



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VANESSA CRISTINA ESTEVAM BITTENCOURT

**COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE INSETICIDAS EM CICLODEXTRINAS:
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADE
INSETICIDA FRENTE A LARVAS DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) E
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA**

GOVERNADOR VALADARES - MG

2016

VANESSA CRISTINA ESTEVAM BITTENCOURT

**COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE INSETICIDAS EM CICLODEXTRINAS:
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADE
INSETICIDA FRENTE A LARVAS DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) E
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cibele Velloso Rodrigues

GOVERNADOR VALADARES - MG

2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bittencourt, Vanessa Cristina Estevam .

Complexos de inclusão de inseticidas em ciclodextrinas: obtenção, caracterização físico-química, atividade inseticida frente a larvas de *Aedes aegypti* e avaliação toxicológica / Vanessa Cristina Estevam Bittencourt. -- 2016.

119 p.

Orientador: Ângelo Márcio Leite Denadai

Coorientadora: Cibele Velloso Rodrigues

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

1. Novaluron. 2. Diflubenzuron. 3. Abamectina. 4. Composto de inclusão. 5. *Aedes aegypti*. I. Denadai, Ângelo Márcio Leite , orient. II. Rodrigues, Cibele Velloso , coorient. III. Título.

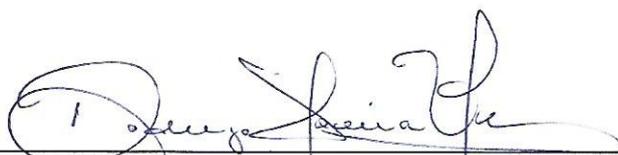
**Complexos de inclusão de inseticidas em ciclodextrinas:
obtenção, caracterização físico-química, atividade inseticida
frente a larvas de *Aedes aegypti* e avaliação toxicológica**

Vanessa Cristina Estevam Bittencourt

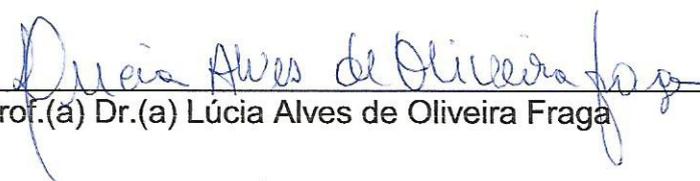
ORIENTADOR: Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 29/09/2016



Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly



Prof.(a) Dr.(a) Lúcia Alves de Oliveira Fraga



Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho não teria sido possível sem a presença divina e a colaboração, direta ou indireta, de diversas pessoas as quais expresso o meu reconhecimento e os meus sinceros agradecimentos.

À Deus, pelo dom da vida, por guiar minhas ações e por tudo e todos que colocou no meu caminho durante esses dois anos.

Ao meu orientador, professor Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai, por ter tornado possível a realização deste trabalho, pela disponibilidade, confiança, entusiasmos, otimismo e partilha de conhecimento.

À minha co-orientadora, professora Dra. Cibele Velloso, pelas contribuições e busca de parcerias viabilizando a realização das análises que tínhamos proposto.

Ao professor Dr. Jeferson Gomes da Silva, pelos ensinamentos, incentivo, amizade e dedicação. Você esteve ao meu lado durante esses dois anos (incluindo finais de semana e feriados) e não mediu esforços para me ajudar, sempre solucionando meus problemas que pareciam gigantes. Não tenho palavras para agradecê-lo.

Aos grandes amigos Anna Isabel, Bolivar, Juliano, Letícia e Vanessa Medeiros. Obrigada por entenderem minhas ausências, pela ajuda tanto no nosso trabalho, quanto nos experimentos do mestrado. Deus me proporcionou conviver com pessoas maravilhosas como vocês e que contribuíram muito para esse projeto, fazendo com que esta trajetória se tornasse mais agradável.

À você, Ana Maria, que além de amiga e companheira de trabalho, foi também meu porto seguro. Compartilhamos os momentos de aprendizado. Rimos, nos desesperamos com prazos, choramos e nos ajudamos mutuamente.

Ao alunos de iniciação científica, Éwerton, Rafael, Máyra, Alan, Aline e Felipe, pela responsabilidade e ajuda na realização das análises. Todos vocês contribuíram, cada um da sua forma, para que este trabalho fosse concluído.

À UFJF e ao laboratório Multiusuário I (Bloco F10 - Univale) por todos os recursos disponibilizados, assim como pelo apoio do grupo de pesquisa de Nanotecnologia dos Fluidos Complexos e dos Sistemas Supramoleculares.

Aos professores e técnicos do laboratório de Imunologia (Bloco F13) e parasitologia (Bloco F14), por possibilitar a realização de algumas análises biológicas e obtenção de imagens.

Aos colaboradores dos Departamentos de Ciências Naturais da UFSJ, de Química da UFES, de Química da UFMG e de Bioquímica e Imunologia da UFMG pela disponibilidade e ajuda técnica.

Aos professores Drs. Gustavo Ferreira Martins (Departamento de Biologia Geral da UFV) e Antônio Frederico de Freitas Gomides pela doação dos ovos utilizados neste trabalho.

À Jenifer pela ajuda na contagem dos ensaios larvicidas, bem como na obtenção dos ovos.

Aos professores do Departamento de Farmácia da UFJF/GV pela colaboração tirando dúvidas, fornecendo material para estudar, compartilhando conhecimentos. Em especial aos chefes do departamento por aceitarem e incentivarem minha capacitação, aos professores Regina e Leonardo por dedicarem parte do seu tempo para a realização deste trabalho e a professora Fernanda, por permitir que eu a acompanhasse nas aulas práticas de química geral e controle de qualidade.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFJF pela oportunidade.

Ao meu marido, Albert, pela presença e apoio contínuo. Inclusive pela ajuda na contagem dos ensaios biológicos em inúmeras noites e finais de semana. Obrigada, amor, pela dedicação e talvez, pela abdicação dos seus sonhos para que eu pudesse terminar esse trabalho com você sempre ao meu lado. Você é a minha Vida!

Aos meus grandes amores, minha família, pelas orações e momentos de descontração quando me encontrava muito cansada e através de seus olhares, abraços e sorrisos sinceros, conseguia forças para continuar, pois tinha minha energia renovada a cada vez que eu ia para casa.

Ao apoio financeiro da CAPES, FAPEMIG, CNPq, PROPG-UFJF, FINEP e UFJF.

RESUMO

Neste trabalho foram preparados, caracterizados e avaliadas as atividades larvicida e citotóxica dos compostos de inclusão formados entre as benzoilfeniluréias (novaluron - NOV e diflubenzuron - DIF) e avermectina (abamectina - ABA) com β -ciclodextrina (β CD). A presença de alterações nos espectros na região do infravermelho e nos perfis térmicos dos compostos de inclusão em relação aos seus precursores e misturas mecânicas sugeriram a ocorrência de interação entre esses compostos e a β CD. Os dados termodinâmicos obtidos por titulação calorimétrica isotérmica permitiram verificar a formação de compostos de inclusão com estequiometria 1:1, sendo os processos espontâneos e com valores bem distintos para as constantes de formação. As análises dos espectros de ressonância magnética nuclear das amostras sugerem que a inclusão ocorre através do grupo 1,1,2-trifluoro-2-trifluoro-metóxi-etóxi, do grupo fenila ou do anel benzofurânico para compostos de inclusão com NOV, DIF e ABA, respectivamente. Dados de espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta demonstram que em todos os compostos de inclusão ocorrem alterações no tamanho das partículas em suspensão em relação aos precursores. Além disso, foi possível verificar através do perfil dos gráficos de solubilização que os compostos de inclusão, com exceção do NOV, apresentam maior solubilização quando comparados com as substâncias puras. Com base nas informações da caracterização em suspensão, o sólido caracteriza-se como um nanoprecipitado hidrofóbico instável com possibilidade de agregação. Com relação aos ensaios biológicos foi observado que em todas as análises os valores de dose letal a 50% das larvas de *Aedes aegypti* (DL_{50}) ou porcentagem de inibição de emergência em 50% de sua população (% IE_{50}) foram menores que 1 ppm, demonstrando a elevada ação inseticida desses compostos. A avaliação da atividade larvicida nos estádios L4 para a benzoilfenilureias e seus compostos de inclusão demonstrou-se pouco efetiva, porém sugeriu a possibilidade de maior atividade larvicida do composto de inclusão com NOV em relação ao seu precursor. Além disso, o teste de inibição de emergência para as benzoilfenilureias possibilitou confirmar o mecanismo de ação desses compostos durante o ciclo de vida do mosquito, verificar a relação direta entre dose e mortalidade, observar atraso no desenvolvimento das fases do mosquito nas amostras tratadas em relação ao controle e constatar a redução do valor de % IE_{50} para os compostos de inclusão. Nos experimentos nos estádios L1 e L4 para ABA e seu composto de inclusão foi verificada maior fragilidade do estágio L1 em relação ao L4 e a redução da DL_{50} para o composto de inclusão em todos os experimentos. Esses dados demonstram a maior atividade larvicida dos compostos de inclusão em relação às substâncias livres. Na avaliação de toxicidade através do ensaio do MTT em células de fibroblastos WI26UA4, foi confirmada que NOV e DIF e seus compostos de inclusão apresentaram baixa toxicidade, enquanto que a ABA e seu composto de inclusão apresentaram moderada toxicidade. Também foi verificado que os valores nos quais se observam elevada citotoxicidade em humanos são bem superiores aos necessários para causar a mortalidade das larvas, demonstrando a seletividade e segurança dessas nanocomposições. Desta forma, a estratégia de preparar os compostos de inclusão resultou em um aumento da atividade larvicida em todas as situações testadas, demonstrando que esta pode ser uma alternativa promissora no controle do mosquito *Aedes aegypti*.

Palavras chaves: novaluron, diflubenzuron, abamectina, composto de inclusão, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

In this work the inclusion compounds formed between benzoylphenylureas (novaluron - NOV and diflubenzuron - DIF) and avermectin (abamectin - ABA) with β -cyclodextrin (β CD) were prepared, characterized and evaluated their larvicide and cytotoxic activities. Changes in the infrared spectra and thermal profiles of the inclusion compounds in relation to mechanical mixtures and precursors suggested the occurrence of interaction between those compounds and the β CD. Thermodynamic data obtained by isothermal titration calorimetry allowed verifying the formation of inclusion compounds with stoichiometry 1: 1, and the spontaneous processes and distinct values for the formation constant. The analysis of the nuclear magnetic resonance spectra of the samples suggests that inclusion via 1,1,2-trifluoro-2-trifluoromethoxy-ethoxy group, the phenyl group, or benzofuran ring for inclusion compounds with NOV, DIF and ABA, respectively. The dynamic light scattering and zeta potential data from inclusion compounds demonstrated changes in the size of the particles in suspension in relation to precursors. Moreover, it was possible to verify by solubilization curves that inclusion compounds have greater solubility compared with the pure substances, except of NOV. Based on suspension data, the solid is characterized as an unstable hydrophobic nanoprecipitated with possibility of aggregation. In relation to biological assays, the lethal dose values to 50% of the larvae of *Aedes aegypti* (LD_{50}) or emergency inhibition percentage at 50% of its population (% IE_{50}) were less than 1 ppm for all compounds, demonstrating the high insecticidal activity of them. The evaluation of larvicidal activity in the L4 stage to benzoylphenylureas and their inclusion compounds proved to be ineffective, suggesting a probable increase in the larvicidal activity of the inclusion compound with NOV compared to its precursor. Furthermore, the emergence inhibition assay for benzoylphenylureas allowed to confirm the mechanism of action of these compounds during the mosquito's life cycle, to verify direct relationship between dose and mortality; to observe the delay in the development stage of mosquitoes in the samples treated compared to control, and, to verify the reduction in % EI_{50} values for inclusion compounds. In the experiments realized in L1 and L4 stadia for ABA and its inclusion compound, it was verified a more fragility L1 stadium with respect to L4 and a reduction of LD_{50} values for the inclusion compounds in all experiments. These data demonstrate the highest larvicidal activity of inclusion compounds in relation to the free substances. In the evaluation of toxicity using the MTT assay WI26UA4 fibroblast cells it was confirmed that NOV and DIF and their inclusion compounds showed low toxicity, while the ABA and its inclusion compound showed moderate toxicity. It was also observed that the values to generate cytotoxicity in humans are much higher than those required to cause larval mortality, demonstrating the selectivity and safety of nano composition. Thus, the strategy for preparing the inclusion compound resulted in an increase in larvicidal activity in all situations tested, demonstrating that this may be a promising alternative for the control of *Aedes aegypti*.

Keywords: novaluron, diflubenzuron, abamectin, inclusion compound, *Aedes aegypti*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Fases do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> .	04
FIGURA 2	Esquema da estrutura do tegumento dos insetos.	09
FIGURA 3	Esquema do processo de muda dos insetos.	10
FIGURA 4	Representação estrutural do novaluron	11
FIGURA 5	Representação estrutural do diflubenzuron	13
FIGURA 6	Representação estrutural da abamectina	15
FIGURA 7	Representação estrutural de algumas ciclodextrinas naturais e da unidade glucopiranoose no polímero	17
FIGURA 8	Representação esquemática da estrutura funcional das ciclodextrinas	18
FIGURA 9	Esquema da formação do composto de inclusão	20
FIGURA 10	Equilíbrio dinâmico de coprecipitação	21
FIGURA 11	Fluxograma dos experimentos	25
FIGURA 12	Esquema do experimento para obtenção dos diagramas de solubilidade	26
FIGURA 13	Esquema de preparação dos compostos de inclusão com ciclodextrinas	27
FIGURA 14	Esquema de preparação das misturas mecânicas	27
FIGURA 15	Esquema do experimento para obtenção dos espectros de infravermelho	28
FIGURA 16	Representação esquemática do Microcalorímetro VP-ITC da Microcal	29
FIGURA 17	Esquema do experimento para avaliação da solubilidade a partir dos espectros eletrônicos das substâncias puras e seus respectivos compostos de inclusão	30
FIGURA 18	Representação esquemática dos experimentos de tamanho hidrodinâmico e Potencial Zeta das substâncias puras e seus respectivos compostos de inclusão	32
FIGURA 19	Esquema de obtenção das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	32

FIGURA 20	Representação esquemática do experimento larvicida L1	33
FIGURA 21	Representação esquemática do experimento larvicida L4	35
FIGURA 22	Representação esquemática do experimento de Inibição de Emergência	36
FIGURA 23	Diagrama de solubilidade de Higuchi e Connors	38
FIGURA 24	Curva de solubilidade do NOV em concentrações crescentes de Bcd	39
FIGURA 25	Curva de solubilidade do DIF em concentrações crescentes de β CD	39
FIGURA 26	Curva de solubilidade da ABA em concentrações crescentes de β CD	40
FIGURA 27	Espectro de infravermelho do NOV, β CD, MM e NOV- β CD na região 4000 a 400 em KBr.	42
FIGURA 28	Espectro de infravermelho do DIF, β CD, MM e DIF- β CD na região 4000 a 400 em KBr.	43
FIGURA 29	Espectro de infravermelho do ABA, β CD, MM e ABA- β CD na região 4000 a 400 em KBr.	44
FIGURA 30	Curvas de TG (A); DTG (B) e DTA (C) da β CD, NOV, MM e NOV- β CD, em N ₂ .	47
FIGURA 31	Curvas de TG (A); DTG (B) e DTA (C) da β CD, DIF, MM e DIF- β CD, em N ₂ .	49
FIGURA 32	Curvas de TG (A); DTG (B) e DTA (C) da β CD, ABA, MM e ABA- β CD, em N ₂ .	50
FIGURA 33	Titulação calorimétrica isotérmica do NOV (30 mM em DMSO:H ₂ O (90:10)) em solução de β CD (2 mM em DMSO:H ₂ O (90:10)) a 25 °C.	53
FIGURA 34	Titulação calorimétrica isotérmica do DIF (30 mM em DMSO:H ₂ O (90:10)) em solução de β CD (2 mM em DMSO:H ₂ O (90:10))	55
FIGURA 35	Titulação calorimétrica isotérmica da ABA (30 mM em DMSO:H ₂ O (90:10)) em solução de β CD (2 mM em DMSO:H ₂ O (90:10))	56

FIGURA 36	Espectros de RMN de ^1H de βCD , NOV e NOV- βCD em DMSO- d_6 ,400 MHz.	58
FIGURA 37	Espectros de RMN de ^1H de βCD , DIF e DIF- βCD em DMSO- d_6 ,400 MHz.	60
FIGURA 38	Regiões selecionadas do mapa de contorno ROESY do DIF- βCD em DMSO- d_6 ,400 MHz	62
FIGURA 39	Espectros de RMN de ^1H de βCD , ABA e ABA- βCD em DMSO- d_6 ,400 MHz.	63
FIGURA 40	Curvas de solubilização do DIF e DIF- βCD (30 °C)	67
FIGURA 41	Curvas de solubilização do ABA e ABA- βCD (30 °C)	67
FIGURA 42	Distribuição dos valores de Potencial Zeta de NOV e NOV- βCD em função da concentração	69
FIGURA 43	Distribuição dos valores de Potencial Zeta de DIF e DIF- βCD em função da concentração	70
FIGURA 44	Distribuição dos valores de Potencial Zeta de ABA e ABA- βCD em função da concentração	70
FIGURA 45	Distribuição de tamanho de partículas em suspensão de NOV e NOV- βCD em função da concentração	71
FIGURA 46	Distribuição de tamanho de partículas em suspensão de DIF e DIF- βCD em função da concentração	71
FIGURA 47	Distribuição de tamanho de partículas em suspensão de ABA e ABA- βCD em função da concentração	72
FIGURA 48	Gráfico de porcentagem de mortalidade das larvas de mosquito <i>Aedes aegypti</i> em seu quarto estágio de desenvolvimento em função do aumento da concentração NOV e NOV- βCD .	74
FIGURA 49	Gráfico de porcentagem de mortalidade das larvas de mosquito <i>Aedes aegypti</i> em seu quarto estágio de desenvolvimento em função do aumento da concentração de DIF e DIF- βCD .	75
FIGURA 50	Porcentagem de mortalidade dos estádios/estágios em função do tempo durante o experimento de inibição de emergência para NOV e NOV- βCD nas concentrações de 10 nM e 0,01 nM.	78
FIGURA 51	Porcentagem de mortalidade dos estádios/estágios em função do tempo durante o experimento de inibição de emergência para DIF e DIF- βCD nas concentrações de 10 nM e 0,01 nM.	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Características das principais ciclodextrinas naturais	18
TABELA 2	Produtos comerciais que tiveram alguma característica melhorada com o uso de CDs	21
TABELA 3	Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho da β CD, NOV, MM e NOV- β CD	43
TABELA 4	Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho da β CD, DIF, MM e DIF- β CD	44
TABELA 5	Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho da β CD, ABA, MM e ABA- β CD	45
TABELA 6	Tabela com os principais eventos térmicos atribuídos para a β CD, NOV, MM e NOV- β CD	48
TABELA 7	Tabela com os principais eventos térmicos atribuídos para a β CD, DIF, MM e DIF- β CD	49
TABELA 8	Tabela com os principais eventos térmicos atribuídos para a β CD, ABA, MM e ABA- β CD	51
TABELA 9	Parâmetros termodinâmicos de interação entre NOV e β CD (T = 298,15 Kelvin)	53
TABELA 10	Parâmetros termodinâmicos de interação entre DIF e β CD (T = 298,15 Kelvin)	55
TABELA 11	Parâmetros termodinâmicos de interação entre ABA e β CD (T = 298,15 Kelvin)	57
TABELA 12	Deslocamentos químicos de hidrogênios (δ) da β CD na molécula pura e no composto de inclusão NOV- β CD (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	58
TABELA 13	Deslocamentos químicos de hidrogênios (δ) do NOV na molécula pura e no composto de inclusão NOV- β CD (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	59
TABELA 14	Deslocamentos químicos de hidrogênios (δ H) da β CD livre e no composto de inclusão DIF- β CD (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	60
TABELA 15	Deslocamentos químicos de hidrogênios (δ H ppm) do DIF na molécula livre e no composto de inclusão DIF- β CD (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	61

TABELA 16	Deslocamentos químicos de hidrogênios (δH ppm) da βCD na molécula livre e no composto ABA- βCD (DMSO- d_6 , 400 MHz)	63
TABELA 17	Deslocamentos químicos de hidrogênios (δH ppm) do ABA na molécula livre e no composto ABA- βCD (DMSO- d_6 , 400 MHz)	64
TABELA 18	Toxicidade da ABA e ABA- βCD frente a larvas de <i>Aedes aegypti</i> . Os dados obtidos são médias de 9 replicatas	76
TABELA 19	Porcentagem de Inibição de Emergência (%IE ₅₀) para os compostos livres e de inclusão	79
TABELA 20	Índice de citotoxicidade (IC ₅₀) para os compostos livres e seus respectivos compostos de inclusão utilizando fibroblastos WI26UA4	81

TABELA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Abamectina
ABA- β CD	Composto de inclusão abamectina com β -ciclodextrina
Ach	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BCD	Beta-ciclodextrina
CD	Ciclodextrina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DIVE	Diretoria de vigilância epidemiológica de Santa Catarina
D _h	Diâmetro hidrodinâmico
DL ₅₀	Dose letal a 50% dos indivíduos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
DSL	Espalhamento de luz dinâmico
DTA	Análise térmica diferencial
EPA	Environmental protection agency
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GABA	Ácido gama-aminobutírico
%IE ₅₀	Porcentagem de inibição de emergência a 50% dos indivíduos
IV	Infravermelho
L1	Primeiro estágio larval

L2	Segundo estágio larval
L3	Terceiro estágio larval
L4	Quarto estágio larval
LIRAA	Levantamento rápido de índice para <i>Aedes aegypti</i>
MELD	Micro-eletoforese laser-doppler
MM	Mistura mecânica
ML	Mortalidade em larva
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil
NOV	Novaluron
NOV- β CD	Composto de inclusão de novaluron com β -ciclodextrina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROESY	Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
TG	Termogravimetria
UBV	Ultrabaixo volume
UV-VIS	Ultravioleta-visível
ZP	Zeta
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	<i>O Aedes aegypti</i>	03
1.2	CONTROLE DO VETOR	06
1.2.1	Novaluron	11
1.2.2	Diflubenzuron	13
1.3	NOVAS ALTERNATIVAS	14
1.3.1	Composto com potencial larvicida frente o <i>Aedes aegypti</i>	14
1.3.2	Preparação de compostos de inclusão	16
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	MATERIAIS	24
3.2	MÉTODOS	24
3.2.1	Diagrama de solubilidade	26
3.2.2	Preparação dos compostos de inclusão	26
3.2.3	Preparo das misturas mecânicas	27
3.2.4	Caracterização físico-química dos compostos de inclusão no estado sólido	28
3.2.4.1	<i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho</i>	28
3.2.4.2	<i>Análises térmicas: termogravimetria (TGA) e análise térmica diferencial (DTA)</i>	28
3.2.5	Caracterização físico-química dos compostos de inclusão em solução/suspensão	29
3.2.5.1	<i>Titulações calorimétricas isotérmicas</i>	29

3.2.5.2	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	30
3.2.5.3	<i>Estudo cinético de solubilidade</i>	30
3.2.5.4	<i>Análise por espalhamento de luz (DLS) e potencial zeta (ZP)</i>	31
3.2.6	Análises biológicas	32
3.2.6.1	<i>Bioensaios envolvendo larvas do mosquito Aedes aegypti</i>	32
3.4.6.1.1	<i>Obtenção das larvas</i>	32
3.4.6.1.2	<i>Avaliação da atividade frente ao estágio L1 de larvas do mosquito Aedes aegypti</i>	33
3.4.6.1.3	<i>Avaliação da atividade frente ao estágio L4 de larvas do mosquito Aedes aegypti</i>	34
3.4.6.1.4	<i>Avaliação da inibição de emergência (IE) em larvas do mosquito Aedes aegypti</i>	35
3.2.6.2	<i>Ensaio de citotoxicidade</i>	36
3.2.6.2.1	<i>Método MTT (viabilidade celular)</i>	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE FASE	38
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO	40
4.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho – FTIR	41
4.2.2	Análise Termogravimétrica e Termogravimetria derivada (TG/DTG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)	45
4.2.3	Titulação calorimétrica isotérmica	52
4.2.4	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	57
4.2.5	Análise de Solubilização	66
4.2.6	Análise por Fotometria de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ZP)	68
4.3	RESULTADOS DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS ENVOLVENDO LARVAS DO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i>	73
4.3.1	Avaliação da atividade frente aos estádios L1 e L4 de larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	73

4.3.2	Avaliação da inibição de emergência	77
4.4	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	80
4.4.1	Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazólio (MTT)	80
5	CONCLUSÃO	82
6	REFERÊNCIAS	84
	APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR	99

1 - INTRODUÇÃO

Os artrópodes constituem o maior grupo de animais existente no mundo. Caracterizam-se pelos pés articulados e cobertura quitinosa, estando subdivididos em diversas classes, dentre as quais se destaca a classe insecta. Os insetos podem causar grande prejuízo a saúde pública uma vez que atuam como vetores na transmissão de diversas doenças ao ser humano (DE REZENDE, 2006; PORTUGAL, 2014).

Considerando os mosquitos vetores, os pertencentes ao gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* são os que causam maior prejuízo à saúde. Os do gênero *Anopheles* responsáveis pela transmissão da malária, os do gênero *Culex* transmitindo infecções como febre do Nilo Ocidental, encefalite viral e malária aviária e os do gênero *Aedes*, como os principais vetores de arbovírus¹ na América do Sul (KANTOR, 2016).

Dentre as doenças causadas por mosquitos do gênero *Aedes*, com impacto real ou potencial para a saúde pública, podem ser destacadas a dengue, chikungunya e zika. Essas enfermidades podem apresentar quadros clínicos que variam de formas assintomáticos até casos de grande severidade como, por exemplo, síndrome hemorrágica (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). No Brasil, até junho do presente ano, foram confirmados mais de um milhão de casos envolvendo essas doenças dos quais 915.391 são casos de dengue, 32.679 de febre chikungunya e 66.180 de febre pelo vírus Zika (BRASIL, 2016a).

A dengue é a principal arbovirose transmitida ao homem, tendo como agente etiológico um vírus pertencente ao gênero *Flavivírus*. Existem cinco sorotipos², DENV 1, DENV 2, DENV 3, DENV 4 e DENV 5, os quais apresentam diferentes características antigênicas. Assim, quando infectado por um desses sorotipos, o indivíduo adquire imunidade específica para o mesmo. Infecções posteriores por outros sorotipos podem elevar o risco de desenvolvimento de formas mais graves da doença (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; GOMEZ-DANTES; WILLOQUET, 2009; MUSTAFA et al., 2015; WHO, 2015).

Estudos demonstram que mundialmente ocorrem cerca de 390 milhões de infecções por dengue a cada ano e que pelo menos 3,9 bilhões de habitantes residem em áreas

¹ Arbovírus são vírus que sobrevivem através de ciclos de desenvolvimento que envolve artrópodes hematófagos como vetores e hospedeiros vertebrados (KARABATSOS, 1985).

² Sorotipos: são cepas de micro-organismos causadores de uma mesma doença, mas com características antigênicas diferentes. No caso da dengue, mais de um vírus é responsável por causar a doença e, como eles podem ser detectados e distinguidos por métodos imunológicos, foram denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

endêmicas (BHATT et al., 2013; BRADY et al., 2012). Até 1970, apenas 9 países relatavam graves epidemias da doença, sendo hoje encontrada em mais de 100 países (BRADY et al., 2012; WHO, 2015).

Em 2012, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reclassificou a dengue como a “doença viral transmitida por mosquito mais importante mundialmente”. Por esse motivo lançou a Estratégia Global para prevenção e controle da doença no período de 2012 a 2020, com a finalidade de reduzir a morbidade e mortalidade em no mínimo 25% e 50%, respectivamente (WHO, 2012).

A infecção por zika também é causada por um vírus da gênero flavivírus. Existem três linhagens principais de zika vírus (ZIKV), das quais uma tem origem na Ásia e as outras duas na África (LUZ; SANTOS; VIEIRA, 2015). A doença caracteriza-se por ser assintomática na grande maioria dos casos (80%). Seus sinais e sintomas, quando presentes, são exantema, conjuntivite não purulenta e febre não muito elevada, os quais apresentam duração de 2 a 7 dias (KANTOR, 2016). Embora normalmente a doença apresente evolução benigna podem ocorrer complicações neurológicas tardias, entre elas a síndrome de Guillain-Barré (PINTO JÚNIOR et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015).

A população mundial exposta ao ZIKV é de 1.340.312.410 indivíduos, dos quais 15% são brasileiros (BRASIL, 2016b). Os casos de febre pelo vírus zika apresentaram destaque no Brasil no ano de 2015 devido a sua relação com a microcefalia e malformações neurológicas em fetos e recém-nascidos no nordeste do país (BRASIL, 2016c; SCHULER-FACCINI et al., 2016).

A síndrome congênita zika, devido ao seu potencial incapacitante levou a Organização Mundial de saúde (OMS) a declarar a epidemia ZIKV como uma emergência global de saúde pública em 1 de Fevereiro de 2016 (OMS, 2016).

Por fim, o arbovírus Chikungunya, que causa febre e dores articulares intensas, apresentou proporções epidêmicas nos anos de 2005 a 2007 devido ao registado de mais de um milhão de casos em ilhas do Oceano Índico e na Índia (BELLINI, 2012). No Brasil, o vírus foi identificada pela primeira vez em 2014. Os pacientes com infecção por este vírus devem ser monitorados e tratados para artralgiias aguda e artrite crônica pós-infecciosa (FAUCI; MORENS, 2016).

As doenças transmitidas por vetores foram pauta das ações da Organização Mundial de Saúde que dedicou o Dia Mundial da Saúde em 2014 a esse tema. O governo federal vem investindo muitos recursos no combate ao *Aedes aegypti*, sendo que só no ano de 2015 foram gastos 1,25 bilhão em ações de vigilância, prevenção e controle do vetor. Parte significativa

desse recurso foi investida na compra de inseticidas para evitar sua proliferação (BRASIL, 2015).

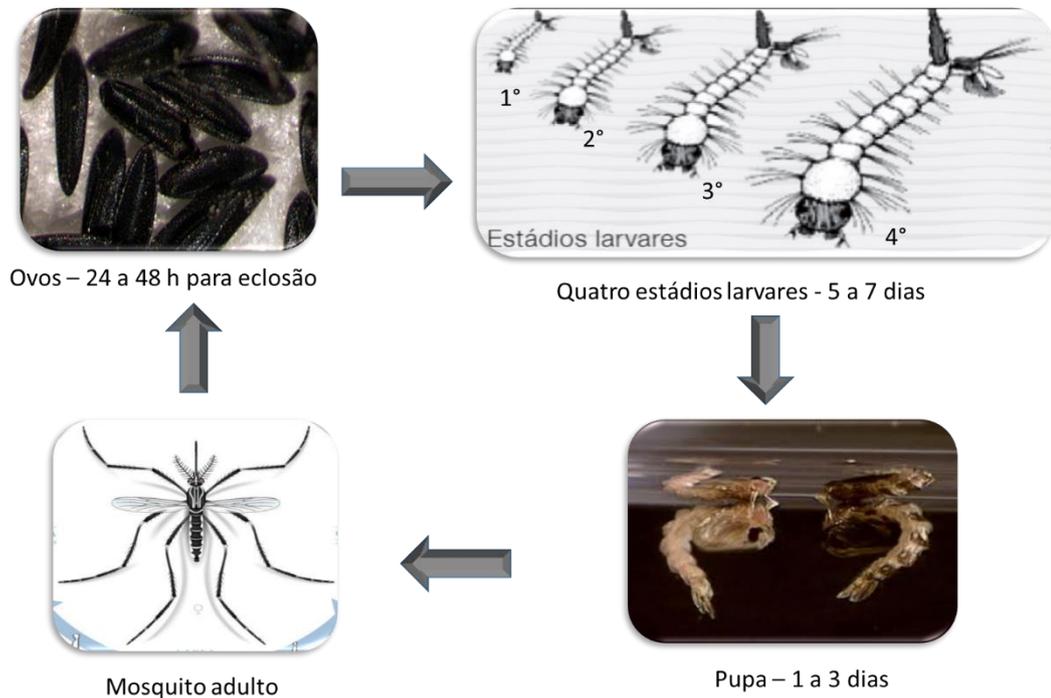
1.1 – O *Aedes aegypti*

O mosquito da espécie *Aedes aegypti* é facilmente reconhecido por sua coloração preta, com listras e manchas brancas. Apresenta hábitos diurnos e está bem adaptado ao ambiente urbano, o que explica seu papel epidemiológico na transmissão de doenças (FUNASA, 2001; NATAL, 2002). Outra espécie que também pode transmitir essas doenças é o *Aedes albopictus*, um importante vetor da dengue na Ásia (BRASIL, 2014).

O *Aedes aegypti* alimenta-se de néctar ou seiva vegetal. No entanto, as fêmeas, após o acasalamento necessitam de albumina e proteínas para a maturação de seus ovos, razão pela qual são hematófagas (ROZENDAAL, 1997). O repasto sanguíneo das fêmeas ocorre nas primeiras horas do dia e ao anoitecer, ocorrendo uma postura após cada repasto, sendo o intervalo entre a alimentação e a postura de três dias (ASSUNÇÃO, 2013). A fêmea geralmente pica inúmeros indivíduos durante cada período de alimentação, facilitando a disseminação da doença, seja por ingestão ou transmissão do vírus (BARATA et al., 2001; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; DONALÍSIO; GLASSER, 2002; WHO, 2012). Desta forma, a transmissão das doenças ocorrem através da picada de fêmeas do *Aedes aegypti* infectadas com o vírus (BRASIL, 2014, MUSTAFA et al., 2015).

O ciclo de vida do mosquito (Figura 1) ocorre por metamorfose completa, sendo composto pelas seguintes fases ou estágios: ovo, larva, pupa e adulto (FUNASA, 2001; SILVA, SILVA; LIRA, 1998). A compreensão das etapas de seu desenvolvimento é fundamental para entendermos as estratégias de combate a esse vetor.

Figura 1. Fases do ciclo de vida do *Aedes aegypti*.



Fonte: Adaptado, <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=336&sid=32>; Osório, 2016.

Os ovos do *Aedes aegypti* são alongados e fusiformes, inicialmente brancos tornando-se pretos pelo contato com o oxigênio e apresentando cerca de um milímetro de comprimento. São depositados, um a um, pelas fêmeas nas paredes internas de recipientes como garrafas e pneus que servem como criadouros, pela possibilidade de armazenarem água (ASSUNÇÃO, 2013, FUNASA, 2001). O mosquito tem preferência por água limpa, apesar de existirem estudos que já verificaram a postura e a viabilidade dos ovos em águas poluídas (BESERRA et al., 2010; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). A oviposição ocorre fora porém muito próximo do meio líquido e/ou em locais com alta probabilidade de inundações (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; NATAL, 2002). A fecundação ocorre durante a postura e o desenvolvimento do embrião dura por volta de dois dias em condições climáticas favoráveis, havendo possibilidade de transmissão vertical dos vírus (FIOCRUZ, 2014; FUNASA, 2001). Após essa etapa, os ovos tornam-se resistentes à dessecação por longos períodos que podem superar um ano (SILVA; SILVA; LIRA, 1998; TAUILL, 2002). No entanto, sempre que os ovos nesses potenciais criadouros receberem água o suficiente para atingi-los, eles serão estimulados a eclodir liberando as larvas do mosquito (NATAL, 2002).

A capacidade de resistência à dessecação dos ovos possibilitando inclusive seu transporte de uma região ou mesmo país para outro, em recipientes secos, constitui um sério

obstáculo à erradicação do mosquito e justifica a migração do mesmo entre os continentes (FIOCRUZ, 2014; FUNASA, 2001).

A fase larvária está dividida em quatro estádios evolutivos (Figura 1) com três mudas e sua duração depende da temperatura, oferta de alimento e do número de larvas no recipiente. Com estas condições favoráveis, o período entre eclosão e pupação dura em média, uma semana. Já em baixas temperaturas e falta de alimentos, o último estágio larvário pode estender-se por várias semanas. Somando-se a isso, uma alta densidade larval pode gerar competição entre as mesmas dificultando seu amadurecimento (FIOCRUZ, 2014; FUNASA, 2001).

Durante este período, as larvas se desenvolvem na água alimentando-se principalmente de partículas orgânicas em suspensão ou no sedimento do sistema aquático. Para respirar, vêm à superfície ficando dispostas quase verticalmente. Movimentam-se em forma de serpente e são sensíveis à luz e a movimentos bruscos na água, aglomerando-se no fundo de recipientes (ASSUNÇÃO, 2013; PORTUGAL, 2014).

No estágio de pupa, os indivíduos têm formato de “vírgula”, não se alimentam e permanecem nesse estágio por dois a três dias quando então ocorre a emergência do inseto adulto (ASSUNÇÃO, 2013; PORTUGAL, 2014). Ao realizar a última metamorfose, o inseto em recente fase adulta procura pousar sobre as paredes de seu criadouro para que ocorra o endurecimento do exoesqueleto, das asas e a rotação da genitália em 180° (machos). Os mosquitos vivem em média de 30 a 35 dias na natureza e podem se acasalar a partir de 24 horas após a última metamorfose (FUNASA, 2001).

Devido à presença da espermateca, somente uma inseminação é necessária para fecundar todos os ovos que a fêmea irá produzir durante seu ciclo vital (ASSUNÇÃO, 2013). Depois de fecundadas, as fêmeas vão abrigar-se em local escuro e úmido até sentirem necessidade de alimentação sanguínea (NATAL, 2002).

Quando o *Aedes aegypti* não está em atividade, ou seja, acasalando, alimentando ou em dispersão, procura locais escuros e quietos para repousar, sendo normalmente encontrado dentro das casas, tendo preferência por paredes, mobília, roupas penduradas e mosquiteiros (FUNASA, 2001). Esse comportamento constitui uma defesa natural dos insetos adultos ao controle químico (NATAL, 2002).

1.2 – CONTROLE DO VETOR

Até o momento não existem drogas antivirais com ação eficaz contra os vírus da dengue, zika e chikungunya. Apesar do fato de que vacinas estejam sendo desenvolvidas, um dos entraves a estes imunoprotetores está na necessidade de conferir proteção contra todos os sorotipos de cada doença (GUY et al., 2011).

As ações de combate ao *Aedes aegypti* executadas e recomendadas pelo Ministério da Saúde (MS) têm sido direcionadas para a eliminação das larvas e dos mosquitos através do controle integrado, o qual envolve métodos físicos (mecânicos), químicos e biológicos, levando em consideração as particularidades de cada região e a importância da participação comunitária (DIVE, 2015; LIMA et al., 2006). O controle físico está baseado na eliminação e proteção dos potenciais criadouros. O biológico, na utilização de peixes larvóforos e bioinseticidas como o *Bacillus thuringiensis* H-14 (Bti). O controle químico envolve o uso de adulticidas e larvicidas. Também foram criadas leis para subsidiar as ações de vigilância no combate à dengue em propriedades privadas abandonadas (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; BRAGA; VALLE, 2007a; BRASIL, 2009; SANTOS, 2009; TAUIL, 2006).

O controle químico constitui parte vital de um programa de combate ao vetor, podendo estar focado em diferentes fases evolutivas do *Aedes aegypti*. No combate ao vetor, faz-se necessário a utilização de um adulticida ou um larvicida em virtude das diferenças fisiológicas e morfológicas entre larvas e adultos e ao *habitat* de cada estágio (BRASIL, 2009).

O combate ao mosquito adulto é uma medida adicional às ações públicas rotineiras do controle da dengue, indicado apenas para o bloqueio da transmissão em casos de surtos ou epidemias, pois apresenta alcance limitado e impacto ambiental significativo (BRASIL, 2009). Nestas modalidades, a forma alada do mosquito é eliminada pelo contato da gotícula do inseticida com o corpo do mosquito. Atualmente os inseticidas preconizados para combate do adulto são os piretróides (deltametrina e cipermetrina) e organofosforados (malation) (FUNASA, 2001; SANTOS, 2009).

Como o combate a forma alada do *Aedes aegypti* envolve inúmeros riscos, o conhecimento da fase larvária torna-se fundamental tanto para a avaliação da positividade dos criadouros como para o desenvolvimento de medidas de combate ao vetor, pois em face da vulnerabilidade dessa fase, ela é o alvo das ações do controle químico (FUNASA, 2001).

Quando não é possível eliminar os criadouros do mosquito devem-se submeter esses locais ao chamado “controle focal”, ou seja, a aplicação direta do larvicida nos mesmos. Entretanto, os recipientes com água para consumo humano só são tratados em casos de

epidemias (BRASIL, 2009). Atualmente são recomendados pela OMS e MS o organofosforado temefós e os reguladores de crescimento novaluron, diflubenzuron e piriproxifem (FUNASA, 2001; BRASIL, 2009).

O temefós é um inseticida organofosforado, praticamente insolúvel em água, comercializado em formulações de grãos de areia contendo 1% do inseticida (LIMA et al., 2006). Sua formulação apresenta bom efeito residual (três meses), devido ao fato dos grãos se acumularem no fundo dos reservatórios, sendo ressuspensos quando a água é adicionada aos mesmos (CAMARGO et al., 1998, MACORIS et al., 1995; THAVARA et al., 2004). É indicado para o tratamento de qualquer local ou recipiente que venha a servir de criadouro para os mosquitos, incluindo a água destinada ao consumo humano (CAMARGO, 1998; LIMA et al., 2006). Seu mecanismo de ação é a inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase (AChE). Deste modo, ele exerce efeito tóxico na junção neuromuscular dos músculos esqueléticos dos insetos, pois quando a AChE é intensamente inibida, ocorre bloqueio neuromuscular despolarizante ocasionando sua paralisia e morte (BRAGA; VALLE, 2007a).

Como o temefós foi usado há décadas indiscriminadamente para o combate do *Aedes aegypti*, diversos estudos demonstraram o aparecimento de resistência (CAMPOS; ANDRADE, 2001; CARVALHO et al., 2004; LIMA et al., 2006; MACORIS, 1995; 1999; PICCOLI, 2009). Deste modo, a rotação de inseticidas é uma boa alternativa para impedir o aparecimento de resistência ao temefós ou a qualquer outro larvicida (CAMPOS; ANDRADE, 2001; LIMA et al., 2006; SILVA, 2010).

Outro grupo de larvicidas utilizados são os reguladores de crescimento de insetos. O termo “IGR (*insect growth regulator*)”, criado por Staal em 1975, teve como finalidade descrever uma nova classe de compostos, os biorracionais. Estas substâncias tem a capacidade tanto de acelerar ou inibir processos fisiológicos fundamentais ao desenvolvimento normal do inseto ou de sua progênie (SIDDAL, 1976). De acordo com Mulla (1995), os IGRs causam anormalidades e efeitos retardados nos insetos, dos quais podem ser citados aberrações morfogênicas, declínio na reprodução e fertilidade e falhas na reprodução (MULLA, 1995). Eles atuam mais especificamente que os outros inseticidas já utilizados, pois agem em estruturas que não existem nos vertebrados, o que reduz sua toxicidade para mamíferos (GRAF, 1993). Assim, eles não matam por intoxicação direta como ocorre com os inseticidas tradicionais (MARTINS; SILVA, 2004). A utilização desses inseticidas além de gerar menor toxicidade para vertebrados, também causa mínimo risco ambiental, visto que outros insetos que compartilhariam o mesmo criadouro natural e poderiam ser afetados, não apresentam

hábitos urbanos (criadouros artificiais), locais onde esses compostos são utilizados (MARTINS; SILVA, 2004). Inúmeros estudos (FONTOURA et al., 2012; SILVA; MENDES, 2002; THAVARA et al., 2004) tem demonstrado que os IGRs são eficazes mesmo no controle de vetores com reconhecida resistência aos inseticidas convencionais, devido seu mecanismo de ação diferencial.

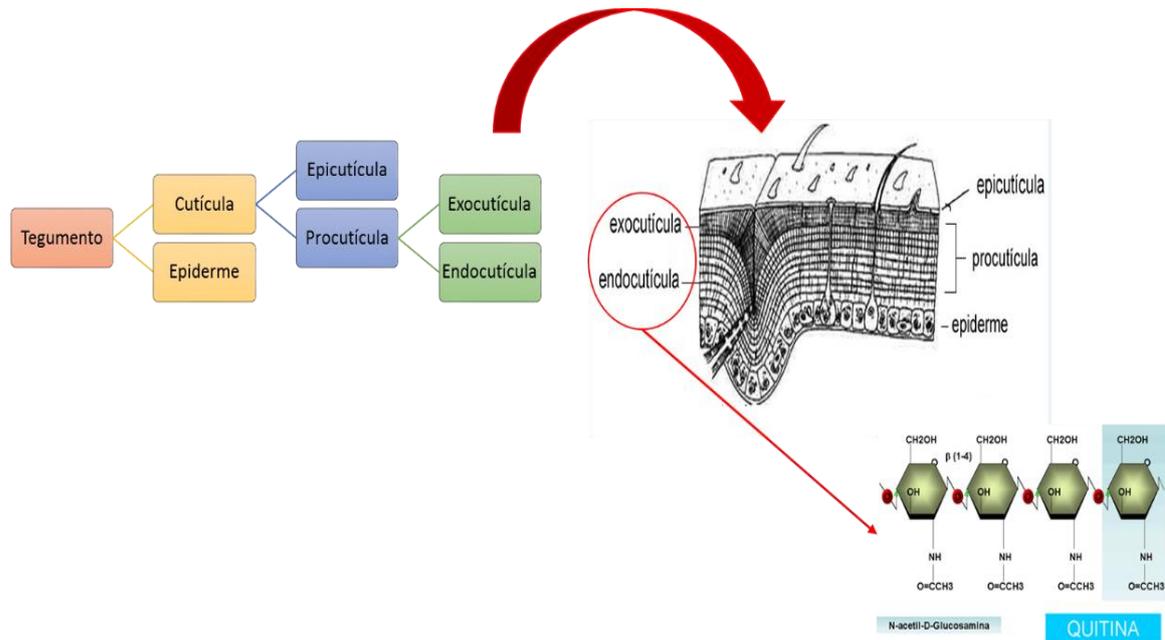
Os IGRs, por não serem neurotóxicos, são considerados por alguns pesquisadores a terceira geração de inseticidas e estão divididos em três categorias de acordo com seu mecanismo de ação, a saber: hormônios juvenis e análogos (juvenóides), agonistas da ecdisona e inibidores da síntese de quitina³. Nessa última categoria destacam-se os compostos da classe das benzoilfeniluréias (STAAL, 1975; GRAF, 1993), sendo os larvicidas diflubenzuron e novaluron, representantes da mesma e um dos focos deste trabalho.

Os compostos da classe da benzoilfenilureias tiveram sua origem na década de 70 destacando-se por sua ação mais específica e menor toxicidade para mamíferos. Somando-se a isso, são biodegradáveis e de baixo impacto ambiental (MARTINS; SILVA, 2004). Para se ter ideia de como esses compostos agem é necessário conhecer a morfologia do inseto e seu processo de muda.

Quanto a morfologia, o tegumento, ou seja, a cobertura externa dos tecidos vivos dos insetos é formado por duas partes, a epiderme e a cutícula (Figura 2). A cutícula (exoesqueleto) encontra-se subdivida em: epicutícula, camada delgada com presença de ceras atuando na redução de perda de água; e procutícula, camada mais espessa responsável pelo suporte e proteção do corpo dos insetos. A procutícula subdivide-se em duas outras camadas, exocutícula e endocutícula, ambas compostas pela interação entre quitina e proteínas através de ligações cruzadas (CHAPMAN, 1998; PEDRINI; CRESPO; JUÁREZ, 2007).

³ A quitina é um homo-amino-polissacarídeo composta por monômeros de N-acetil-glicosamina unidos através de pontes glicosídicas do tipo β 1-4 (MERZENDORFER E ZIMMICH, 2003) fundamental para a manutenção da vida e o desenvolvimento dos insetos. Está presente na superfície exterior do corpo dos mosquitos e também em outras estruturas que são revestidas por cutícula, como o intestino, os tubos traqueais e partes do sistema reprodutor conferindo rigidez a estas estruturas (REYNOLDS; SAMUELS, 1996). Não sendo encontrada em seu estado puro em cutículas, mas sempre em associação com proteínas. (CANDY; KILBY, 1962).

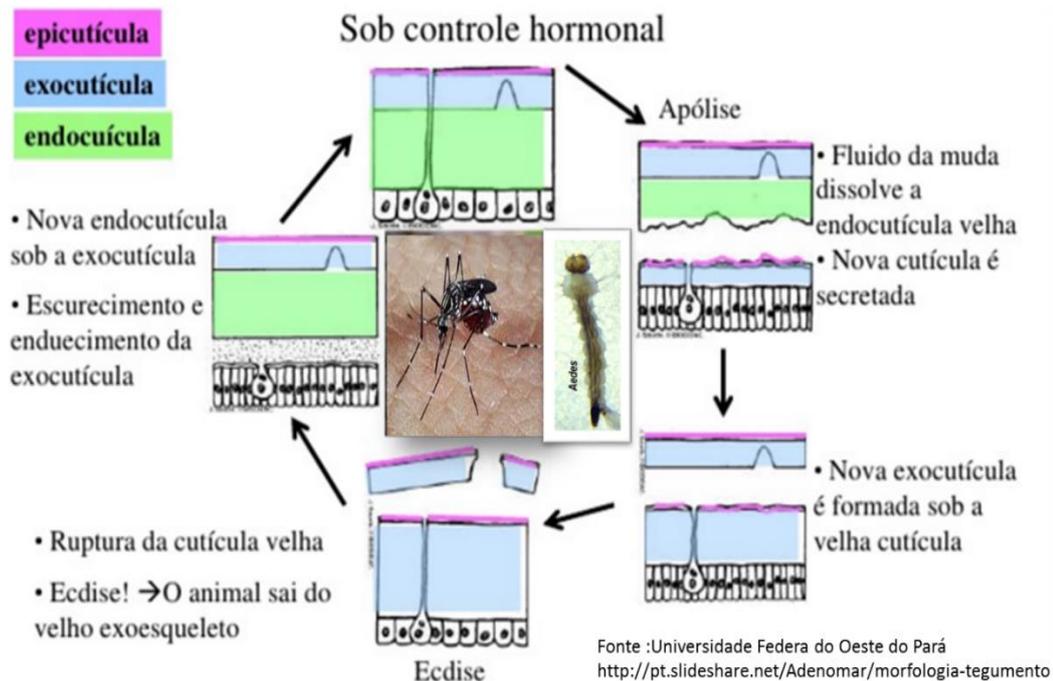
Figura 2. Esquema da subdivisão da estrutura do tegumento dos insetos.



Fonte: A autora, 2016.

A muda consiste na troca da cutícula velha por uma nova por meio de um processo que inclui alterações fisiológicas, hormonais, morfológicas e comportamentais e que culmina na ecdise, que é a liberação da cutícula velha. Desta forma, o processo de muda envolve as seguintes etapas (Figura 3): apólise, que consiste na retração da epiderme em relação à superfície interna da cutícula velha mantendo as ligações dos músculos e nervos entre ambas permitindo que o inseto se movimente. A epiderme secreta o fluido de muda composto por quitinases e proteases inativas. Ocorre a formação da membrana ecdisal, responsável por separar a nova procutícula do fluido de muda e da endocutícula antiga. A seguir, ocorre ativação das enzimas do fluido de muda as quais começam a degradar a endocutícula antiga. A nova procutícula secretada pelas células da epiderme em baixo da anterior irá se diferenciar em exocutícula e endocutícula (CHAPMAN, 1998; MERZENDORFER E ZIMOCH, 2003). Concomitantemente, a nova epicutícula se forma através de ductos formados pelas glândulas da epiderme. Até que ocorra a ecdise, o inseto possui duas cutículas. Pouco antes de ecdise, o fluido de muda é reabsorvido possibilitando a reciclagem de componentes da cutícula antiga. No momento da ecdise as fibras que mantem a ligação entre os músculos e a cutícula antiga são rompidas devido à alteração da pressão hidrostática do corpo. Este novo esqueleto é mole, pois ainda não foi esclerotizado, permitindo ao inseto moldá-lo para acomodar seu novo tamanho (CHAPMAN, 1998; MERZENDORFER E ZIMOCH, 2003).

Figura 3. Esquema do processo de muda dos insetos.



Fonte: Adaptado, Universidade Federal do Oeste do Pará (<http://pt.slideshare.net/Adenomar/morfologia-tegumento>).

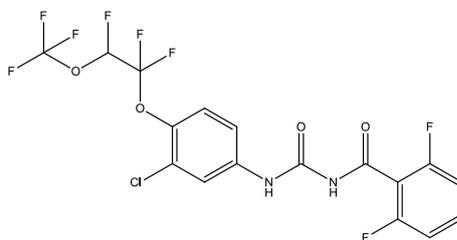
Deste modo, as benzoilfeniluréias atuam através da inibição da síntese de quitina em seus estádios larvais, causando a morte por deposição endocuticular anormal e muda abortiva. Os efeitos incluem inibição completa ou parcial da muda, pupas mal formadas e dificuldade de alimentação. A mortalidade após tratamentos com esses compostos só pode ser observada durante a mudança de estádios larvais ou do estágio larva/pupa e pupa/adulto, quando a quitina está sendo ativamente sintetizada (RETNAKARAN; WRIGHT 1987).

O mecanismo molecular de ação dos benzoilfeniluréias ainda não encontra-se elucidado (COHEN, 2001), podendo estar relacionado com interferências na expressão ou bloqueio na ação da enzima quitina sintase (COHEN, 1987; ZHANG; ZHU, 2006), interferência com a regulação hormonal da síntese de quitina (FOURNET et al., 1995), impedimento da translocação das microfibrilas de quitina na membrana plasmática ou ainda, interferência no transporte dos monômeros de *N*-acetil-glicosamina necessários para síntese de quitina (GANGISHETTI et al., 2008).

1.2.1 - Novaluron

O novaluron, (\pm)-1-[3-cloro-4-(1,1,2-trifluoro-2-trifluorometoxietoxilo)fenil]-3-(2,6-difluorobenzoil)ureia (Figura 4) é um composto da classe das benzoilfenilureias que caracteriza-se como um sólido de odor não detectável, pressão de vapor muito baixa e baixa solubilidade em água (3 $\mu\text{g/L}$), que é independente do pH. Ele apresenta sua maior solubilidade em acetona (198 g/L). Não apresenta hidrólise significativa em pH 5 e 7, porém sofre fotólise lenta em pH 5 e pode ser hidrolisado em pH 9 à temperatura ambiente (CUTLER; SCOTT-DUPREE, 2007).

Figura 4. Representação estrutural do novaluron (NOV).



Fonte: A autora, 2015.

Assim como outros inseticidas, após ter demonstrado ação sobre pragas agrícolas, o novaluron foi escolhido para ser testado em mosquitos transmissores de doenças aos humanos. Isso pode ser justificado pelo alto custo envolvido no desenvolvimento de um novo produto nessa área, sendo bem mais acessível considerar agentes e produtos que já têm algum uso em outros tipos de insetos (EPA, 2011; MULLA et al., 2003). Hoje ele se destaca como um dos análogos mais potentes dessa classe (CUTLER; SCOTT-DUPREE, 2007).

O novaluron foi inicialmente indicado para uso contra larvas de *Aedes aegypti* em habitats temporários do mosquito, águas poluídas e recipientes não potáveis de armazenamento de água, sendo recomendada uma dose de 10-50 ppm ou 10-100 g/ha do princípio ativo (WHO, 2004). Após avaliação de risco em 2007, o composto passou a ser recomendado pela OMS para uso na água potável, contudo sua concentração não deve ultrapassar 0,05 ppm (WHO, 2008).

Estudos como o de Tawastzin e colaboradores (2006) tem mostrado que o novaluron apresenta baixo risco para o ambiente e para organismos não alvos com baixa toxicidade aguda, subaguda e crônica para mamíferos. Todavia, foi verificada alta toxicidade para crustáceos aquáticos. O composto encontra-se na classe IV de toxicidade de acordo com os

critérios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sendo portanto, pouco tóxico. Não é irritante nem sensibilizador. Também não foram identificados efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, nem sinais de toxicidade reprodutiva ou no desenvolvimento (ANVISA, 2010; EPA, 2011).

Mulla e colaboradores (2003) avaliaram a atividade e eficácia de novaluron grau técnico e de sua formulação emulsionável contendo 10% m/v do princípio ativo contra o *Aedes aegypti*, tanto em laboratório quanto em campo. A análise dos dados demonstrou sua elevada atividade larvicida a longo prazo, com mortalidade nos diferentes estádios larvais dependente da dose, sendo que concentrações de 0,05-1,0 ppm de novaluron foram capazes de inibir o segundo e quarto estádios larvais do mosquito por até 6 meses. Os autores sugerem que o desenvolvimento de formulações de liberação controlada de novaluron poderia prolongar ainda mais a eficácia residual do compostos contra *Aedes aegypti* em recipientes destinados ao armazenamento de água (MULLA et al., 2003).

Um estudo realizado no Brasil em 2007 por Fontoura e colaboradores avaliou a resistência de quatro populações brasileiras de *Aedes aegypti* aos inseticidas temefós, deltametrina e novaluron. A análise dos resultados demonstrou que o novaluron foi eficaz contra todas as populações de *Aedes aegypti* testadas, independentemente se as populações de insetos já apresentavam resistência aos inseticidas químicos clássicos. Os resultados confirmaram a eficácia do novaluron em condições climáticas brasileiras, tanto no laboratório, quanto em campo (FONTOURA et al., 2012). Estudo realizado por Farnesi e colaboradores (2012), além de reiterar a eficácia desse composto e sua relação dose-resposta sobre a emergência de mosquitos, demonstrou histologicamente as alterações ocorridas no conteúdo de quitina, na epiderme e nos órgãos internos das larvas submetidas ao tratamento. Foi observado ainda que, quando ocorria emergência de mosquitos, estes eram predominantemente machos, o que possui relevância epidemiológica uma vez que a transmissão da doença ao homem ocorre somente através de fêmeas (FARNESI et al., 2012).

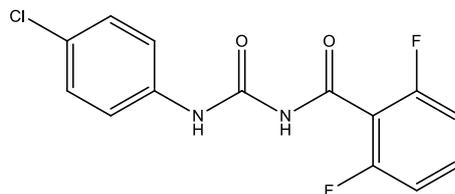
Através do trabalho de Lau e colaboradores (2015) também foi demonstrado que as cepas de campo de *Aedes aegypti* são suscetível a diflubenzuron e novaluron apresentando concentrações para inibir a emergência de 50% dos mosquitos (%IE₅₀) de 0,74 e 0,38 ppb, respectivamente (LAU et al., 2015), o que confirma a maior potência de novaluron em relação ao seu precursor.

1.2.2 – Diflubenzuron

O diflubenzuron, N-[[[4-clorofenil)amino] carbonil]-2,6-difluorobenzamida ou 1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil)ureia, (Figura 5) foi o primeiro inibidor da síntese de quitina pertencente a classe das benzoilfenilureias a ser utilizado comercialmente em agricultura e contra moscas de importância veterinária (GRAF, 1993). Hoje é utilizado na agricultura, horticultura e silvicultura contra larvas de Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e na saúde pública contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* (WHO, 2006).

Caracteriza-se como um sólido branco cristalino com ponto de fusão entre 210-230 °C, praticamente insolúvel em água (0,08 mg/L), mas é solúvel em solventes orgânicos como acetonitrila (2 g/L), acetona (6,5 g/L), dimetilsulfóxido e dimetilformamida (120 g/L) (EPA, 1997; FAO, 2004).

Figura 5. Representação estrutural do diflubenzuron (DIF).



Fonte: A autora, 2015.

A formulação é comercializada na forma de pó ou grânulos com teor máximo de princípio ativo de 25% m/m. O composto encontra-se na classe IV de toxicidade de acordo com os critérios da ANVISA (ANVISA, 2015), sendo praticamente atóxico para mamíferos, biodegradável, não sistêmico e com baixo impacto ambiental (APPERSON et al., 1978). Ele pode ser utilizado ainda em recipientes com água potável desde que sua dose não exceda de 0,25 ppm, uma vez que seus efeitos tóxicos aparecem apenas em concentrações acima de 4500 ppm (BRASIL, 2008).

No Brasil e no mundo, diversos estudos mostraram a susceptibilidade do *Aedes aegypti* a esse composto (BELINATO; VALLE, 2015; GARCIA NETO, 2011; PORTO, 2015; SECCACINI et al., 2008; SILVA, 2006). Dentre os vários estudos sobre a ação deste larvicida em *Aedes aegypti* pode ser citado o trabalho de Machado (2012), a partir do qual se pôde concluir que o diflubenzuron é efetivo a 2 ppb em cepas *Rockefeller*, nas condições laboratoriais, além de ser eficaz em populações de campo com resistência baixa e

intermediária ao temefós, na concentração de 0,25 ppm mantendo seu efeito por até sete semanas (MACHADO, 2012).

Borges e colaboradores (2012) demonstraram através de análises morfológicas em nível ultraestrutural que o diflubenzuron atua impedindo a liberação da cutícula velha que, por sua vez, provoca estrangulamento das partes segmentares da larva. Também foi verificado rompimento da cápsula cefálica e alterações no mesêntero (BORGES et al., 2012). O principal modo de ação do diflubenzuron é por ingestão, no entanto, já foram relatados casos de ação por contato direto com o tegumento (GROSCURT; JONGSMA, 1984).

Os estudos de Saleh e colaboradores (2013) verificaram que o diflubenzuron além de ser eficaz contra larvas, provoca alterações fisiológicas nos mosquitos adultos sobreviventes sendo observada uma redução de quase 50% na postura de ovos oriunda de fêmeas sobreviventes e de aproximadamente 25% na emergência de adultos provenientes desses ovos (SALEH et al., 2013).

Uma avaliação realizada em laboratório tratando gerações sucessivas com um dose pré-determinada de diflubenzuron identificou a possibilidade de surgimento de resistência de forma rápida para o composto, sendo a mesma possivelmente relacionada à resistência metabólica (BELINATO; VALLE, 2015). Este dado corrobora para a necessidade de avaliação constante dos inseticidas preconizados pela OMS, bem como para a busca contínua de melhoramento dos inseticidas já existentes e avaliação de novos potenciais inseticidas.

1.3 - NOVAS ALTERNATIVAS

1.3.1 – Composto com potencial larvicida frente o *Aedes aegypti*

Hoje, o mercado de inseticidas é carente de produtos sintéticos com novos mecanismos, seja pela dificuldade de desenvolvimento ou mesmo pelo custo destas pesquisas. Assim, além da busca de imunoprotetores eficazes para combater os vírus, as estratégias de controle dos vetores têm sido focadas em outras vertentes como biotecnologia, busca de novas formulações para os compostos já existentes e controle biológico através de substâncias naturais derivadas de plantas, patógenos e micro-organismos com potencial inseticida (BISSET, 2002).

Diante deste contexto, substâncias já utilizadas contra outros organismos como ácaros e nematoides, ou mesmo outros insetos, podem ser reavaliadas a fim de verificar uma nova utilização para as mesmas. É o caso das avermectinas que apresentam ampla aplicação para a

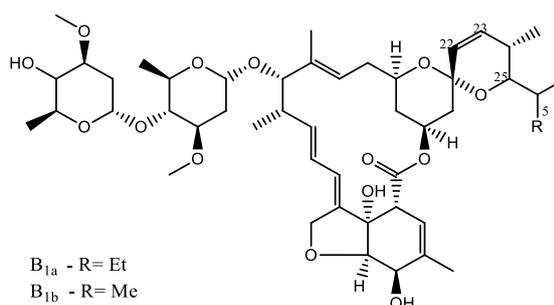
indústria farmacêutica (antibióticos, antitumorais, etc) e agroquímica (inseticidas) (DEWICK, 2009).

As avermectinas são substâncias obtidas por fermentação através de culturas de *Streptomyces avermitilis*, pertencente a um dos gêneros de micro-organismos mais abundantes no solo (DEWICK, 2009). Estas são lactonas pentacíclicas formadas por dois pares de homólogos que se diferem quanto à ligação ao carbono 5 sendo que no grupo que recebe o nome de A está ligado um metoxi enquanto que no B, o radical é o hidroxil. Esses dois grupos ainda se subdividem em A₁ e A₂, de acordo com a presença ou não de dupla ligação no carbono 22. Por fim, cada um destes subgrupos recebe a letra “a” ou “b” pelo fato de serem majoritários ou secundários, respectivamente. Os principais possuem uma cadeia butil secundária no carbono 25, já nos outros está presente um grupo isopropil. Desta forma, têm-se as seguintes avermectinas: A_{1a}, A_{1b}, A_{2a}, A_{2b}, B_{1a}, B_{1b}, B_{2a} e B_{2b} (ALBERS-SCHONBERG et al., 1981; SPRINGER et al., 1981).

São compostos muito lipofílicos, praticamente insolúveis em soluções aquosas havendo necessidade do auxílio de surfactantes aquosos ou solventes e com elevada adsorção em matéria orgânica (CAMPBELL, 1989; LO et al., 1985).

Esse grupo é formado pela abamectina, ivermectina e doramectina. A abamectina (Figura 6) consiste numa mistura de cerca de 85% de avermectina B_{1a} e 15% de avermectina B_{1b} sendo amplamente utilizada em culturas agrícolas no combate de ácaros e insetos. A fórmula molecular do componente majoritário é C₄₈H₇₂O₁₄ e do secundário C₄₇H₇₀O₁₄ (ANVISA, 2015a). Apresenta baixa toxicidade para mamíferos, no entanto, é extremamente destrutiva para microcrustáceos e peixes pela capacidade de atingirem o cérebro desses animais (NOVELII, 2010). Devido a fácil degradação e adsorção pela matéria orgânica, solo e partículas sedimentares, dificilmente ocorre lixiviação e/ou contaminação dos lençóis freáticos (TISLER; ERZEN, 2006).

Figura 6. Representação estrutural da abamectina (ABA).



Fonte: A autora, 2015.

As avermectinas agem sobre os receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA) presentes na membrana pós-sináptica dos neurônios levando a maior permeabilidade dos íons cloreto, que, por sua vez, provocam hiperpolarização irreversível das células nervosas e musculares promovendo paralisia e morte dos insetos (FREITAS et al., 1996; TISLER; ERZEN, 2006). Essas ações não são tão prejudiciais ao homem, porque em humanos esses mediadores químicos não afetam a função motora periférica. Eles agem em nível de sistema nervoso central e as avermectinas não atravessam a membrana hematoencefálica (DOURMISHEV; DOURMISHEV; SCHWARTZ, 2005).

Duas formulações comerciais de avermectinas, uma contendo abamectina e a outra ivermectina, foram testadas contra larvas do *Aedes aegypti* e demonstraram atividade em baixas concentrações sendo a que continha abamectina foi a mais eficaz (PAMPIGLIONE apud GERIS et al., 2012). Outros trabalhos visando tanto a aplicação adulticida quanto larvicida dos compostos desta classe demonstraram-se efetivos no combate ao *Aedes aegypti* (DEUS et al., 2012; PRIDGEON et al., 2008; ROSA et al., 2011). Tais dados realçam o potencial das avermectinas para o combate do mosquito *Aedes aegypti*. Além disso, compostos com mecanismo de ação não relacionados constituem uma alternativa promissora para o controle de populações de campo resistentes a inseticidas tradicionais.

1.3.2 – Preparação de compostos de inclusão

Dentro da perspectiva de novas formulações, a nanotecnologia surge como um conjunto de técnicas usadas para manipular objetos e dispositivos em dimensões moleculares (nanométricas) buscando assim, utilizar as diferentes propriedades físico-químicas que surgem quando os materiais encontram-se nessa escala para desenvolver novos dispositivos tecnológicos com funções diferenciadas (ALVES, 2004; MELO; PIMENTA; 2004).

Nanoformulações são amplamente utilizadas no setor farmacêutico, no entanto, a indústria agroquímica tem dado maior importância a esta tecnologia a partir dos últimos dez anos, quando segundo Kah e colaboradores (2013) pode-se verificar a ocorrência de mais de 3000 pedidos de patentes e cerca de 85 documentos científicos entre artigos e relatórios tratando de nanopesticidas (KAH et al., 2013).

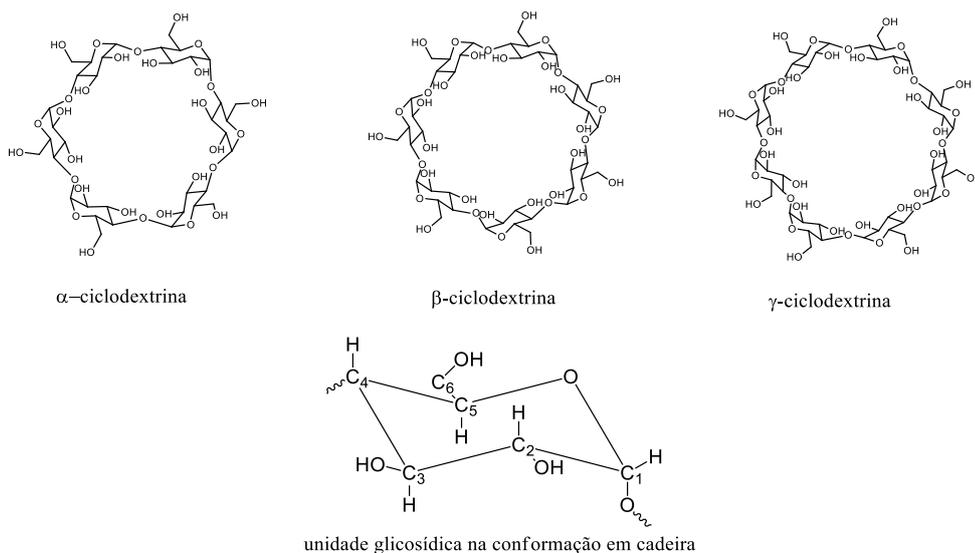
É uma tecnologia com um amplo espectro de aplicações, com destaque para os sistemas de liberação controlada que permitem alojar um determinado princípio ativo numa matriz de encapsulamento, possibilitando uma liberação gradual do mesmo no meio de

interesse. Nesse contexto, as ciclodextrinas (CDs) surgem como uma alternativa de matriz encapsulante (SCHAFFAZICK et al., 2003; DEL VALLE, 2004).

As CDs foram descobertas há mais de 100 anos, porém sua utilização industrial, como excipiente, é bem mais recente (DEL VALLE, 2004; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007). São originárias de uma abundante fonte natural, o amido, através de conversão enzimática (SCHARDINGER, 1911 *apud* LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

As principais CDs naturais são policristalinas, homogêneas, não higroscópicas e compostas por seis, sete ou oito unidades de glucopiranoses unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,4 sendo denominadas α -ciclodextrinas (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) e γ -ciclodextrina (γ -CD) (Figura 7), respectivamente (SZEJTLI, 1998; THOMPSON, 1997; UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998). Na Tabela 1 estão apresentadas suas principais características. Em decorrência da conformação cadeira das glucopiranoses, tais compostos adquirem a forma de cone truncado (Figura 8), com uma cavidade em seu interior que permite acomodar outras substâncias. O tamanho desta cavidade varia com o tipo de CD, pois o número de unidades de glicose determina o diâmetro interno e o volume do orifício (DEL VALLE, 2004). Existem ainda CDs maiores, no entanto, estas por não apresentam forma cônica, tornam-se menos importantes neste contexto (SZEJTLI, 1998).

Figura 7. Representação estrutural de algumas ciclodextrinas naturais e da unidade glucopiranosose no polímero.

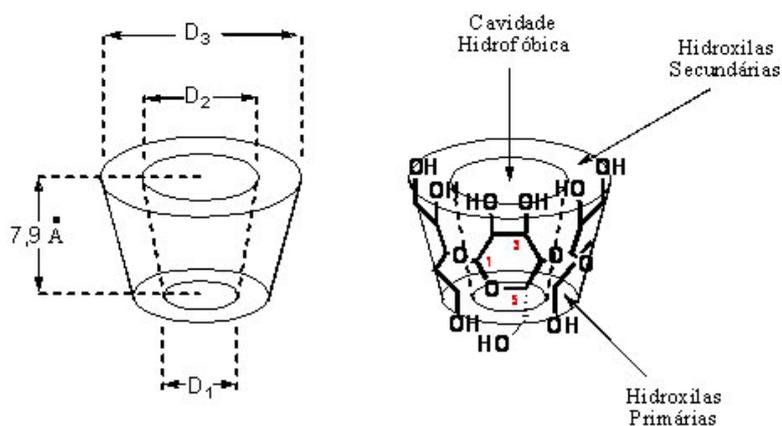


Fonte: A autora, 2015.

Tabela 1. Características das principais ciclodextrinas naturais.

CD	Nº de monômeros	Altura da molécula	Diâmetro interno (borda superior)	Diâmetro externo (borda superior)	Massa Molar	Solubilidade
α CD	6	7,9 Å	5,7 Å	13,7 Å	972,8 g mol^{-1}	149,2 mmolL $^{-1}$
β CD	7	7,9 Å	7,8 Å	15,3 Å	1135,0 g mol^{-1}	16,3 mmolL $^{-1}$
γ CD	8	7,9 Å	9,5 Å	16,9 Å	1297,1 g mol^{-1}	178,8 mmolL $^{-1}$

Fonte: Adaptado, THOMPSON, 1997; SAENGER, 1980.

Figura 8. Representação esquemática da estrutura funcional das ciclodextrinas.

Fonte: http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/resenhas_ciclodextrinas.html.

A estrutura cônica com hidroxilas nas extremidades exteriores possibilita que esses oligossacarídeos cíclicos se solubilizem em solução aquosa e simultaneamente acomodem substâncias hidrofóbicas em seu interior. As hidroxilas secundárias localizam-se na borda mais larga do cone, já as primárias estão na outra extremidade, mais estreita (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; CHOWDARY; SHANKAR; TANNIRU, 2014). É a livre rotação das hidroxilas primárias, o fenômeno responsável por reduzir o diâmetro da cavidade na extremidade mais estreita das CDs (KRZYSZTOF; KATARZYNA, 2008).

Quanto a diferenças na solubilidade, esta encontra-se relacionada à estabilização do anel macrocíclico através de interações intramoleculares entre a hidroxila do C-2 de uma unidade de glicose com a hidroxila do C-3 da unidade de glicose consecutiva. Quanto maior o número de interações intramoleculares, mais rígido será o cone e menor a solubilidade da CD. Isso é a causa da reduzida solubilidade da β CD (ver tabela 1) (ASTRAY, 2009).

A porção interna da cavidade das CDs é composta pelos hidrogênios H₃, H₅ e H₆. Também há no interior da cavidade oxigênios glicosídicos cujos pares de elétrons não-ligantes se encontram orientados em direção ao interior da cavidade. Isso origina uma elevada

densidade eletrônica, fazendo com que a molécula apresente características de base de Lewis (BUDAL, 2003).

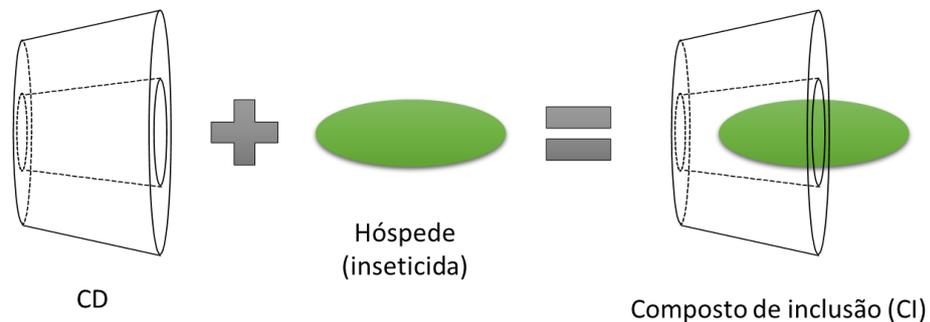
Dentre as CDs naturais, a β -CD é a mais utilizada em formulações farmacêuticas devido ao tamanho da sua cavidade e a melhor relação custo-benefício quando comparada com outras disponíveis comercialmente (NITALIKAR; SAKARKAR; JAIN, 2012). Essa substância, após administração oral, apresenta mínima absorção pelo trato gastrointestinal superior, sendo metabolizada apenas no ceco e cólon, porém apresenta certa restrição quanto à administração parenteral devido à sua nefrotoxicidade e atividade hemolítica (DEL VALLE, 2004).

As CDs naturais podem ser modificadas quimicamente através de diversas rotas sintéticas dando origem a CDs derivadas (PITHA et al., 1986; THOMPSON, 1997). Estas alterações conferem a elas vantagens como maior solubilidade e menor toxicidade parenteral (DUCHÊNE; WOUESSIDJEWÉ, 1990; PITHA; PITHA, 1985).

São inúmeras as características que fazem com que estes açúcares cíclicos sejam interessantes para alojar e transportar outros compostos, a saber: estrutura química conhecida, baixa toxicidade, cavidades de diferentes tamanhos, proteção dos compostos incluídos e razoável solubilidade em água (RAJEWSKI; STELLA, 1996; SZEJTLI, 1998; UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998).

Quando essas moléculas interagem com outros compostos, chamados “hóspedes”, aprisionando-os total ou parcialmente em seu interior, originando os denominados compostos ou complexos de inclusão. De acordo com o tamanho da cavidade, tamanho do hóspede e das possíveis interações entre eles podem ser formados complexos com as seguintes estequiometrias (CD:hóspede): 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 1:2, 2:2 ou 1:3, sendo a primeira a mais comum. Na formação destes complexos, as moléculas de água presentes na cavidade da CD hospedeira são trocadas pelas moléculas da substância hóspede, mais hidrofóbicas, obtendo uma associação mais estável energeticamente. Nenhuma ligação covalente é quebrada ou originada durante este processo (SZEJTLI, 1998; THOMPSON, 1997). Em resumo, os complexos de inclusão são estruturas formadas por duas ou mais moléculas, sendo que a molécula hospedeira, no caso a CD, inclui total ou parcialmente a molécula hóspede sem a ocorrência de ligações covalentes entre elas (Figura 9) (VEIGA, PECORELLI, RIBEIRO, 2006).

Figura 9. Esquema da formação do composto de inclusão.



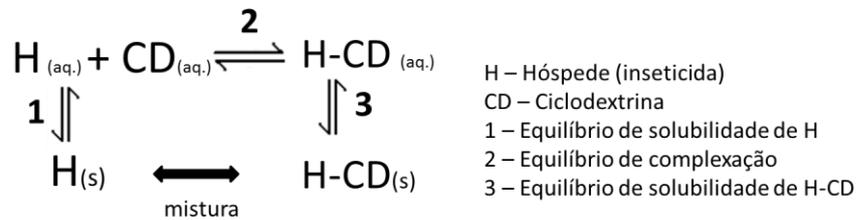
Fonte: A autora, 2015.

As moléculas de água presentes na cavidade da CD apresentam-se em elevado estado energético por não satisfazerem completamente seu potencial de formação de ligações de hidrogênio. Por essa razão, são facilmente substituídas por moléculas do hóspede com região apolar e de dimensões adequadas à cavidade. A liberação das moléculas de água durante a inclusão também gera um aumento da entropia do sistema, por ganharem liberdade rotacional e translacional (SZEJTLI, 1998; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

No processo de complexação, a constante de formação do complexo apresenta importância ímpar, pois através da mesma é possível inferir sobre o grau de afinidade entre as duas espécies. Alguns autores defendem que apenas compostos com constantes na faixa de 200 a 5000 poderiam ser utilizados comercialmente, pois as interações seriam fortes o suficiente para garantir a integridade das formulações, mas não tão fortes a ponto de impedir a dissociação no meio biológico e comprometer a atividade da molécula (PITHA; SZENTE, 1983).

Dentro da cavidade, a substância hóspede ajusta sua conformação devido às diversas interações intermoleculares. A ligação entre hóspede e hospedeiro caracteriza-se por um equilíbrio dinâmico, sendo sua dissociação fácil e rápida na presença de um grande volume de água (DEL VALLE, 2004).

O processo de complexação pode ocorrer de diferentes maneiras sendo que para preparações laboratoriais com espécies de baixa solubilidade predomina o método de coprecipitação (Figura 10), no qual a substância hóspede é adicionada a uma solução de CDs que se encontra sob agitação. Posteriormente, o complexo formado (Figura 10) é recolhido e o solvente removido, por exemplo, por liofilização (HEDGES, 1998).

Figura 10. Equilíbrio dinâmico de coprecipitação.

Fonte: A autora, 2015.

A formação destes complexos de inclusão provoca alterações em várias propriedades físico-químicas das moléculas hóspede, que facilitam suas aplicações em sistemas biológicos. Como exemplo de melhorias, é válido citar o aumento da solubilidade em água e em solventes orgânicos; aumento da estabilidade química (frente à degradação por oxidação, temperatura ou radiação ultravioleta); redução da pressão de vapor de substâncias voláteis; inibição do cheiro e/ou sabor e liberação modificada da substância (DEL VALLE, 2004; HEDGES, 1998; LOFTSSON; MÁSSON; BREWSTER, 2004; SZEJTLI, 1998). Devido a essas vantagens existem hoje no mercado inúmeros produtos/medicamentos que utilizam esta tecnologia. Alguns exemplos estão citados da tabela 2.

Tabela 2. Produtos comerciais que tiveram alguma característica melhorada com o uso de CDs.

Ativo	Ciclodextrina utilizada	Benefício alcançado
Capsaicina	HPβCD	Melhora da absorção percutânea
Vancomicina	Bcd	Novos mecanismo de liberação do antibiótico
Sulfametoxazol	HPβCD	Melhora da solubilidade
Albendazol	HPβCD	Melhora da solubilidade e da farmacocinética
Nicotina	βCD	Melhora das características organolépticas
Praziquantel	βCD	Melhora da solubilidade e da atividade
Valsartan	HPβCD	Melhora da solubilidade e estabilidade
Óleo de peixe ou vegetais	βCD	Melhora das características organolépticas
Triclosan	βCD	Aumento da disponibilidade

Fonte: Adaptado, CHOWDARY, SHANKAR; TANNIRU, 2014; VENTURINI et al., 2008.

As CDs podem aumentar a permeabilidade do hóspede através de mucosas devido a maior disponibilidade do hóspede livre na superfície de absorção, fato que pode aumentar a absorção de substâncias pouco solúveis, intensificando a atividade das mesmas (ZUO et al., 2000; CHOI et al., 2001). Isto pode resultar em um aumento da atividade biológica, possibilitando uma redução na dosagem a ser utilizada (DEL VALLE, 2004; GARNERO et al., 2010).

Diante do exposto, o desenvolvimento de tecnologias focadas na racionalização do uso de inseticidas ou outras moléculas, com possibilidade de redução da dose utilizada ou que apresentem novos mecanismos de ação possibilitando minimização da resistência e do impacto ambiental constitui um grande desafio para a indústria de pesticidas. Nesse sentido, a modificação de moléculas pela preparação de compostos de inclusão ampliam as possibilidades de desenvolvimento de formulações que possam atender essas expectativas.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar novas composições nanoestruturadas de inseticidas e avaliá-las frente aos estádios larvais do vetor da dengue, bem como avaliar a segurança dessas nanocomposições frente a fibroblastos humanos.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar os compostos de inclusão de novaluron, diflubenzuron e abamectina em β CD;
- Avaliar as interações intermoleculares entre as ciclodextrinas e os inseticidas no estado sólido;
- Avaliar as interações intermoleculares entre as ciclodextrinas e os inseticidas em solução;
- Avaliar o efeito das ciclodextrinas na estabilidade térmica dos compostos;
- Avaliar o efeito das ciclodextrinas na formação de nanoprecipitados hidrofóbicos em mistura de solvente;
- Avaliar a atividade larvicida dos compostos de inclusão e seus precursores frente às larvas do *Aedes aegypti* nos diferentes estádios/estágios larvais;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos de inclusão utilizando métodos de viabilidade celular.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

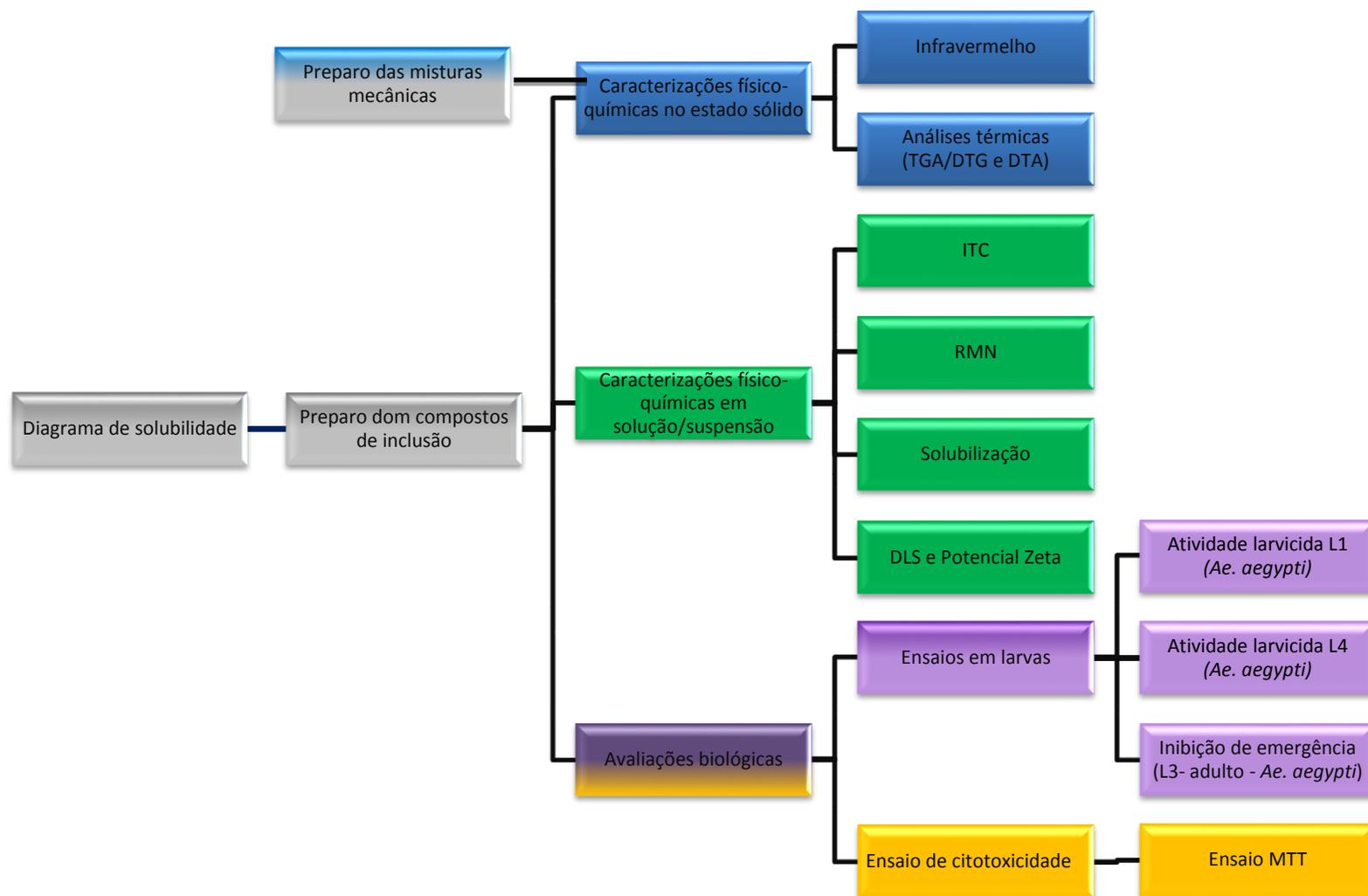
3.1 – MATERIAIS

A abamectina utilizada foi cedida pelo Departamento de Ciências Naturais de São João Del-Rei (pureza 95,73% B_{1a} e 1,99% B_{1b}). O novaluron (pureza 95,2%) e o diflubenzuron (pureza 96,00%) foram extraídos e purificados a partir das formulações comerciais (Mosquilon® - Bayer) e (Dimilin® - Chemtura), respectivamente. A pureza desses produtos foi determinada por HPLC comparando com padrões de novaluron e diflubenzuron adquiridos da Sigma-Aldrich. Mais informações sobre a obtenção, caracterização e pureza desses produtos podem ser encontradas no Apêndice A. A β -ciclodextrina (β CD) foi adquirida da Sigma-Aldrich. Os solventes foram adquiridos de empresas idôneas (Vetec, Synth e J.T. Baker) com pureza para fins analíticos (P.A.).

3.2 – MÉTODOS

Na figura 11 está apresentado um fluxograma das etapas executadas nesse trabalho. Após a obtenção das substâncias puras e seus respectivos compostos de inclusão, o trabalho foi dividido em três etapas, a saber:

- Caracterização físico-química no estado sólido;
- Caracterização físico-química em solução/suspensão; e
- Ensaio biológicos.

Figura 11. Fluxograma dos experimentos.

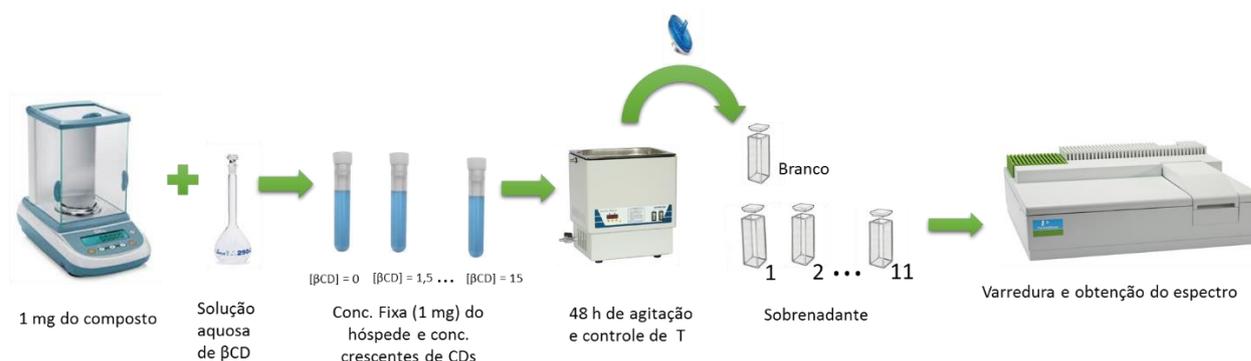
Fonte: A autora, 2016.

3.2.1 – Diagrama de solubilidade

Os diagramas de solubilidade das moléculas hóspede (novaluron, diflubenzuron e abamectina) em água, na presença de β CD foram obtidos usando o procedimento estabelecido por Higuchi & Connors, o qual está descrito a seguir (HIGUCHI; CONNORS, 1965).

Em tubos de ensaio (11 tubos) de 10 mL foi adicionado 1 mg do composto hóspede. Em seguida, adicionou-se um volume pré-definido da solução estoque de β CD (15 mM) em água Milli-Q. O volume final no tubo foi ajustado para 3 mL com água Milli-Q. A concentração de β CD nos tubos variou de 0 a 15 mM. Essas suspensões foram colocadas em um banho termostático com agitação a $30,0 \pm 0,1$ °C, durante 48 horas para se garantir o equilíbrio termodinâmico de dissolução. Após este período, o sobrenadante foi filtrado utilizando um filtro Millipore® 0,22 μ m e transferido para cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. A quantidade da molécula hóspede no sobrenadante foi dosada utilizando espectrofotômetro UV-Vis, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25, contendo acessório de troca automática para oito amostras, acoplado a um banho termostático peltier (20 °C – 60 °C) e gerenciado pelo *software* UV WinLab. O branco utilizado nesse ensaio foi água Milli-Q. Após a obtenção dos espectros, os dados foram transferidos e editados no programa Microcal Origin 8.0. Na figura 12 está apresentada uma representação esquemática do experimento.

Figura 12. Esquema do experimento para obtenção dos diagramas de solubilidade.



Fonte: A autora, 2015.

3.2.2 - Preparação dos compostos de inclusão

Os compostos de inclusão foram preparados usando quantidades equimolares da molécula hóspede e β CD pelos métodos de co-precipitação/liofilização com adaptações

(CAO; GUO; PING, 2005; CHOWDARY; SHANKZR; TANNIRU, 2014; PATIL et al., 2010). O roteiro utilizado está descrito a seguir e esquematizado na figura 13.

Em béqueres separados foram solubilizadas a molécula hóspede e a β CD utilizando, respectivamente, 15 mL de etanol e 35 mL de água. Em seguida, a solução da molécula hóspede foi vertida para o béquer contendo a solução aquosa de β CD, sob agitação, e a suspensão formada permaneceu assim por 24h. Depois, essa suspensão foi rotaevaporada para retirada do etanol e, por fim, congelada e submetida à liofilização para obtenção do composto de inclusão desejado.

Figura 13. Esquema de preparação dos compostos de inclusão com ciclodextrinas.



Fonte: A autora, 2015.

3.2.3 – Preparo das misturas mecânicas

As misturas mecânicas foram preparadas usando quantidades equimolares da molécula hóspede e β CD, sendo os sólidos, após pesagem, levemente homogeneizados em gral de ágata com auxílio de pistilo. Posteriormente, as misturas foram acondicionadas em tubos *ependorf*® e armazenadas em geladeira. Na figura 14 está apresentada uma representação esquemática da preparação.

Figura 14. Esquema de preparação das misturas mecânicas (MM).



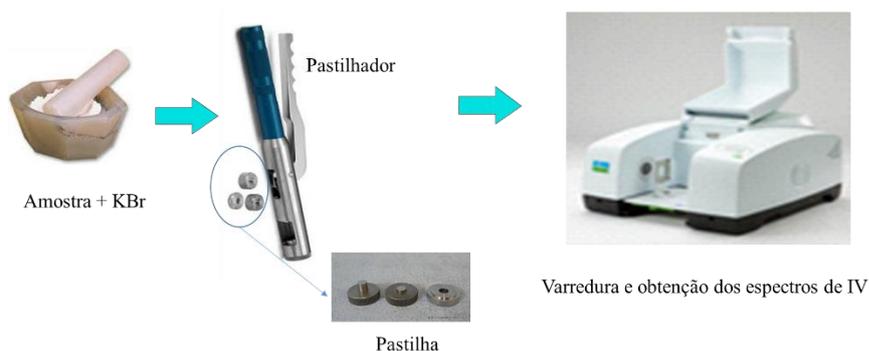
Fonte: A autora, 2015.

3.2.4 – Caracterização físico-química dos compostos de inclusão no estado sólido

3.2.4.1 – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) dos compostos puros, da β CD, das misturas mecânicas (MM) e dos compostos de inclusão (CI's) foram registrados em um equipamento da Perkin Elmer, com transformada de Fourier, modelo Spectrum Two TM, a partir de pastilhas contendo KBr. Os espectros foram obtidos como a média de 16 varreduras consecutivas, com resolução de 2 cm^{-1} e intervalo de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . Para a aquisição e processamento dos espectros foi utilizado o programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). A figura 15 representa o esquema do experimento. Os dados foram exportados para o Microcal Origin 8.0 para edição.

Figura 15. Esquema do experimento para obtenção dos espectros de infravermelho.



Fonte: A autora, 2015.

3.2.4.2 - Análises térmicas: termogravimetria (TGA) e análise térmica diferencial (DTA)

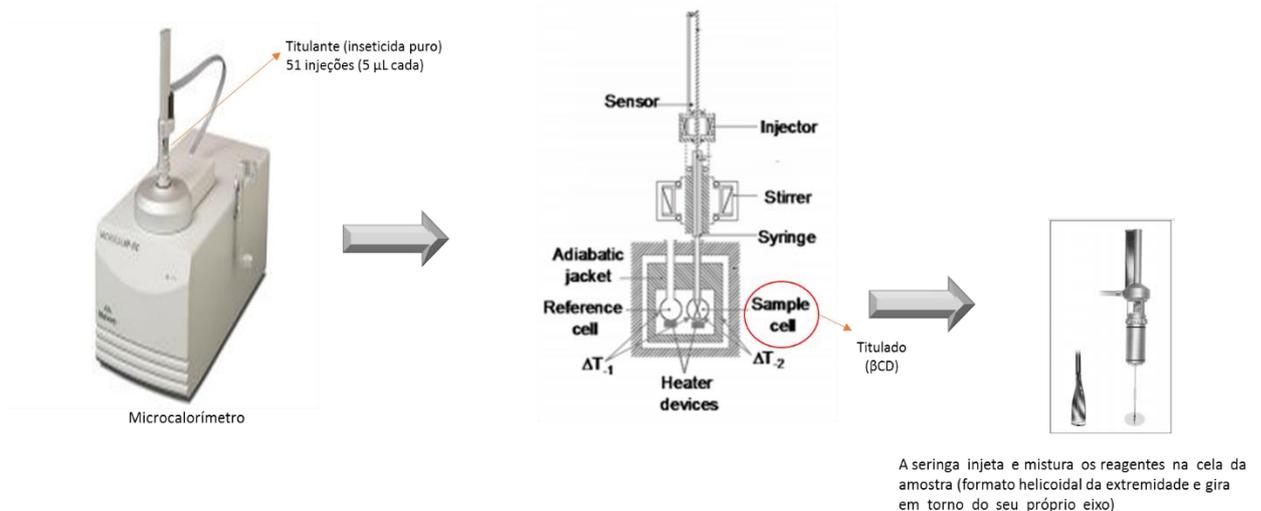
As análises térmicas para os compostos puros, a ciclodextrina, as misturas mecânicas e os compostos de inclusão foram realizados por colaboradores no Departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ). O equipamento DTG 60/60H da Shimadzu foi utilizado na aquisição das curvas TGA e DTA. Na referência foi utilizado o cadinho de alumina vazio. As análises foram realizadas em atmosfera de N_2 a 50 mL/min , com rampa de temperatura de 30 a $700\text{ }^\circ\text{C}$ e uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C/min}$ com massa aproximada de $3,5\text{ mg}$ do composto a ser analisado em cadinho de alumina. Os dados foram exportados para o Microcal Origin 8.0 para edição.

3.2.5 – Caracterização físico-química dos compostos de inclusão em solução/suspensão

3.2.5.1 – *Titulações calorimétricas isotérmicas*

Os parâmetros físico-químicos envolvidos na formação dos compostos de inclusão em solução foram determinados a partir da titulação calorimétrica isotérmica envolvendo o sistema molécula hóspede e β CD, a 25°C. O experimento foi realizado utilizando um Microcalorímetro VP-ITC da Microcal (figura 16) e os seguintes parâmetros experimentais: rotação de 300 rpm, tempo de injeção de 2 s, tempo de equilíbrio de 5 min, 51 injeções automáticas de 5 μ L de titulante em 1,5 mL do titulado. A primeira injeção de 1 μ L foi descartada a fim de eliminar os efeitos de difusão de material da seringa para a cela e vice-versa. O titulante consistiu na solução da molécula hóspede a 30 mM em DMSO:H₂O (90:10 v/v). Já o titulado foi a solução de β CD a 2 mM no mesmo solvente. Os experimentos de referência (branco) consistiram de titulação da molécula hóspede a 30 mM em 1,5 mL de DMSO:H₂O (90:10 v/v). Após os experimentos, as curvas de titulação foram subtraídas dos respectivos brancos afim de se eliminar matematicamente os efeitos de interação dos compostos com o solvente. Os experimentos foram realizados em duplicata e o tratamento dos dados executado com o auxílio do programa Microcal Origin 6.0.

Figura 16. Representação esquemática do Microcalorímetro VP-ITC da Microcal.



Fonte: A autora, 2016.

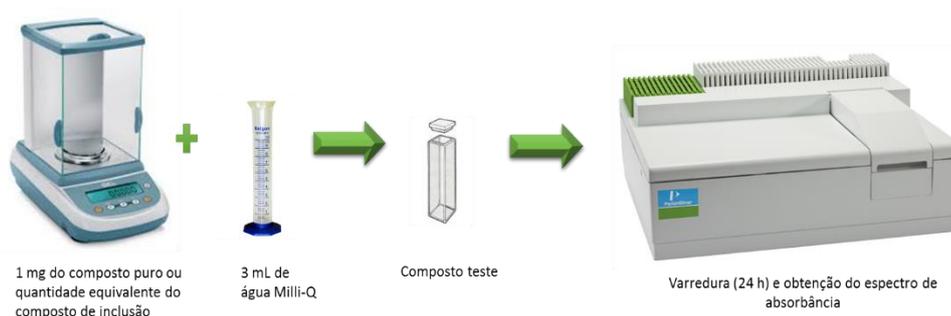
3.2.5.2 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN de ^1H e ROESY dos compostos puros, da βCD e dos compostos de inclusão foram realizadas por colaboradores do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Os espectros foram adquiridos utilizando um espectrômetro Bruker DRX400 – série *AVANCE*, a 400 MHz. As amostras foram dissolvidas em $\text{DMSO-}d_6$ sem TMS. Os espectros foram editados utilizando o programa MestReC[®].

3.2.5.3 – Estudo cinético de solubilização

Neste experimento, 1,0 mg do composto puro ou quantidade molar equivalente de seu composto de inclusão foram pesados em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e, em seguida, adicionou-se 3 mL de água Milli-Q. Os espectros eletrônicos para cada sistema foram adquiridos na região de 400-200 nm a cada 15 minutos durante um intervalo de 24 horas, contabilizando 97 ciclos. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro UV-vis, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25. Todas as medidas foram realizadas a 30 °C. O branco utilizado foi água Milli-Q. Após a obtenção dos espectros, os dados foram transferidos e editados no programa Microcal Origin 8.0. Na figura 17 está apresentada uma representação esquemática do experimento.

Figura 17. Esquema do experimento para avaliação da solubilidade a partir dos espectros eletrônicos das substâncias puras e seus respectivos compostos de inclusão.



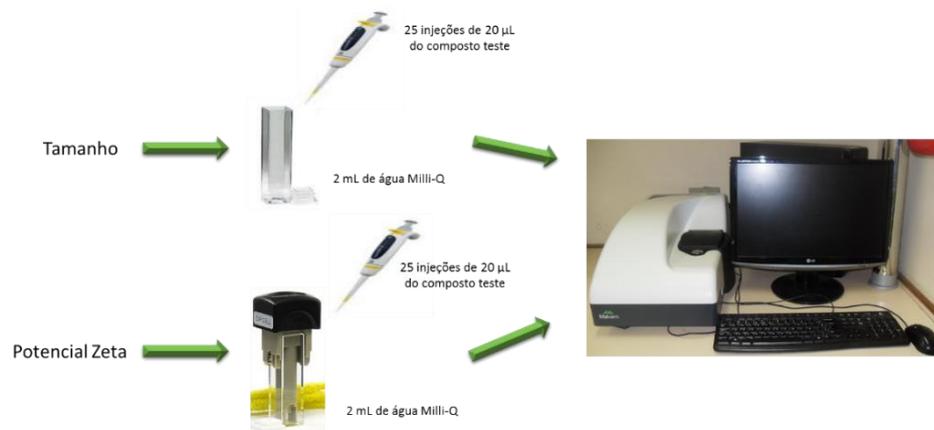
Fonte: A autora, 2016.

3.2.5.4 – Análise por espalhamento de luz (DLS) e potencial zeta (ZP)

O caráter nanométrico dos compostos puros e seus respectivos compostos de inclusão foi avaliado por medidas de tamanho de partículas (diâmetro hidrodinâmico – D_h) por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Os experimentos foram realizados em um módulo fotométrico de DLS, Zetasizer Nano ZS90 da Malvern, a 25 °C, com termostatização via sistema Peltier. As amostras foram inseridas em cubeta de polietileno de 1 cm de caminho óptico, padrão Malvern, e submetidas a um feixe de luz monocromático (Laser He-Ne de 4 mW e comprimento de onda de 633 nm), com intensidade de luz espalhada medida a um ângulo de 90°. O Diâmetro hidrodinâmico (D_h) foi determinado pela média de cinco medidas independentes, cada uma delas obtida a partir da média de 5 contagens. Neste caso, foram pesados 1 mg do composto puro e quantidade equimolar do composto de inclusão e ambos solubilizados em 500 μ L de DMSO cada. A seguir, foram realizadas 25 injeções de 20 μ L da solução em 2 mL de água Milli-Q. O tratamento dos dados foi executado com o auxílio do programa Microcal Origin 8.0.

Para determinação da energia potencial normalizada pela carga superficial das partículas ou potencial zeta (ZP) foram utilizadas suspensões similares às utilizadas no experimento de tamanho hidrodinâmico citado acima. Cada uma das suspensões foi vertida em uma cubeta de vidro, a qual é imersa a célula de medida (Dip Cell) e avaliada pelo módulo Zetasizer Nano-ZS 90 através da técnica de micro-eletoforese laser-doppler (MELD), com ângulo de espalhamento de luz a 173° e DDP alternada 10 V, a partir dos valores de mobilidade eletroforética, calculado pelo modelo de Smoluchowski. Assim como o diâmetro hidrodinâmico, o valor final do potencial zeta foi calculado como a média de 5 medidas independentes com 5 contagens cada e o tratamento dos dados executado com o auxílio do programa Microcal Origin 8.0. Na figura 18 está apresentada uma representação esquemática do experimento.

Figura 18. Representação esquemática dos experimentos de tamanho hidrodinâmico e Potencial Zeta das substâncias puras e seus respectivos compostos de inclusão.



Fonte: A autora, 2016.

3.2.6 – Análises biológicas

3.2.6.1 - Bioensaios envolvendo larvas do mosquito *Aedes aegypti*

3.2.6.1.1 - Obtenção das larvas

Os ovos de *Aedes aegypti*, doados pelo Professor Gustavo Ferreira Martins do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, foram colocados para eclodir em bacias plásticas com dimensões de 30 x 20 x 7 cm contendo 2 L de água declorada, em ambiente climatizado (ver esquema Figura 19). Após 24 h foram obtidas as larvas de 1º estágio (L1) que foram transferidas para outra bacia, onde se adicionou 2 L de água declorada e aproximadamente 118 mg de alimento (ração de peixe GoldFish®). A partir daí, a água foi trocada diariamente fazendo reposição do alimento até os indivíduos atingirem o estágio de desenvolvimento necessário para cada teste descrito a seguir.

Figura 19. Esquema de obtenção das larvas de *Aedes aegypti*.



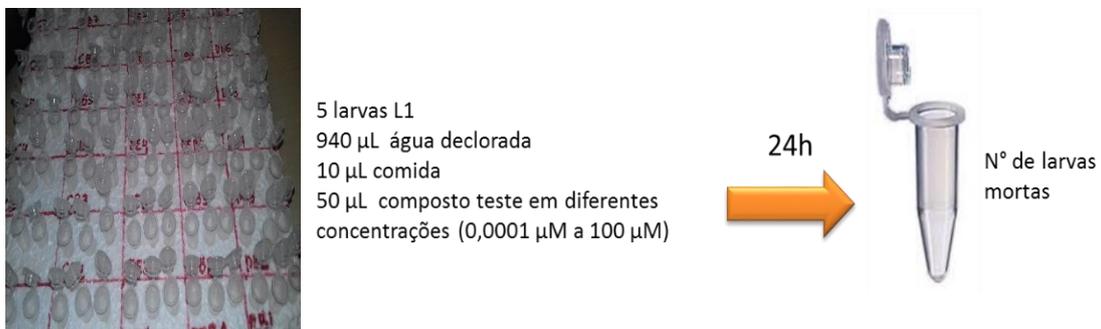
Fonte: A autora, 2015.

3.2.6.1.2 - Avaliação da atividade frente ao estágio L1 de larvas do mosquito *Aedes aegypti*

A avaliação da atividade larvicida frente ao estágio L1 para a abamectina e seu composto de inclusão foi realizada utilizando uma adaptação do método desenvolvido por Pridgeon e colaboradores (PRIDGEON et al., 2009). Esse é um teste rápido, de triagem para identificar o potencial larvicida dos compostos.

Cinco larvas no estágio L1 (24 h após a eclosão dos ovos) foram adicionadas em um tubo *ependorf*® juntamente com 940 μL de água deionada e 10 μL de uma suspensão de comida. Em seguida, foram adicionados 50 μL do composto de tal forma que a solução final ($V = 1.000 \mu\text{L}$) tivesse a concentração desejada do composto teste e 1% (v/v) de DMSO. A curva dose-resposta foi construída utilizando sete concentrações que variam de 0,0001 μM a 100 μM (100 μM , 10 μM , 1 μM , 0,1 μM ; 0,01 μM , 0,001 μM e 0,0001 μM em DMSO 1%). Após 24 h de exposição ao composto, o número de larvas mortas foi registrado sendo considerada mortas aquelas que não apresentaram movimento ou não responderem aos estímulos externos (figura 20). Para cada concentração, três experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os resultados dos testes foram submetidos à análise estatística PROBIT pelo programa GraphPad Prism 5.0, para determinar a dose letal a 50% da população, DL_{50} . Como controle negativo foi utilizado água, βCD e a solução de DMSO 1%. Nesses testes foram adotados os cuidados preconizados por Silva, Silva e Lira (1998), ou seja, manuseadas apenas larvas com tegumento escuro e cápsula cefálica bem visível.

Figura 20. Representação esquemática do experimento larvicida L1.



Fonte: A autora, 2015.

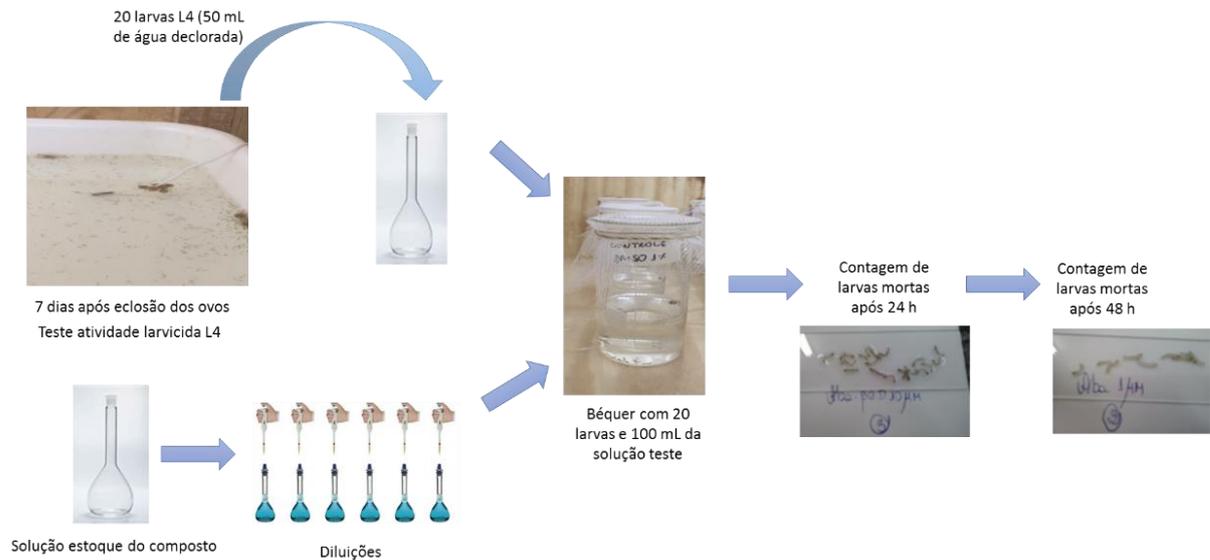
3.2.6.1.3 - Avaliação da atividade frente ao estágio L4 de larvas do mosquito *Aedes aegypti*

A avaliação da atividade larvicida da abamectina e seu composto de inclusão no estágio L4 foi realizada através de uma adaptação do método recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005).

Quantidades equimolares do composto puro e seu respectivo composto de inclusão foram pesadas e diluídas em solução de DMSO obtendo uma solução estoque. A partir desta solução foram realizadas diluições dando origem às soluções de trabalho. Em seguida, 20 larvas no estágio L4 de desenvolvimento do *Aedes aegypti* foram transferidas com o auxílio da pipeta de Pasteur para um balão volumétrico e o volume ajustado para 50 mL com água. Posteriormente, o material foi transferido para um béquer de 250 mL e adicionados 50 mL de solução do composto em concentrações definidas para um volume final de 100 mL gerando as concentrações teste (100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M; 0,01 μ M e 0,001 μ M em DMSO 1%). Após 24h e 48 h de exposição das larvas ao tratamento, o número de larvas mortas foi registrado sendo consideradas mortas aquelas que não apresentaram movimento ou não responderam aos estímulos externos. Para cada concentração, três experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os resultados dos testes foram submetidos à análise estatística PROBIT pelo programa GraphPad Prism 5.0, para determinar a dose letal a 50% da população, DL₅₀. Os gráficos de % mortalidade x concentração foram construídos no programa GraphPad Prism 5.0. Como controle negativo foi utilizado água, β CD e a solução de DMSO 1%. Na figura 21 está apresentada uma representação esquemática do experimento.

Os dados do teste foram utilizados somente quando durante a realização do teste menos que 10% das larvas se tornaram pupas e a mortalidade no controle foi inferior a 20% atendendo assim, às recomendações preconizadas pela literatura (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Figura 21. Representação esquemática do experimento larvicida L4.



Fonte: A autora, 2016.

3.2.6.1.4 - Avaliação da inibição de emergência (IE) em larvas do mosquito *Aedes aegypti*

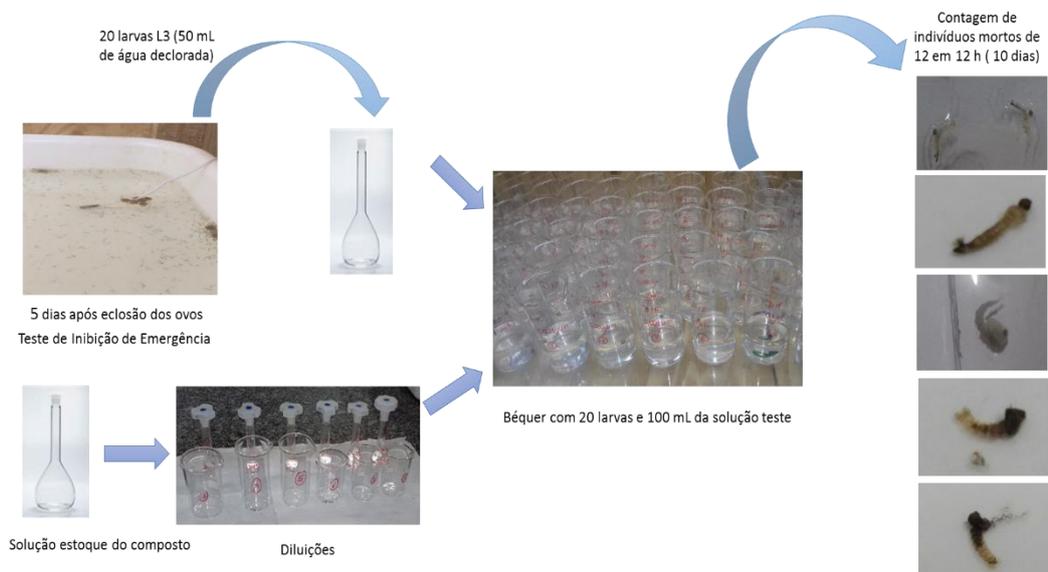
A avaliação da inibição de emergência para as benzoilfeniluréias e seus respectivos compostos de inclusão foi realizada através de uma adaptação do método recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005).

Quantidades equimolares dos compostos puros e seus respectivos compostos de inclusão foram pesadas e diluídas em solução de DMSO obtendo uma solução estoque. A partir desta solução foram realizadas diluições dando origem às soluções de trabalho. Em seguida, 20 larvas no estágio L3 de desenvolvimento do *Aedes aegypti* foram transferidas com o auxílio da pipeta de Pasteur para um balão volumétrico e o volume ajustado para 50 mL com água. Posteriormente, o material foi transferido para um bêquer de 250 mL e adicionados 50 mL de solução do composto em concentrações definidas para um volume final de 100 mL gerando as concentrações teste (1 μM , 0,1 μM ; 0,01 μM , 0,001 μM , 0,00001 μM e 0,000001 μM em DMSO 1%). A mortalidade foi verificada em intervalos de 12 em 12 horas, sendo o número de indivíduos mortos registrado. Foram considerados mortos aqueles que não apresentaram movimento ou não responderam aos estímulos externos. Devido ao mecanismo de ação desses inseticidas a mortalidade foi acompanhada até a emergência de todos os adultos no controle (média de 10 dias após as larvas entrarem no estágio L3). Todos aqueles que estavam mortos ou apresentaram deformações foram considerados afetados para o cálculo da porcentagem de inibição de emergência. Para cada concentração, três experimentos

independentes foram realizados em triplicata. Os resultados dos testes foram submetidos à análise estatística PROBIT pelo programa GraphPad Prism 5.0, para determinar a inibição de emergência a 50% da população, IE_{50} . Os gráficos de porcentagem de inibição de emergência (%IE) em função da concentração ou log (concentração) foram construídos no GraphPad Prism 5.0. Como controle negativo foi utilizado água, β CD e a solução de DMSO 1%. Na figura 22 está apresentada uma representação esquemática do experimento.

Os dados do teste foram utilizados somente quando, durante a realização do teste, a emergência de adultos no controle foi superior a 80%. Quando o percentual de emergência ficou no intervalo de 80% a 95% os dados foram corrigidos pela fórmula de Abbott, atendendo às recomendações da literatura (WHO, 2005).

Figura 22. Representação esquemática do experimento de Inibição de Emergência.



Fonte: A autora, 2016.

3.2.6.2 – Ensaio de citotoxicidade

3.2.6.2.1 - Método MTT (viabilidade celular)

A citotoxicidade das novas composições de inseticidas foi avaliada através do ensaio que utiliza o corante brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil (MTT) para verificar a viabilidade celular. A técnica baseia-se na avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais, as quais clivam e reduzem o anel tetrazólio do MTT (corante amarelo e solúvel

em água) a formazan (cristais com coloração violeta e insolúveis em água), que é impermeável às membranas celulares, acumulando-se no interior das células saudáveis.

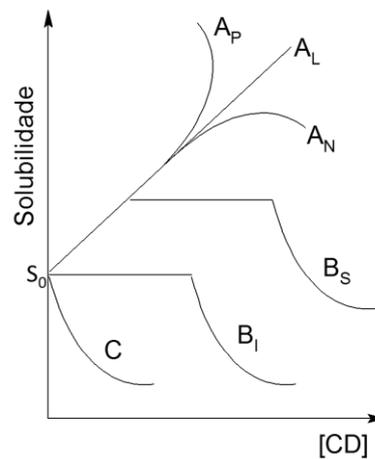
As análises dos compostos puros e seus respectivos compostos de inclusão foram realizadas por colaboradores do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foram realizados dois ensaios independentes utilizando quatro replicatas por concentração em cada ensaio. Foram utilizadas linhagens de células de fibroblastos WI26UA4 enriquecidas com meio de cultura EMEM. As células foram cultivadas para a replicação e após atingirem uma confluência adequada, foram colocadas em placas de 96 poços (5×10^3 células). As células foram mantidas durante 48 h a 37 °C em uma atmosfera contendo 5% CO₂ com meio de cultura EMEM suplementado com bicarbonato de sódio, L-glutamina e de soro fetal bovino estéril (10% (v/v)). Em seguida, cada amostra plaqueada foi dissolvida no meio de cultura com concentrações variáveis na faixa de 0,001 μM a 500 μM do composto teste, para um volume final de 100 μL por poço e as placas foram incubadas novamente durante 48 h a 37 °C em uma atmosfera contendo 5% CO₂. Por fim, o MTT foi utilizado para determinar a viabilidade celular e os resultados foram plotados de acordo com a porcentagem da viabilidade celular x concentração molar da amostra, utilizando-se o programa GraphPad Prism 6.0.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE FASE

Uma das primeiras estratégias para se avaliar a interação entre a molécula hóspede e a matriz (β CD) consiste no experimento de solubilidade. Essa técnica permite avaliar como a solubilidade da molécula hóspede é afetada pela adição da β CD (LOFTSSON; BREWSTER, 1996), conforme proposto por Higuchi e Connors (Figura 23) (HIGUCHI; CONNORS, 1965).

Figura 23. Diagrama de solubilidade de Higuchi e Connors, onde S_0 é a solubilidade intrínseca do hóspede sozinho.



Fonte: Adaptado por DENADAI (2005), UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998.

De acordo com a figura 23, as curvas podem ser classificadas como (HIGUCHI; CONNORS, 1965):

- tipo A - o complexo formado é solúvel, aumentando sua solubilidade com a elevação da concentração de ciclodextrina. Está subdividido em: A_L , quando a solubilidade do hóspede aumenta linearmente com a concentração de ciclodextrina; A_P , a solubilidade sofre um desvio positivo indicando que mais de uma molécula de ciclodextrina está envolvida na complexação; e A_N , a solubilidade sofre um desvio negativo devido a contribuição significativa de interações soluto-solvente para a complexação;

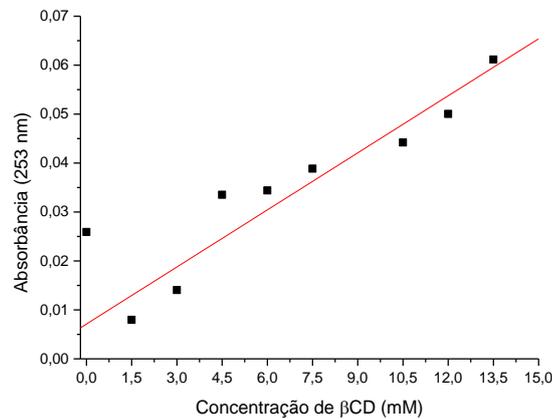
- tipo B - o complexo formado apresenta solubilidade aquosa limitada. Está subdividido em: B_S , quando inicialmente ocorre um aumento da solubilidade seguida por uma região onde a solubilidade não mais aumenta, devido à formação de precipitado e posterior redução da solubilidade em decorrência da formação de complexo pouco solúvel de estequiometria

diferente daquela encontrada nas regiões crescente e constante; e B_I: não há aumento de solubilidade, indica estabilização inicial da solubilidade com consequente redução da mesma devido à precipitação do complexo em água.

- tipo C - o complexo formado apresenta menor solubilidade aquosa do que na forma livre, havendo precipitação do complexo desde o início.

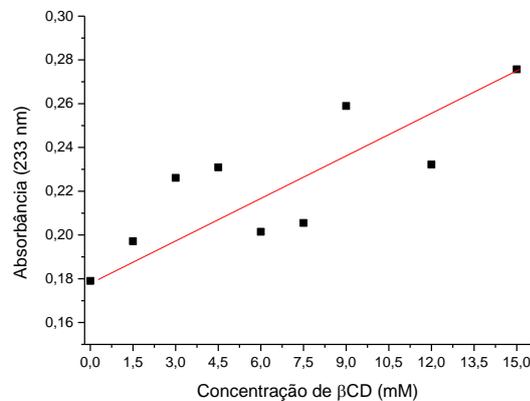
Nas Figuras 24, 25 e 26 estão representadas as curvas de solubilidade do novaluron (NOV), diflubenzuron (DIF) e abamectina (ABA), respectivamente, na presença de concentrações crescentes de β CD, à temperatura controlada de 30°C. Na ordenada, tem-se a absorvância dos compostos no comprimento de onda máximo informado em cada gráfico.

Figura 24. Curva de solubilidade do NOV em concentrações crescentes de β CD.



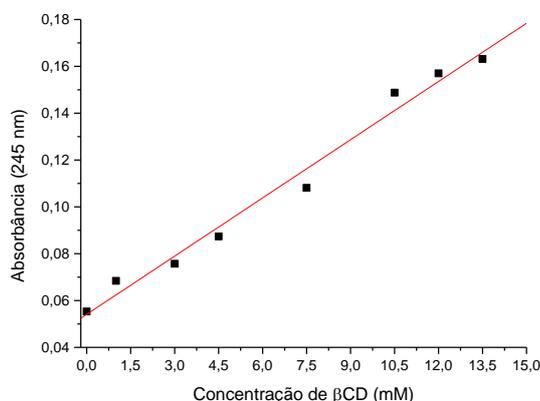
Fonte: A autora, 2015.

Figura 25. Curva de solubilidade do DIF em concentrações crescentes de β CD.



Fonte: A autora, 2015.

Figura 26. Curva de solubilidade da ABA em concentrações crescentes de β CD.



Fonte: A autora, 2015.

Para todos os compostos, observa-se uma tendência de ligeiro aumento da solubilidade com a concentração, apesar da baixa correlação dos pontos em alguns casos. Com base nos diagramas de solubilidade propostos por Highuchi e Connors, pode-se dizer que os sistemas apresentam perfis de solubilidade do tipo A.

Esses dados sugerem que a contribuição hidrofílica da β CD é ligeiramente superior à contribuição hidrofóbica dos compostos livres provavelmente pela saída de água da cavidade da ciclodextrina e entrada de grupos hidrofóbicos das moléculas hóspedes.

Considerando que mesmo na presença de β CD a solubilidade dos compostos foi baixa, foi proposto que os compostos de inclusão fossem preparados pelos métodos da co-precipitação seguido por liofilização, uma vez que são técnicas simples para uso em pequena escala e com alto rendimento (AGUIAR et al., 2014; CARRIER; MILLER; AHMED, 2007).

4.2 – CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO

Os compostos de inclusão obtidos pelo método da co-precipitação/liofilização foram caracterizados no estado sólido, por espectroscopia na região do infravermelho e análises térmicas. Em solução, foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e ROESY. Também em solução/suspensão, as interações entre os compostos hóspedes com a β CD foram verificadas por titulação calorimétrica isotérmica (ITC), análise cinética de solubilização, titulações por espalhamento de luz dinâmico (para se medir o diâmetro hidrodinâmico - D_h) e titulações por potencial zeta.

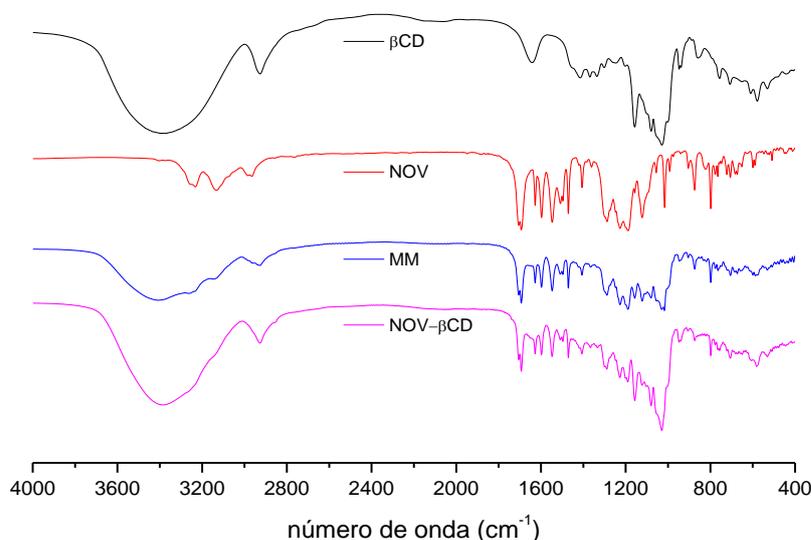
4.2.1 – Espectroscopia na região do infravermelho - FTIR

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) é uma técnica capaz de detectar as variação do momento de dipolo elétrico das ligações químicas em virtude de seus movimentos vibracionais ou rotacionais. A técnica é sensível aos diferentes tipos de vibrações entre átomos de uma molécula de acordo com suas ligações interatômicas, sendo utilizada para a identificação de grupos funcionais em compostos orgânicos, inorgânicos, organometálicos, tanto no estado líquido quando no estado sólido (cristalino ou amorfo) (CANTOR; SCHIMMEL, 1980; FORATO et al., 1998; 2010).

No caso dos compostos de inclusão, a penetração de grupos funcionais de moléculas hóspede na cavidade das ciclodextrinas gera uma série de novas interações intermoleculares, as quais alteram a distribuição eletrônica sobre os núcleos atômicos envolvidos. Como consequência, o momento de dipolo das ligações ou grupos funcionais podem sofrer alterações, se refletindo no espectro de FTIR como aumento ou redução das bandas. Outro efeito que pode ocorrer em decorrência das interações é a restrição ou intensificação do movimento vibratório, que se reflete no espectro de FTIR como deslocamentos das bandas (DENADAI et al., 2006, 2007; SUAREZ et al., 2014). Diante do exposto, foram identificadas as interações entre as moléculas hóspedes e a β CD através da comparação dos espectros de FTIR das moléculas livres, das misturas mecânicas e dos compostos de inclusão.

Na figura 27 estão apresentados os espectros de infravermelho de β CD, NOV, mistura mecânica (MM) e o composto de inclusão (NOV- β CD) na região de 4000 a 400 cm^{-1} . A mistura mecânica foi preparada para demonstrar que o produto obtido (composto de inclusão) apresenta características físico-químicas diferentes do que apenas uma mistura dos dois componentes isolados, sendo necessário um tempo de contato entre as espécies em solução, para que a interação ocorra.

Figura 27. Espectros de infravermelho da β CD, NOV, MM e NOV- β CD na região 4000 a 400 em KBr.



Fonte: A autora, 2015.

No espectro da β CD podemos observar suas bandas características, sendo elas: uma banda associada aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação O-H ($\nu_{(O-H)}$) com mínimo em 3371 cm^{-1} ; uma banda em 1650 cm^{-1} associada a deformações $\delta_{(O-H)}$ de moléculas de água de hidratação e bandas em torno de 1158 cm^{-1} e 1028 cm^{-1} associadas aos estiramentos $\nu(\text{C-O-C})$, $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{O-C-H})$, $\delta(\text{C-C-H})$, $\delta(\text{C-C-O})$ observada para a maioria dos sacarídeos e atribuída às vibrações do anel da piranose e aos estiramentos assimétricos das ligações glicosídicas (EGYED, 1990).

No espectro do NOV pode-se observar bandas com mínimo em 3234 cm^{-1} e 3126 cm^{-1} , características do estiramento das ligações N-H; bandas em 1706 cm^{-1} e 1692 cm^{-1} , que caracterizam o estiramento das ligações C=O, estando a última relacionada à amida secundária; bandas na região entre 1600 e 1400 cm^{-1} que caracterizam presença de anel aromático e bandas na região de 1400 a 1200 cm^{-1} atribuídas aos CF_2 e CF_3 (SILVERSTEIN; BOSSLER; MORRIL, 1994).

Na MM não ocorreram mudanças significativas nas posições das principais bandas observadas para o NOV e a β CD isolados (Tabela 3), sendo que o perfil observado é justificado pela sobreposição das bandas oriundas do NOV e da β CD (Figura 27).

No composto NOV- β CD mudanças significativas ocorrem no perfil das bandas no espectro de infravermelho, tais como: afinamento da banda de β CD a 3386 cm^{-1} (referente às hidroxilas), devido à formação de um novo padrão de ligações de hidrogênio;

desaparecimento da banda a 1650 da β CD; atenuação de bandas do NOV em torno de 1118 cm^{-1} e mudança no perfil das bandas na região de 1200 a 900 cm^{-1} associadas a β CD. Estas alterações sugerem que o composto de inclusão foi realmente formado, pois a presença do NOV no interior da β -CD promove a saída de moléculas de água e, conseqüentemente, reduz o número de ligações de hidrogênio como o açúcar.

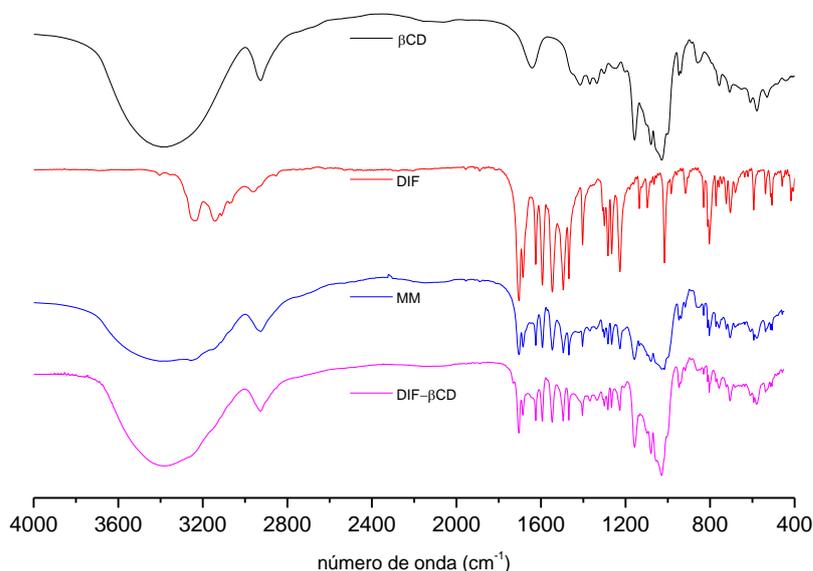
Tabela 3. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho de β CD, NOV, MM e NOV- β CD.

Composto	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=O})$	Vibração do anel piranose
β CD	3371	-	-	1158;1028
NOV	-	3234; 3126	1706; 1692	--
MM	3408	3234; 3126	1705; 1693	1157; 1029
NOV- β CD	3386	3234; 3143	1706; 1693	1157;1030

Fonte: A autora, 2015.

Na figura 28 estão apresentados os espectros de infravermelho da β CD, DIF, MM e o composto de inclusão (DIF- β CD) na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

Figura 28. Espectro de infravermelho do DIF, β CD, MM e DIF- β CD na região 4000 a 400 em KBr.



Fonte: A autora, 2015.

No espectro do DIF podem-se observar bandas com mínimo em 3233 cm^{-1} e 3142 cm^{-1} , características do estiramento das ligações N-H; bandas em 1705 cm^{-1} e 1685 cm^{-1} , que caracterizam o estiramento das ligações C=O; bandas na região entre 1600 e 1400 cm^{-1} que

caracterizam presença de anel aromático; bandas na região de 1400 a 1000 cm^{-1} atribuídas a ligação C-F, bem como bandas na região de 800 a 600 atribuídas a ligação C-Cl (SILVERSTEIN; BOSSLER; MORRIL, 1994).

Na MM não ocorreram mudanças significativas nas posições das principais bandas observadas para o DIF e a β CD isolados (Tabela 4), sendo que o perfil observado é justificado pela sobreposição das bandas oriundas de ambos os compostos em separado (Figura 28).

No composto DIF- β CD mudanças significativas ocorrem no perfil das bandas no espectro de infravermelho, tais como: intensificação da banda a 3379 cm^{-1} e desaparecimento da banda a 1650 da β CD (referente às hidroxilas); atenuação de bandas do DIF na região de 1700 a 1200 cm^{-1} ; e mudança no perfil das bandas na região de 1200 a 900 cm^{-1} associadas a β CD. Estas alterações sugerem a formação do composto de inclusão.

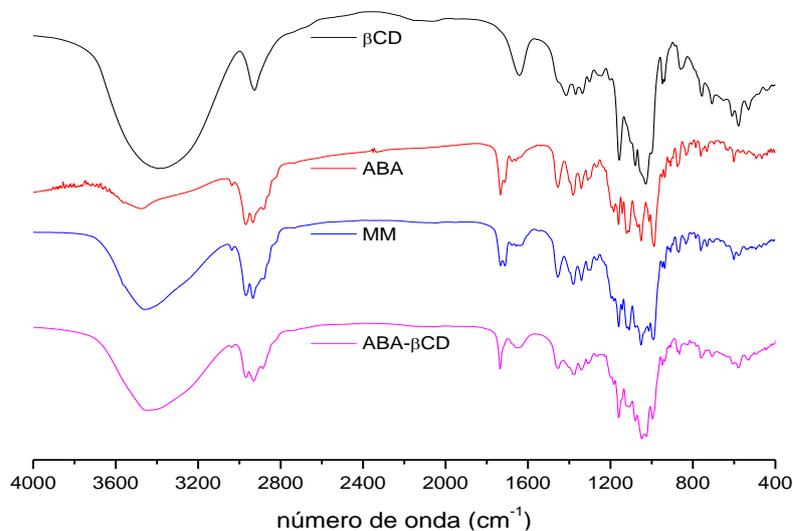
Tabela 4. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho da β CD, DIF, MM e DIF- β CD.

Composto	$V_{(\text{O-H})}$	$V_{(\text{N-H})}$	$V_{(\text{C=O})}$	Vibração do anel piranose
β CD	3371	-	-	1158;1028
DIF	-	3233; 3142	1705;1685	-
MM	3391	3256; 3156	1705;1685	1158; 1028
DIF- β CD	3379	3259	1703;1686	1157; 1031

Fonte: A autora, 2015.

Na figura 29 estão apresentados os espectros de infravermelho de ABA, β CD, MM e o composto de inclusão (ABA- β CD) na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

Figura 29. Espectro de infravermelho da ABA, β CD, MM ABA- β CD na região 4000 a 400 em KBr.



Fonte: A autora, 2015.

Para a ABA as principais absorções observadas foram: uma banda em 3473 cm^{-1} associada ao estiramento da ligação O-H; bandas com mínimos em 1713 cm^{-1} e 1733 cm^{-1} associadas ao estiramento da ligação C=O do anel macrolídeo; bandas na região de 1656 cm^{-1} e 1669 cm^{-1} associadas ao estiramento de alcenos conjugados ($\nu\text{C}=\text{C}$); banda com mínimo em 1457 cm^{-1} associada ao dobramento assimétrico do grupo CH_3 ($\delta_{\text{ass}}\text{CH}_3$), bandas na região de 1300 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} associadas à ligação de éteres ($\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$).

Na MM não ocorreram mudanças significativas nas posições das principais bandas observadas para a ABA e a βCD isoladas (Tabela 5), sendo que o perfil observado é justificado pela sobreposição das bandas oriundas na ABA e βCD .

Apesar da ABA apresentar unidades glicosídicas como a βCD , no espectro do composto de inclusão (ABA- βCD) marcantes modificações podem ser observadas como a sobreposição das vibrações atribuídas à ligação C=O em 1735 cm^{-1} oriunda da ABA e a mudança no perfil e posições de bandas na região de 1200 a 900 cm^{-1} . Estas alterações sugerem a formação desse composto de inclusão no estado sólido.

Tabela 5. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho de βCD , ABA, MM e ABA- βCD .

Composto	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{C=O})$	Vibração do anel piranose
βCD	3371	-	1158;1028
ABA	3473	1713; 1733	--
MM	3461	1712; 1734	1158
ABA- βCD	3448	1735	1160;1026

Fonte: A autora, 2015.

Os dados obtidos a partir dos espectros de infravermelho sugerem a formação dos compostos de inclusão no estado sólido, contudo mais informações foram necessárias para entendermos melhor como se deu a formação desses compostos de inclusão.

4.2.2 - Análise Termogravimétrica e Termogravimetria derivada (TG/DTG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

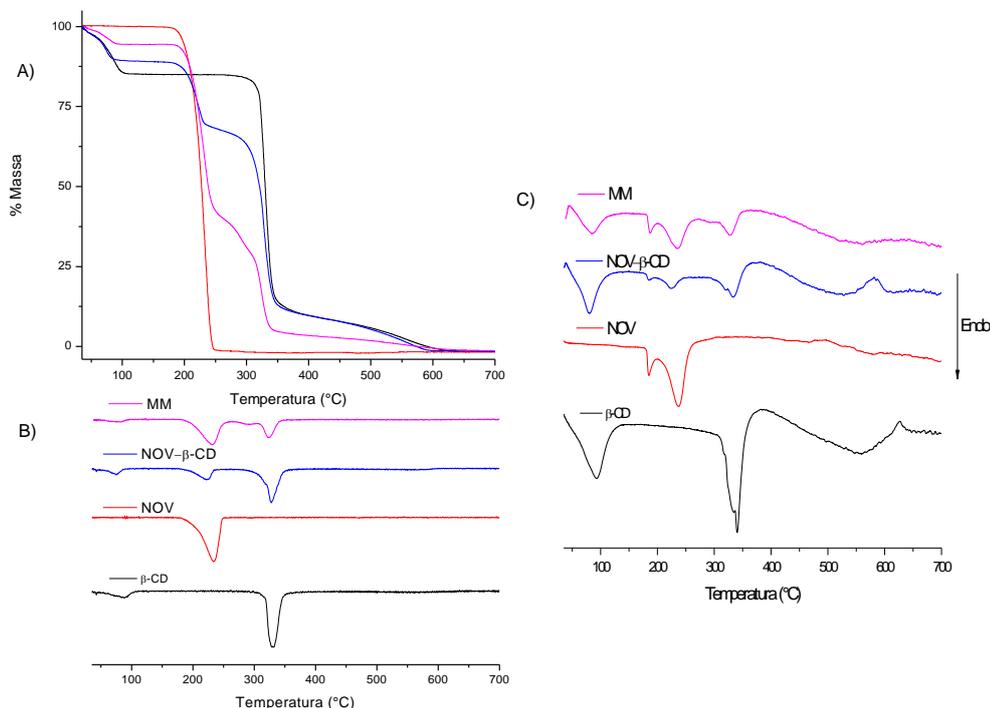
As análises térmicas são métodos analíticos que avaliam mudanças nas propriedades térmicas de amostras quando expostas a uma varredura de temperatura. A análise termogravimétrica (TG ou TGA) é um método que baseia-se na medida da alteração da massa em função da temperatura ou do tempo, permitindo verificar processos de decomposição e oxidação, intimamente relacionados à estabilidade de compostos. Ela fornece duas curvas,

sendo a primeira relacionada a variação da massa (curva TG) e a segunda, a sua derivada (curva DTG), que devido à presença de bandas permite determinar com maior precisão a temperatura em que ocorre determinada perda de massa da amostra (CALDERINI, 2006). Já a análise térmica diferencial (DTA) é uma técnica de monitoramento contínuo das temperaturas da amostra e da referência (material termicamente inerte), à medida que ambas vão sendo aquecidas ou arrefecidas em um forno. Ela fornece o fluxo de calor resultante da diferença entre a temperatura da referência e da amostra em função da temperatura ou do tempo e permite determinar a natureza dos eventos (endotérmicos/exotérmicos). Tais técnicas podem ser utilizadas para avaliar a estabilidade térmica dos composto de inclusão e compará-los com seus precursores (GIOLITO; IONASHIRO, 1988; IONASHIRO, 2005).

Este tipo de avaliação é importante visto que ao ser formado o composto de inclusão podem ocorrer modificações tanto na transição de fases (fusão, ebulição, sublimação, decomposição, etc), quanto relacionadas as reações desidratação, decomposição entre outras, levando a uma alteração do comportamento térmico do material (VILLAVARDE et al., 2004; YAO et al., 2014).

Na figura 30 estão apresentadas as curvas de TG/DTG e DTA da β CD, NOV, MM e NOV- β CD. Na curva TG/DTG da β CD livre observa-se uma perda de massa de 14,9% no intervalo de 30 °C a 106,4°C atribuída ao processo de desidratação. Esse evento é seguido por um período de estabilidade térmica até 279 °C, ponto onde inicia-se a fusão (LANNA, 2015). Por fim, observa-se um segundo evento de perda de massa iniciado a 351,3 °C atribuído à decomposição/calцинаção do composto (KOHATA; KOUKI; AKIRSA, 1993). Na curva DTA verifica-se a partir de 278 °C sucessivos picos endotérmicos demonstrando que a decomposição ocorre em múltiplas etapas.

Figura 30. Curvas de TG (A); DTG (B) e DTA (C) da β CD, NOV, MM e NOV- β CD, em N_2 .



Fonte: A autora, 2016.

Na curva TG/DTG do NOV observa-se um único evento de perda de massa iniciado a 170,7 °C, com máximo em 233,7 °C, sendo totalmente concluído a 245,3 °C, atribuído ao processo de decomposição de composto. Já na curva de DTA observa-se dois picos endotérmicos, sendo um atribuído à fusão e outro à decomposição do composto.

Nas curvas TG/DTG e DTA da MM observa-se eventos relacionados à β CD e ao NOV, porém com mudanças no perfil térmico em relação às substâncias livres (ver tabela 6).

O composto NOV- β CD apresenta um perfil térmico diferente dos compostos isoladamente e da própria MM. Observa-se que no composto de inclusão existem moléculas de água residuais, já que apresentam desidratação na mesma faixa de temperatura da β CD livre. Além disso, ocorre a mudança em todas as faixas de decomposição o que reafirma que as interações no composto são diferentes das demais. A mudança no perfil térmico das espécies analisadas sinaliza o ocorrência de novas interações intermoleculares, que são distintas, para a MM e composto NOV- β CD.

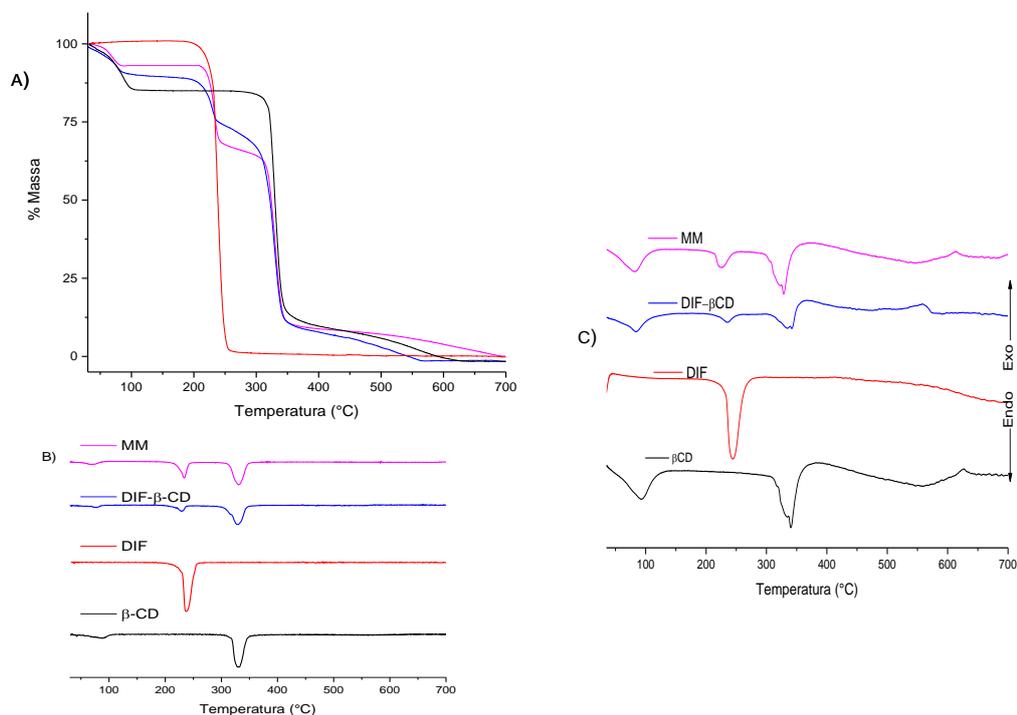
Tabela 6. Tabela com os principais eventos térmicos atribuídos para a β CD, NOV, MM e NOV- β CD.

Composto	TG/DTG					DTA				
	Eventos			Δm (%)	Atribuição	Eventos			Atribuição	
	T_i	T_f	$T_{m\acute{a}x}$			T_i	T_f	$T_{m\acute{a}x}$		
β CD	30	106,4	87,1	14,9	Perda de moléculas de água.	30	140,6	92,6	Processo endotérmico de desidratação	
	279	351,3	331,6	72,7	Decomposição.	278	382	340,7	Processos endotérmicos de fusão e decomposição	
	351,3	591,1		12,4		384,7	627,2	555,2		
NOV	170,7	245,3	233,7	100	Decomposição.	171,8	199,7	183,7	Processos endotérmicos de fusão	
						199,7	291,8	237,3	Processos endotérmicos de decomposição	
MM	30	95,9	81,7	5,6	Perda de moléculas de água.	30	130,4	86,5	Processo endotérmico de desidratação	
	187,7	256,4	231,3	53,2	Decomposição da mistura mecânica.	178,2	199,2	186,1	Processo endotérmico de decomposição do NOV	
	256,4	318,1	289,9	15,6		199,2	269,8	236,7	Processo endotérmico de decomposição do NOV	
	318,1	349,2	322,9	20,7		269,8	367,2	328,5	Múltiplos processos endotérmicos de decomposição da β CD	
	349,2	576,3		4,9		367,2		557,4		
	-	-	-	-		608	700	673		
NOV - β CD	30	86,68	75,5	11	Perda de moléculas de água.	30	128,5	79,9	Processo endotérmico de desidratação	
	177	232	222,8	19,4	Estágios múltiplos de decomposição do complexo.	175,5	200,3	185,5	Múltiplos processos endotérmicos de decomposição da β CD e do NOV	
	278,2	357,6	323,7	57,3		200,3	251,9	224		
	357,6	573,3		12,3		293,9	374	333,5		

Legenda: T_i - temperatura inicial do evento, T_f - temperatura final do evento, $T_{m\acute{a}x}$ - temperatura onde há a máxima perda de massa (DTG) ou máximo fluxo de calor (DTA).

Fonte: A autora, 2016.

Na figura 31 estão apresentadas as curvas de TG/DTG e DTA da β CD, DIF, MM e DIF- β CD. Na curva TG/DTG e DTA do DIF observa-se que o composto apresenta um único evento térmico relacionado ao processo de decomposição do composto (ver dados tabela 7). Nas curvas TG/DTG e DTA da MM observa-se eventos relacionados à β CD e ao DIF, porém com mudanças no perfil térmico em relação às substâncias livres (ver dados tabela 7).

Figura 31. Curvas de TG (A); DTG (B) e DTA (C) da β CD, DIF, MM e DIF- β CD, em N_2 .

Fonte: A autora, 2016.

O composto DIF- β CD apresenta quatro eventos térmicos. O primeiro corresponde ao processo de desidratação da β CD que ocorre em uma faixa de temperatura inferior à observada para o composto livre, provavelmente, devido a substituição das moléculas de água presentes na cavidade pelo DIF durante a complexação. Somando-se a isto, ainda verifica-se mudança em todas as faixas de decomposição o que sinaliza o ocorrência de novas interações intermoleculares.

Tabela 7. Tabela com os principais eventos térmicos atribuídos para a β CD, DIF, MM e DIF- β CD.

Composto	TG/DTG					DTA			
	Eventos			Δm (%)	Atribuição	Eventos			Atribuição
	T_i	T_f	$T_{m\acute{a}x}$			T_i	T_f	$T_{m\acute{a}x}$	
β CD	30	106,4	87,1	14,9	Perda de moléculas de água.	30	140,6	92,6	Processo endotérmico de desidratação.
	279	351,3	331,6	72,7	Decomposição.	278	382	340,7	Processos endotérmicos de decomposição e fusão com pico característico atribuído a fusão da molécula de β -CD.
	351,3	591,1		12,4		384,7	627,2	555,2	
DIF	183,2	269,9	237,6	100	Decomposição.	185,1	299	240,6	Processos endotérmicos de decomposição

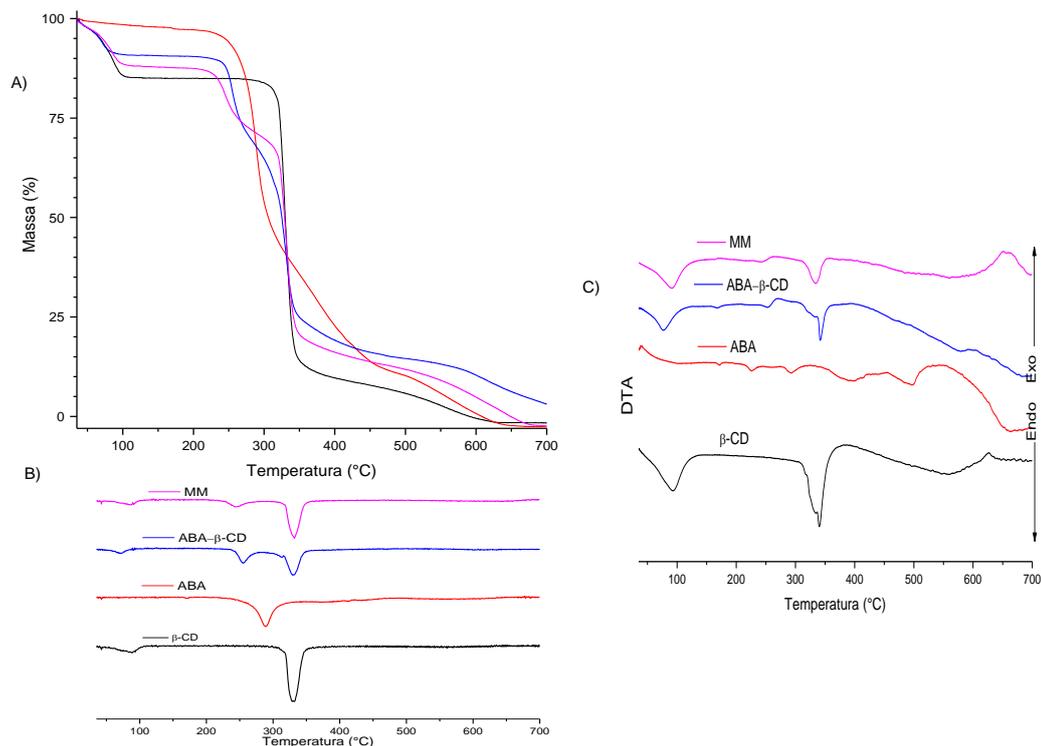
MM	30	82,0	76,5	6,73	Perda de moléculas de água.	30	117,5	82,3	Processo endotérmico de desidratação.
	210,6	245,1	234,7	25,7	Decomposição da mistura mecânica.	209,4	251,1	224	Processos endotérmicos de decomposição
	245,1	361,8	331,7	58,1		294,4	363	327,8	
	361,2	697,7		9,4					
DIF – βCD	30	94,4	77,3	10	Perda de moléculas de água.	30	158,4	82	Processo endotérmico de desidratação.
	181,5	234	229,9	13,9	Estágios múltiplos de decomposição do complexo.	187	263,8	233,5	Processos endotérmicos de decomposição
	234	361,8	329,3	66,7		293	366,3	332	
	361,8	546,8		9,4					

Legenda: T_i - temperatura inicial do evento, T_f - temperatura final do evento, $T_{m\acute{a}x}$ - temperatura onde há a máxima perda de massa (DTG) ou máximo fluxo de calor (DTA).

Fonte: A autora, 2016.

Na figura 32 estão apresentadas as curvas de TG/DTG e DTA da βCD, ABA, MM e ABA-βCD. A curva de TG/DTG da ABA apresenta uma sequência de eventos térmicos de decomposição com máximo em 288,73 °C (ver tabela 8). Na curva de DTA foram observados discretos picos endotérmicos de decomposição.

Figura 32. Curvas de TG (A); DTG (B) e DTA (C) da βCD, ABA, MM e ABA-βCD, em N₂.



Fonte: A autora, 2016.

Na curva de TG/DTG, a MM apresenta três eventos térmicos, sendo o primeiro atribuído a desidratação da βCD com faixa e mínimo bem próximos aos observados para a molécula livre (ver tabela 8). Os demais eventos correspondem à decomposição da mistura

apresentando um perfil térmico diferente em relação às moléculas livres. Através da curva de DTA observa-se que todos esses eventos são endotérmicos.

Na curva de TG/DTG do composto ABA- β CD, observa-se também três eventos térmicos. O primeiro corresponde à perda de massa devido a desidratação da β CD, ocorrendo em uma faixa menor e com menor perda de massa quando comparado à MM e à β CD livre. Esses dados podem ser justificados por interações mais fracas com as moléculas de água presentes devido a complexação, bem como pela presença de ligações glicosídicas na ABA. Para os demais eventos são evidenciadas mudança em todas as faixas de decomposição o que reafirma que as interações no composto são diferentes das demais.

Tabela 8. Tabela com os principais eventos térmicos atribuídos para a β CD, ABA, MM e ABA- β CD.

Composto	TG/DTG					DTA			
	Eventos			Δm (%)	Atribuição	Eventos			Atribuição
	T_i	T_f	$T_{m\acute{a}x}$			T_i	T_f	$T_{m\acute{a}x}$	
β CD	30	106,4	87,1	14,9	Perda de moléculas de água.	30	140,6	92,6	Processo endotérmico de desidratação.
	279	351,3	331,6	72,7	Decomposição.	278	382	340,7	Processos endotérmicos de decomposição e fusão com pico característico atribuído a fusão da molécula de β -CD.
	351,3	591,1		12,4		384,7	627,2	555,2	
ABA	228,87	603,74	288,73	100	Estágios múltiplos de decomposição	-	-	-	Processos endotérmicos de decomposição com picos discretos em etapas sucessivas
MM	30	102,26	86,27	11,78	Perda de moléculas de água.	30	137,10	91,68	Processo endotérmico de desidratação.
	213,49	344,80	243,17	66,55	Estágios múltiplos de decomposição	290,01	351,57	334,23	Processos endotérmicos de decomposição
	344,80	649,97	332,16	21,67		351,57	658,71	562,58	
ABA- β CD	30	89,07	71,65	8,69	Perda de moléculas de água.	30	122,79	77,15	Processo endotérmico de desidratação.
	229,65	343,02	254,30	64,67	Estágios múltiplos de decomposição	300,41	369,88	342,79	Processos endotérmicos de decomposição
	343,02	700	330,58	23,67		407,38	700		

Legenda: T_i - temperatura inicial do evento, T_f - temperatura final do evento, $T_{m\acute{a}x}$ - temperatura onde há a máxima perda de massa (DTG) ou máximo fluxo de calor (DTA).

Fonte: A autora, 2016.

Os dados obtidos a partir das análises térmicas permitiram verificar mudanças nos perfis térmicos das espécies analisadas, sendo que para todos os composto de inclusão os eventos de desidratação/decomposição ocorreram em temperaturas intermediárias entre as identificadas para as moléculas livres, bem como com perfis térmicos diferentes em relação às MM. Isso pode ser decorrente de novas interações intermoleculares estabelecidas entre as

moléculas durante o processo de complexação, sinalizando a formação dos compostos de inclusão no estado sólido.

4.2.3. – Titulação calorimétrica isotérmica

As alterações nas propriedades termodinâmicas em decorrência das interações entre espécies químicas podem ser medidas por microcalorimetria. Esta técnica mede diretamente o fluxo de calor liberado ou absorvido pelo sistema ao longo de uma reação, onde estão envolvidas interações inter e intramoleculares. Esta energia é registrada em função da concentração de reagente titulante, sendo o calor liberado ou absorvido proporcional à quantidade de reagente injetado (WISEMAN et al., 1989). As variações de calor entre a amostra e a referência são devidas às interações que ocorrem durante a titulação, sendo determinadas por um sistema de resposta eletrônico, o qual garante que a temperatura no sistema seja sempre constante (FERNANDES et al., 2007; JIANG, W. et al., 2012).

Por meio dos dados obtidos por uma titulação calorimétrica e utilizando a isoterma de Wiseman para modelar os dados (equação 1), é possível determinar a(s) constante(s) de afinidade para o sistema (K) e a estequiometria de reação (n). Com o emprego de equações termodinâmicas (equações 2 e 3), a energia livre de Gibbs (ΔG°), entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°) podem ser determinadas, fornecendo assim, o perfil termodinâmico completo da interação molecular (TURNBULL; DARANAS, 2003).

$$\overline{\Delta_{int}H^\circ} = \left(\frac{dQ}{d[X]_{int}} \right)_p = \Delta_{int}H^\circ V_0 \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - X_R - r}{2\sqrt{(1 + X_R - r)^2 - 4X_R}} \right] \quad Eq. 1$$

$$\Delta_{int}G = -RT \ln K \quad Eq. 2$$

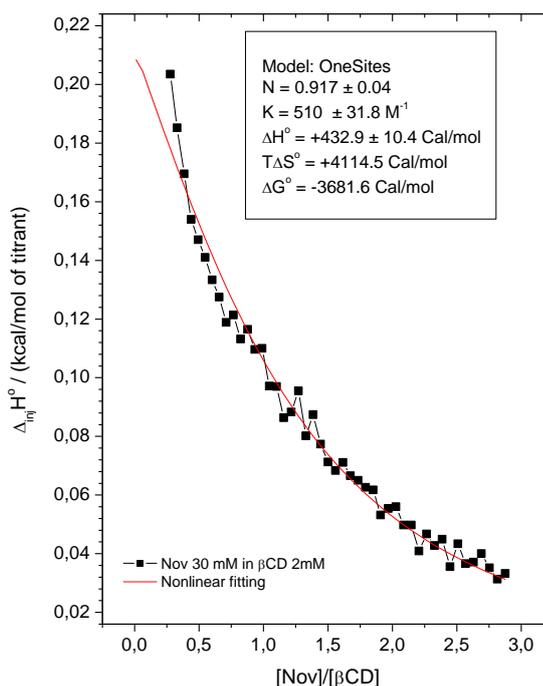
$$\Delta_{int}G = \Delta_{int}H^\circ - T\Delta_{int}S \quad Eq. 3$$

Esta técnica tem sido amplamente adotada na caracterização de composto de inclusão pois, quando ocorre a complexação, ocorrem uma série de interações, relacionadas com: 1) saída da água do interior da cavidade e sua liberação no meio; 2) dessolvatação da molécula hóspede; 3) transferência de calor para o ambiente externo; 4) alterações conformacionais; 5) inclusão da molécula hóspede com o estabelecimento de novas interações intermoleculares; 6) reorganização das moléculas de água em torno do composto de inclusão e 7) redução da mobilidade de rotação em torno das ligações glicosídicas da ciclodextrina devido a presença da molécula hóspede dentro da cavidade; (BHOPATE SAPANA; DHOLE SHASHIKANT, 2014). O balanço de todas essas interações pode resultar em um processo endotérmico ou

exotérmico, com aumento ou redução de entropia. Considerando que o ITC monitora apenas processos espontâneos, a energia livre de Gibbs será sempre menor do que zero ($\Delta G^{\circ} < 0$).

Na figura 33 esta apresentada a curva final de titulação do NOV em β CD. Inicialmente foram realizadas as titulações do compostos em água e, após a subtração dessa curva de diluição (branco), obteve-se a curva final de titulação. Esse procedimento visa excluir os efeitos de interação soluto-soluto e soluto-solvente, a fim de avaliar apenas as interações soluto-ciclodextrina (DENADAI, 2005), especialmente porque foi utilizado a mistura DMSO/H₂O 90:10 como solvente. Além disso, optou-se pela matriz (β CD) como titulado, visto que altas concentrações de ciclodextrinas podem induzir auto agregação (BERTAUT, 2014). Na tabela 9 estão apresentados os valores termodinâmicos de interação entre NOV e β CD, obtidos pelo experimento, na unidade de kJ/mol.

Figura 33. Titulação calorimétrica isotérmica do NOV (30 mM em DMSO:H₂O (90:10)) em solução de β CD (2 mM em DMSO:H₂O (90:10)) a 25 °C.



Fonte: A autora, 2016.

Tabela 9. Parâmetros termodinâmicos de interação entre NOV e β CD (T = 298,15 Kelvin).

Complexo	n	K	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	T ΔS° (kJ.mol ⁻¹)
NOV- β CD	0,917 \pm 0,04	510 \pm 31,8	- 13,593	1,811 \pm 0,044	15,404

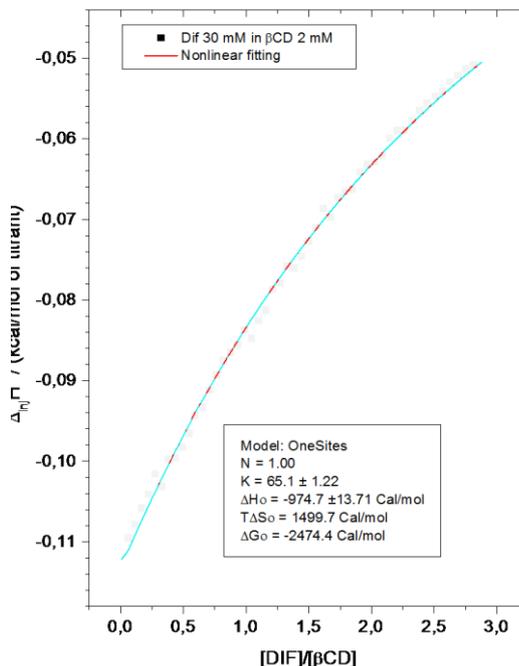
Fonte: A autora, 2016.

Para a titulação de NOV em β CD foi possível verificar que a estequiometria do complexo é 1:1, uma vez que o “n” encontrado foi de $0,917 \pm 0,04$. De acordo com os dados termodinâmicos, pôde-se observar que a complexação é um processo endotérmico favorecido por entropia, com uma constante de equilíbrio relativamente baixa (TURNBULL; DARANAS, 2003; REKHARSKY; INOUE; 1998), mas da mesma magnitude da encontrada na literatura para outros compostos de inclusão (DENADAI et al., 2007; SILVA, 2015). Um processo endotérmico ($\Delta H^\circ > 0$) indica quebra de interações intermoleculares com subsequente formação de interações menos estáveis do que as existentes antes da complexação.

A variação positiva de entropia (ΔS°) indica que moléculas hidrofóbicas como o NOV, tendem a apresentar interação molecular conhecida como “efeito hidrofóbico” no processo de inclusão. Durante esse processo ocorre quebra da estrutura de solvatação dos grupos funcionais do NOV com consequente liberação de moléculas de água que ganham graus de liberdade rotacionais e translacionais gerando desta forma, uma elevação da entropia (desordem) do sistema. Tal efeito é geralmente endotérmico, devido à quebra de muitas ligações de hidrogênio (DENADAI, 2005; LOFTSSON; BREWSTER, 1996; SILVA, 2015).

Na figura 34 esta apresentada a curva final de titulação do DIF em β CD. Para essa interação a estequiometria encontrada também foi de 1:1 e ocorre espontaneamente nas condições do experimento (ver tabela 10). O processo é favorecido tanto por entalpia (valor negativo) quanto por entropia (valor positivo). Contudo apresenta baixa constante de afinidade quando comparada com outros compostos de inclusão na literatura (DENADAI et al., 2007; SILVA, 2015).

Figura 34. Titulação calorimétrica isotérmica do DIF (30 mM em DMSO:H₂O (90:10)) em solução de β CD (2 mM em DMSO:H₂O (90:10)) a 25 °C.



Fonte: A autora, 2016.

Tabela 10. Parâmetros termodinâmicos de interação entre DIF e β CD (T = 298,15 Kelvin).

Complexo	N	K	ΔG° (KJ.mol ⁻¹)	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	T ΔS° (KJ.mol ⁻¹)
DIF- β CD	1,00	65,1 \pm 1,22	- 10,353	- 4,078 \pm 0,574	6,275

Fonte: A autora, 2016.

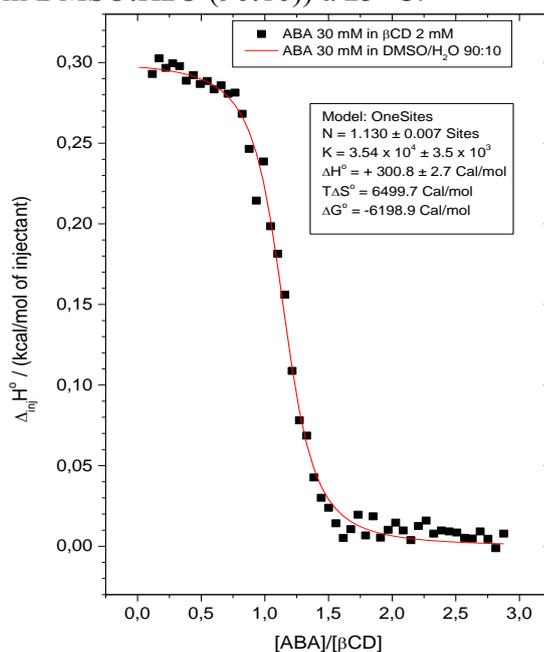
O valor de entalpia negativo (processo exotérmico), sugere que as interações no composto de inclusão são mais estáveis que as iniciais. Esse valor originou-se provavelmente da formação de ligações de hidrogênios entre as moléculas de água que saíram da cavidade da β CD com as moléculas de água presente no solvente e/ou a formação de novas interações entre o DIF, dentro da cavidade e a β CD. Quanto ao termo entrópico, novamente observa-se grande influência do “efeito hidrofóbico” no processo de inclusão, gerando dessolvatação do DIF e liberação de moléculas de água que ganham graus de liberdade rotacionais e translacionais explicando a elevação da entropia observada no sistema.

Apesar das semelhanças estruturais dos compostos NOV e DIF nas regiões aromáticas, as constantes de equilíbrio foram bem diferentes e entalpia de interação foi endotérmica para o sistema NOV- β CD e exotérmica para o sistema DIF- β CD. Esse dado é compatível com o fato de que o grupo “1,1,2-trifluoro-2-trifluoro-metoxietoxi” torna o

NOV muito mais hidrofóbico que o DIF, já que a solubilidade do NOV é cerca de 27 vezes menor que a do DIF. Sendo menos solúvel e mais hidrofóbico, sua interação com a β CD torna-se maior. Além disso, o fato da entalpia de interação ser positiva no caso do NOV pode ser devido ao consumo energético envolvido na dessolvatação parcial do grupo fluorcarbônico durante a inclusão, o que não ocorre no caso do DIF. Essa maior hidrofobicidade do NOV deve ser o mesmo motivo pelo qual é mais ativo que o DIF.

Na figura 35 esta apresentada a curva final de titulação da ABA em β CD. O composto de inclusão apresentou novamente uma estequiometria de 1:1 sendo o processo para sua formação espontâneo nas condições do experimento (ver tabela 11). Com relação ao ΔH° , observa-se que o processo é endotérmico sendo as interações no composto de inclusão de menor estabilidade, no entanto, como já descrito anteriormente o elevado valor positivo do termo entrópico garante a espontaneidade da interação, uma vez que o processo deve ser regido por dessolvatação. Por fim, observa-se um perfil sigmoidal da curva, característico de compostos com altas constantes de afinidade (valores próximos ou superiores a 20000), o que sugere uma forte interação entre as espécies e está condizentes com outros estudos que também obtiveram altas constantes de equilíbrio para seus compostos de inclusão (TURNBULL; DARANAS, 2003; LULA et al., 2007; FERNANDES et al., 2007).

Figura 35. Titulação calorimétrica isotérmica da ABA (30 mM em DMSO:H₂O (90:10)) em solução de β CD (2 mM em DMSO:H₂O (90:10)) a 25 °C.



Fonte: A autora, 2016.

Tabela 11. Parâmetros termodinâmicos de interação entre ABA e β CD (T = 298,15 Kelvin).

Complexo	N	K	ΔG° (KJ.mol ⁻¹)	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	T ΔS° (KJ.mol ⁻¹)
ABA- β CD	1,13 \pm 0,007	3,54 10 ⁴ \pm 3,5 10 ³	-25,94	1.25 \pm 0,01	27,19

Fonte: A autora, 2016.

Esses dados reafirmam que o composto de estequiometria de 1:1 foi o mais favorecido o que justificou a preparação dos mesmos com esta estequiometria. Além disso, os parâmetros termodinâmicos são compatíveis com os de outros compostos de inclusão (DENADAI et al., 2006b, 2007; FERNANDES et al., 2007; LULA, 2007; SILVA, 2015, SOUSA et al., 2008).

4.2.4 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

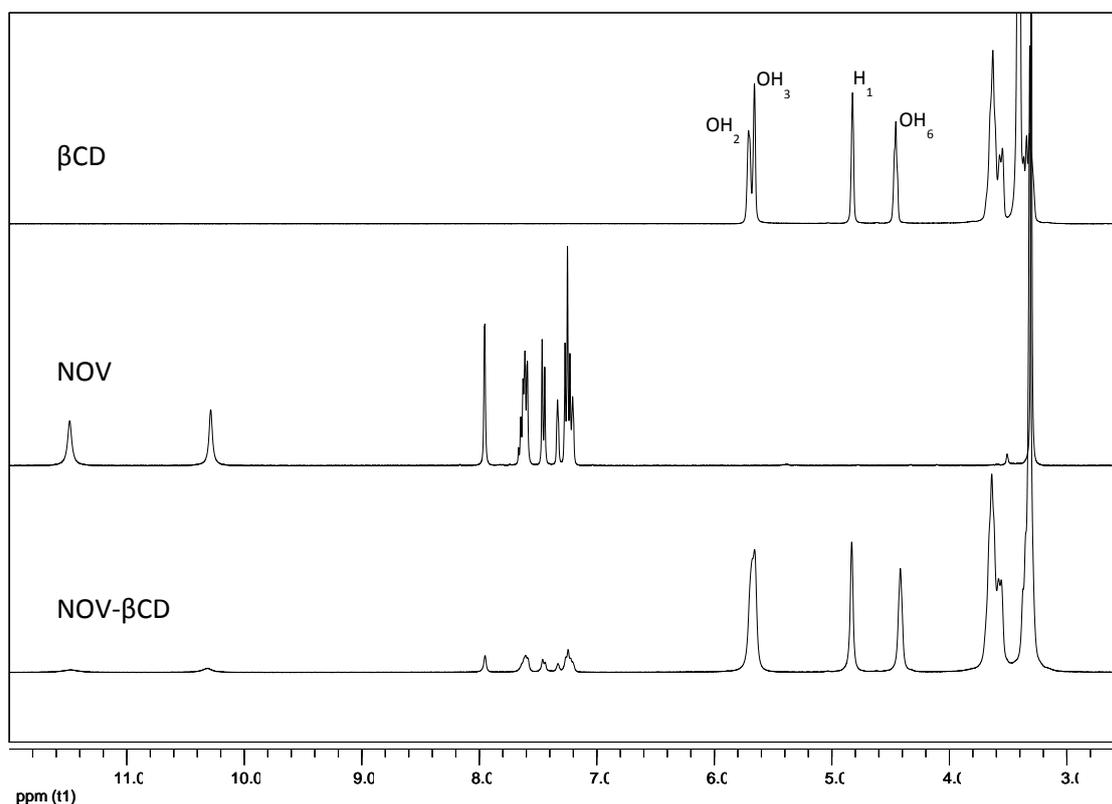
A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear está baseada na absorção de energia, radiofrequências, pelos núcleos numa molécula submetida a um campo magnético externo forte. As transições detectadas pela radiação emitida quando os núcleos excitados voltam ao estado fundamental geram os sinais de RMN desse núcleo (ALVES, 2010).

Diversos núcleos podem ser detectados e estudados por RMN tais como: ¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F e ³¹P. A espectroscopia pode ser uni ou bidimensional. No caso dos espectros de RMN de ¹H de compostos de inclusão, a unidimensional é amplamente utilizada para avaliação dos mesmos devido à facilidade de interpretação dos dados, bem como boa sensibilidade, uma vez que os deslocamentos químicos envolvidos na interação hospedeiro-hóspede fornecem informações fundamentais sobre a complexação, enquanto o bidimensional fornece maior detalhamento estrutural desses complexos (CAMERON; FIELDING, 2001; COBAS; MARTIN-PASTOR, 2004).

Esta técnica é capaz de caracterizar os compostos de inclusão em solução fornecendo diversas informações estruturais como, por exemplo, orientação molecular da substância hóspede dentro da cavidade da ciclodextrina (FIELDING, 2000; SCHNEIDER et al., 1998). As modificações nos sinais da matriz se devem as alterações causadas pela associação com o hóspede, visto que ocorre alteração no ambiente químico ao redor dos átomos de hidrogênio no interior da cavidade da ciclodextrina. Além disso, o composto hóspede sofre alterações dos sinais de seus núcleos que penetram na cavidade da CD, pois os mesmo se encontram em um novo ambiente químico, distinto daquele onde estavam originalmente solvatado (HEDGES, 1998; VENTURINI et al., 2008).

Na figura 36 estão apresentados os espectros de RMN de ^1H de βCD , NOV e NOV- βCD . Nas tabelas 12 e 13 estão descritos os valores de deslocamentos químicos atribuídos aos hidrogênios da βCD livre e NOV- βCD e do hóspede livre e NOV- βCD , respectivamente.

Figura 36. Espectros de RMN de ^1H de βCD , NOV e NOV- βCD em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.



Fonte: A autora, 2016.

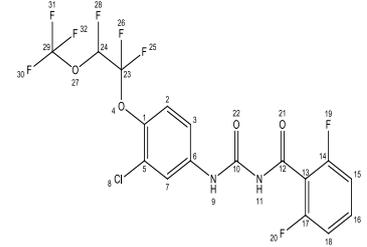
Tabela 12. Deslocamentos químicos de hidrogênios (δ) da βCD na molécula livre e no composto de inclusão NOV- βCD ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz)

Atribuições	βCD	COMPLEXO		
		NOV- βCD	$\Delta\delta$	
1	—CH	4,82, s	4,83, s	0,01
2	—CH	3,38-3,30, m	3,39-3,28, m	-
2 ^a	—OH	5,66, s	5,66, s	-
3	—CH	3,73-3,51, m	3,77-3,49, m	-
3 ^a	—OH	5,71, s	5,67, s	-0,04
4	—CH	3,38-3,30, m	3,39-3,28, m	-
5	—CH	3,73-3,51, m	3,77-3,49, m	-
6	—CH ₂	3,73-3,51, m	3,77-3,49, m	-
6 ^a	—OH	4,45, s	4,42, s	-0,03

Multiplicidade do sinal: s – singlete; m – multipeto. J – constante de acoplamento. ($\Delta\delta$) – variação do deslocamento dos sinais de H da βCD no respectivo complexo.

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 13. Deslocamentos químicos de hidrogênios (δ) do NOV na molécula livre e no composto de inclusão NOV- β CD (DMSO- d_6 , 400 MHz)



		NOV	COMPLEXO	
			NOV- β CD	$\Delta\delta$
11	—NH	11,48, s	11,48, s	-
9	—NH	10,29, s	10,32, s	0,03
7	—CH	7,95, s	7,95, s	-
16,3	—CH	7,69-7,57, m	7,60, d (J = 7,6 Hz)	-
2	—CH	7,45, d (J = 9,2 Hz)	7,45, d (J = 8,0 Hz)	-
24	—CH	7,27, d (J = 51,6 Hz)	7,27, d (J = 50,0 Hz)	-
15,18	—CH	7,25, t (J = 8,4 Hz)	7,23, t (J = 8,4 Hz)	-0,02

Multiplicidade do sinal: s – singlete; d – dublete; t – tripleto e m – multipeto. J – constante de acoplamento. ($\Delta\delta$) – variação do deslocamento dos sinais de H da β -CD no respectivo complexo.

Fonte: A autora, 2016.

O espectro de RMN de ^1H obtido para a β CD (Figura 36) foi semelhante ao encontrado na literatura (SCHNEIDER et al., 1998). Nele foi observado sinais referentes aos hidrogênios 1-6 do monômero glicopiranosídico.

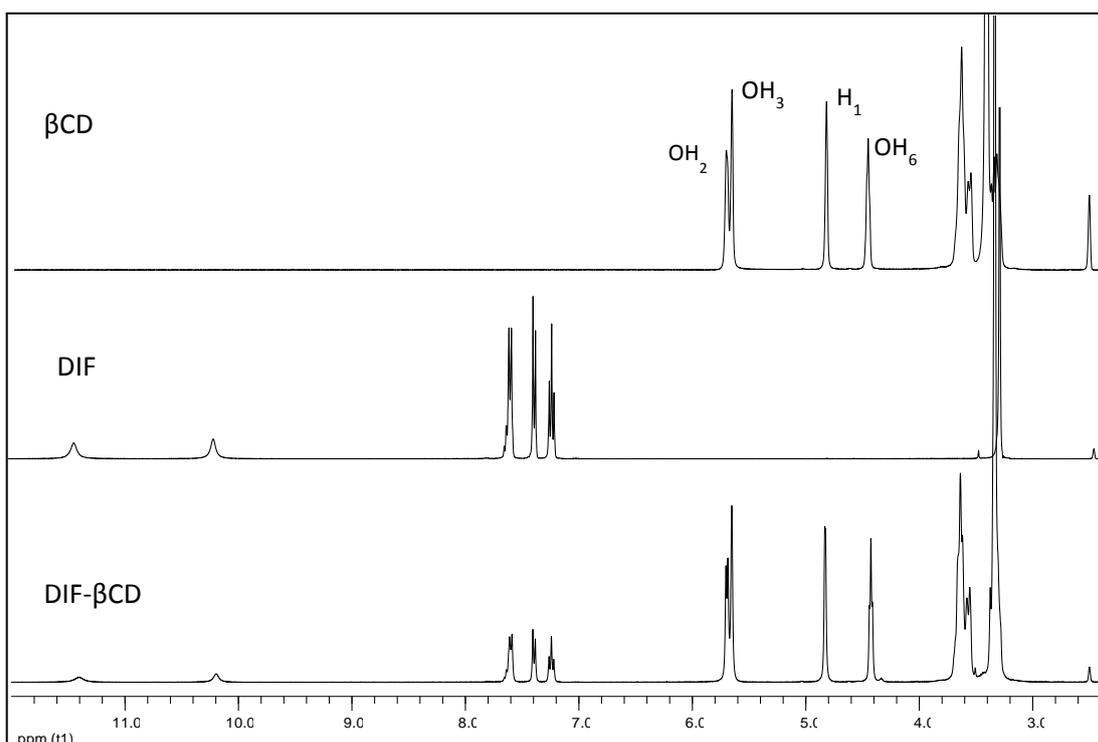
O espectro de RMN de ^1H do NOV foi semelhante ao da amostra padrão de novaluron fornecido pela Sigma-Aldrich. Os sinais de seus hidrogênios foram atribuídos baseando-se no espectro simulado de RMN do programa ChemDraw Ultra (versão 12.0.2.1076) e a comparação desse espectro com o espectro do diflubenzuron (apresentado abaixo). Esses dados encontram-se na tabela 13. Nesse espectro, foi possível observar o acoplamento entre o hidrogênio CH-24 e o flúor ($\delta = 7,27$), com $J = 51,4$ Hz.

É bem conhecido na literatura que a formação de complexos supramoleculares com ciclodextrinas gera alterações sobre a densidade eletrônica dos núcleos de hidrogênio envolvidos nas interações, o que se reflete nos espectros de RMN como alterações de deslocamento químico ou alargamento dos picos. No espectro de RMN de ^1H de NOV- β CD foram observadas variações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios OH-3, OH-6 e CH-1 da β CD, bem como dos hidrogênios NH-9, CH-15 e CH-18 do NOV. A redução do “ δ ” da OH-6 pode estar associada a aproximação dos elétrons não ligantes do flúor.

Foi realizado ainda o experimento de ROESY para o composto NOV- β CD, visto que a presença de sinais de correlação dipolar (proximidade espacial menor do que 5 \AA) entre os hidrogênios do hóspede e da matriz de encapsulamento pode confirmar a interação entre ambos. No entanto, não foram observadas correlações entre os hidrogênios da molécula hóspede e da β CD.

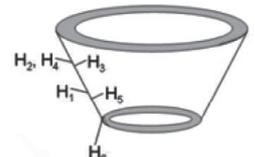
Na figura 37 estão apresentados os espectros de RMN de ^1H da βCD , do DIF e DIF- βCD enquanto que nas tabelas 14 e 15 estão descritos os valores de deslocamentos químicos dos compostos puros e do composto de inclusão.

Figura 37. Espectros de RMN de ^1H de βCD , DIF e DIF- βCD em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.



Fonte: A autora, 2016.

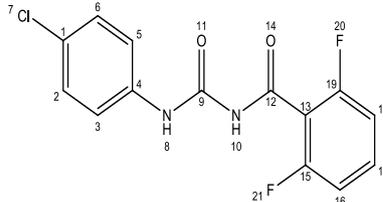
Tabela 14. Deslocamentos químicos de hidrogênios (δH) da βCD livre e no composto de inclusão DIF- βCD ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz)

	Atribuições	βCD	COMPLEXO		
			DIF-Bcd	$\Delta\delta$	
	1	—CH	4,82, s	4,83, s	0,01
	2	—CH	3,38-3,30, m	3,37, s	-
	2a	—OH	5,66, s	5,65, s	-0,01
	3	—CH	3,73-3,51, m	3,63 e 3,57, m	-
	3a	—OH	5,71, s	5,70, s	-0,01
	4	—CH	3,38-3,30, m	3,37, s	-
	5	—CH	3,73-3,51, m	3,63 e 3,57, m	-
	6	—CH ₂	3,73-3,51, m	3,64 e 3,57, m	-
	6a	—OH	4,45, s	4,43, s	-0,02

Multiplicidade do sinal: s – singleto; m – multipeto. J – constante de acoplamento. ($\Delta\delta$) – variação do deslocamento dos sinais de H da $\beta\text{-CD}$ no respectivo complexo.

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 15. Deslocamentos químicos de hidrogênios (δ H ppm) do DIF na molécula livre e no composto de inclusão DIF- β CD (DMSO- d_6 , 400 MHz)

	Atribuições		DIF	COMPLEXO	
				DIF- β CD	$\Delta\delta$
	10	—NH	11,42, s	11,41, s	-0,01
	8	—NH	10,20, s	10,20, s	-
	3,5,17	—CH	7,67-7,59, m	7,68-7,56, m	-
	2,6	—CH	7,39, d (J=8,79)	7,40, d (J=8,62)	0,01
	16,18	—CH	7,24, t (J=8,25)	7,24, t (J=8,25)	-

Multiplicidade do sinal: s – singleto; d – dubleto; dd – duplo dubleto; t- tripleto e m - multipletto. J – constante de acoplamento (Hz). ($\Delta\delta$) – variação do deslocamento dos sinais de H da β -CD no respectivo complexo.

Fonte: A autora, 2016.

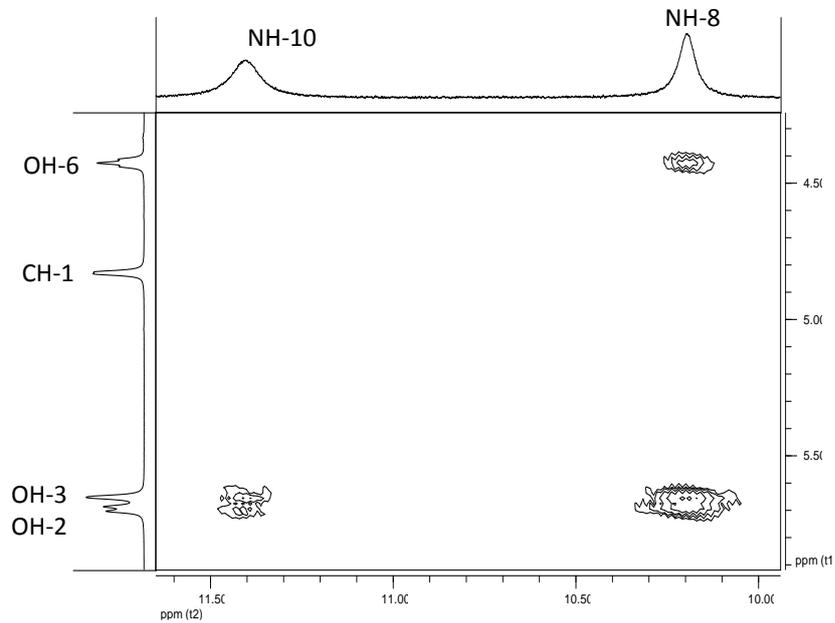
O espectro de RMN de ^1H do DIF foi semelhante ao apresentado no laudo de análise do padrão de diflubenzuron adquirido da Sigma-Aldrich. Os sinais de seus hidrogênios foram atribuídos baseando-se no espectro simulado de RMN do programa ChemDraw Ultra (Versão 12.0.2.1076) e a comparação desse espectro com o espectro do novaluron. Esses dados encontram-se na tabela 15.

No espectro de RMN de ^1H do DIF- β CD foi observada uma variação nos deslocamentos químicos dos hidrogênios CH-1, CH-5, OH-2, OH-3 e OH-6 da β CD e nos hidrogênio NH-10, CH-2 e CH-6 do DIF. Além disso, observa-se que os hidrogênios OH-2 passaram a ter acoplamento melhor definido. Isso pode ser devido a uma interação intermolecular DIF/ β CD que deixa os hidrogênios OH-2 mais orientados. Sugere-se que essa hidroxila OH-2 deixou de fazer ligações de hidrogênio.

Foi realizado ainda o experimento de 2D $\text{H}^1\text{-H}^1$ ROESY para o composto DIF- β CD. Conforme mostrado na figura 38, existem correlações entre os hidrogênios da hidroxilas externas (OH-6) da β CD e os hidrogênios ligados ao nitrogênio 8 do DIF, como também, correlações entre os hidrogênios das hidroxilas OH-2 e OH-3 da β CD e os hidrogênios dos nitrogênios NH-8 e NH-10 do DIF, sendo mais intensa a correlação com os hidrogênios do NH-8. Desta forma, podemos sugerir que a inclusão deve estar ocorrendo pela porção fenila.

A existência de correlação no mapa de contorno ROESY para o sistema DIF- β CD é mais um indicativo de que o modo de interação da ciclodextrina com a molécula hóspede deve ser diferente do sistema NOV- β CD, corroborando as diferenças nos parâmetros termodinâmicos observadas nos experimentos de ITC.

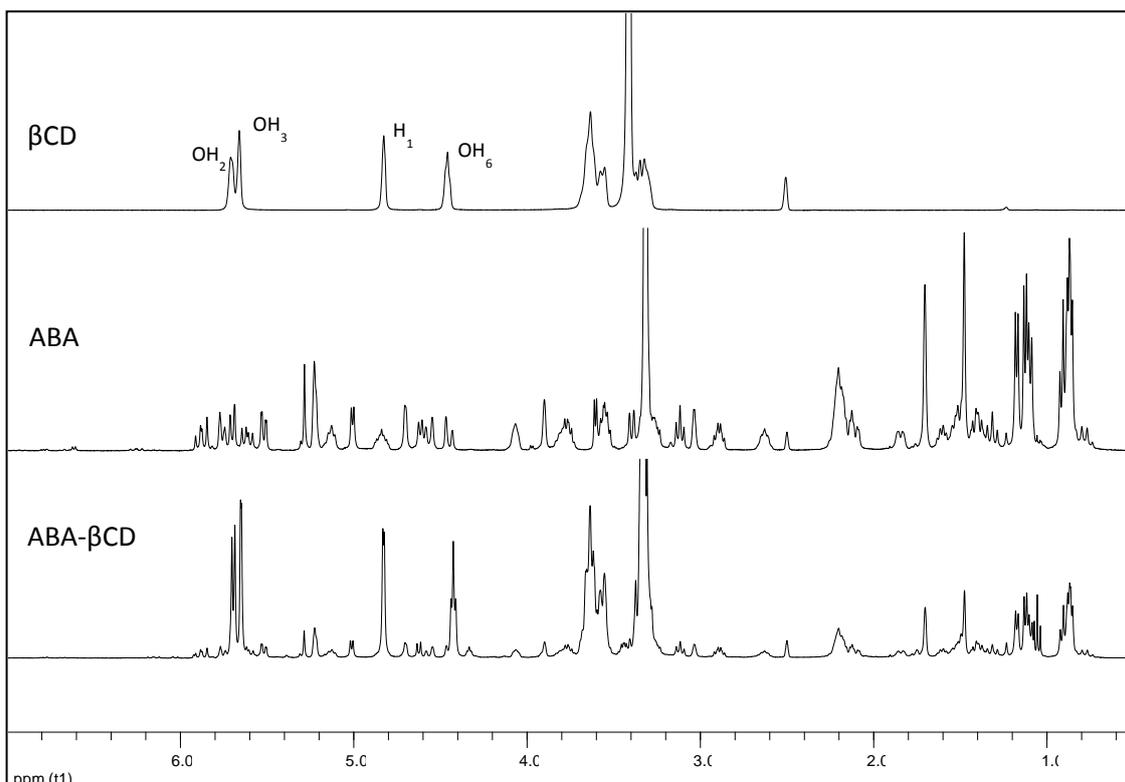
Figura 38. Regiões selecionadas do mapa de contorno ROESY do DIF- β CD em DMSO- d_6 , 400 MHz.



Fonte: A autora, 2016.

Na **figura 39** estão apresentados os espectros de RMN de ^1H da β CD, ABA e do composto de inclusão ABA- β CD. Na tabela 16 estão descritos os valores de deslocamentos químicos atribuídos aos hidrogênios na β CD livre e no composto ABA- β CD. Já na tabela 17 estão apresentados os valores de deslocamentos químicos atribuídos aos hidrogênios do hóspede livre e do composto ABA- β CD.

Figura 39. Espectros de RMN de ^1H de βCD , ABA e ABA- βCD em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.



Fonte: A autora, 2016.

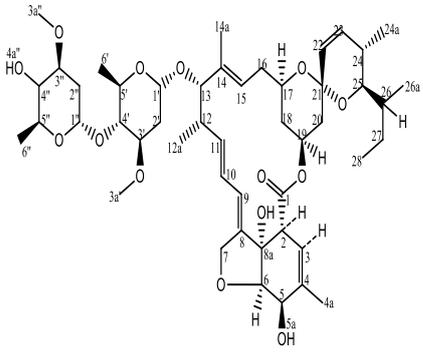
Tabela 16. Deslocamentos químicos de hidrogênios (δ H ppm) da βCD na molécula livre e no composto ABA- βCD ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz)

Atribuições	Bcd	COMPLEXO		
		ABA- βCD	$\Delta\delta$	
1	—CH	4,82, s	4,83, d	0,01
2	—CH	3,38-3,30, m	3,31, d	-
2a	—OH	5,66, s	5,69, d	0,03
3	—CH	3,73-3,51, m	3,71-3,51, m	-
3a	—OH	5,71, s	5,69, d	-0,02
4	—CH	3,38-3,30, m	3,31, d	-
5	—CH	3,73-3,51, m	3,71-3,51, m	-
6	—CH ₂	3,73-3,51, m	3,71-3,51, m	-
6a	—OH	4,45, s	4,43, t	-0,02

Multiplicidade do sinal: s – singlete; d – dublete; t – tripleto; m; – multiplete. J – constante de acoplamento. ($\Delta\delta$) – variação do deslocamento dos sinais de H da βCD no respectivo complexo.

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 17. Deslocamentos químicos de hidrogênios (δ H ppm) do ABA na molécula livre e no composto ABA- β CD (DMSO- d_6 , 400 MHz)



The chemical structure shows the ABA-βCD complex. The ABA molecule is a long-chain polyketide with various functional groups and stereocenters. The β-cyclodextrin (β-CD) is a cyclic oligosaccharide with three glucose units. Protons in both molecules are labeled with numbers and letters (e.g., 10, 9, 22, 11, 23, 3, 1', 1'', 15, 6, 19, 4'', 5'', 7, 7, 8^a, 13, 17,5, 3'', 3',24, 25, 3^a, 3^{aa}, 4', 2, 4^{aa}, 12, 5^a, 2'',16, 20^a, 20^b, 20, 4^a, 2', 14^a, 6', 6'', 12^a, 28, 26^b, 26^a) to indicate their positions for NMR assignment.

Atribuições		ABA	COMPLEXO	
			ABA- β CD	$\Delta\delta$
10	-CH	5,88 (dd)	5,93-5,83 (m)	-
9	-CH	5,76 (d)	5,75(d)	-0,01
22	-CH	5,70 (d)	5,69 (d)	-0,01
11	-CH	5,61 (dd)	5,63-5,56 (m)	-
23	-CH	5,52 (dd)	5,52 (dd)	-
3	-CH	5,28 (s)	5,29 (s)	0,01
1', 1''	-CH	5,25-5,19 (m)	5,23 (s)	-
15	-CH	5,13 (t)	5,14 (dd)	0,01
6	-CH	5,01 (d)	5,01 (d)	-
19	-CH	4,90-4,77 (m)	4,83 (d)	-
4''	-CH	4,70 (d)	4,70 (s)	-
5''	-CH	4,62 (d)	4,62 (d)	-
7	-CH ₂	4,57 (d)	4,56 (d)	-0,01
7	-CH	4,45 (d)	4,48-4,39 (m)	-
8 ^a	-OH	4,07 (s)	4,06 (s)	-0,01
13	-CH	3,90 (s)	3,90 (s)	-
17,5	-CH	3,86-3,69 (m)	3,86-3,71 (m)	-
3''	-CH	3,60 (d)	3,67-3,59 (m)	-
3',24	-CH	3,55 (td)	3,57 (d)	0,02
25	-CH	3,40 (d)	3,47-3,40 (m)	-
3 ^a , 3 ^{aa}	-OCH ₃	3,33-3,30 (m)	3,31 (s)	-
4'	-CH	3,12 (t)	3,12 (t)	0,02
2	-CH	3,04 (d)	3,03 (d)	-0,01
4 ^{aa}	-OH	2,89 (dd)	2,89 (dd)	-
12	-CH	2,68-2,58 (m)	2,73-2,57 (m)	-
5 ^a ,	-OH	2,27-2,15 (m)	2,27-2,15 (m)	-
2'',16	CH ₂	2,27-2,15 (m)	2,27-2,15 (m)	-
20 ^a	CH	2,27-2,15 (m)	2,27-2,15 (m)	-
20 ^b	-CH	2,11 (dd)	2,11 (dd)	-
20	-CH ₂	1,85 (d)	1,84 (d)	-0,01
4 ^a	-CH ₃	1,70 (s)	1,70 (s)	-
2'	-CH	1,61 (dd)	1,61 (dd)	-
	-CH	1,56-1,50 (m)	1,57-1,45 (m)	-
14 ^a	-CH ₃	1,48 (s)	1,45-1,38 (m)	-
	-CH	1,45-1,22 (m)	1,45-1,38 (m)	-
6'	-CH ₃	1,17 (d)	1,17 (d)	-
6''	-CH ₃	1,13 (d)	1,12 (d)	-0,01
12 ^a	-CH ₃	1,10 (d)	1,09 (d)	-0,01
28	-CH	0,92 (d)	0,91 (d)	-0,01
26 ^b	-CH	0,88 (d)	0,87 (dd)	-0,01
26 ^a	-CH ₃	0,86 (d)	0,78 (d)	-
	-CH	0,82-0,72 (m)	0,74 (s, 1H)	-

Multiplicidade do sinal: s – singlete; d – dublete; t – tripleto; dd – duplo dublete e m – multiplete.

J – constante de acoplamento. Dada a complexidade da molécula, os valores de J não foram calculados.

($\Delta\delta$) – variação do deslocamento dos sinais de H da β -CD no respectivo complexo.

Fonte: A autora, 2016 (com base em AWASTHI et al., 2012).

O espectro de RMN de ^1H obtido para a ABA foi semelhante ao encontrado na literatura (AWASTHI et al., 2012). Devido à complexidade estrutural da molécula, os sinais de seus hidrogênios foram atribuídos baseando-se na análise conjunta dos dados da literatura e dos espectros uni e bidimensional da molécula. Esses dados encontram-se nas tabelas 17.

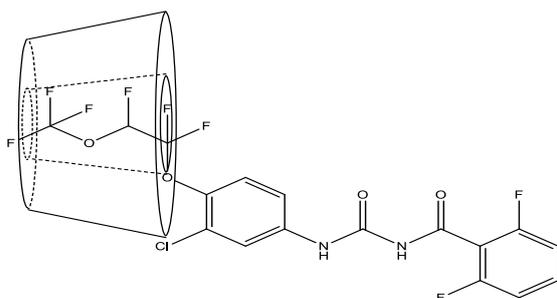
No espectro de RMN de ^1H de ABA- βCD foram observadas variações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios CH-1, OH-2, OH-3 e OH-6 da βCD e nos hidrogênios CH-2, CH-3, CH-3', CH₃-6'', CH₂-7, OH-8^a, CH-9, CH₃-12^a, CH-15, CH₂-20, CH-22, CH-24, CH-26^b, CH-28 da ABA. O deslocamento dos hidrogênios externos da βCD pode ser justificado pela interação entre as hidroxilas da βCD e essas subunidades glicosídicas da molécula de ABA, tendo em vista a liberdade rotacional desses grupos. O grande número de deslocamentos dos sinais envolvendo hidrogênios do anel benzofurano da ABA indicam a participação desse grupo na inclusão.

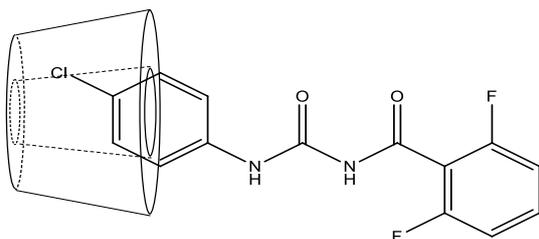
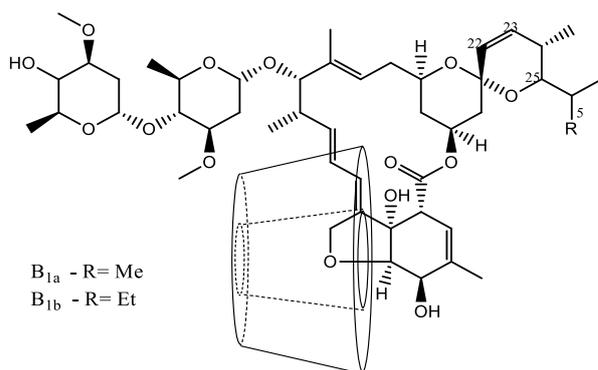
Comparando as mudanças nos deslocamentos químicos da βCD no complexo ABA- βCD em relação aos demais complexos, observa-se que para este sistema houve uma maior variação desse parâmetro. Tal mudança é condizente com o maior valor de constante de equilíbrio encontrados para o sistema ABA- βCD , sendo esses dados atribuídos à maior hidrofobicidade do composto em relação às benzoilfeniluréias.

Também foi realizado o experimento de ROESY para ABA- βCD , contudo a análise do mapa de contornos ROESY não nos permitiu identificar correlações indicativas de acoplamento dipolar entre essas moléculas. Isso se deve à grande sobreposição de sinais, principalmente na região de deslocamento dos sinais referentes aos hidrogênios presentes na cavidade da βCD .

Os dados de RMN nos permite propor as seguintes estruturas supramoleculares para cada composto de inclusão:

a) NOV- βCD



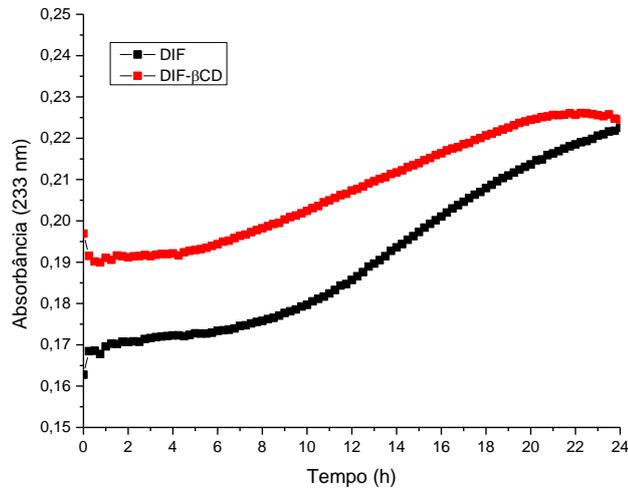
b) DIF- β CDc) ABA- β CD

4.2.5 - Análise de Solubilização

A solubilidade de uma substância corresponde a quantidade máxima da mesma que pode ser dissolvida por quantidade de solvente a uma dada temperatura. Ela constitui um importante parâmetro para avaliar a disponibilidade de um determinado composto no meio líquido. No presente trabalho, a solubilização dos compostos foi monitorada por medida da absorbância em função do tempo, durante o intervalo de 24 h (DENADAI, 2005; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 1986; 2010; SAVJANI).

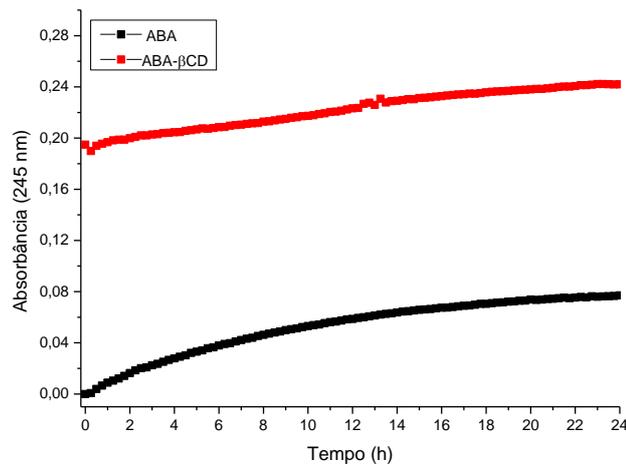
O experimento foi realizado para as três moléculas livres e seus respectivos compostos de inclusão. Nas figuras 40 e 41 está apresentado o gráfico de solubilização dos sistemas DIF/DIF- β CD e ABA/ABA- β CD, respectivamente, a 30 °C ao longo de 24 h. No entanto, para o NOV e seu composto de inclusão cuja solubilidade são muito baixas, não houve detecção do processo em virtude da baixa solubilidade do novaluron.

Figura 40. Curvas de solubilização do DIF e DIF- β CD (30 °C).



Fonte: A autora, 2016.

Figura 41. Curvas de solubilização do ABA e ABA- β CD (30 °C).



Fonte: A autora, 2016.

A análise dos dados dos gráficos 40 e 41 permite verificar que em todos os casos ocorre um aumento de absorbância da solução ao longo das 24 h. As diferenças nos perfis de solubilização para as duas espécies sugerem diferentes mecanismos de solubilização para as espécies estudadas. No caso do sistema DIF- β CD, o perfil sigmoide sugere que deva existir um período de “ativação” das moléculas na fase líquida, antes que o equilíbrio seja atingido.

Na presença de β CD, os compostos DIF e ABA apresentaram maiores valores de absorbância que seus precursores a uma mesma temperatura. Como a absorbância correlaciona-se com a concentração, esses dados sugerem que nas condições observadas o

composto de inclusão apresentam maior solubilidade que seus precursores em toda a faixa de tempo estudada.

Na figura 41, observa-se que somente após ≈ 24 h, as concentrações de DIF e DIF- β CD se igualam. Entretanto, em aproximadamente 20 h, o DIF- β CD já atinge o equilíbrio, uma vez que a concentração muda pouco com o tempo. Este dado sugere que o DIF- β CD tem uma cinética de dissolução mais rápida do que o DIF puro. Para a ABA, dentro do intervalo de tempo estudado, tanto o composto livre quanto seu composto de inclusão aparentemente não atingem o equilíbrio, embora a menor declividade da curva de dissolução da ABA- β CD sugira uma condição mais próxima do equilíbrio de dissolução.

4.2.6 - Análise por Fotometria de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ZP).

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma ferramenta amplamente utilizada para determinar o tamanho médio de nanopartículas em meio líquido. Este método baseia-se na dispersão do feixe de laser monocromático quando a partícula é iluminada pelo mesmo considerando o movimento browniano das partículas e o fato que pequenas partículas se deslocam mais rapidamente do que partículas maiores. Em sistemas formados apenas por partículas pequenas, a variação da intensidade de luz espalhada é maior, pois como se movimentam mais rapidamente, essas partículas cruzam a janela do detector mais vezes dentro de um mesmo intervalo de tempo. As flutuações de intensidade resultantes são utilizadas para calcular o diâmetro hidrodinâmico das partículas utilizando a equação de Stokes-Einstein (equação 4) (DENADAI, 2005; KANTER, 2015).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (\text{Eq. 4}), \text{ onde:}$$

D = coeficiente de difusão
 K_B = constante de Boltzmann
 T = temperatura
 η = viscosidade dinâmica
 R_h = raio hidrodinâmico

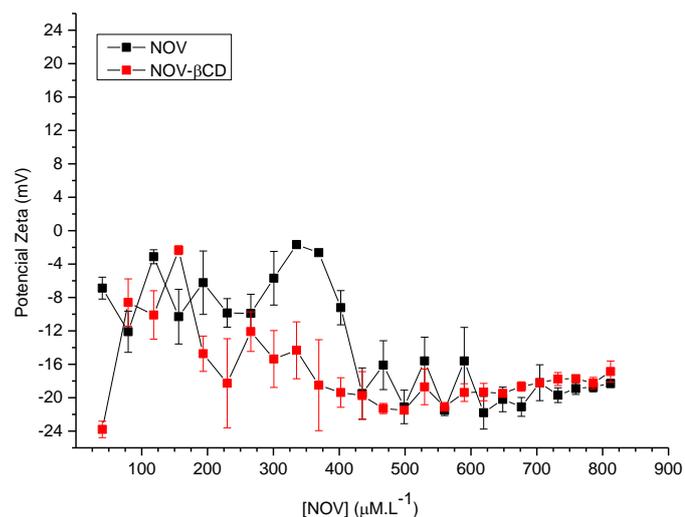
O Potencial Zeta (PZ) relaciona-se com a carga superficial da partícula estando intimamente ligado à estabilidade da dispersão. Quando o PZ é baixo tem-se dispersões mais instáveis, já valores elevados de PZ podem indicar maior estabilidade, visto que as partículas

carregadas se repelem umas às outras e essa força supera as forças de Van Der Waals, as quais são sempre de natureza atrativa e promovem à agregação. Do ponto de vista prático, tem sido observado que suspensões com valores de PZ superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são estáveis, enquanto que aquelas cujo valor se situa entre -30 mV e +30 mV são instáveis e podem flocular (INSTRUTECNICA, 2016; MALVEN, 2005). A análise das propriedades D_h e PZ nos permite sugerir o comportamento coloidal e a estabilidade de sistemas dispersos em suspensões ou emulsões líquidas (MURDOCK et al., 2008).

Nesse contexto, considerando que os inseticidas descritos no presente trabalho, mesmo na presença de β CD, apresentam solubilidade relativamente baixa, uma estratégia de uso consiste em se trabalhar com suspensões aquosas formadas por nanoprecipitados hidrofóbicos. Tais precipitados se formam quando um determinado composto é dissolvido inicialmente em um solvente menos polar que a água mas solúvel em água, como DMSO ou DMF por exemplo. Em seguida, esta mistura é adicionada em água sob agitação, formando-se imediatamente os nanoprecipitados. Desta forma, o efeito da β CD na formação desses nanoprecipitados hidrofóbicos foi avaliada por medidas de D_h e ZP.

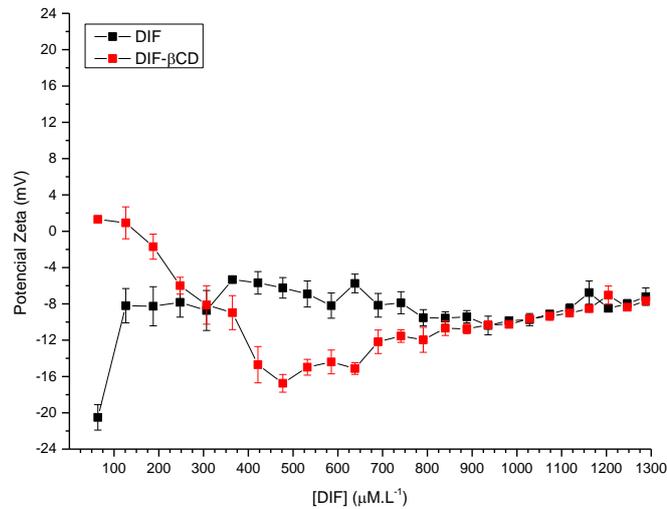
Nas figuras 42, 43 e 44 estão apresentados os gráficos de potencial zeta em função do aumento da concentração dos compostos livres e seus respectivos compostos de inclusão.

Figura 42. Distribuição dos valores de PZ de NOV e NOV- β CD em função da concentração.



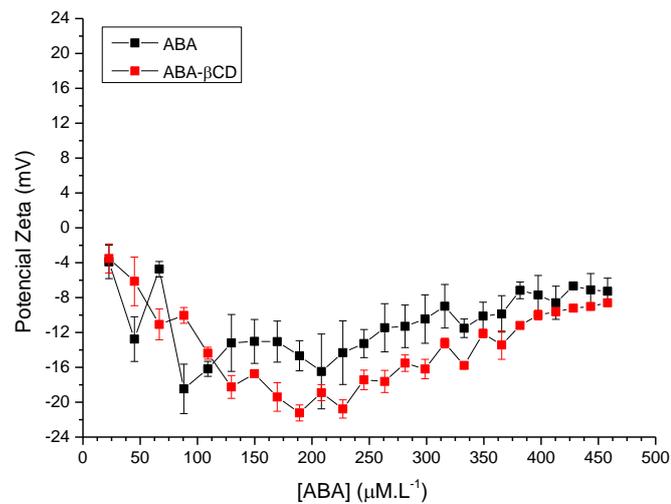
Fonte: A autora, 2016.

Figura 43. Distribuição dos valores de PZ de DIF e DIF- β CD em função da concentração.



Fonte: A autora, 2016.

Figura 44. Distribuição dos valores de PZ de ABA e ABA- β CD em função da concentração.

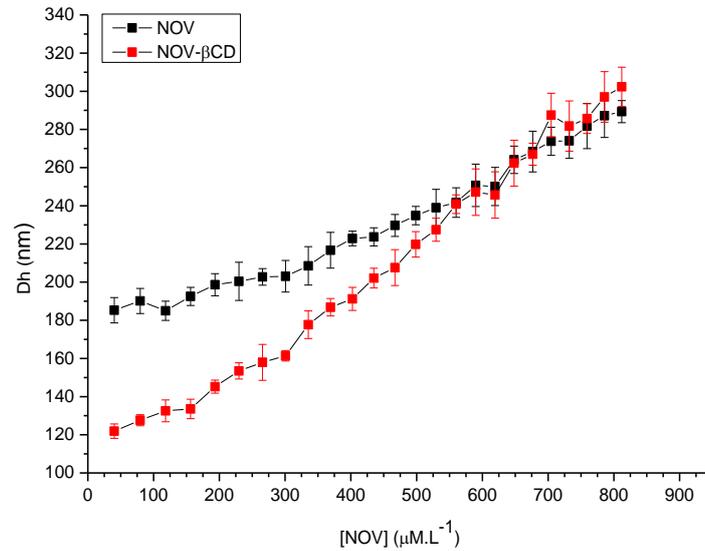


Fonte: A autora, 2016.

Com relação aos dados de PZ observa-se, para todos os sistemas, que tanto o composto livre quanto o composto de inclusão apresentaram valores de PZ na faixa entre -30 mV a +30 mV. Isso demonstra que todas as espécies apresentam comportamento da carga superficial semelhante, estando na região de instabilidade com possibilidade de formação de agregados e precipitados.

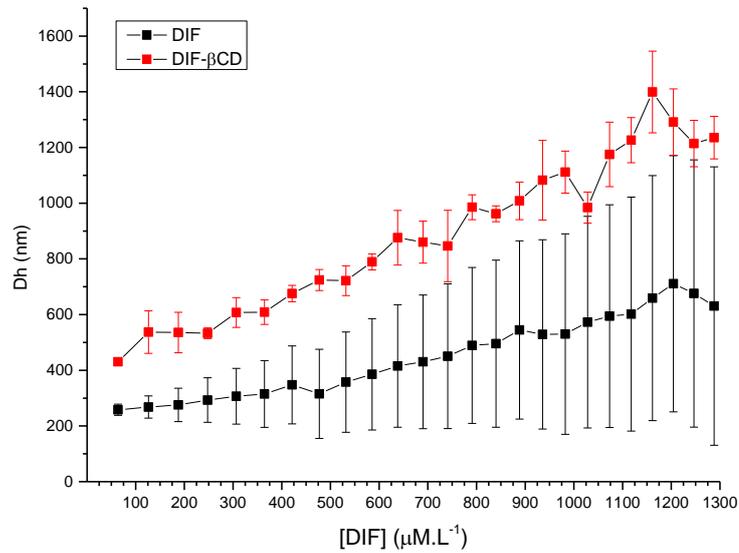
Nas figuras 45, 46 e 47 estão apresentados os gráficos de D_h em função do aumento da concentração dos compostos livres e seus respectivos compostos de inclusão.

Figura 45. Distribuição de tamanho de partículas em suspensão de NOV e NOV- β CD em função da concentração.



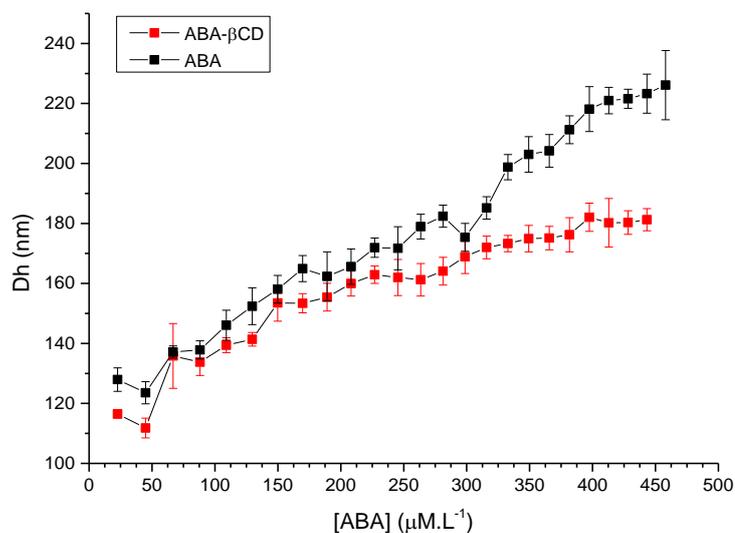
Fonte: A autora, 2016.

Figura 46. Distribuição de tamanho de partículas em suspensão de DIF e DIF- β CD em função da concentração.



Fonte: A autora, 2016.

Figura 47. Distribuição de tamanho de partículas em suspensão de ABA e ABA- β CD em função da concentração.



Fonte: A autora, 2016.

Para todos os sistemas, observa-se que o tamanho de partícula aumenta com o aumento da concentração. Este comportamento pode ser associado ao gradativo aumento da dificuldade de se estabilizar os nanoprecipitados no ambiente aquoso e ao aumento da probabilidade de colisão efetiva entre as partículas, com subsequente coalescência e crescimento.

Para as titulações NOV e NOV- β CD, observa-se que para concentrações menores que 600 μM , o composto de inclusão apresenta menores valores de D_h , o que sugere maior estabilidade coloidal para esta nanocomposição. Como consequência da redução de tamanho, uma maior área superficial da partícula é exposta possibilitando um novo padrão de interações com o meio. O menor tamanho de partículas pode ser atribuído à presença de moléculas de β CD na superfície das partículas, o que favorece a interação com o solvente e uma menor interação partícula-partícula.

Já para as titulações com DIF e DIF- β CD, observa-se que os valores de D_h foram superiores ao composto puro. Esta diferença pode ser atribuída à ausência do grupo 1,1,2-trifluoro-2-trifluoro-metóxi-etóxi na molécula de DIF, que deve gerar um novo modo de interação hóspede-hospedeiro, produzindo alterações coloidais nos nanoprecipitados hidrofóbicos. No entanto, para a curva de titulação do DIF livre observa-se uma grande polidispersidade, já que os desvios padrões dos valores de tamanho de partícula são muito grandes, o que sugere uma instabilidade coloidal do sistema. No composto de inclusão, a

presença de β CD confere uma maior homogeneidade de tamanho às partículas, já que os desvios padrões são menores. Este fenômeno foi também atribuído à maior capacidade das nanopartículas interagirem com o solvente, devido à presença da β CD.

Nas titulações envolvendo ABA e ABA- β CD observa-se que para concentrações menores que 250 μ M não há diferença significativa entre os valores de D_h . Já a partir dessa concentração, verifica-se que o composto de inclusão apresenta menores valores de D_h . Isso sugere comportamento similar ao descrito para o sistema NOV- β CD, embora o efeito da β CD na redução de tamanho se expresse em concentrações menores para o sistema NOV- β CD, enquanto que para o sistema ABA- β CD esse fenômeno se expressa em concentrações maiores.

A partir dos dados obtidos pelo experimento de espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta podemos observar que o composto ABA- β CD apresentou menores valores de D_h entre os compostos de inclusão, sugerindo que o mesmo seria o colóide mais estável. Contudo, em todos os casos observa-se valores de potencial zeta que permitem inferir que esses sistemas são instáveis e podem flocular.

Diante desses dados e do conhecimento de que a alimentação nos estádios larvais é intensa, rápida e indiscriminada através de partículas presentes na água, o fato dos compostos de inclusão estarem sujeitos à floculação juntamente com a presença de β CD poderia ser uma forma de atrair as larvas. Assim, os nanoprecipitados de compostos de inclusão poderiam ser utilizados como “isca” destinada a atrair o alvo desejado ou ser ingerida por ele e aumentar a efetividade no controle de larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

4.3 – RESULTADOS DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS ENVOLVENDO LARVAS DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

Os compostos de inclusão foram avaliados quanto a sua atividade frente as larvas do *Aedes aegypti* nos estádios L1, L4 e inibição de emergência (estádio L3 até adulto) como também a sua segurança através de ensaios de citotoxicidade.

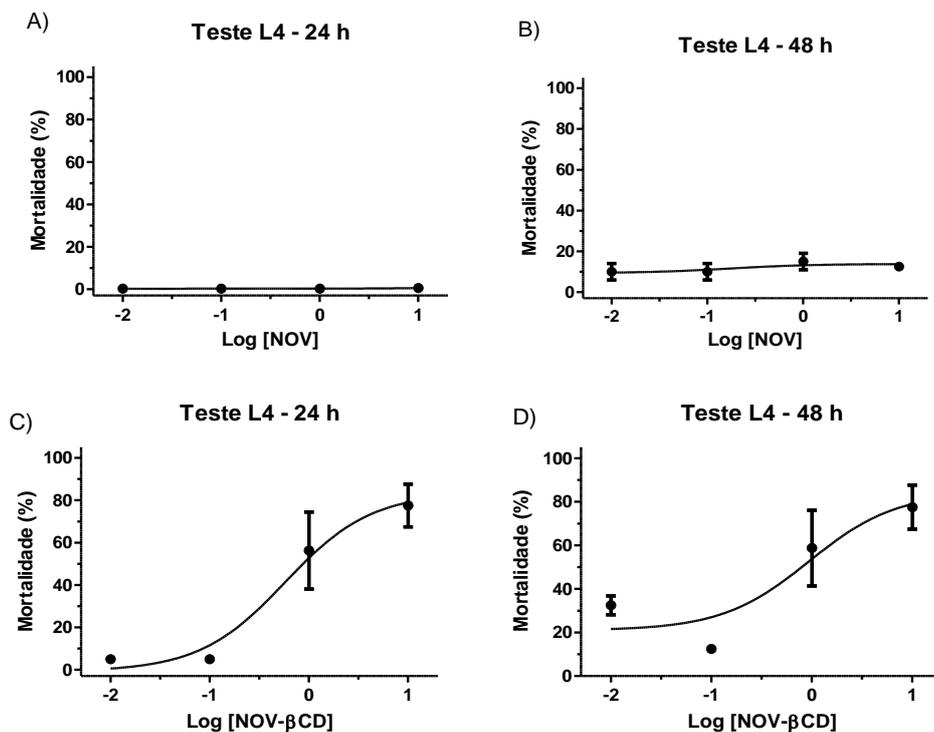
Com base nas informações da caracterização acima descritas, em suspensão, o sólido caracteriza-se como um nanoprecipitado hidrofóbico instável, com possibilidade de agregação.

4.3.1 - Avaliação da atividade frente aos estádios L1 e L4 de larvas do mosquito *Aedes aegypti*

O teste no estágio L1, desenvolvido por Pridigeon e colaboradores, consiste em um teste de triagem que fornece de forma rápida, com redução de trabalho e utilização de pequeno número de larvas por experimento, informações acerca do potencial tóxico dos compostos em análise (PRIDGEON et al., 2009). Já o ensaio no estágio L4 é um teste preconizado pela OMS para verificar de forma padronizada a atividade larvicida de compostos com ação rápida (neurotóxicos) para os insetos tanto em laboratório, quanto em campo, uma vez que a partir deste teste pode-se observar a ação aguda dos compostos (WHO, 2005).

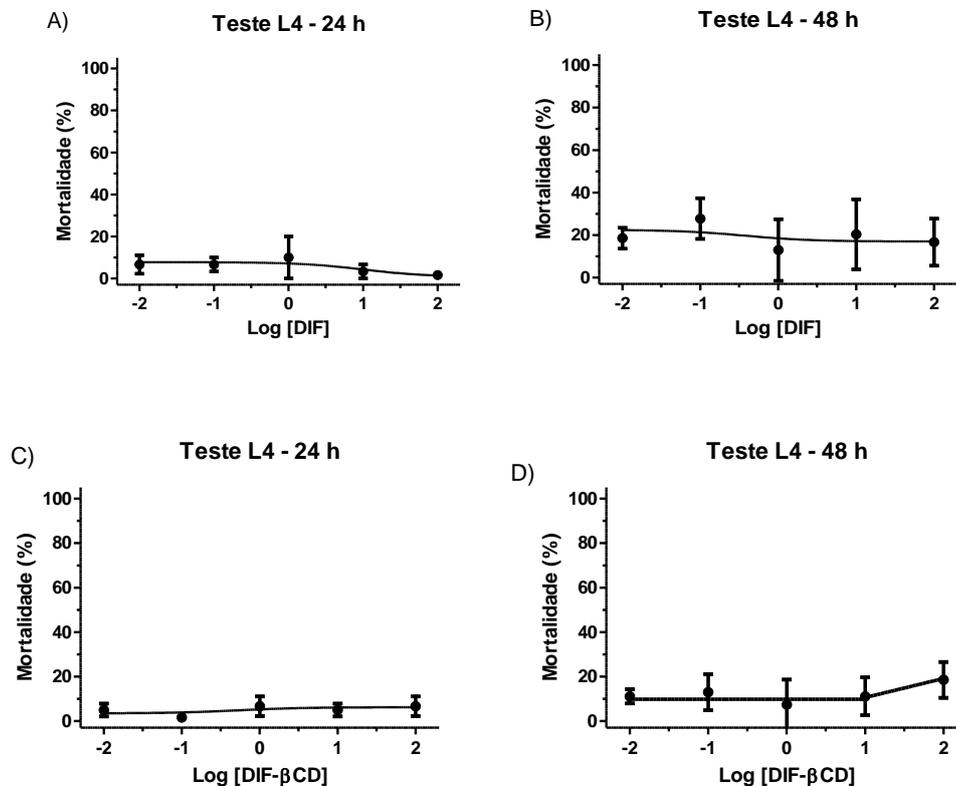
NOV, DIF e seus compostos de inclusão não foram avaliados no estágio L1, por se tratar de um teste de triagem, que não exclui a realização dos ensaios L3 ou L4, como também pelo fato dos compostos livres já serem utilizados comercialmente no combate de larvas do mosquito. Foi realizado o experimento no estágio L4 para esses compostos e nas figuras 48 e 49 estão apresentados os gráficos de porcentagem de mortalidade em função da concentração.

Figura 48. Gráfico de porcentagem de mortalidade das larvas de mosquito *Aedes aegypti* em seu quarto estágio de desenvolvimento em função do aumento da concentração de NOV e NOV- β CD. Para cada concentração foram realizadas três replicatas.



Fonte: A autora, 2015.

Figura 49. Gráfico de porcentagem de mortalidade das larvas de mosquito *Aedes aegypti* em seu quarto estágio de desenvolvimento em função do aumento da concentração de DIF e DIF- β CD. Para cada concentração foram realizadas três replicatas.



Fonte: A autora, 2015.

As linhas de tendência apresentadas nos gráficos da figura 49 demonstram que, tanto o composto livre quanto o composto de inclusão apresentam o mesmo perfil. No entanto, quando comparamos o NOV e NOV- β CD (figura 48), o composto de inclusão apresentou-se mais potente numa concentração menor que a molécula livre. Isto sugere que a estratégia de preparar o composto de inclusão pode ter um efeito na redução da dose. Contudo, um efeito agudo não é esperado para compostos dessa classe, o que foi confirmado pela baixa mortalidade dos indivíduos tratados com o composto livre na concentração limite estudada. Desse modo, foi realizado o experimento de inibição de emergência conforme recomendação pela Organização Mundial de Saúde para compostos cujo mecanismo de ação está relacionado à regulação do crescimento de insetos. O mesmo será apresentado na próxima seção.

Na perspectiva de revisitar compostos já utilizados no controle de outros artrópodes para o combate de larvas de *Aedes aegypti*, foi realizado o estudo da atividade larvicida da ABA e seu composto de inclusão utilizando duas metodologias, uma relacionada ao estágio L1 e a outra ao estágio L4. Na tabela 18 estão apresentados os valores de dose capaz de

causar a morte de 50% da população de larvas (DL_{50}) para os compostos ABA e ABA- β CD obtidos nesses experimentos.

Em ambos os ensaios, os controles negativos utilizados foram água dechlorada, solução aquosa de DMSO 1% e solução aquosa de β CD na maior concentração utilizada nos testes. Para o teste larvicida no estágio L4, a faixa de mortalidade foi de 2-7%, 5-10% e 6-9% para água dechlorada, DMSO 1% e β CD a 100 μ M, respectivamente. Neste teste, quando a taxa de mortalidade nos controles ficou entre 5% e 20%, as taxas de mortalidade dos grupos tratados foi corrigida de acordo com a fórmula de Abbott. Além disso, menos de 2% das larvas se tornaram pupas durante as 48h do experimento no estágio L4.

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{X - Y}{X} 100, \text{ onde}$$

X = porcentagem de sobreviventes no controle

Y = porcentagem de sobreviventes em cada tratamento

Tabela 18. Toxicidade da ABA e ABA- β CD frente a larvas de *Aedes aegypti*. Os dados obtidos são médias de 9 replicatas.

Composto	DL ₅₀ e intervalo de confiança entre parênteses					
	(L1) 24h		(L4) 24 h		(L4) 48 h	
	μ M	ppm (para o ativo)	μ M	ppm (para o ativo)	μ M	ppm (para o ativo)
ABA	0,101 (0,039-0,265)	0,088 (0,034-0,231)	0,906 (0,602-1,36)	0,791 (0,526- 1,191)	0,252 (0,142-0,448)	0,220 (0,124-0,391)
ABA- β CD	0,047 (0,033-0,066)	0,041 (0,029-0,057)	0,449 (0,290-0,695)	0,392 (0,253- 0,607)	0,228 (0,135-0,385)	0,199 (0,118-0,336)

Fonte: A autora, 2015.

Todos os resultados obtidos encontram-se abaixo de 1 ppm, o que demonstra a alta atividade desses compostos contra larvas de *Aedes aegypti* (PRIDGEON et al., 2009). Ao compararmos os resultados das duas metodologias verificamos que as DL_{50} para o estágio L1 foram inferiores aquelas encontradas no experimento envolvendo o estágio L4 a 24 h, o que demonstra a fragilidade deste estágio larval aos compostos testados e uma maior efetividade dos compostos neste estágio. Também observamos que o aumento do tempo de exposição ao composto no estágio L4 levou a uma redução da DL_{50} . Em relação à substância livre e ao composto de inclusão, ABA- β CD demonstrou ser mais potente que seu precursor em todos os experimentos realizados.

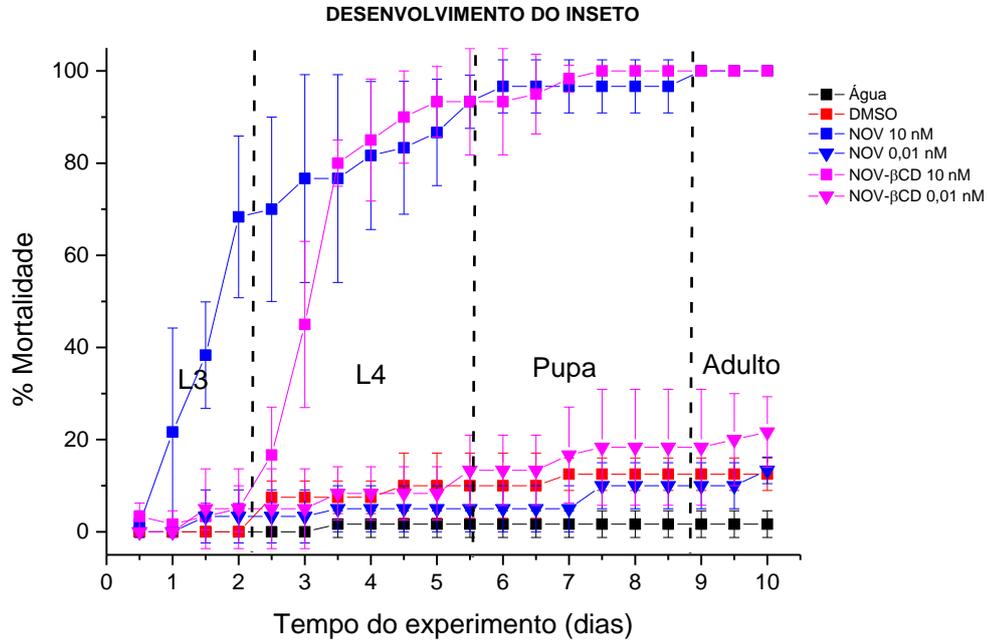
O valor de DL_{50} obtido para ABA no ensaio com larvas no estágio L1 foi superior ao encontrado por Pridgeon e colaboradores (DL_{50} de 2,2 ppb). Contudo, no ensaio com larvas no estágio L4 os valores encontrados são próximos aos obtidos por Vianney (DL_{50} entre 0,56 ppm a 1,61 ppm, 24 h de tratamento). A variabilidade nos valores de DL_{50} são comuns em ensaios desta natureza e pode ser atribuída às diferentes condições experimentais, como por exemplo, solventes utilizados na solubilização dos compostos, susceptibilidade das larvas testadas, tempo de exposição, habilidade do grupo de pesquisa em classificar a fase larval, número de replicatas, bem como as condições operacionais de ensaio (GERIS et al., 2012).

4.3.2 - Avaliação da inibição de emergência

Compostos cujo mecanismo de ação estão relacionados com alterações no processo de crescimento e desenvolvimento dos insetos, como as benzoilfeniluréias, irão necessitar de um acompanhamento do desenvolvimento do inseto para verificar sua ação, uma vez que sua ação não é imediata. Por esta razão, o OMS preconizou a realização do teste de inibição de emergência para compostos em que o mecanismo de ação seja a regulação do crescimento de insetos.

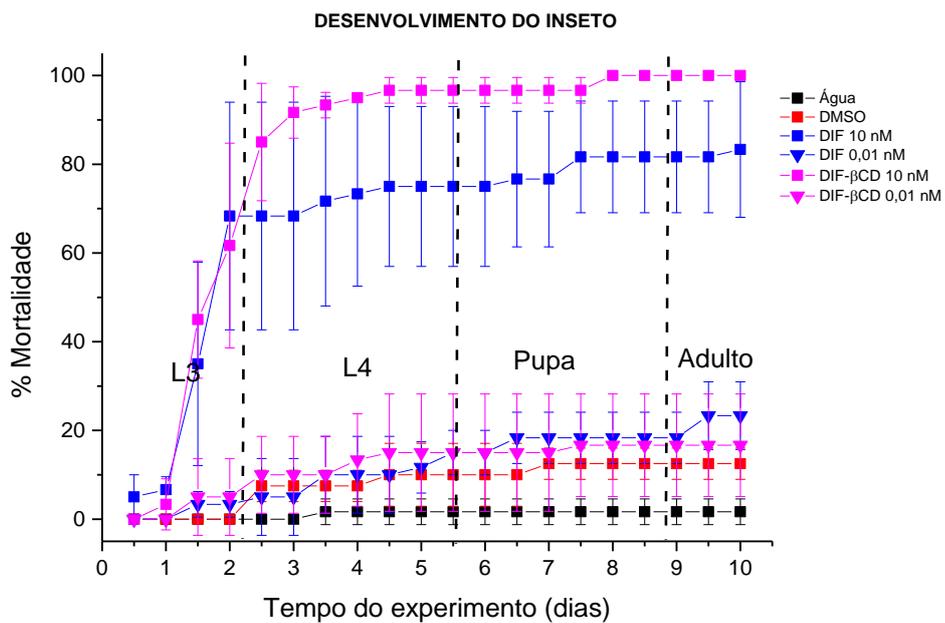
Nas figuras 50 e 51, estão apresentados os dados de porcentagem de mortalidade dos estádios/estágios em função do tempo durante o experimento de inibição de emergência de NOV, DIF e seus compostos de inclusão, nas concentrações de 10 nM e 0,01 nM.

Figura 50. Porcentagem de mortalidade dos estádios/estágios em função do tempo durante o experimento de inibição de emergência para NOV e NOV- β CD nas concentrações de 10 nM e 0,01 nM.



Fonte: A autora, 2015.

Figura 51. Porcentagem de mortalidade dos estádios/estágios em função do tempo durante o experimento de inibição de emergência para DIF e DIF- β CD nas concentrações de 10 nM e 0,01 nM.



Fonte: A autora, 2015.

A partir desses dados observa-se que em todos os compostos, nas concentrações utilizadas, não ocorre a morte dos indivíduos nas primeiras 12 horas do experimento. Isso comprova que o mecanismo de ação não está relacionado a um efeito agudo, típico de compostos neurotóxicos.

Durante a mudança de fase na ecdise de L3-L4, tanto para o composto puro quanto para o composto de inclusão, observamos uma significativa mortalidade principalmente nas concentrações de 10 nM, o que confirma que o mecanismo de ação de compostos é regulação de crescimento. Uma alta mortalidade nessas concentrações também sugere que a mortalidade é dose dependente. Nessas concentrações, os indivíduos que não morrem apresentam grande atraso de desenvolvimento em relação aos indivíduos expostos à menores concentrações dos compostos. Por fim, observou-se um prolongamento do ciclo de vida dos indivíduos em relação ao grupo controle, ocorrendo mudança de estágio/estágio até um dia após o final da mudança de estágio/estágios nos grupos controles. Esse comportamento já foi relatado na literatura para NOV e DIF (FARNESI, 2009; FONTOURA, 2008).

Os controles negativos utilizados foram água deionada, solução aquosa de DMSO 1% e solução aquosa de β CD na maior concentração utilizada nos testes. Em nenhum caso ocorreu menos de 80% de emergência de adultos no controle. Assim como no experimento L4, quando a taxa de emergência nos controles ficou entre 80% e 95% os dados foram corrigidos de acordo com a fórmula de Abbott. Para a água as taxas de emergência ficaram por volta de 95% e para o DMSO 1% na faixa de 90%.

Na tabela 19 estão apresentados os valores de dose capaz de inibir a emergência de 50% da população dos insetos (%IE₅₀) para NOV e DIF e seus compostos de inclusão.

Tabela 19. Porcentagem de Inibição de Emergência (%IE₅₀) para os compostos livres e de inclusão.

Composto	%IE ₅₀ (nM) com intervalo de confiança de 95% (entre parênteses)	Valores em ppb para a %IE ₅₀ de ativo no caso do composto de inclusão
NOV	0,877 (0,459-1,676)	0,432 (0,226-0,826)
NOV- β CD	0,490 (0,268-0,8960)	0,242 (0,132-0,441)
DIF	5,688 (3,340-9,685)	1,767 (1,038-3,009)
DIF- β CD	3,772 (1,812-7,853)	1,172 (0,563-2,440)

Fonte: A autora, 2016.

Os valores de %IE₅₀ para todos os compostos foi da ordem do ppb. Os valores obtidos para NOV e DIF estão próximos daqueles apresentados por outros trabalhos relacionados na literatura, 0,135 ppb (FONTOURA, 2008) e 1,59 ppb (SECCACINI, 2008), respectivamente.

Os compostos de inclusão foram mais potentes que as moléculas livres. Isso demonstra que a estratégia de preparar composto de inclusão levou ao aumento da toxicidade contra larvas do *Aedes aegypti*.

4.4 - ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

4.4.1 - Ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT)

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* é fundamental na etapa inicial de desenvolvimento de novas composições fornecendo informações acerca da segurança das mesmas. Geralmente, são utilizados testes que verificam a viabilidade celular após a exposição a substância em estudo, sendo o ensaio MTT ([brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil)-2H-tetrazólio]) um dos testes colorimétricos mais empregados devido ao baixo custo e rapidez no processamento das amostras (DE ARAÚJO et al., 2008).

O teste com MTT avalia a função mitocondrial da célula através da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, sendo que as células que respiram ativamente reduzem o MTT a formazan, um cristal púrpura insolúvel, que após solubilizado, permite determinar a concentração através da leitura da densidade óptica. Assim, o ensaio mede a respiração celular que é proporcional a quantidade de formazan produzida e ao número de células viáveis. Quanto menor a atividade mitocondrial, menor a viabilidade celular e maior a toxicidade do composto. A partir desses dados é possível determinar a concentração do composto capaz de reduzir em 50% as células viáveis, ou seja, o índice de citotoxicidade 50% (IC₅₀) (DE ARAÚJO et al., 2008; FOTAKIS, TIMBRELL, 2006; MOSMANN, 1983).

Nesta etapa do trabalho, estão apresentados os dados da avaliação da viabilidade de fibroblastos WI26UA4 frente a diferentes concentrações de ABA, NOV E DIF e seus compostos de inclusão, pelo método do MTT. Na tabela 20 estão apresentados os valores de concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% (IC₅₀) obtidos para os compostos nesse experimento.

Tabela 20. Índice de citotoxicidade (IC_{50}) para os compostos livres e seus respectivos compostos de inclusão utilizando fibroblastos WI26UA4.

Composto	IC_{50} (μM) com intervalo de confiança de 95% (entre parênteses) Fibroblastos WI26UA4
NOV	> 200
NOV- β CD	> 200
DIF	> 500
DIF- β CD	184,5 (144,4-235,6)
ABA	14,81 (12,90-17,01)
ABA- β CD	15,07 (13,37-16,97)

Fonte: A autora, 2016.

Os resultados de IC_{50} indicam que dos três compostos livres avaliados, a ABA foi o que apresentou maior efeito citotóxico sobre fibroblastos WI26UA4, nas condições experimentais. Isso está relacionado ao mecanismo de ação desse composto, o qual envolve canais de cloreto que, por existirem em células de vertebrados, podem estar sendo atingidos causando algum prejuízo aos fibroblastos. Além disso, já foram relatados na literatura a citotoxicidade desse composto em outras linhagens celulares (AL-SARAR et al., 2015; LI et al., 2013; MAIOLI et al., 2013; HUANG et al., 2011).

As benzoilfeniluréias, NOV e DIF, apresentaram uma baixa toxicidade, acima da concentração máxima utilizada no experimento. NOV e DIF, por serem mais seletivos, atuando sobre a síntese de quitina, mecanismo esse que não existe nos vertebrados, mostraram uma reduzida toxicidade sobre os fibroblastos WI26UA4.

Em relação aos compostos de inclusão, a ABA- β CD foi tão citotóxica quanto seu precursor enquanto que NOV- β CD e DIF- β CD apresentam ou apresentariam um IC_{50} superior a 100 μM , o que sugere a baixa toxicidade dessa classe de compostos para células humanas, mesmo o composto de inclusão DIF- β CD tendo apresentado um aumento da toxicidade em relação ao seu precursor.

5 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos durante a caracterização confirmaram o sucesso no preparo dos compostos, podendo ser destacados os seguintes pontos:

- Os espectros de absorção na região do infravermelho e análises térmicas indicaram a ocorrência de interação entre os inseticidas e seus respectivos compostos de inclusão no estado sólido;

- A calorimetria de titulação isotérmica confirmou essa interação em solução, sendo todas as estequiometrias 1:1, embora apresentando constantes de afinidade bem distintas para os três compostos de inclusão (NOV – K = $510 \pm 31,8$; DIF – K = $65,1 \pm 1,22$ e ABA – K = $3,54 \cdot 10^4 \pm 3,5 \cdot 10^3$);

- A técnica de ressonância magnética nuclear foi fundamental para propor a estrutura supramolecular formada pela interação entre as moléculas hóspede e hospedeira e a β CD através de uma associação. Tal associação pode ser explicada em termos da maior afinidade das moléculas pelo solvente;

- Os ensaios de solubilização permitiram verificar que os compostos de inclusão apresentam maior dissolução quando comparados a seus precursores;

- Os experimentos de diâmetro hidrodinâmico possibilitaram observar a redução de tamanho para os compostos NOV- β CD e ABA- β CD;

- A análise dos dados de potencial zeta revelou que todos os compostos são instáveis e podem flocular. Todavia, considerando a aplicação desses compostos, esta característica mostra-se benéfica, uma vez que formulações deste tipo podem favorecer a ingestão dos compostos pelas larvas, facilitando o combate as mesmas.

Quanto aos ensaios biológicos, os resultados para os testes larvicidas, tanto no estágio L1 e L4 quanto inibição de emergência, demonstraram que os compostos de inclusão foram mais potentes que seus precursores. Quanto aos ensaios de avaliação da segurança, os experimentos de toxicidade demonstraram que o encapsulamento em β CD não alterou o potencial citotóxico e genotóxico desses compostos. As benzoilfeniluréias, assim como seus compostos de inclusão apresentaram menor toxicidade em relação à abamectina como já esperado devido a seletividade dos reguladores de crescimento de insetos.

Por fim, a estratégia de revisitar compostos já utilizados no combate a outros artrópodes aliada ao encapsulamento molecular resultou em uma melhora na sua potência. Isso pode contribuir para aumentar o arsenal de inseticidas utilizados no combate a larvas do

Aedes aegypti, uma vez que, as avermectinas apresentam mecanismo de ação diferente em relação aos compostos hoje utilizados no controle químico das larvas do mosquito. Com relação ao novaluron e diflubenzuron, observou-se também um aumento da potência larvicida com o encapsulamento, sinalizando que a estratégia de preparar compostos de inclusão pode trazer ganhos relacionados a biodisponibilidade, sem alterar o mecanismo de ação dos mesmos.

6 – REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Índice Monográfico. D17 – Diflubenzuron**. Brasília, 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/D17%2B%2BDiflubenzurom.pdf/02e42a13-3f5c-48f8-ac8f-0ab691ab3a32>. Acessado em: 16 set 2015.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Índice Monográfico. N09 – Novaluron**. Brasília, 2015a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/N09%2B%2BNovalurom.pdf/9cbf5ac8-2295-41f2-9daf-42ef374f1972>. Acessado em: 16 set 2015.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução - RE Nº 5.148, de 11 de novembro de 2010**. Índice Monográfico. Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/23165393/pg-50-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-16-11-2010>. Acessado em: 16 set 2015.
- AGUIAR, U. N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 50-55, 2014.
- AL-SARAR, A. S. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of abamectin, chlorfenapyr, and imidacloprid on CHOK1 cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 17041-17052, 2015.
- ALBERS-SCHÖNBERG, G. et al. Avermectins. Structure determination. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, n. 14, p. 4216-4221, 1981.
- ALVES, J. M. A. M. **Aplicação de técnicas de RMN em solução ao estudo de sistemas químicos e biológicos**. Dissertação (Mestrado em Química). Faculdade de Ciências. Departamento de Química e Bioquímica. Universidade de Lisboa. 2010. 85 p
- ALVES, O. L. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. **Parcerias Estratégicas**. Brasília, n. 18, p. 23-40, 2004.
- APPERSON, C. S. et al. Effects of diflubenzuron on *Chaoborus astictopus* and nontarget organisms and persistence of diflubenzuron in lentic habitats. **Journal of economic entomology**, v. 71, n. 3, p. 521-527, 1978.
- ASSUNÇÃO, G. V. **Caracterização química e avaliação da atividade larvicida frente a *Aedes aegypti* do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce)**. Dissertação (Mestrado em Química). –Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013. 93f.
- ASTRAY, G. et al. A review on the cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, n. 33, v. 7, p. 1631-1640, 2009.
- AWASTHI, A. et al. Separation and Identification of Degradation Products in Abamectin Formulation Using LC, LTQ FT-MS, H/D Exchange and NMR. **Current**

Pharmaceutical Analysis, v. 8, p. 415-430, 2012.

BARATA, E. A. M. F. et al. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 237-242, 2001.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.

BELLINI, R. et al. Impact of Chikungunya Virus on *Aedes albopictus* Females and Possibility of Vertical Transmission Using the Actors of the 2007 Outbreak in Italy. **PLoS ONE**, v.7, n. 2, p.:e28360, 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0028360.

BELINATO, T. A.; VALLE, D. The Impact of Selection with Diflubenzuron, a Chitin Synthesis Inhibitor, on the Fitness of Two Brazilian *Aedes aegypti* Field Populations. **PLoS One**, v. 10, p. 1-19, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0130719.

BERTAUT, E.; LANDY, D. Improving ITC studies of cyclodextrin inclusion compounds by global analysis of conventional and non-conventional experiments. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v.10, p. 2630-2641, 2014.

BESERRA, E.B., et al. Efeito da qualidade da água no ciclo de vida e na atração para oviposição de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.39, n. 6, p.1016-1023, 2010. DOI:10.1590/S1519-566X201000060002.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.

BHOPATE SAPANA B., DHOLE SHASHIKANT N. Inclusion complexation by cyclodextrin: a novel approach to improve solubility and bioavailability of poorly water soluble drug. **International Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 4, p.175-188, 2014

BISSET, L. J. A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistência. **Revista Cubana Medicina Tropical**, v. 54, n. 3, p.202-219, 2002.

BORGES, R. A. et al. Mecanismos da ação larvicida do diflubenzuron sobre *Aedes aegypti* evidenciados pelas alterações ultraestruturais. **Revista de Patologia Tropical**. v. 41, n. 2., p. 222-232, 2012. DOI:10.5216/rpt.v41i2.19326.

BRADY, O. J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.8, p.e1760, 2012. DOI: 10.1371 /journal.pntd.0001760.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, DF, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007a.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília,DF, v. 16, n. 4, p.295-302, out./dez., 2007b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Básica, Departamento de Atenção Básica, série A. **Normas e Manuais Técnicos, Cadernos de atenção Básica nº 21**. Brasília – DF, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portal da Saúde**. Dengue. Informações Técnicas. Brasília – DF, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**. Brasília, 2009. 160p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. **Monitoramento dos casos de dengue e febre da chikungunya até a Semana Epidemiológica 23, 2015**, v. 46, n. 18, 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Plano de Contingência Nacional para Epidemias de Dengue**. Brasília, 2015. 42p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 23, 2016**, Brasília, v. 47, n. 28, 2016a.

BRASIL. Ministério da saúde. **Informe epidemiológico nº 33 – semana epidemiológica (se) 26/2016 (26/06 a 02/07/2016) monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil**. Brasília, 2016b.

BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional – ESPII. **Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do sistema nervoso central (SNC)** Atualização: 10/03/2016 18:10. 2ª edição – 2016c.

BUDAL, R. M. **Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas**. Tese (doutorado) Pós-Graduação em Química. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Universidade Federal de Santa Catarina. 2003. 191p.

CALDERINI, A. **Encapsulação e caracterização físico- química do fármaco vasodilatador minoxidil em ciclodextrinas**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, São Paulo. 2006. 196 f.

CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Biological Molecules. **Journal of Solid-Phase Biochemistry**, v. 5, n. 3, 1980.

CAMARGO, M. F. et al. Avaliação da ação residual do larvicida temephós sobre o *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) em diferentes tipos de recipientes. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, n. 1, p. 65-70, jan-jun. 1998.

CAMERON, K. S.; FIELDING, L. NMR diffusion spectroscopy as a measure of host-guest complex association constants and as a probe of complex size. **The Journal of organic chemistry**, v. 66, n. 21, p. 6891-6895, 2001.

CAMPBELL, W. C. **Ivermectin and abamectin**. 1 Edição. New York: Springer Science & Business Media, 1989. 363p.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 232-236, 2001.

CANDY, D. J.; KILBY, B. A. Studies on chitin synthesis in the desert locust. **Journal of Experimental Biology**, v. 39, p.129-140, 1962.

CAO, F.T.; GUO, J.; PING, Q. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin- cyclodextrin tetracomponent complexes. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, p. 747-56, 2005.

CARVALHO, M. S. L. et al. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 623-629, 2004.

CARRIER, R. L.; MILLER, L. A., AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. Review. **Journal of Controlled Release**, v. 6, n. 1232, p. 78-99, nov. 2007.

CHAPMAN, R. F. **The insects: Structure and Function**. 4ª Edição, Cambridge University Press. 1998. 770p.

CHOI, H. G. et al. Terfenadine-beta-Cyclodextrin inclusion complex with antihistaminic activity enhancement. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, p. 857-862, 2001.

CHOWDARY, K. P. R.; SHANKAR, K. R.; TANNIRU, A. Recent research on cyclodextrin complexation in formulation development- A review. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 1576-1583, 2014.

COBAS, J. C.; MARTIN-PASTOR, M. A homodecoupled diffusion experiment for the analysis of complex mixtures by NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 171, n. 1, p. 20-24, 2004.

COHEN, E. Chitin Biochemistry: synthesis and inhibition. **Annual Review Entomology**, v. 32, p.71-93, 1987.

COHEN, E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. **Pest Management Science**, v. 57, p.946- 950, 2001.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 1994. 225p.

CUNHA-FILHO, M. S. S. D.; SÁ-BARRETO, M. S. S. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

CUTLER, G. C.; SCOTT-DUPREE, C. D. Novaluron: prospects and limitations in insect

pest management. **Pest Tech**, v. 1, n. 1, p. 38-46, 2007.

DE ARAÚJO, S. et al. Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, v. 18, n. 1, p. 25-31, 2008.

DENADAI, Â. M. L. **Caracterização estrutural e termodinâmica de complexos supramoleculares formados por β -ciclodextrina e fármacos**. Tese (Doutorado em química). Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo-Horizonte. 2005. 166p.

DENADAI, Â. L. et al. A Supramolecular Complex between Proteinases and β -Cyclodextrin that Preserves Enzymatic Activity. **BioDrugs**, v. 20, n. 5, p. 283-291, 2006.

DENADAI, Â. M. L. et al. Supramolecular self-assembly of β -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 15, p. 2286-2296, 2007.

DENADAI, A. M. L. et al. Self-assembly characterization of the beta-cyclodextrin and hydrochlorothiazide system: NMR, phase solubility, ITC and QELS. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 55, n. 1-2, p. 41-49, Jun. 2006b.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, 2004.

DE REZENDE, J. M. ARTRÓPODO, ARTRÓPODE. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 3, p. 253-254, 2007.

DEUS, K. M. et al. The effect of ivermectin in seven strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) including a genetically diverse laboratory strain and three permethrin resistant strains. **Journal of medical entomology**, v. 49, n. 2, p. 356-363, 2012.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. In: _____ **The acetate pathway: fatty acids and polyketides 2^a**. Edition. John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex, England. 2002, Capítulo 3, p. 96-101.

DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (DIVE). **Dengue - Orientações Técnicas para Pessoal de Campo**. Santa Catarina, 2015.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 259-279, 2002.

DOURMISHEV, A. L.; DOURMISHEV, L. A.; SCHWARTZ, R. A. Ivermectin: pharmacology and application in dermatology. **International journal of dermatology**, v. 44, n. 12, p. 981-988, 2005.

DUCHENE, D.; WOUESSIDJEW, D. Pharmaceutical uses of cyclodextrins and derivatives. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.16, p.2487-2499, 1990.

EGYED, O. Spectroscopic studies on β -cyclodextrin. **Vibrational Spectroscopy**, v. 1, p.

225–229, 1990.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Novaluron; Pesticide Tolerances**. Federal Register, v. 76, n. 175, sep. 2011.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Reregistration Eligibility Decision (RED) Diflubenzuron**. Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs Special Review and Reregistration Division. EPA 738-R-97-008, 1997.

FARNESI, L. C. **Avaliação do efeito de novaluron, um inibidor da síntese de quitina, sobre a formação de larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 2009. 88f.

FARNESI, L. C. et al. Physiological and Morphological Aspects of *Aedes aegypti* Developing Larvae: Effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30363, 2012.

FAUCI, A. S.; MORENS, D.M. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. **New England Journal of Medicine**, v. 374, p. 601-604, 2016. DOI: 10.1056/NEJMp1600297.

FERNANDES, V. C. et al. Caracterização físico-química de complexos de insulina: dimetil-beta-ciclodextrina e insulina: hidroxipropil-beta-ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 543-553, Dec. 2007.

FIELDING, L. Determination of association constants (Ka) from solution NMR data. **Tetrahedron**, v. 56, n. 34, p. 6151-6170, 2000.

FONTOURA, N. G. et al. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 387-395, 2012.

FONTOURA, N. G. **Efeito do Novaluron - um inibidor da síntese de quitina – sobre *Aedes aegypti* em laboratório e simulado de campo**. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) Entomologia Médica Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2008. 90f.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) Specifications and evaluations for agricultural pesticides. **DIFLUBENZURON 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea**. 2004. 22p.

FORATO, L. A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Protein Structure in KBr Pellets by Infrared Spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 259, n.1, p. 136-141, 1998.

FORATO, L. A. et al. A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações. **Embrapa Instrumentação**. São Carlos, São Paulo, 2010.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. Vol.

2. Edusp, 1996.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FOURNET, F. et al. Effects of two insect growth regulators on ecdysteroid production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 32, p. 588-593, 1995.

FREITAS, R. M. C. D. et al. Effects of ivermectin on *Culex quinquefasciatus* larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 4, p. 293-298, 1996.

FROMMING, K. H.; SZEJTIL, J. Cyclodextrins in Pharmacy, **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, 1994.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Ministério da Saúde. **Dengue: Instruções Para Pessoal de Combate ao Vetor: Manual de Normas e Técnicas**. 3ed. Brasília, 2001.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Dengue vírus e vetor**. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>. Acessado em: 16 set 2014.

GANGISHETTI, U. et al. Effects of benzoylphenylurea on chitin synthesis and orientation in the cuticle of the *Drosophila* larvae. **European Journal of Cell Biology**, p. 1-14, 2008.

GARCIA NETO, L. J. **Efeito residual do Diflubenzuron sobre larvas de *Aedes aegypti* em condições simuladas de campo, no laboratório**. Dissertação (mestrado). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.107 p.

GARNERI, C. et al. Studies on trimethoprim: hydroxypropyl-cyclodextrin: aggregate and complex formation. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 345, n. 17, p. 2550-2556, nov. 2010.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica–Parte II. **Cerâmica**, v. 34, n. 225, p. 163-164, 1988.

GERIS, R. et al. Bioactive natural products as potential candidates to control *Aedes aegypti*, the vector of dengue. **Studies in natural products chemistry**, v. 37, p. 277-377, 2012.

GOMEZ-DANTES, H.; WILLOQUET, J. R. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, supl. 1, p. S19-S31, 2009.

GRAF, J. F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitology Today**, v. 9, n. 12, p. 471-474, 1993.

GUEDES, F. L. et al. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a

biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 3, p. 220-225, 2008.

GUY, B. et al. From research to phase III: Preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7229-7241, 2011.

HEDGES, A. R., Industrial applications of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2035-2044, 1998.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v. 4, p. 117-212, 1965.

HUANG, J. F. et al. Preliminary studies on induction of apoptosis by abamectin in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cell line. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 100, n. 3, p. 256-263, 2011.

INSTRUTÉCNICA INSTRUMENTAÇÃO PARA PESQUISA E INDÚSTRIA. 1996-2014. Disponível em: <http://www.instrutec.com.br/represen/bic/teoriazeta.html>.

IONASHIRO, M. Giolito: Fundamentos da Termogravimetria. Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial. **São Paulo: GIZ**, 2005. 80p.

KAH, M., et al. Nanopesticides: state of knowledge, environmental fate, and exposure modeling. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 16, p. 1823-1867, 2013.

KANTER, M. et al. Enabling the measurement of particle sizes in stirred colloidal suspensions by embedding dynamic light scattering into an automated probe head. **Measurement**, v. 80, p. 92-98, 2016.

KANTOR; I. N. Dengue, Zika and Chikungunya. **Medicina**, B. Aires, v. 76, n. 2, p. 93-97, 2016.

KOHATA, S.; KOUKI, J.; AKIRSA, O. Thermal decomposition of cyclodextrins (α -, β -, γ - and modified β -CyD) and of metal-(β -CyD) complexes in the solid phase. **Termochimica Acta**, v. 217, p. 187-198, 1993.

KRZYSZTOF; KATARZYNA, Use of cyclodextrins in tropical formulations. Practical aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 467-478, 2008.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **The theory and practice of industrial pharmacy**. Lea & Febiger, 1986.

LANNA, E.G. **Composições nanoestruturadas de *Bryophyllum Pinnatum* (Lam.) Oken com β -ciclodextrina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2015. 161f.

LAU, K. W. et al. Evaluation of Insect Growth Regulators Against Field-Collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Malaysia. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 2, p.199-206, 2015. DOI: 10.1093/jme/tju019.

LI, S. et al. Avermectin exposure induces apoptosis in King pigeon brain neurons. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 2, p. 177-187, 2013.

LIMA, E. P. et al. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em Municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 3, p. 259-263, 2006.

LO, P. K.A. et al. Pharmacokinetic studies of ivermectin: effects of formulacion. **Veterinary Research Communications**. v. 9, p. 251-268, 1985.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 329, n. 1, p. 1-11, 2007.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; MASSON, M.; BREWSTER, M. E., Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 5, p. 1091-1099, 2004.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde.**, v.5, n.3, p. 55-64, 2014. DOI:10.5123/S2176-62232014000300007

LULA, I. et al. Study of angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its β -cyclodextrin inclusion complexes: Complete sequence-specific NMR assignments and structural studies. **Peptides**, v. 28, n. 11, p. 2199-2210, 2007.

LUZ, K. G.; SANTOS, G. I. V.; VIEIRA, R. M. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília , v. 24, n. 4, p. 785-788, 2015.

MACHADO, A. A. **Eficácia e período residual do diflubenzuron para o controle de larvas de *Aedes aegypti* resistentes ao temefós.** Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. Jaboticabal. São Paulo, 2012.

MACORIS, M. L. G. et al. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.

MACORIS, M. L. G. et al. Modificações da suscetibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao Temefós. **Revista de Patologia Tropical**, n. 24, v. 1, p. 31-40, 1995.

MAIOLI, M. A. et al. The role of mitochondria and biotransformation in abamectin-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 2, p. 570-

579, 2013.

MALVERN. Disponível em:

<http://www.malvern.com/br/products/technology/isothermal-titration-calorimetry/>.

Acesso em: 28 agos. 2015.

MARTINS, F.; SILVA, I. G. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, n. 2, p. 135-138, 2004 .

MELO, C. P; PIMENTA, M. A. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, Brasília, n. 18, p. 9-21, 2004.

MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v.206, p. 4393-4412, 2003.

MICROCAL. ITC Data Analysis In origin1. In: MicroCal, editor. The calorimetry experts. 5.0 ed. MicroCal; 1998, [http:// www.microcalorimetry.com](http://www.microcalorimetry.com).

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, dec. 1983.

MULLA, M. S. The future of insect growth regulators in vector control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.11, n. 2, p. 269-273, 1995.

MULLA, M. S. et al. Laboratory and field evaluation of novaluron, a new acylurea insect growth regulator, against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 28, n. 2, p. 241-254, 2003.

MURDOCK, R. C. et al. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 239-53, feb. 2008.

MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p.67-70, 2015. DOI: 10.1016/j.mjafi.2014.09.011.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.205-207, 2002.

NITALIKAR, M. M.; SAKARKAR, D.; JAIN, P. V. Cyclodextrins: A Review. **Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2012.

NOVELLI, A. **Efeito do Vertimec 18® CE e de seu princípio ativo, a abamectina, em ambiente aquático: uma análise laboratorial e in situ**. Tese (doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Vigilância da infecção pelo vírus**

Zika, microcefalia e síndrome de Guillain-Barré. Orientações provisórias 7 de Abril de 2016 WHO/ZIKV/SUR/16.2 Rev.1, 2016.

PATIL J.S., et al . Inclusion complex system; a novel technique to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, may. – jun. 2010.

PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUÁREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology.**, v.146, p. 124-137, 2007.

PICCOLI, C. F. **Suscetibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) ao inseticida temefós.** Monografia (graduação em Ciências Biológicas). Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

PINTO JUNIOR, V. L. et al. Vírus Zika: revisão para clínicos. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 28, n. 6, p. 760-765, 2015.

PITHA J. M. et al. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin in preparation and characterization: effects on solubility of drugs. **International Journal Pharmaceutics**, v. 29, p. 73-82, 1986.

PITHA J., PITHA J. Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins: nontoxic dissolution enhancing excipients. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 9, p. 987-90, 1985.

PITHA, J.; SZENTE, L. Molecular encapsulation of drugs by cyclodextrins and congeners. **Controlled Drug Delivery**, v. 1, p. 125-14, 1983.

PORTO, V. S. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ao diflubenzuron e novaluron e seus efeitos residuais em Campina Grande.** Trabalho de conclusão de curso (graduação). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Estadual da Paraíba. 2015. 49p.

PORTUGAL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. **Artrópodes e Roedores Associados à Transmissão de Agentes Infeciosos.** Lisboa, 2014.

PRIDGEON, J. W. et al. Susceptibility of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Say, and *Anopheles quadrimaculatus* Say to 19 pesticides with different modes of action. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 1, p. 82-87, 2008.

PRIDGEON, J. W. et al. High-Throughput Screening Method to Identify Potential Pesticides for Mosquito Control. **Journal of Medical Entomology**, v.46, n.2, p. 335-341, 2009.

RAJEWSKI, R.A.; STELLA, V.J., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 11, p. 1142, 1996.

REKHARSKY, M. et al. Ion-pairing molecular recognition in water: Aggregation at low

concentrations that is entropy-driven. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 50, p. 14959-14967, 2002.

REKHARSKY, M. V.; INOUE, Y., Complexation thermodynamics of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, 1875-1917, 1998.

RETNAKARAN, A.; WRIGHT J.E. Control of insect pests with benzoylphenyl ureas. In: **Chitin and benzoylphenyl ureas**. Springer Netherlands, 1987. p. 205-282.

REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R.I. Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. **Advances in Insect Physiology**, v. 26, p. 157-232, 1996.

ROSA, C. S. et al. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) forma imaturas para ivermectina. **BioAssay**, v. 6, n. 6, 2011.

ROZENDAAL, J. A. Vector control methods for use by individuals and communities. Geneve: World Health Organization. 1997; 398p.

SALEH, M. S., et al. Effectiveness of slow-release tablet formulations of the IGR diflubenzuron and the bioinsecticide spinosad against larvae of *Aedes aegypti* (L.). **African Entomology**, v. 21, n. 2, p. 349-353, 2013.

SANTOS, S. L. **Abordagem ecossistêmica aplicada ao controle da Dengue no nível local: um enfoque com base na reprodução social**. Tese (Doutorado em Saúde Pública)—Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

SAENGER, W. Cyclodextrin Inclusion-Compounds in Research and Industry. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 19, n. 5, p. 344-362, 1980.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. Published online 2012 July. **Pharmaceutics**, 2012
DOI: 10.5402/2012/195727.

SCHNEIDER, H. J.; HACKET, F.; RUDIGER, V.; IKEDA, H., NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1755-1785, 1998.

SCHAFFAZICK, S.R. et al. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Possível associação entre a infecção pelo vírus Zika e a microcefalia — Brasil, 2015. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention. **Morbidity and Mortality Weekly Report MMWR**, Vol. 65, Jan. 2016.

SECCACINI, E. et al. Effectiveness of pyriproxyfen and diflubenzuron formulations as larvicides against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 24, n. 3, p. 398-403, 2008.

SIDDAL, J. B. Insect growth regulators and insect control: A critical appraisal. **Environmental Health Perspectives**, v.14, p. 119-126, 1976.

SIEUWERTS, A. M. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival. **Europe Journal Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 11, p. 813-823, 1995.

SILVA, J. J. da. **Potencial dos reguladores de crescimento de insetos (IGRs), Diflubenzuron e Metrophene no controle do Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae) em Uberlândia - MG.** Tese (doutorado) Programa de Pós-graduação em imunologia e parasitologia aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia. 2006. 75p.

SILVA, H. H. G., SILVA I. G., LIRA, K. S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, n. 1, p. 53-63, jan./jun., 1998.

SILVA, L. M. G. E. **Estudo químico biomonitorado por ensaio com larvas *Aedes aegypti* das espécies *Ocoetea velloziana* (Meisn.) Mez. e *Aiouea trinervis* (Meisn.).** 2010. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

SILVA, J. J.; MENDES, J. Effect of Diflubenzuron on immature stages of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 679-682, 2002.

SILVA, P. V. da. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Compostos de Inclusão Formados Entre Sulfadiazina de Sódio e Ciclodextrinas.** Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2015. 77 p.

SILVERSTEIN, R. M.; BOSSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 5ª. ed., Editora LTC: Rio de Janeiro, 1994. 387p.

SOUSA, F. B. et al. Supramolecular Self-Assembly of Cyclodextrin and Higher Water Soluble Guest: Thermodynamics and Topological Studies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 26, p. 8426-8436, 2008.

SPRINGER, J. P. et al. The absolute stereochemistry and conformation of avermectin B_{2a} aglycon and avermectin B_{1a}. **Journal of American Oil Chemists Society**. v. 103, p. 4221-4224, 1981.

STAAL GB. Insect growth regulators with juvenile hormone activity. **Annual Review of Entomology**, v. 20, p. 417-460, 1975.

SUÁREZ, D. F. et al. Structural and thermodynamic characterization of doxycycline/ β -cyclodextrin supramolecular complex and its bacterial membrane interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, p. 194-201, 2014.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chemical**

Reviews, v. 98, n. 5, p. 1743-1753, 1998.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 867-871, jun. 2002.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 275-277, mai./jun., 2006.

TAWATSIN, A. et al. Field evaluation of Novaluron, a chitin synthesis inhibitor larvicide, against mosquito larvae in polluted water in urban areas of Bangkok, Thailand. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health**, U. California, v. 38, n. 8, p. 434-441, may. 2007.

THAVARA, U. e t al. Efficacy and Longevity of a New Formulation of Temephos Larvicide Tested in Village-Scale Trials against *Aedes aegypti* Larvae in Water-Storage Containers. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 20, n. 2, p.176-182, jun. 2004.

THOMPSON, D. O. Cyclodextrins - Enabling excipients: Their present and future use in pharmaceuticals. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 14, n. 1, p. 101-104, 1997.

TIŠLER, T.; ERŽEN, N. K. Abamectin in the aquatic environment. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 6, p. 495-502, 2006.

TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; PINHEIRO, F. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. In: _____. **Febres Hemorrágicas Viróticas**. Rio de Janeiro, 2005. p.1741-1754.

TURNBULL, W. B.; DARANAS, A. H. On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 48, p. 14859-14866, nov. 2003.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2045-2076, Jul./Aug., 1998.

VEIGA, F.J.B.; PECORELLI, C.C.M.F.; RIBEIRO, S.S.L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. **Minerva Coimbra: Coimbra**, p.21-26, 140-143, 2006.

VENTURINI, C. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, p. 360-368, 2008.

VIANNEY, R. R. **Susceptibilidad de cuatro poblaciones de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) a insecticidas**. Tesis (Maestría en Ciencias, especialista en Entomología y Acarología). Intitución de Enzenanza e investigación em ciências agrícolas. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo de México, 2011. 50p.

VILLAVARDE, J. et al. Preparation and Characterization of Inclusion Complex of Norflurazon and β -Cyclodextrin To Improve Herbicide Formulations. **Journal of**

Agricultural and Food Chemistry, v. 52, n. 4, p. 864-869, 2004.

ZHANG, J.; ZHU, K.Y. Characterization of a chitin syntase cDNA and its increased mRNA level associated with decrease chitin synthesis in *Anopheles quadrimaculatus* exposed to diflubenzuron. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 712-725, 2006.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-72, jun. 2015.

ZUO, Z. et al. Flutamide-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex: formulation, physical characterization, and absorption studies using the Caco-2 in vitro model. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.**, v. 3, p.220-227, 2000.

WISEMAN, T. et al. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Analytical Biochemistry.**, v. 179, p. 131-137, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Novaluron in drinking-water: Use for vector control in drinking-water sources and containers.** Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/HSE/AMR/08.03/11), 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **DIFLUBENZURON 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea.** WHO Specifications and evaluations for public health pesticides, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Review of: NOVALURON 10% EC.** Report of the 8th WHOPES Working Group meeting. Geneva, World Health Organization, dec. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020.** WHO. Geneva. 2012. 43p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue and severe dengue. Fact sheet** n. 11, mai. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides.** WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13, 2005.

YAO, Q. et al. Inclusion complexes of cypermethrin and permethrin with monochlorotriazinyl-beta-cyclodextrin: A combined spectroscopy, TG/DSC and DFT study. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 117, p. 576-586, jan. 2014.

APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS BENZOILFENILURÉIAS

A - Obtenção do novaluron e diflubenzuron

Devido ao alto custo para aquisição do novaluron e diflubenzuron de grau de pureza elevados, os mesmos foram purificados a partir de formulações comerciais. O novaluron, foi extraído a partir da formulação Mosquilon®, que apresenta o teor do ativo de 10% m/m. O diflubenzuron foi extraído da formulação comercial Dimilin®, cuja porcentagem de ativo é de 25% m/m.

O procedimento consistiu no particionamento líquido-líquido de 1 mL dessas formulações em uma mistura de água e metilisobutilcetona na proporção (2:8). As fases aquosa e orgânica foram separadas por centrifugação e a fase orgânica deixada evaporar à temperatura ambiente. Após a evaporação lenta do solvente na fase orgânica, iniciou-se o processo de cristalização espontânea do novaluron. Esta fase foi lavada por filtração utilizando metilisobutilcetona como solvente de lavagem. O sólido obtido após sucessivas lavagens foi submetido a caracterizações físico-químicas afim de se determinar sua integridade.

B – Caracterização dos produtos de extração

A caracterização do novaluron e diflubenzuron extraídos foi realizada através da determinação do ponto de fusão (equipamento digital de ponto de fusão, modelo MQAPF – 302 da Microquímica®), por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (equipamento da Perkin Elmer, modelo Spectrum Two TM, a partir de pastilhas contendo KBr) e por cromatografia líquida de alta eficiência (equipamento da Jasco, modelo CO-2060 Plus com detector UV PDA, modelo MD-2018 Plus do mesmo fabricante).

Para determinação do perfil cromatográfico e pureza dos compostos, foram utilizados padrões da SIGMA (Novaluron - Pestanal®, pureza de 99,5% (HPLC) e lote SZBF068XV; Diflubenzuron - Pestanal®, pureza de 99,8% (HPLC) e lote SZBF110XV). Soluções com diferentes concentrações do padrão foram preparadas por diluição de uma solução estoque, filtradas em filtro PTFE de 0,22 µm e armazenadas em vials de 1,5 mL. Em seguida foram realizadas corridas cromatográficas cujos dados permitiram a elaboração da curva de

calibração para cada composto. Posteriormente, foi realizada uma corrida cromatográfica da amostra em uma concentração pré-determinada. Para todas as soluções o solvente utilizado foi acetonitrila acidificada com ácido acético a 0,5%. A fase móvel foi uma mistura de acetonitrila e água (70:30) e a fase estacionária uma coluna C18 (15 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro). Todos os ensaios foram realizados em triplicata utilizando sistema de eluição isocrático, fluxo de 1 mL/min, injeção de 20 µL de amostra, tempo de 6 minutos por corrida e detecção em comprimento de onda de 254 nm e 280 nm. Os dados foram tratados utilizando o programa excel.

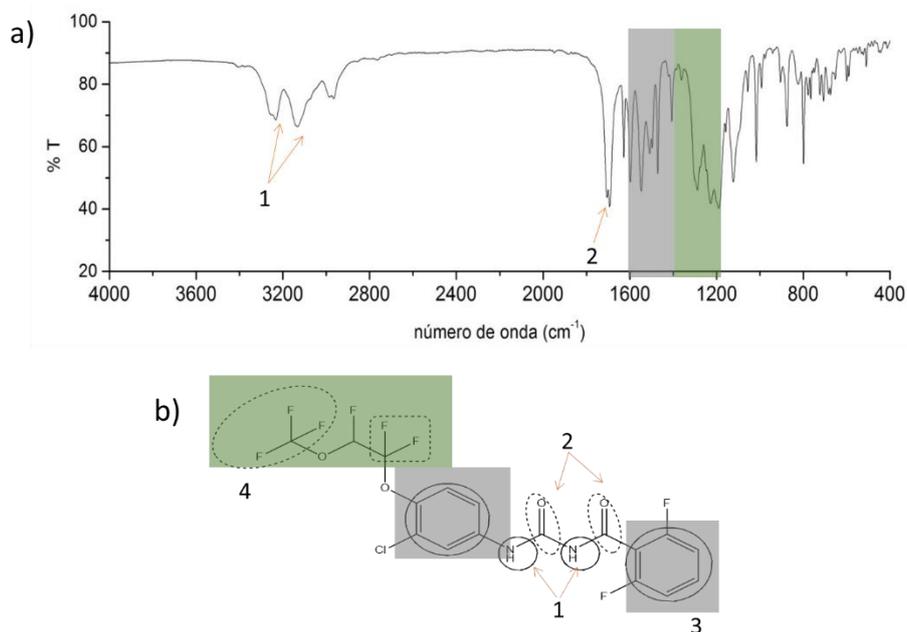
B.1 - Novaluron

O novaluron purificado apresentou-se como cristais brancos, cujo ponto de fusão foi de 174,3-176,8 °C, estando próximo aos dados da literatura (176,5-178 °C) (SIGMA ALDRICH, 2014).

Ainda com a finalidade de avaliar a integridade química do composto, foi obtido o espectro de infravermelho do composto em pastilhas de KBr, no modo transmitância (figura S1). Neste espectro, pôde-se observar bandas com mínimo em 3234 cm^{-1} e 3126 cm^{-1} , características do estiramento das ligações N-H; bandas em 1706 cm^{-1} e 1692 cm^{-1} , que caracterizam o estiramento das ligações C=O, estando a última relacionada à amida secundária; bandas na região entre 1600 e 1400 cm^{-1} que caracterizam presença de anel aromático e bandas na região de 1400 a 1200 cm^{-1} atribuídas aos CF_2 e CF_3 (SILVERSTEIN; BOSSLER; MORRIL, 1994).

Para verificar a pureza do composto, foi realizada uma corrida cromatográfica com a amostra, na concentração de aproximadamente 0,4 µmol/L ($197,08 \cdot 10^{-6}$ g/L) em acetonitrila acidificada. O tempo de retenção observado para o padrão foi de 7,46 minutos e para o extraído 7,50 minutos. A quantidade de inseticida na solução foi obtida por interpolação a partir da curva de calibração. O ensaio foi realizado em triplicata e a média das concentrações foi 0,381 µmol/L ($187,72 \cdot 10^{-6}$ g/L), portanto, o composto apresentou pureza de 95,2%.

Figura S1. Espectro na região do infravermelho do novaluron, em KBr (a) e estrutura molecular do novaluron (b).



Fonte: A autora, 2015.

Com base nos dados obtidos, pôde-se confirmar que o composto extraído tratava-se do novaluron, o qual apresentou pureza satisfatória, sendo então utilizado para a produção do composto de inclusão.

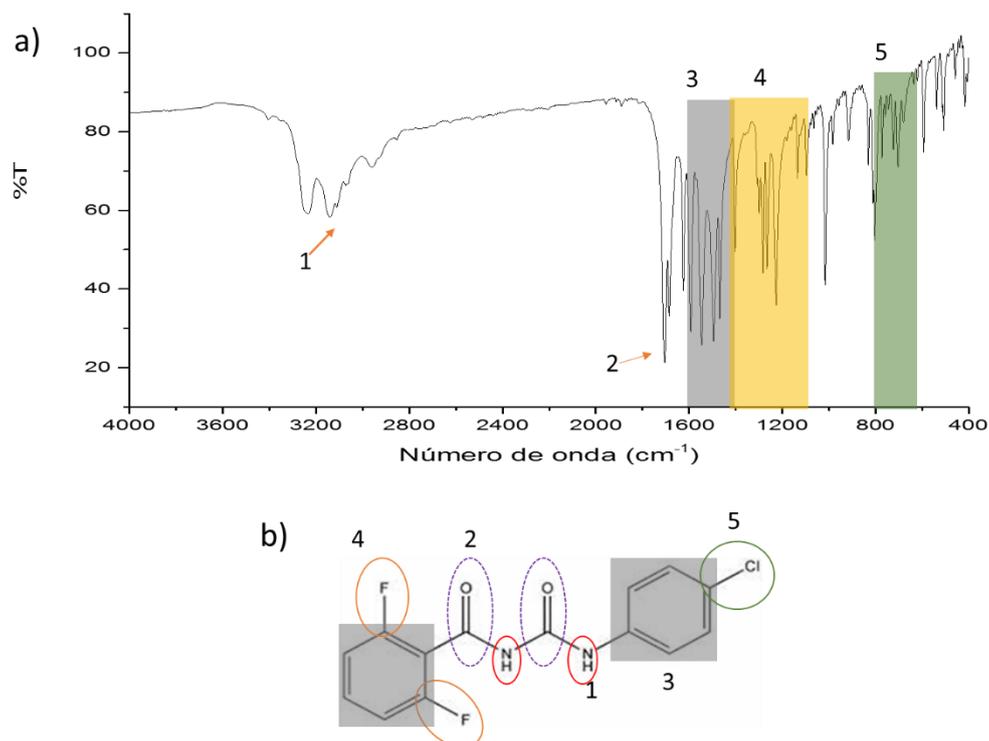
B.2 – Diflubenzuron

O diflubenzuron, foi obtido na forma de pó branco, cujo ponto de fusão determinado experimentalmente foi de 216,8-218.0 °C, estando próximo aos dados da literatura (217,1 - 219,1 °C) (SIGMA ALDRICH, 2014).

Também foi obtido o espectro de infravermelho do composto em pastilhas de KBr, no modo transmitância (figura S2). Neste espectro, podem-se observar bandas com mínimo em 3233 cm⁻¹ e 3142 cm⁻¹, características do estiramento das ligações N-H; bandas em 1705 cm⁻¹ e 1685 cm⁻¹, que caracterizam o estiramento das ligações C=O; bandas na região entre 1600 e 1400 cm⁻¹ que caracterizam presença de anel aromático; bandas na região de 1400 a 1000 cm⁻¹ atribuídas a ligação C-F, bem como bandas na região de 800 a 600 atribuídas a ligação C-Cl

(SILVERSTEIN; BOSSLER; MORRIL, 1994). Estes dados estão de acordo com o espectro do diflubenzuron encontrado na biblioteca do equipamento de análise.

Figura S2. Espectro na região do infravermelho do diflubenzuron, em KBr (a) e estrutura molecular do diflubenzuron (b).



Fonte: A autora, 2015.

Por fim, a determinação da pureza do composto foi realizada através de uma corrida cromatográfica com a amostra, nas mesmas condições descritas acima para o novaluron, sendo que neste caso o composto apresentou uma concentração média de 0,384 $\mu\text{mol/L}$ ($119,30 \cdot 10^{-6} \text{ g/L}$), o que corresponde a uma pureza de 96%. Além disso, o tempo de retenção para o padrão foi de 3,97 minutos, enquanto que para o extraído foi 4,01 minutos.

Com base nos dados supracitados, também confirmou-se que o diflubenzuron foi o composto extraído tendo o mesmo apresentado pureza satisfatória, sendo, desta forma, utilizado para a produção do composto de inclusão.