acta Tropica 117, 165–170. 2011.
- MULLA, M.S. **The future of insect growth regulators in vector control.** J. Am. Mosq. Control Assoc. 11, 269–273., 1995.
- MURRAY N.E.A.; QUAM M.B.; WILDER SMITH A. **Epidemiology of dengue: past, present, and future prospects.** Clin Epidemiol (5): 299-309, 2013.
- MURILLO-MARTÍNEZ, M.M.; PEDROZA-ISLAS R.; LOBATO-CALLEROS.; MARTÍNEZ-FEREZ A.; VERNON-CARTER E.J. **Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: rheological, mechanical and water vapour properties.** Food Hydrocoll (25), 577–85, 2011.
- NARASIMHAN, B.; PANGHAL, A.; SINGH, N.; DHAKE, A.S. **Efficiency of anacardic acids as preservative in tomato products.** Journal of Food Processing and Preservation 32, 600–609, 2008.
- NITIKA A.; RAVINESH M.; CHIRAG G.; MANU A. **Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery: A Review** Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences, 2(1): 1-20, 2012.
- OBENAUER P.J, ALLAN S.A, KAUFMAN P.E. ***Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) oviposition response to organic infusions from common flora of suburban Florida.** J Vector Ecol 35(2): 301-306, 2010.
- OLIVEIRA E. F.; PAULA HAROLDO C.B.; CUNHA R. M. DE PAULA **Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 113, 146–151, 2014.
- OLIVEIRA M.S.C.; MORAIS S. M.; MAGALHÃES D.V.; CRAVEIRO A.A. **Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents.** ActaTropica,117, 165–170, 2011.
- OMS - **Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever (background of disease, transmission, history, description of the data; trends, conclusions, tables).** In: report on global surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases, Geneva, 2010. Disponível, em: <<http://www.who.int/surveillance>> Acesso em: Março de 2012.

OPAS – 2013 Disponível, em: <<http://www.who-surveillance>> Acesso em: novembro de 2014.

PARAMASHIVAPPA, R.; PHANI KUMAR, P.; VITHAYATHIL, P.J.; SRINIVASA RAO, **A Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 2548–2551, 2001.

PARIS M.; TETREAU G.; LAURENT F.; LELU M.; DESPRES L.; DAVID J.P. **Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes.** Pest Manag Sci, 67(1), 122-128, 2011.

PAVELA, R. **Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*.** J. Asia-Pacif. Entomol. 17, 287–293, 2014.

PAWAR, H. A.; LALITHA, K. G. **Isolation, purification and characterization of galactomannans as an excipient from *Senna tora* seeds.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 65, p. 167-175, 2014.

PEIGHAMBARDOUST, S.H.; TALFTI, A.G.; HESARI, J. **Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review trends in food science & technology,** 22, 215-224, 2011.

PELL, S. K. **Tese de PhD, Louisiana State University e Agricultural and Mechanical.** College, Blazdell, P.; Interd. Sci. Ver. 2000, 25, 220, 2004.

PEREIRA ST.; SECUNDINO NFC.; BOTELHO ACC.; PINHEIRO VC.; TADEI WP.; PIMENTA PFB. **Role of eggs buster in hatching of *Aedes aegypti* scanning electron microscopy study.** J Med Entomol 43: 68-2. 2006

PÉREZ MASIÁ, R.; FABRA, M.J.; LAGARON, J.M.; LÓPEZ RUBIO. **A. Use of electrospinning for encapsulation.** In V. Mittal (Ed.) Encapsulation Technologies, 107–136, 2013.

PETKOWICZ, C.L.O.; MILAS, M.; MAZEAU, K.; BRESOLIN, T.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S.; RINAUDO, M. **Conformation of galactomannan: experimental and modelling approaches.** Food Hydrocolloids 13, 263–266, 1999.

POLLARD, M.A.; FISCHER, P.A. **Partial aqueous solubility of low-galactose-content galactomannans - What is the quantitative basis?** Current Opinion in Colloid & Interface Science, 11, 184–190, 2006.

PORTAL DA SAÚDE – SUS – Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/>> Acesso em janeiro de 2016.

PORTAL ANVISA - Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/men+u+-noticias+anos/2015/anvisa+registra+primeira+vacina+contra+dengue+no+brasil> >
Acesso em janeiro de 2016.

PRAJAPATI, V. D; JANI G. K; MORADIYA, N. G; RANDERIA, N. P; NAGAR, B. J. **Locust bean gum: A versatile biopolymer**. Carbohydrate Polymers, 94, 814–821, 2013.

QUIN, L. D. **A Guide to Organophosphorus Chemistry**; John Wiley & Sons, ISBN 0-471-31824-8, 2000.

RADHIKA WARIKOO L.; NAIM WAHAB, SARITA KUMAR. **Oviposition-altering and ovicidal potentials of five essential oils against female adults of the dengue vector, *Aedes aegypti*** Parasitol Res 109:1125–1131, 2011.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN A. **Larvicidal and oviposition activity of *Cassia obtusifolia* Linn (Family: Leguminosae) leaf extract against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae)**. Parasitol Res 104(2):337–340 2009.

RAKHMANBERDYEVA, R. K., & SHASHKOV, A. S. **Structure of galactomannans from *Gleditsia delavayi* and *Gleditsia aquatica* by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy**. Chemistry of Natural Compounds, 41, 14–16, 2005.

RAKSHIT K. D.; SUDIP K. R.; ROBERT F.H.D. **Forest biorefinery: Potential of popular phytochemicals as value-added co-products**. Biotechnology Advances 33 681–716, 2015.

RATCLIFFE, P.A. WILLIAMS M., EVANS, I. **Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes**. Current Opinion in Colloid & Interface Science 18, 272–282, 2013.

RODRIGUES D.C.; CUNHA A.P.; BRITO E.S.; AZEREDO H.M.C.; GALLAO M.I. **Mesquite seed gum and palm fruit oil emulsion edible films: Influence of oil content and sonication** Food Hydrocolloids 56, 227- 235, 2016.

RODRIGUES, F.H.A.; FEITOSA, J.P.A.; RICARDO, N.M.P.S.; FRANÇA, F.C.F.; CARIOCA, J.O.B. **Antioxidant activity of cashew nut shell liquid (CNSL) derivatives on the thermal oxidation of synthetic cis-1,4-polyisoprene**. Journal of Brazilian Chemistry Society 17, 265–271, 2006.

ROEL, A.R. **Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável**. Revista Internacional de Desenvolvimento Local, v.1, p.43-50, 2001.

ROEL A. R.; ANDRADE, P K.J.; SILVA, M. M.; MATIAS R. C. **Atividade larvicida do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 41(6):586-589, nov-dez, 2008.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TAL MON, Y. **Factors affecting retention in spray drying microencapsulation of volatile materials.**

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38, 1288-1294, 1990.

ROSS TM. **Dengue virus.** *Clinics in Laboratory Medicine* 30(1):149-60, 2010.

RUI GUO; NANNAN CAO; YAN WU; JINHONG WU. **Optimized extraction and molecular characterization of polysaccharides from *Sophora alopecuroides* L. seeds.** *International Journal of Biological Macromolecules* 82, 231–242, 2016.

SANTOS A.B.; FERREIRA V.P.; GROSSO C.R.F. **Microesferas: uma alternativa viável microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo- resina páprica.** *Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento.* Brasília, 3(16), 26-30, 2000.

SANTOS M.A T.; AREAS M. A.; REYES F G. **PIRETRÓIDES – UMA VISÃO GERAL.** *Alim. Nutr.* ISSN 0103- 4235 , v.18, n.3, p. 339-349, 2007.

SCOTT TW, TAKKEN W. **Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission.** *Trends Parasitol* (28), 114–21, 2012.

SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE (SVS).

Aspectos Clínicos da Infecção pelo Vírus da Dengue. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/kiddengue/aspectosclinicos/livreto_aspecto_sclinicos.pdf>. Acesso em agosto de 2014.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Orientação Técnica para uso do larvicida Pyriproxyfen 0,5G no Programa de Controle da Dengue em Santa Catarina.** Disponível em:

<www.dive.sc.gov.br/Orientacao%20Tecnica%20Pyriproxyfen.pdf>. Acesso em maio de 2015.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ (Sesa). **Informe Semanal dengue. Semana Epidemiológica 01 a 41.** Fortaleza; 2015.

SAIFUR RGM.; DIENG H.; HASSAN A.A.; SATHO T.; MIAKE F.; BOOTS M, *et al.* **The effects of moisture on ovipositional responses and larval eclosion of *Aedes albopictus*.** *J Am Mosq Contr Assoc.* 26(4):373–80, 2010.

SATHO TOMOMITSU.; HAMADY DIENG.; MUHAMMAD H.I.; SALBIAH B.E, AHMAD A. H, FATIMAH ABANG, *et al.* **Coffee and its waste repel gravid *Aedes albopictus* females and inhibit the development of their embryos.** *Parasites & Vectors* 8:272-296, 2015.b

Service, M., Medical Entomology for Students, Fourth Edition, United Kingdom, Cambridge University Press Fourth Edition, 2008.

SIERAKOWSKI, M.R.; MILAS.M.; DESBRIEES, J.; RINAUDO, M. **Specific modifications of galactomannas.** *Carbohydrate Polymers,* 42, 51-57, 2000.

SIHUINCHA, M. E.; ZAMORA P. W.; ORELLANA R.J.D.; STANCIL, V. L.; VIDAL O.C. **Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru** J Med Entomol, 42 (4), 620–630, 2005.

SILVA H.H.G.; SILVA I.G. **Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus,1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório.** Rev.Soc.Bras.Med.Trop. 32(4), 349-355, 1999.

SILVA, A. L. **Nanobiocompósitos super paramagnéticos para aplicação como antenas ressoadoras dielétricas.** Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, 2014.

SINDICAJU. Disponível em: <sindicaju.org.br/perfil-do-setor/perfil-do-setor/> Acesso em setembro de 2015.

SINDICAJU Disponível em <<http://sindicaju.org.br/seguranca-alimentar/valor-nutritivo/>> Acesso em janeiro de 2016.

SOIN, T.; SWEVERS, L.; KOTZIA, G.; LATROU, K.; JANSSEN, C.; ROUGE, P.; HARADA, T.; NAKAGAWA, Y.; SMAGGE, G. **Comparison of the activity of non-steroidal ecdysone agonists between dipteran and lepidopteran insects, using cell-based EcR reporter, assays.** Pest Manag. Sci. 66, 1215–1229. 2010.

SOOTTITANTAWAT, A.; BIGEARD, F.; YOSHI, H.; FURUTA, T.; OHKAWARA, M.; LINKO, P. **Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D limonene by spray drying.** Innovative Food Science and Emerging Technologies 6 (1), 107–114, 2005.

SOSULSKI, F.W.; SOSULSKI, K. **Legumes horticulture, properties and processing.** In: HVI, Y.H.(Ed). Handbook of food science, technology and engineering. New York, CRC Press, v.1, p.18-1 -18-2,2006.

SOUZA, C.F.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F.A.; SIERAKOWSKI, M.R., ***Caesalpinia ferrea* var *Ferrea* seeds as a new source of partially substituted galactomannan** Carbohydrate Polym. 82, 641–647, 2010.

SOUZA R P.; ROCCO IM.; MAEDA AY.; SPENASSATTO C.; BISORDI I.; SUZUKI A. **Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil.** Trop Diseases. Dec;5(12),1439, 2011.

SOUZA C. A. G; SIQUEIRA S. M. C; MORAIS S. M; GONÇALVES T; CUNHA P; RICARDO N.M.P.S. **Encapsulação do ácido L-ascórbico no biopolímero natural Galactomanana por *spray-drying*: preparação, caracterização e atividade antioxidante** Quim. Nova, Vol. 38, No. 7, 877-883, 2015.

SPRENT J. I. **Nodulation in Legumes.** Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 2001.

SPRENT J. I. **Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective of the occurrence of nodulation.** New Phytol,171, 11–25, 2007.

- SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V.P. **Seed galactomannans: an overview**. Chemistry and Biodiversity, 2, (3), 295-317, 2005.
- STIJNMAN, A. C., BODNAR, I., & HANS TROMP, R. **Electrospinning of food-grade polysaccharides**. Food Hydrocolloids, 25, 1393–1398, 2011.
- SUMATHI, S.; ALOK, R.R. **Release behavior of drugs from Tamarind Seed Polysaccharide tablets**. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 5, 12-18, 2002.
- SUMEDHA L.; NOUREDDINE A.; DICK A.; HANNA M. **Chemical and physical characterization of galactomannan extracted from guar cultivars (*Cyamopsis tetragonolobus* L.)**. Industrial Crops and Products 74, 388–396, 2015.
- TENNYSON S.; RAVINDRAN KJ.; ARIVOLI S. **Screening of plant extracts for ovicidal activity against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera:Culicidae)**. Elixir Appl Botany 40: 5456-5460, 2011.
- THOMBRE, N. A.; GIDE, P. S. **Rheological characterization of galactomannans extracted from seeds of *Caesalpinia pulcherrima***. Carbohydrate Polymers, v. 94, p. 547-554, 2013.
- TONON, R.V.; GROSSO, C.R.F.; HUBINGER, M.D. **Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spraydrying**. Food Research International 44 (1), 282–289, 2011.
- TREVISAN, M.T.S.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R.; WURTELE, G.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R. **Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity**. Food and Chemical Toxicology 44, 88–197, 2006.
- TRIEBOLD, H.O. **Quantitative analysis with applications to agricultural and food products**. Van Nostrand, New York, 1946.
- TODD, R. D. **Microencapsulation and flavour industry**. Flavour Industry, London, 1 (11), 768-771, 1970.
- TYMAN, J. H. P.; **Anal. Chem.**48, 30,1976.
- VENDRUSCOLO, C. W.; FERRERO, C.; PINEDA, E. A.; SILVEIRA, J. L.; FREITAS, R. A.; JIMENEZCASTELLANOS, M. R. **Physicochemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosas cabrella*: effect of drying method**. Carbohydrate Polymers, 76(1), 86-93. 2009.
- VIDAL, B.C. **Métodos em Biologia Celular**. IN: VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. (Ed.). Biologia Celular. Rio de Janeiro. Atheneu, p. 5-39. 1987.
- WANG, J. L.; ZHAO, B. T.; WANG, X. F.; YAO, J.; ZHANG, J. **Structure and antioxidant activities of sulfated guar gum: Homogeneous reaction using**

- DMAP/DCC catalyst.** International Journal of Biological Macromolecules, 50, 1201–1206.2012
- WAN FATMA ZUHARAH.; CHAN JIA LING; NURFAZLINA ZULKIFLY; NIK FADZLY. **Toxicity and sub-lethal effect of endemic plants from family Anacardiaceae on oviposition behavior of *Aedes albopictus*** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine Asian Pac J Trop Biomed 5(8): 612–618, 2015a.
- WAN FATMA ZUHARAH; ALI YOUSAF. **Lethal response of the dengue vectors to the plant extracts from Family Anacardiaceae** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Asian Pac J Trop Biomed; 5(10): 812–818, 2015b
- WANG JUN-HUI; JIN-LONG XU; ZHANG JING-CHENG; YONG LIU; HAN-JU SUN; XUEQIANG ZHA. **Physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharide from floral mushroom cultivated in Huangshan Mountain** Carbohydrate Polymers, 131, 240–247, 2015.
- WEINBRECK, F.; MINOR M. C.G. **Microencapsulation of oils using whey protein/gum Arabic cocervates.** J Microencapsulation (4), 667–79, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition.** Geneva: World Health Organization.2009, Chapter 1. General consideration, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Geneva: **Dengue transmission research in WHO Bulletin**, 2012 Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/news-events/news/dengue-transmission>>Acesso em abril de 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Instruction for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides.** /NBC/ 81.806,1981.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Pesticide and Their Application. For the Control of Vectors and Pests of Public Health Importance.** Geneva, Switzerland. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue, countries or areas at risk**, 2013. Geneva – WHO – 2014.
- WU X.; HONG H.; YUE J.; WU Y.; LI X.; JIANG L. **Inhibitory effect of small interfering RNA on dengue virus replication in mosquito cells.** Virol J. Dec;7(270):1-8. 2010.
- ZAMANI, M.; PRABHAKARAN, M. P.; RAMAKRISHNA, S. **Advances in drug delivery via electrospun and electrospayed nanomaterials.** International Journal of Nanomedicine, 8, 2997–3017, 20013.
- Zeta Potential Using Laser Doppler Electrophoresis - Malvern.com. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/zeta-potential/default.aspx>>. Acesso em março de 2016.

ZETTEL N.C.M; ALLAN A.S; BECNEL J.J; KAUFMAN P.E. **Oviposition substrate selection by Florida mosquitoes in response to pathogen infected conspecific larvae.** J Vector Ecol 38(1): 182-187, 2013.

YEMN, E. W.; WILLIS, A. J. **The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone.** The Biochemical Journal, London, v.57, p.508-514, 1954.

YU, S. J. **The Toxicology and Biochemistry of Insecticides**, New York, CRC Press, 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em Fevereiro de 2014.

GLOSSÁRIO

- **Arbovírus:** trata-se de vírus essencialmente transmitido por vetores artrópodes, como, por exemplo, os mosquitos.
- **Arbovirose:** termo derivado da expressão inglesa “*Arthropod Borne Viruses*”, utilizado para designar grupo de doenças virais, transmitidas para o homem por meio de artrópodes (insetos e aracnídeos).
- **Biomassa:** quantidade total de matéria viva existente em um ecossistema ou numa população animal ou vegetal.
- **Bioproduto:** novo produto desenvolvido a partir de organismos vivos e/ou partes constituintes destes, que podem substituir ou elevar a produção de produtos de fontes não renováveis.
- **Bioensaio:** ou ensaio biológico é um tipo de experimento científico que investiga os efeitos de uma substância em um órgão isolado ou em um organismo vivo essencial no desenvolvimento de novas drogas e monitoramento de poluentes no meio ambiente.
- **Concentração letal (CL₅₀):** consiste da concentração letal média ou a concentração que causa 50% de mortalidade na população de organismos submetidos a um agente tóxico. Através da CL₅₀ é possível determinar o grau de toxicidade ou letalidade que causa o agente tóxico. Geralmente o tempo de exposição varia entre 24 a 96 h.
- **Encapsulação:** termo derivado do latim *cápsula*, que significa *pequena caixa*; é uma técnica que consiste em isolar do meio externo, através de uma barreira material, uma molécula química ou biológica, uma partícula sólida, líquida ou gasosa, por um tempo determinado. A diferença entre encapsulação, microencapsulação e nanoencapsulação baseia-se apenas no tamanho da cápsula formada.
- **Iscas:** são armadilhas com larvicida que atraem o mosquito da dengue; através delas a contagem de vetores é mais eficiente.
- **Larvicida:** substância utilizada no controle ou no combate de larvas.
- **Ovicida:** substância utilizada no controle ou no combate de ovos.
- **Oviposição:** postura de ovos por fêmeas de animais invertebrados.
- **Polissacarídeos:** são polímeros naturais (macromoléculas) formados pela união de muitas unidades de monossacarídeos; alguns exemplos são amido, a

celulose e a glicose. Apresentam massa molecular muito elevada, que depende do número de unidades de monossacarídeos que se unem. Nos organismos, os polissacarídeos são classificados em dois grupos, dependendo da função biológica que exercem: polissacarídeos de reserva energética e polissacarídeos estruturais.