

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**INCORPORAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS CARREADAS COM ÓLEO ESSENCIAL EM  
HOLOCELULOSE EXTRAÍDA DE REJEITO ORGÂNICO PARA O DESENVOLVIMENTO  
DE UM BIODEFENSIVO LARVICIDA**

PAULO VICTOR RODRIGUES GOMES

MANAUS, AM

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PAULO VICTOR RODRIGUES GOMES

**INCORPORAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS CARREADAS COM ÓLEO ESSENCIAL EM  
HOLOCELULOSE EXTRAÍDA DE REJEITO ORGÂNICO PARA O DESENVOLVIMENTO  
DE UM BIODEFENSIVO LARVICIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química de Materiais e Interfaces

Orientador: Prof. Dr. Edgar Aparecido Sanches (PPGCEM/UFAM)

MANAUS, AM

2020

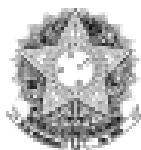
### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G633i Gomes, Paulo Victor Rodrigues  
Incorporação de micropartículas carregadas com óleo essencial em holocelulose extraída de rejeito orgânico para o desenvolvimento de um biodefensivo larvicida : Simular o efeito de proteção natural de espécies aromáticas em uma pastilha desenvolvida em laboratório para combater a proliferação de *Aedes aegypti* / Paulo Victor Rodrigues Gomes . 2020  
98 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edgar Aparecido Sanches  
Dissertação (Mestrado em Química - Físico-Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Aedes aegypti*. 2. *Piper hispidum*. 3. concentração letal. 4. holocelulose. 5. atividade larvicida. I. Sanches, Edgar Aparecido. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata de Defesa Pública de Defesa de  
Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a)  
Paulo Victor Rodrigues Gomes, do Curso de  
Pós-Graduação em Química, realizada no dia  
31 de julho de 2020.

Às 14 horas do dia 31 de julho de 2020, por meio de videoconferência, foi realizada a Sessão Pública de defesa de dissertação do (a) aluno (a) Paulo Victor Rodrigues Gomes, intitulado "Incorporação de micropartículas carregadas com óleo essencial em holocelulose extraída de rejeito orgânico para o desenvolvimento de um biodenensivo larvicida", como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre (a) em Química. A Banca Examinadora constituiu-se dos seguintes professores: Edgar Aparecido Sanches (DF/UFAM) – Presidente/Orientador; Marcos Batista Machado (DQ/UFAM) – membro titular (interno); Virginia Mansanares Giacon (FT/UFAM) - membro titular (externo). Após a apresentação do trabalho pelo (a) aluno (a), os examinadores fizeram as observações e questionamentos de praxe. Em seguida, a Banca Examinadora reuniu-se para a definição do conceito do trabalho apresentado, tendo considerado o aluno **APROVADO**. Por decisão do colegiado se aprovado(a), o (a) aluno (a) deverá entregar a versão definitiva da dissertação em 30 dias, prorrogáveis por mais 30 dias, observando todas as sugestões da banca examinadora. Em conformidade com o RI do PPGQ (Art. 89, § 7º e 8º), a emissão de qualquer documento comprobatório da defesa da dissertação está condicionada a entrega dessa versão no prazo máximo de 60 dias. Nada mais havendo a tratar, o Presidente agradeceu a presença de todos e deu por encerrada a sessão. Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus, 31 de julho de 2020.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Edgar Aparecido Sanches (DF/UFAM)  
Presidente/Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Marcos Batista Machado (DQ/UFAM)  
Membro Interno

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Virginia Mansanares Giacon (FT/UFAM)  
Membro Externo

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, pois sem ela essa jornada nem sequer teria iniciado. Todo o suporte, confiança e amor foram a base para concluir esta etapa.

Ao Prof. Dr. Edgar A. Sanches, o pesquisador e orientador mais incrível, compreensível e competente que já tive o prazer de conhecer. Este sempre disponível, independente da hora, para ajudar e esclarecer dúvidas e desfazer obstáculos. A ele agradeço a confiança e o apoio.

À Laiane Souza da Silva e Sidney Gomes, que juntos me proporcionaram ferramentas para seguir em frente, foram pacientes e professores. Além de me proporcionar momentos leves e felizes dentro de um grupo de pesquisa. Algo que pensei jamais ser possível.

Aos meus amigos mais próximos Victoria e Emerson, que me ajudaram em momentos de crise. Cooperaram em momentos de dúvidas. E apoio emocional sempre que necessário.

A todos os membros do NANOPOL por serem presentes e incríveis na cooperação para desenvolvimento em pesquisa.

Ao IPEN/CCCH, pela oportunidade de realizar pesquisa fora da minha zona de conforto.

À FAPESAM, pelo apoio através do Projeto Universal Amazonas.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À UFAM, pela estrutura.

*“Estou andando pelo meu caminho, você está andando no seu.”*

*Neil Gaiman*

## RESUMO

Plantas contendo óleos essenciais costumam apresentar constituintes químicos com atividades biológicas pronunciadas, especialmente as pertencentes à família Piperaceae. Muitos estudos têm como foco a extração do óleo essencial das espécies vegetais, descartando em seguida a biomassa residual. Este trabalho utiliza integralmente o óleo essencial e a biomassa da espécie *Piper hispidum* dentro de um processo metodológico, extraindo a holocelulose do rejeito orgânico produzido. Em seguida, foram desenvolvidas micropartículas baseadas em isolado proteico de soro de leite (*Whey Protein Isolate* - WPI) com o óleo essencial encapsulado para serem incorporadas à holocelulose extraída, objetivando o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada na forma de pastilhas com propriedades larvicidas. Como muitos países subdesenvolvidos vêm sofrendo demasiadamente com as doenças causadas pelo vírus transmitido pelo vetor *Aedes aegypti*, esse sistema foi avaliado quanto à sua eficácia larvicida, obtendo  $CL_{50} = 77,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $CL_{90} = 93,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  em 24 h. A técnica de Difração de Raios X (DRX) permitiu a verificação da eficiência do processo de extração da holocelulose. A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permitiu avaliar o impacto da metodologia de extração da holocelulose através da análise morfológica das folhas secas e do material resultante do processo de extração. A técnica de FTIR permitiu a verificação da eliminação parcial da lignina pelo processo de extração, além de apontar estiramentos característicos da estrutura molecular da celulose e da hemicelulose. Finalmente, foram produzidas pastilhas a partir da mistura do material microencapsulado e holocelulose. As pastilhas apresentaram dispersão total em até 2 h e a liberação controlada indicou concentração aproximada de  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$  em 24 h. Estes resultados indicam que apenas uma pastilha atinge a concentração letal para atuar no controle das larvas do *A. aegypti*.

**Palavras chave:** *Piper hispidum*, holocelulose, *Aedes aegypti*, atividade larvicida, concentração letal, liberação controlada.

## ABSTRACT

Plants containing essential oils usually have chemical constituents with pronounced biological activities, especially those belonging to the Piperaceae family. Many studies have focused on extracting essential oil from plant species, then discarding residual biomass. This work makes full use of the essential oil and biomass of the species *Piper hispidum* within a methodological process, extracting the holocellulose from the produce organic waste. Then, microparticles were developed using *Whey Protein Isolate* – WPI with the encapsulated essential oil to be incorporated into the extracted holocellulose, aiming at the development of a controlled release system in the form of tablets with larvicidal properties. As many underdeveloped countries have been suffering too much from the diseases caused by the virus transmitted by the vector *Aedes aegypti*, this system was evaluated for its larvicidal efficacy, obtaining  $LD_{50} = 77.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $LD_{90} = 93.3 \mu\text{g mL}^{-1}$  after 24 h of exposition. X-Ray Diffraction (XRD) technique allowed the verification of the efficiency of the holocellulose extraction process. Scanning Electron Microscopy (SEM) technique allowed to assess the impact of the holocellulose extraction methodology through the morphological analysis of the dried leaves and the material resulting from the extraction process. FTIR technique allowed the verification of the partial elimination of lignin by the extraction process, in addition to pointing out stretches characteristic of the molecular structure of cellulose and hemicellulose. Finally, pellets were produced from the mixture of microencapsulated material and holocellulose. The pellets showed total dispersion in up to 2 h and the controlled release indicated an approximate concentration of  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$  in 24 h. These results indicate that only one pellet reached the lethal dosage to act in the control of *A. aegypti* larvae.

**Keywords:** *Piper hispidum*, holocellulose, *Aedes aegypti*, larvicidal activity, lethal dosage, controlled release.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Representação esquemática das diferentes etapas envolvidas na presente pesquisa .....                                                                                                                                                                                           | 2  |
| <b>Figura 2:</b> <i>P. hispidum</i> localizada na Universidade Federal do Amazonas.....                                                                                                                                                                                                          | 4  |
| <b>Figura 3:</b> Estrutura da celulose, representação da celobiose em 3D com os átomos de carbono representados pelas esferas amarelas, enquanto os átomos de oxigênio e hidrogênio estão representados, respectivamente, pelas esferas vermelhas e azuis .....                                  | 7  |
| <b>Figura 4:</b> Cadeia de celulose com duas unidades de celobiose em conformação cadeira visualizada em 3D através dos planos Z e Y. Na imagem é possível verificar as extremidades redutoras e não-redutoras, além das ligações intramoleculares O5–OH–C3 indicadas a partir deste plano ..... | 8  |
| <b>Figura 5:</b> Representação esquemática da microfibrila com ênfase nas regiões cristalinas e nas regiões não-cristalinas .....                                                                                                                                                                | 8  |
| <b>Figura 6:</b> Origem e métodos de obtenção da celulose I e II .....                                                                                                                                                                                                                           | 10 |
| <b>Figura 7:</b> Estrutura molecular da <i>L</i> -arabino- <i>D</i> -xylan.....                                                                                                                                                                                                                  | 11 |
| <b>Figura 8:</b> Os precursores principais da lignina e suas estruturas .....                                                                                                                                                                                                                    | 13 |
| <b>Figura 9:</b> Representação esquemática da extração e caracterização do óleo essencial ..                                                                                                                                                                                                     | 15 |
| <b>Figura 10:</b> Sistema de hidrodestilação Clevenger em funcionamento .....                                                                                                                                                                                                                    | 16 |
| <b>Figura 11:</b> Representação esquemática das etapas de extração e caracterização das folhas <i>in natura</i> e holocelulose.....                                                                                                                                                              | 18 |
| <b>Figura 12:</b> Balança para determinação de umidade.....                                                                                                                                                                                                                                      | 20 |
| <b>Figura 13:</b> No lado esquerdo estão representados os cadinhos com o material orgânico carbonizado antes de ser inserido na mufla. No lado direito está representada a parte frontal da mufla utilizada .....                                                                                | 21 |
| <b>Figura 14:</b> Procedimento de agitação em temperatura ambiente em funcionamento ....                                                                                                                                                                                                         | 21 |
| <b>Figura 15:</b> Sistema de extração soxhlet em funcionamento.....                                                                                                                                                                                                                              | 22 |
| <b>Figura 16:</b> Sistema de extração de lignina.....                                                                                                                                                                                                                                            | 24 |
| <b>Figura 17:</b> Sistema de extração de celulose .....                                                                                                                                                                                                                                          | 26 |
| <b>Figura 18:</b> Representação esquemática das técnicas utilizadas para caracterização dos materiais obtidos.....                                                                                                                                                                               | 27 |

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 19:</b> Cinética de extração do óleo essencial evidenciando o volume (mL) de óleo essencial extraído com relação ao tempo (h) de extração .....               | 28 |
| <b>Figura 20:</b> Espectro de FTIR (4000 – 400 cm <sup>-1</sup> ) do óleo essencial extraído das folhas da <i>P. hispidum</i> . ....                                    | 31 |
| <b>Figura 21:</b> Difrátogramas de Raios X das folhas da <i>P. hispidum</i> (preto) e da holocelulose extraída (vermelho). ....                                         | 35 |
| <b>Figura 22:</b> Padrões de DRX da celulose (a) em pó adquirida comercialmente e (b) extraída das cascas da <i>X. sorbifolia</i> através de tratamentos químicos ..... | 35 |
| <b>Figura 23:</b> Difrátogramas de Raios X da holocelulose tratada por 48 h. ....                                                                                       | 37 |
| <b>Figura 24:</b> Imagens de MEV das folhas pré-tratadas da <i>P. hispidum</i> em diferentes resoluções.....                                                            | 38 |
| <b>Figura 25:</b> Morfologia da holocelulose obtida após extração em diferentes resoluções.                                                                             | 38 |
| <b>Figura 26:</b> Morfologia da holocelulose obtida após extração com método otimizado.....                                                                             | 39 |
| <b>Figura 27:</b> Espectro de FTIR (4000 – 400 cm <sup>-1</sup> ) das folhas secas da <i>P. hispidum</i> e holocelulose extraída. ....                                  | 40 |
| <b>Figura 28:</b> Teste da estabilidade da emulsão formada após o processo mecânico.....                                                                                | 47 |
| <b>Figura 29:</b> Micropartículas obtidas após a liofilização das emulsões formadas a partir de WPI e óleo essencial da <i>P. hispidum</i> .....                        | 48 |
| <b>Figura 30:</b> Espectros de FTIR das micropartículas de WPI contendo o óleo essencial da espécie <i>P. hispidum</i> . ....                                           | 50 |
| <b>Figura 31:</b> Perfil de higroscopicidade das micropartículas a 25 °C e umidade relativa de 75%.....                                                                 | 51 |
| <b>Figura 32:</b> Microcápsulas de WPI e óleo essencial da <i>P. hispidum</i> encapsulado. ....                                                                         | 52 |
| <b>Figura 33:</b> Ciclo da vida do <i>Aedes aegypti</i> .....                                                                                                           | 55 |
| <b>Figura 34:</b> Ovos do <i>A. aegypti</i> em meio aquoso.....                                                                                                         | 55 |
| <b>Figura 35:</b> Larva do <i>A. aegypti</i> em meio aquoso .....                                                                                                       | 56 |
| <b>Figura 36:</b> Pupa do <i>A. aegypti</i> em meio aquoso.....                                                                                                         | 57 |
| <b>Figura 37:</b> Fase adulta do <i>A. aegypti</i> .....                                                                                                                | 57 |
| <b>Figura 38:</b> Pastilhador.....                                                                                                                                      | 60 |
| <b>Figura 39:</b> Espectrofotômetro de FTIR/ATR.....                                                                                                                    | 61 |
| <b>Figura 40:</b> Pastilha de holocelulose em solução. ....                                                                                                             | 66 |
| <b>Figura 41:</b> Pastilhas produzidas com holocelulose e glucose (1:1).....                                                                                            | 66 |
| <b>Figura 42:</b> Pastilhas de holocelulose e ativo microencapsulado na proporção (1:1).....                                                                            | 67 |

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 43:</b> (a) suporte PVC para acoplar lâmpada <i>UVC</i> ; (b) suporte impresso em 3D para fixar no equipamento espectroscópico.....          | 68 |
| <b>Figura 44:</b> Espectros de FTIR da liberação controlada <i>in situ</i> em condições ambientes.....                                                 | 69 |
| <b>Figura 45:</b> Espectros de FTIR da liberação controlada <i>in situ</i> em diferentes pH.....                                                       | 70 |
| <b>Figura 46:</b> Espectros de FTIR de liberação controlada <i>in situ</i> em diferentes pH e com incidência de luz ultravioleta C ( <i>UVC</i> )..... | 71 |
| <b>Figura 47:</b> Curva de calibração do óleo essencial da <i>P. hispidum</i> .....                                                                    | 73 |
| <b>Figura 48:</b> Liberação controlada em diferentes pH do óleo essencial da <i>P. hispidum</i> microencapsulado por WPI.....                          | 73 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Constituintes químicos de óleo essencial da <i>P. hispidum</i> identificados por CG-EM.....                                                                                           | 29 |
| <b>Tabela 2:</b> Caracterização química das folhas da <i>P. hispidum</i> .....                                                                                                                         | 32 |
| <b>Tabela 3:</b> Métodos de microencapsulação .....                                                                                                                                                    | 43 |
| <b>Tabela 4:</b> Eficiência de encapsulação e teor de óleo superficial das micropartículas de WPI contendo óleo essencial da <i>P. hispidum</i> . ....                                                 | 48 |
| <b>Tabela 5:</b> Coeficientes modelos para adsorção de água das micropartículas de WPI a 25 °C e umidade relativa (75%).....                                                                           | 51 |
| <b>Tabela 6:</b> Teste piloto com o óleo essencial da <i>P. hispidum</i> após 72 h. ....                                                                                                               | 62 |
| <b>Tabela 7:</b> Bioensaios de dose resposta com óleo essencial da <i>P. hispidum</i> após 24 h.....                                                                                                   | 63 |
| <b>Tabela 8:</b> Concentrações letais a 50% (CL <sub>50</sub> ) e 90% (CL <sub>90</sub> ) para controle das larvas de <i>A. aegypti</i> com óleo essencial da <i>P. hispidum</i> após 24 h e 48 h..... | 64 |
| <b>Tabela 9:</b> Teste de dispersão da holocelulose em diferentes pH.....                                                                                                                              | 65 |
| <b>Tabela 10:</b> Modelos e coeficientes de liberação controlada do óleo essencial de <i>P. hispidum</i> . ....                                                                                        | 75 |

## LISTA DE SÍMBOLOS E ACRÔNICOS

**%TU** – Teor percentual de umidade

**%TCZ** – Teor percentual de cinzas

**%TSAF** – Teor percentual de componentes solúveis em água

**%TE** – Teor percentual de extrativos

**%THL** – Teor percentual de holocelulose

**%TC** – Teor percentual de celulose

**%THEM** – Teor percentual de hemicelulose

**ATR** – Refletância Total Atenuada

**CCCH** – Centro de Pesquisa de Células a Combustível e Hidrogênio

**CG-DIC** – Cromatografia Gasosa acoplada a Detector por Ionização em Chamas

**CG-EM** - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas

**CL** – Concentração Letal

**CN** – Controle Negativo

**CP** – Controle Positivo

**DP** – Desvio Padrão

**DRX** - Difração de Raio X

**EE** – Eficiência de Encapsulamento

**EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**FTIR** – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

**INPA** – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

**IPEN** – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

**MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**TAPPI** – *Technical Association of the Pulp and Paper Industry*

**UV-vis** – Espectroscopia nas regiões do Ultravioleta e Visível

**WPC** – *Whey Protein Concentrate*

**WPI** – *Whey Protein Isolate*

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                        |           |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVO.....</b>                                                                                                   | <b>3</b>  |
| 2.1      | Objetivo Geral .....                                                                                                   | 3         |
| 2.2      | Objetivos Específicos .....                                                                                            | 3         |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                                                                     | <b>4</b>  |
| 3.1      | <i>Piper hispidum</i> .....                                                                                            | 4         |
| 3.2      | Celulose .....                                                                                                         | 6         |
| 3.3      | Hemicelulose.....                                                                                                      | 11        |
| 3.4      | Lignina .....                                                                                                          | 13        |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA .....</b>                                                                                               | <b>15</b> |
| 4.1      | Pré-tratamento das Folhas <i>in natura</i> da <i>P. hispidum</i> .....                                                 | 15        |
| 4.2      | Extração de Óleo Essencial .....                                                                                       | 16        |
| 4.3      | Caracterização do Óleo Essencial.....                                                                                  | 16        |
| 4.3.1    | Densidade .....                                                                                                        | 16        |
| 4.3.2    | Rendimento .....                                                                                                       | 17        |
| 4.3.3    | Índice de Refração .....                                                                                               | 17        |
| 4.3.4    | Cinética Química .....                                                                                                 | 17        |
| 4.3.5    | Caracterização Química dos Óleos Essenciais por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) ..... | 17        |
| 4.4      | Caracterização Físico-química das Folhas da <i>P. hispidum</i> e da Holocelulose Extraída.....                         | 18        |
| 4.4.1    | Extração da Holocelulose.....                                                                                          | 19        |
| 4.4.2    | Caracterização Química .....                                                                                           | 20        |
| 4.4.3    | Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....                                               | 26        |
| 4.4.4    | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....                                                                        | 26        |
| 4.4.5    | Difração de Raios X (DRX) .....                                                                                        | 27        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                                 | <b>27</b> |
| 5.1      | Caracterizações Físicas do Óleo Essencial <i>in natura</i> .....                                                       | 28        |
| 5.1.1    | Rendimento, Densidade, Índice de Refração e Cinética Química.....                                                      | 28        |
| 5.1.2    | Caracterização Química do Óleo Essencial por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) .....    | 29        |
| 5.1.3    | Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....                                               | 31        |
| 5.2      | Holocelulose .....                                                                                                     | 32        |
| 5.2.1    | Caracterização Química .....                                                                                           | 32        |

|           |                                                                                   |           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.2     | <i>Extração de Holocelulose</i> .....                                             | 33        |
| 5.2.3     | <i>Difração de Raios X (DRX)</i> .....                                            | 34        |
| 5.2.4     | <i>Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV</i> .....                            | 37        |
| 5.2.5     | <i>A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i> ..... | 40        |
| <b>6</b>  | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                                                | <b>42</b> |
| 6.1       | <b>Microencapsulação</b> .....                                                    | <b>42</b> |
| 6.2       | <b>Soro Proteico</b> .....                                                        | <b>44</b> |
| <b>7</b>  | <b>METODOLOGIA</b> .....                                                          | <b>45</b> |
| 7.1       | <b>Microencapsulação contendo Isolado Proteico de Soro de Leite - WPI</b> .....   | <b>45</b> |
| 7.2       | <b>Estabilidade das Emulsões</b> .....                                            | <b>45</b> |
| 7.3       | <b>Teor de Óleo Superficial e Eficiência de Encapsulação</b> .....                | <b>45</b> |
| 7.4       | <b>Higroscopicidade</b> .....                                                     | <b>46</b> |
| 7.5       | <b>Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....   | <b>46</b> |
| 7.6       | <b>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....                            | <b>46</b> |
| <b>8</b>  | <b>RESULTADOS</b> .....                                                           | <b>47</b> |
| 8.1       | <b>Micropartículas Encapsulantes</b> .....                                        | <b>47</b> |
| 8.2       | <b>Eficiência de Encapsulação e Teor de Óleo Essencial</b> .....                  | <b>48</b> |
| 8.3       | <b>Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....   | <b>49</b> |
| 8.4       | <b>Higroscopicidade</b> .....                                                     | <b>50</b> |
| 8.5       | <b>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....                            | <b>52</b> |
| <b>9</b>  | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                                                | <b>53</b> |
| 9.1       | <b><i>Aedes aegypti</i></b> .....                                                 | <b>53</b> |
| 9.1.1     | <i>Ciclo de Vida</i> .....                                                        | 54        |
| 9.2       | <b>Liberação Controlada</b> .....                                                 | <b>58</b> |
| <b>10</b> | <b>METODOLOGIA</b> .....                                                          | <b>59</b> |
| 10.1      | <b>Produção de Pastilhas</b> .....                                                | <b>59</b> |
| 10.2      | <b>Teste de Dispersão</b> .....                                                   | <b>60</b> |
| 10.3      | <b>Bioensaio Piloto</b> .....                                                     | <b>60</b> |
| 10.4      | <b>Bioensaio Dose-Resposta</b> .....                                              | <b>61</b> |
| 10.5      | <b>Liberação Controlada Qualitativa</b> .....                                     | <b>61</b> |
| 10.6      | <b>Liberação Controlada Quantitativa</b> .....                                    | <b>62</b> |
| <b>11</b> | <b>RESULTADOS</b> .....                                                           | <b>62</b> |
| 11.1      | <b>Bioensaios</b> .....                                                           | <b>62</b> |
| 11.2      | <b>Pastilhas</b> .....                                                            | <b>65</b> |
| 11.3      | <b>Liberação Controlada Qualitativa</b> .....                                     | <b>68</b> |

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| 11.4 Liberação Controlada Quantitativa..... | 72 |
| 12 CONCLUSÕES.....                          | 76 |
| 13 REFERÊNCIAS.....                         | 77 |

## 1 INTRODUÇÃO

Um grande desafio nas pesquisas que envolvem produtos naturais é o aproveitamento integral dos produtos e subprodutos do processo metodológico, especialmente dos rejeitos orgânicos (biomassa). Desde 2013 o Laboratório de Polímeros Nanoestruturados (NANOPOL) vem desenvolvendo pesquisas com óleos essenciais extraídos de espécies do campus da Universidade Federal do Amazonas para as mais diversas aplicações biológicas, incluindo controles inseticidas, larvicidas e acaricidas (MAR et al., 2018; SILVA et al., 2019). A partir das pesquisas desenvolvidas, foi-se observando que uma quantidade significativa de rejeitos orgânicos (biomassa lignocelulósica oriunda especialmente das folhas) era descartada após a extração dos óleos essenciais. Desta forma, houve uma preocupação em aproveitar esse subproduto do processo metodológico, propondo uma pesquisa na qual ele pudesse ter uma função adequada, juntamente com o óleo essencial do qual foi extraído.

A espécie *Piper hispidum* foi utilizada nesta pesquisa tanto para a extração de seu óleo essencial quanto para a utilização de seu material lignocelulósico de rejeito. Apesar da relativa abundância desta espécie nas regiões tropicais, existem poucos trabalhos que reportam seu uso em aplicações tecnológicas. Por essa razão, torna-se interessante a sua aplicação como biodefensivo visto que os óleos essenciais das espécies da família Piperaceae apresentam altos teores de constituintes químicos com pronunciadas atividades biológicas (ALVES; SETZER; DA SILVA, 2019; SANTOS et al., 2011). O óleo essencial e a holocelulose extraída da biomassa de rejeito da *P. hispidum* foram caracterizados e utilizados para o desenvolvimento de um material alternativo com potencial larvicida contra o vetor *Aedes aegypti*. As doenças virais transmitidas por esse vetor (como a dengue, a zika e a chikungunya) vêm causando sérios problemas de saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos. Ainda não estão disponíveis medicamentos para o tratamento e nenhuma vacina eficaz. Torna-se importante, portanto, a busca por produtos alternativos, principalmente aqueles baseados em recursos naturais explorados de forma sustentável, visando o controle da densidade populacional das larvas, uma vez que o uso contínuo de inseticidas químicos vem causando resistência desse vetor (LIMA et al., 2006a; MAR et al., 2018).

Para melhor entendimento e visualização, a proposta desta pesquisa está representada na **Figura 1**.



**Figura 1:** Representação esquemática das etapas envolvidas na presente pesquisa. **Fonte:** O autor.

Após a extração do óleo essencial da *P. hispidum* **(1)**, o mesmo foi utilizado como agente ativo (*core*) encapsulado em micropartículas de Isolado Proteico de Soro de Leite (*Whey Protein Isolate* - WPI) (*shell*) **(2)**. A biomassa residual obtida após a extração do óleo essencial **(3)** foi submetida a um processo de mercerização para a extração da holocelulose **(4)**. Na sequência, as micropartículas de WPI contendo óleo essencial encapsulado foram adicionadas à holocelulose anteriormente extraída para a confecção de pastilhas **(5)**. Então, as pastilhas desenvolvidas contendo óleo essencial encapsulado tiveram sua eficiência testada no controle de larvas do *A. aegypti* **(6)**.

Dessa forma, este trabalho tem como foco o aproveitamento de todo o processo metodológico proposto, evitando a utilização de rejeitos com potencial econômico agregado. Em contrapartida, também prevê a inserção de tecnologia e aplicabilidade de um material alternativo com potencial larvicida para controlar uma das grandes problemáticas da saúde pública atual, que são as doenças causadas pelo vetor *A. aegypti*.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um material alternativo com potencial larvicida a base de holocelulose e de óleo essencial extraído das folhas da espécie *P. hispidum* encapsulado em micropartículas de Isolado Proteico de Soro de Leite (*Whey Protein Isolate* - WPI).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Extrair e caracterizar o óleo essencial e a biomassa de rejeito das folhas da espécie *P. hispidum*;
- Desenvolver uma metodologia adequada para a extração da holocelulose a partir da biomassa obtida pós-extração do óleo essencial;
- Sintetizar e caracterizar micropartículas a base de WPI para serem carreadores do óleo essencial extraído;
- Determinar a eficiência de encapsulamento dos sistemas encapsulados;
- Incorporar as micropartículas contendo o óleo essencial encapsulado na holocelulose extraída e otimizar a dispersão das pastilhas;
- Avaliar a liberação controlada dos óleos essenciais a partir das pastilhas produzidas;
- Avaliar a suscetibilidade larvas do *A. aegypti* quando em contato com as pastilhas produzidas.

## CAPÍTULO 1 – Extração e Caracterização do Óleo Essencial da *Piper hispidum* e da Biomassa de Rejeito

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Piper hispidum*

A família Piperaceae possui ocorrência em toda a América Latina, sendo constituída por 10 gêneros. Porém, quatro destes gêneros possuem destaque em decorrência de seus potenciais econômicos e científicos: *Peperomia*, *Piper*, *Manelia* e *Zippelia*. No Brasil, são descritos os quatro gêneros citados anteriormente, além de 465 espécies derivadas, com destaque para o gênero *Piper* L., o qual possui 292 espécies (ALVES; SETZER; DA SILVA, 2019). O clima tropical e subtropical brasileiro propicia um ambiente favorável para a reprodução destas espécies, sendo encontradas principalmente na Região Amazônica (ALBIERO *et al.*, 2008). A **Figura 2** mostra as folhas *in natura* da *P. hispidum*.



**Figura 2:** *P. hispidum* localizadas na Universidade Federal do Amazonas. **Fonte:** O Autor.

A biodiversidade do Estado do Amazonas é imensurável quando se trata de plantas ricas em óleos essenciais, os quais apresentam diversos constituintes químicos voláteis em sua composição, tais como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (MAIA *et al.*, 1998; POTZERNHEIM *et al.*, 2012). Estes constituintes químicos conferem aromas característicos de acordo com a espécie de origem, além de diversas atividades biológicas cientificamente comprovadas (SANTOS *et al.*, 2011). Em consequência da abundância dos diferentes tipos de óleos essenciais e de suas mais diversas propriedades, um amplo leque de possibilidades em aplicações vem sendo desenvolvido, incluindo aplicações que agregam nanotecnologia (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018a).

Dentre as espécies ricas em óleos essenciais do gênero *Piper* L. está a *Piper hispidum* Sw., também conhecida popularmente como “matico”. É encontrada no Estado do Amazonas e em outros Estados brasileiros que apresentam regiões antropizadas. Consiste em uma planta aromática rica em óleo essencial, com rendimento entre 0,1% e 0,3% (BARDELLI; KIRIZAWA; SOUSA, 2008; POTZERNHEIM; BIZZO; VIEIRA, 2006; SIMEONE *et al.*, 2011). As folhas *in natura* da *P. hispidum* vem sendo coletadas e estudadas em diferentes Estados, e diferentes quimiotipos vêm sendo observados devido à variação dos constituintes químicos majoritários de acordo com o local de coleta.

(MAIA S.; ANDRADE A., 2009) realizaram um levantamento dos componentes majoritários em diferentes espécies do gênero *Piper* e verificaram a presença de germacreno (34,0 – 42,5%) e  $\beta$ -cariofileno (10,6 – 14,3%). (MACHADO *et al.*, 1994) coletaram as folhas no Estado de Rondônia e verificaram a presença de  $\gamma$ -cadineno (25,1%), canfeno (15,6%),  $\alpha$ -guaíeno (11,5%) e  $\gamma$ -elemeno (10,9%). (DA SILVA *et al.*, 2014) reportaram os constituintes do óleo essencial das folhas coletadas no Estado do Pará, e reportaram os seguintes constituintes:  $\delta$ -3-careno (9,1%),  $\alpha$ -copaeno (7,3%),  $\beta$ -cariofileno (10,5%),  $\alpha$ -humuleno (9,5%), limoneno (6,9%), oxido de carofileno (5,9%) e  $\beta$ -sileneno (5,1%). (SIMEONE *et al.*, 2011) avaliaram os constituintes presentes na espécie *P. hispidum* e reportaram os seguintes constituintes:  $\alpha$ -pineno (13,9 – 7,1%),  $\beta$ -pineno (13,3 – 7,5%) e  $\alpha$ -copaeno (32,2 – 28,7%). (PINO *et al.*, 2004) coletou as folhas da *P. hispidum* em Cuba e encontrou majoritariamente  $\beta$ -eudesmol (17,5%),  $\alpha$ -eudesmol (8,1%) e  $\gamma$ -eudesmol (9,3%).

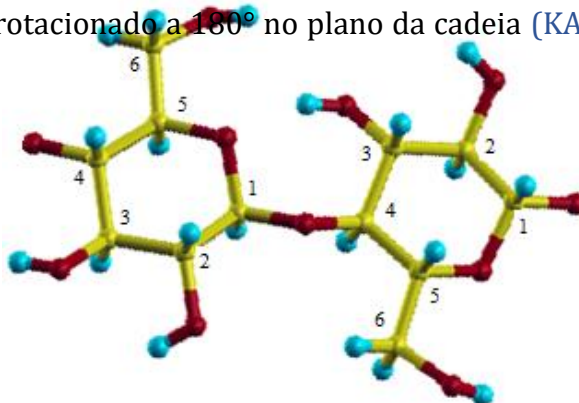
Devido à vasta variabilidade presente nos constituintes químicos do óleo essencial da *P. hispidum* apresentada acima, alguns trabalhos realizaram testes para avaliar seu potencial biológico. (SANTOS *et al.*, 2011) avaliaram a atividade inseticida do extrato acetônico das folhas *in natura* frente a *Hypothenemus hampei*, mostrando que 25,0 mg mL<sup>-1</sup> do extrato resultou em 100% de mortalidade. Os constituintes  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno foram reportados em trabalhos que avaliaram a atividade biológica de óleos essenciais dos quais são os componentes majoritários, sendo considerados responsáveis por atividades antimicrobiana e fungicida (CAO *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2005; FARAG *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2006b; MACHADO *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 2018) Dentre os constituintes majoritários presentes nas pesquisas de (SANTOS *et al.*, 2008) e (BAYLAC; RACINE, 2003) estão o  $\alpha$ -copaeno (7,3%) e o  $\beta$ -cariofileno. Os autores sugeriram que os óleos essenciais que possuem estes constituintes podem apresentar atividades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana. Dessa forma, a espécie *P. hispidum* foi escolhida como agente biodefensivo neste presente trabalho devido às diversas pesquisas descritas acima reportando seu possível potencial biológico.

### 3.2 Celulose

A celulose (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub> é um dos da parede celular dos materiais vegetais, sendo o polímero natural de maior abundância conhecido atualmente, e com taxa de produção anual de 75 a 100 bilhões de toneladas (CHEN *et al.*, 2016; KLEMM *et al.*, 2005). Sua estrutura molecular consiste na repetição de unidades conhecidas como  $\beta$ -D-glucopiranosose, e através das ligações  $\beta$ -(1,4)-glicosídica que ocorrem mediante as funções acetais entre o grupo hidroxila equatorial do átomo de carbono C-4 e o C-1, sofrendo esterificação e produzindo as unidades de repetição conhecidas como celobiose (CHENG *et al.*, 2019; KAPLAN, 1998; KLEMM *et al.*, 2005).

Tais unidades de repetição (**Figura 3**) são conformadas espacialmente para melhor estabilização termodinâmica e, como consequência, adquirem a conformação conhecida por cadeira. Nesta conformação, a estrutura molecular fornece estabilização energética e concede posições axiais aos átomos de hidrogênio ao longo do plano estruturado pelos átomos de carbono centrais. No entanto, os três grupos hidroxilas livres ligados aos átomos de carbono C-2, C-3 secundário e C-6 primário permanecem na

posição equatorial (TAJIMA *et al.*, 2019). Para acomodar os grupos funcionais que participam das ligações de hidrogênio, ocorre uma disposição no segundo anel da celobiose, este sendo rotacionado a 180° no plano da cadeia (KAPLAN, 1998; KLEMM *et al.*, 2005).

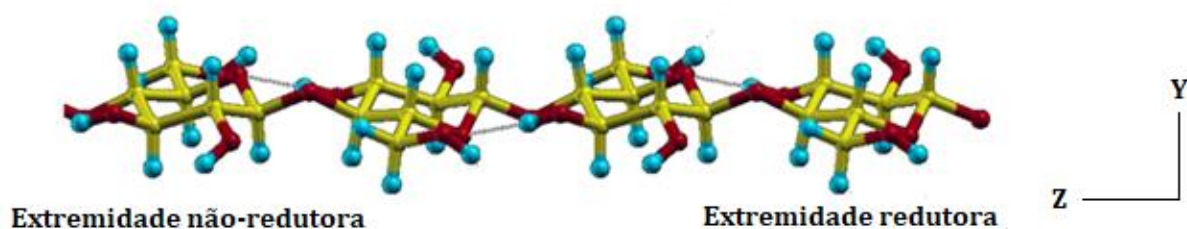


**Figura 3:** Estrutura da celulose, representação da celobiose em 3D com os átomos de carbono representados pelas esferas amarelas, enquanto os átomos de oxigênio e hidrogênio estão representados, respectivamente, pelas esferas vermelhas e azuis. **Fonte:** O Autor.

O carbono anomérico possui uma configuração que possibilita a formação de cadeias de celulose predominantes lineares, viabilizando a formação de ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares devido à uniformização dos grupos hidroxilas, resultado em uma ampla variabilidade de estruturas e morfologias (KLEMM *et al.*, 2005; LIU; WANG; LU, 2019).

A massa molecular elevada da celulose está diretamente relacionada ao comprimento médio das cadeias, sendo este grau variável e determinante nas propriedades químicas e físico-químicas. Portanto, como resultado desta estruturação polimérica, a celulose apresenta um caráter predominantemente hidrofílico, biodegradabilidade e reatividade elevada uma vez que o doador dos grupos hidroxilas está disponível (BILIUTA; COSERI, 2019; KAPLAN, 1998; SHARMA *et al.*, 2019a).

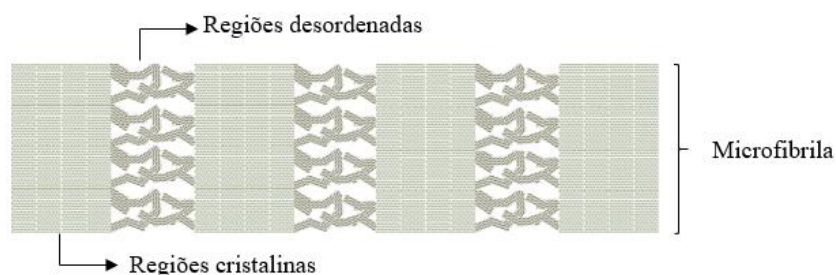
Nas extremidades laterais das cadeias de celulosas estão presentes as regiões redutoras e não redutoras (**Figura 4**) formadas por grupos -OH livres ligados a carbonos não eterificados, como o C1-OH anomérico livre de ligações glicosídicas, sendo um potencial aldeído e responsável pela região redutora, enquanto a região não redutora é resultante da presença do C4-OH (KAPLAN, 1998; KLEMM *et al.*, 2005).



**Figura 4:** Cadeia de celulose com duas unidades de celobiose em conformação cadeira visualizada em 3D através dos planos Z e Y. Na imagem é possível verificar visualmente as extremidades redutoras e não-redutoras, além das ligações intramoleculares entre o O5-OH-C3 indicadas a partir deste plano. **Fonte:** O Autor.

A celulose é um polímero rico em grupos hidroxilas. As ligações de hidrogênio representam o principal fator que afeta suas propriedades físico-químicas e, como consequência das ligações de hidrogênio intramoleculares nas cadeias centrais da sua estrutura, ocorre o endurecimento e a estabilização da cadeia, afetando diretamente a cristalinidade (BOLUK, 2005; KONDO *et al.*, 2008; MANIAN; PHAM; BECHTOLD, 2018). As ligações intermoleculares são menos resistentes e não possuem especificidade de quais átomos interagem entre as cadeias adjacentes. Em contrapartida, as ligações intramoleculares são definidas quanto às posições dos átomos que interagem, sendo eles 'OH-C2-OH-C6' e 'O5-OH-C3' (KONDO *et al.*, 2008). Embora os átomos que participam das interações intermoleculares não sejam definidos, eles são sugeridos, particularmente, entre os grupos OH-C6 e OH-C3 de cadeias paralelas, pois de acordo com suas posições espaciais ocorre uma aproximação favorável destes grupos quando observada a cela unitária da celulose nativa (KLEMM *et al.*, 2005). O alinhamento das unidades de repetição proporcionado pelas interações intermoleculares possibilita a produção da fibra vegetal e, consequentemente, as microfibrilas (SHARMA *et al.*, 2019b).

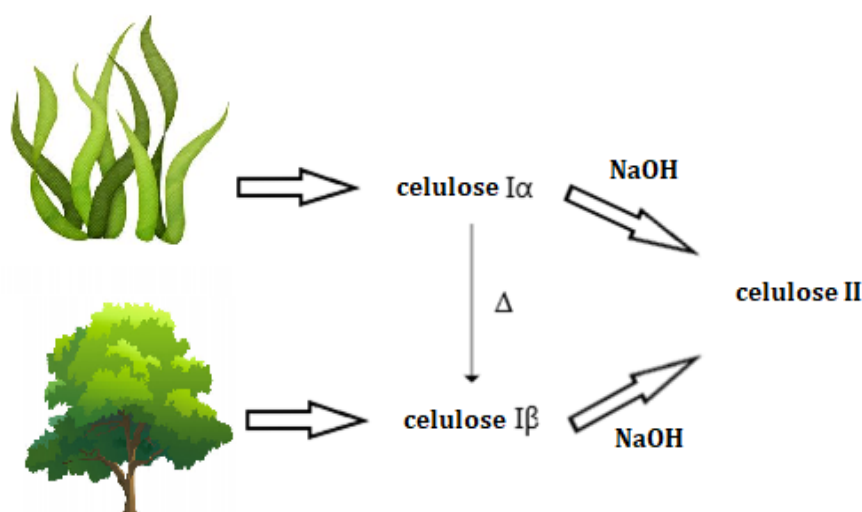
A **Figura 5** mostra a representação esquemática de uma microfibrila, destacando as regiões cristalinas e não-cristalinas.



**Figura 5:** Representação esquemática de uma microfibrila com ênfase nas regiões cristalinas e não-cristalinas. **Fonte:** O Autor.

As microfibrilas possuem uma estrutura complexa, contendo regiões tridimensionais de alta ordenação, conhecidas como *cristalitos*. No entanto, tais regiões coexistem com regiões desordenadas, não-cristalinas (SHARMA *et al.*, 2019b). Devido às diferentes fontes disponíveis para a obtenção de celulose e às irregularidades presentes entre as fases ordenadas, são encontrados polimorfos da celulose, tais como: celulose I, celulose II, celulose III e celulose IV. A celulose I é a mais abundante e, além de possuir duas fases cristalinas diferentes de acordo com sua origem, a celulose I $\alpha$  é a fase obtida a partir dos organismos vivos (algas e bactérias), enquanto a celulose I $\beta$  é obtida através de biomassas (BILIUTA; COSERI, 2019; KLEMM *et al.*, 2005; MAHMUD *et al.*, 2019; TAJIMA *et al.*, 2019).

A celulose II é obtida através de uma transformação irreversível da celulose I mediante processos de mercerização ou regeneração. Tal irreversibilidade da celulose II é dada através da sua estabilidade energética proporcionada pela estrutura antiparalela, enquanto a celulose nativa possui uma orientação espacial paralela (KLEMM *et al.*, 2005; MAHMUD *et al.*, 2019). O procedimento de mercerização é realizado por tratamento alcalino alterando a estrutura cristalina, resultando em modificações de propriedades estruturais e físico-químicas. Como previamente reportado, a celulose II adquire estabilidade térmica e resistência mecânica, além da diminuição das concentrações de lignina e hemicelulose. É possível obter a celulose II por regeneração utilizando um solvente que dissolva a celulose I e, em seguida, a recristalize alterando sua estrutura (MAHMUD *et al.*, 2019). A **Figura 6** esquematiza a origem e os métodos de obtenção da celulose I e II.



**Figura 6:** Origem e métodos de obtenção da celulose I e II. **Fonte:** O Autor.

Devido aos três grupos hidroxilas disponíveis e reativos, é possível formar derivados com propriedades modificadas e específicas, possibilitando aplicações do material celulósico em diversas áreas (BILIUTA; COSERI, 2019; LIU; WANG; LU, 2019). O principal motivo para a produção de derivados de celulose se dá pela sua insolubilidade em água, além da baixa solubilidade em diversos solventes orgânicos. Como consequência, existem diversos trabalhos científicos que abordam a produção de derivados celulósicos obtidos sob condições brandas e por metodologias não nocivas ao meio ambiente. Estudos recentes obtiveram relativo êxito na produção de derivados mais solúveis que o biopolímero precursor (THIANGTHAM; RUNT; MANUSPIYA, 2019).

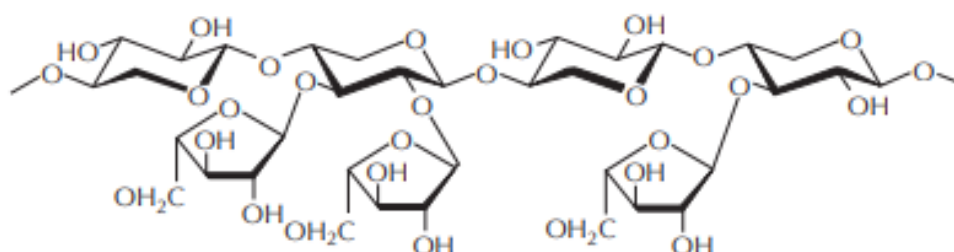
(GIBIS *et al.*, 2017) verificaram o impacto de moléculas de carboximetilcelulose com diferentes massas moleculares e graus de substituições em modelos de salsicha do tipo emulsão aquecida e não-aquecida, indicando que a inserção de pequenas concentrações de carboximetilcelulose de baixa massa molecular influenciou na redução de gordura. (FENG *et al.*, 2018) utilizaram carboximetilcelulose de sódio e celulose microcristalina para encapsular astaxantina pelo método de liofilização visando melhorar a estabilidade e atividade antioxidante, além de reduzir o potencial de degradação. Com rendimentos superiores a 52%, o material liofilizado foi utilizado na produção de iogurte. (PENG *et al.*, 2019) realizaram um trabalho utilizando micropartículas de etilcelulose carregadas com huperzina A, avaliando o mecanismo de dissolução, captação de água, tamanho de partículas e molhabilidade. Obtiveram resultados favoráveis de molhabilidade diretamente relacionados aos componentes utilizados na composição das pastilhas, resultando em uma captação de água mais efetiva e em uma liberação mais rápida do medicamento presente nas micropartículas de etilcelulose. (YIN *et al.*, 2018) estabeleceram uma metodologia para caracterizar comprimidos contendo celulose microcristalina, utilizando-se tomografia por raios X. Como resultado, foi obtida uma arquitetura morfológica tridimensional em 3D sendo possível avaliar a desintegração dos comprimidos, morfologia e arranjo espacial das cavidades dos comprimidos.

Pesquisas voltadas para a solubilidade da celulose respeitando o meio ambiente e utilizando reagentes não tóxicos, ou de mais baixa toxicidade, têm representado uma

construção da conscientização ambiental. Muitos reagentes tóxicos vêm sendo utilizados em vários níveis em pesquisas que propõem a solubilização da celulose, tais como dimetilsulfóxido, cloreto de lítio, iodeto de metila, anidro maleico etc. (KLEMM *et al.*, 2005). Dessa forma, esse tópico de pesquisa representa um campo promissor a ser estudado devido às necessidades de preservação ambiental e reaproveitamento sustentável de rejeitos orgânicos.

### 3.3 Hemicelulose

A hemicelulose é um polissacarídeo de cadeia curta e altamente ramificado por monossacarídeos e ácidos orgânicos, contendo cinco e seis carbonos, tais como, *D*-glicose, *D*-xilose, *D*-manose, *D*-galactose, *L*-arabinose, ácido glucurônico e ácido galacturônico (JAIN; SJÖSTEDT; GLASSER, 2000; LEI *et al.*, 2019; REN; SUN, 2010). Os grupos laterais monossacarídeos que estão presentes nas ramificações das hemiceluloses podem variar de acordo com a origem do material lignocelulósico, afetando diretamente o grau de polimerização, uma vez que a estrutura ramificada impede a formação das ligações de hidrogênio de maneira efetiva, promovendo baixas interações inter- e intramoleculares (DOLAN *et al.*, 2019). Como consequência da deficiência em ligações de hidrogênio, a hemicelulose adquire uma estrutura não-cristalina tornando-se suscetíveis à hidrólise. Geralmente, hemiceluloses originadas a partir de plantas possuem os monossacarídeos *D*-xilose e *L*-arabinose predominantes em sua estrutura e são conhecidas como arabinoxilanas, cuja estrutura molecular é indicada na **Figura 7** (LEI *et al.*, 2019; TERRETT; DUPREE, 2019).



**Figura 7:** Estrutura molecular da *L*-arabino-*D*-xylan. **Fonte:** O Autor.

Em decorrência da sua origem vegetal, a hemicelulose pode ser encontrada na parede celular de plantas e algas. Sua presença propicia uma interação direta com a celulose e lignina através de ligações covalentes, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas (REN; SUN, 2010).

Como resultado da estrutura não-cristalina da hemicelulose é possível, com relativa facilidade, induzir a hidrólise das suas cadeias gerando subprodutos com valor agregado e possíveis aplicações (AJAO *et al.*, 2018; GABRIEL DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Devido a hemicelulose ser um dos componentes presentes em abundância nos materiais lignocelulósicos, é interessante buscar aplicações para agregar valor comercial à biomassa que, em primeiro momento, seria um rejeito (REN; SUN, 2010).

(JIA *et al.*, 2019) utilizaram a *D*-xilose obtida a partir da degradação da hemicelulose, propondo uma via catalítica viável da produção de furfural, precursor renovável com potencial em aplicações industriais e farmacêuticas. (GABRIELII *et al.*, 2000) obtiveram filmes e hidrogéis a base de *D*-xilose e quitosana isolados a partir da hemicelulose extraída da *Populus tremula*. As propriedades obtidas após a formação dos filmes e hidrogéis foram relacionadas à proporção adequada dos constituintes isolados, bem como aos domínios cristalinos de xilanas ligadas às cadeias de quitosana. (JAIN; SJÖSTEDT; GLASSER, 2000) utilizaram *D*-xilose isolada para dupla derivatização de sua estrutura para obter hidroxipropil xilano (HPX) solúvel em água e termoplástico, além da formação de acetoxipropil xilano (APX) através de HPX que apresentou insolubilidade em água e termoplasticidade. Os filmes obtidos neste trabalho apresentaram alta resistência à tração e biodegradabilidade.

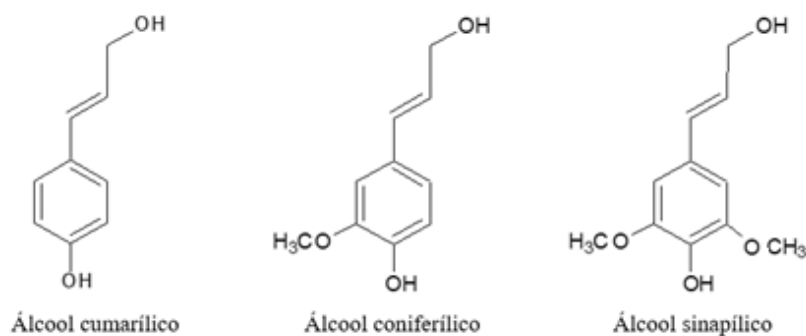
A porção resultante após a retirada de lignina de um material lignocelulósico é conhecido como *holocelulose*. A holocelulose é um material composto de celulose e hemicelulose e as proporções destes dependem diretamente do método de extração e da origem do material inicial. A celulose pode ser obtida a partir da holocelulose, porem envolve mais etapas de extração elevando o custo e reduzindo o rendimento do material final. Por essa razão, dependendo da aplicabilidade do material não é interessante etapas de isolamento da celulose ou hemicelulose (DEEPA *et al.*, 2015).

### 3.4 Lignina

A palavra lignina teve origem na língua latina “*lignum*” cujo significado é madeira. É um subproduto proveniente do processo de polpação para a obtenção de celulose (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014). São produzidas anualmente cerca de 50 milhões de toneladas como resultado da produção da celulose (MAHMOOD *et al.*, 2016). Dentre os polímeros naturais, a lignina é o segundo mais abundante, consistindo entre 15% a 40% da parede celular dos vegetais (CHEON *et al.*, 2019).

A lignina está presente nos tecidos de angiospermas, gimnospermas e tecidos vasculares. É um biopolímero tridimensional complexo e desordenado que possui uma variedade ampla na sua composição estrutural, seja em espécies diferentes ou mesmo entre uma mesma espécie (DARMAWAN *et al.*, 2016; MAHMOOD *et al.*, 2016). Sua importância nos materiais vegetais está na proteção da parede celular contra microrganismos nocivos, resistência mecânica, além de fornecer metabólitos, água e micronutrientes (CHEON *et al.*, 2019).

A lignina é um copolímero cuja estrutura é formada por monômeros fenilpropanóides advindos, principalmente, de três precursores aromáticos alcoólicos: os álcoois *trans*-coniferílicos, *trans*-*p*-cumarílicos e *trans*-sinapílicos. Através da reação via condensação desidrogenativa, são formadas subestruturas fenólicas, siringila, guaiacila e *p*-hidroxifenila. A estrutura da lignina não é a mesma em todas as biomassas pois, dependendo da espécie, há uma produção de lignina com predominância de unidades fenólicas diferentes, impactando o processo de extração (YANG *et al.*, 2019; ZHANG; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2003). A **Figura 8** mostra os precursores principais da lignina e suas estruturas.



**Figura 8:** Os precursores principais da lignina e suas estruturas. **Fonte:** O Autor.

Devido às diferentes proporções de lignina nas biomassas presentes na natureza foi necessário construir e adaptar diferentes métodos de extração ao longo do tempo, e os mais comuns são os métodos que degradam a macromolécula gerando frações insolúveis e solúveis de lignina. Apesar das diversas metodologias presentes na literatura, ainda não foi possível obter lignina extraída nas mesmas condições estruturais das isoladas nas biomassas, pois durante o processo de extração são causados efeitos severos em sua estrutura que anteriormente estava em equilíbrio com os demais componentes da parede celular.

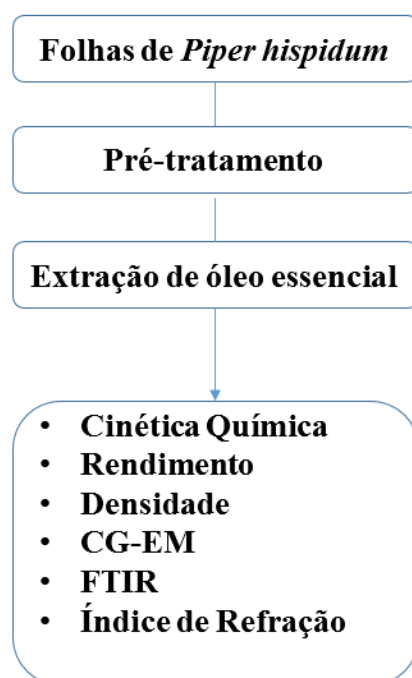
O método mais utilizado para a determinação do teor da lignina é o Klason. Nesta metodologia ocorrem duas etapas de extração da lignina. Na primeira, o material lignocelulósico é imerso em uma solução de ácido sulfúrico 72% à temperatura ambiente e, na etapa seguinte, a mistura resultante é diluída a 3% seguido de um processo térmico. Ao fim do processo, é obtida a lignina insolúvel e solúvel. A lignina insolúvel é neutralizada e seca, sendo possível calcular o seu teor. Já o teor da lignina solúvel é obtido através do método espectroscópico na região do UV-vis absorvendo radiação em  $280\text{ cm}^{-1}$ . Ao obter o teor de lignina solúvel e o teor de lignina insolúvel é possível determinar o teor de lignina total presente no material lignocelulósico (MORAIS; ROSA; MARCONCINI, 2010).

Devido a lignina ser um subproduto abundante na indústria do papel com pouco valor agregado, algumas pesquisas vêm sendo realizadas visando aplicações alternativas deste material. O método de aplicação mais recorrente é o uso da lignina como combustível para aquecimento de caldeiras, porém essa não é a solução ideal para o reaproveitamento deste resíduo, uma vez que o material degrada em temperaturas baixas quando comparadas a outros materiais, além do baixo rendimento energético (CHEON *et al.*, 2019; SHELDON *et al.*, 2012; ZHU; LI; CHEN, 2019). Apesar das dificuldades de agregar valor nas aplicações da lignina, é interessante a continuidade de pesquisas pois o mesmo possui propriedades interessantes no seu estado *in natura*. Algumas alternativas estão sendo exploradas nos últimos anos, tais como o início da produção de catalisadores derivados de lignina para sínteses quimicamente sustentáveis (ZHU; LI; CHEN, 2019). Devido à sua coloração marrom, após as extrações convencionais, é praticamente inviável aplicações envolvendo biofármacos, porém uma vez contornada essa problemática as

propriedades antioxidante e antimicrobiana possibilitam sua aplicação (CHEON *et al.*, 2019; ROOPAN, 2017).

## 4 METODOLOGIA

A **Figura 9** resume as etapas realizadas. A primeira foi referente à extração e caracterização do óleo essencial, enquanto o segundo baseou-se na extração e caracterização da holocelulose.



**Figura 9:** Representação esquemática da etapa de extração e caracterização do óleo essencial. **Fonte:** O Autor.

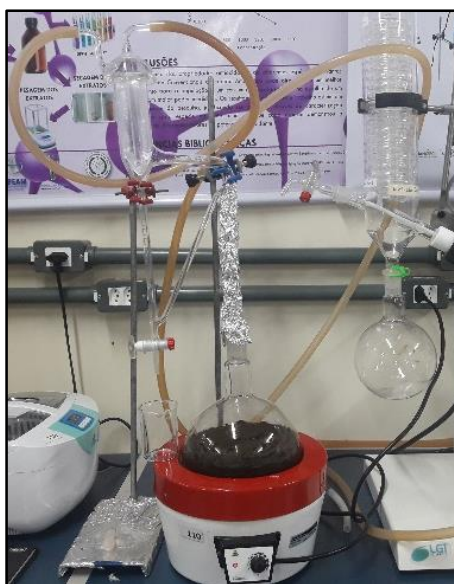
### 4.1 Pré-tratamento das Folhas *in natura* da *P. hispidum*

A coleta das folhas da espécie *P. hispidum* foi realizada na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) no primeiro semestre de 2019 às 16h30min. A identificação botânica foi realizada no herbário da UFAM através do voucher referente à *P. hispidum*. As folhas coletadas foram lavadas com água corrente para a retirada de impurezas superficiais e,

em seguida, com água destilada. Em seguida, foram secas em estufa com circulação forçada de ar, produzindo uma atmosfera de 50% de umidade relativa a 45 °C por 48 h. Ao fim da secagem, as folhas foram trituradas mecanicamente.

## 4.2 Extração de Óleo Essencial

O óleo essencial da *P. hispidum* foi extraído utilizando-se o sistema de hidrodestilação tipo Clevenger modificado, por 4 h a 75 °C (**Figura 10**). Foram utilizados 130 g de folhas secas e trituradas inseridas em um balão volumétrico de 2 L. O óleo essencial foi tratado com sulfato de sódio anidro para a remoção de água residual.



**Figura 10:** Sistema de hidrodestilação Clevenger em funcionamento. **Fonte:** O Autor.

## 4.3 Caracterização do Óleo Essencial

### 4.3.1 Densidade

O cálculo da densidade do óleo essencial foi estimado utilizando-se a **Equação 1**.

$$Densidade = \frac{m_2 - m_1}{m_1 - m} \quad \text{Eq.1}$$

O método abordado para o cálculo de densidade foi baseado na aplicação de capilares a 25°C. Foi utilizado um tubo capilar seco preenchido com água destilada e com massa previamente determinada ( $m_1$ ). Um segundo tubo capilar foi preenchido com óleo essencial e teve sua massa determinada ( $m_2$ ) para obter a diferença de massa do capilar cheio e vazio ( $m$ ) (PERRY *et al.*, 1997).

#### 4.3.2 Rendimento

O rendimento do óleo essencial foi estimado utilizando-se a **Equação 2**.

$$Rendimento (\%) = \frac{Massa_{oleo}}{Massa_{folha}} \times 100 \quad \text{Eq.2}$$

#### 4.3.3 Índice de Refração

O índice de refração do óleo essencial foi medido a 25° C em um refratômetro de bancada ABBE modelo DR-Al. Uma gota do óleo essencial foi depositada na superfície do cristal para posterior leitura.

#### 4.3.4 Cinética Química

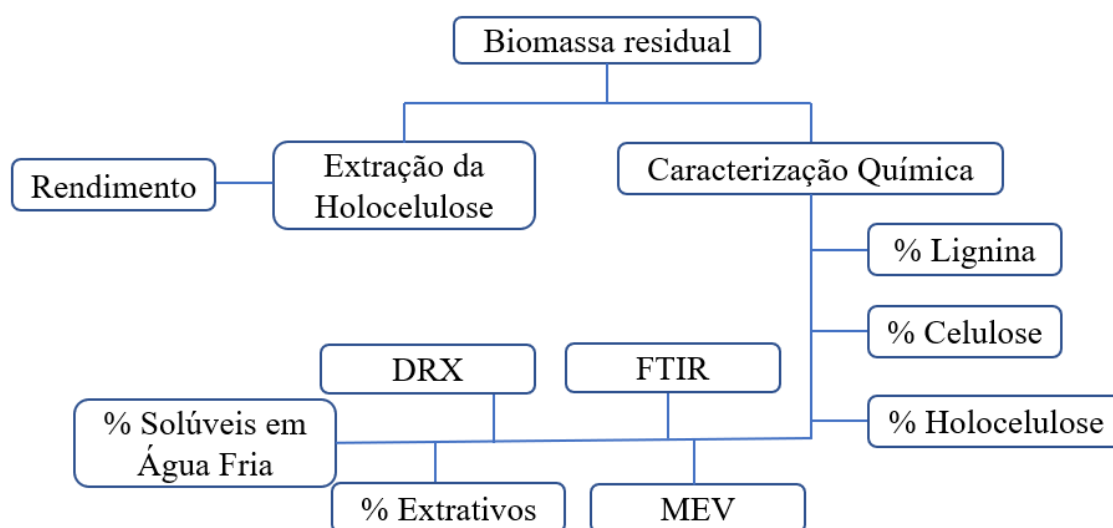
O tempo ótimo de extração do óleo essencial foi avaliado a partir do volume extraído ao longo do tempo, observando o início da formação da primeira gota do óleo essencial extraído e o tempo em que houve uma pausa na variação de volume do óleo essencial.

#### 4.3.5 Caracterização Química dos Óleos Essenciais por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

A caracterização química do óleo essencial foi realizada por CG-EM utilizando-se uma coluna DB5-MS. O gás utilizado como arraste foi o gás hélio em um fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor foi de 240 °C, com temperatura inicial do forno de 60 °C, mantida em isoterma por 2 min, seguida por uma rampa de temperatura a 3 °C min<sup>-1</sup> até 250 °C, e por outra rampa a 10 °C min<sup>-1</sup> até 290 °C, mantendo-se em condição isoterma por 5 min. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos pela média da porcentagem de área normalizada relativa dos picos cromatográficos.

A análise GC-DIC foi realizada utilizando um instrumento Shimadzu™ GC2010-FID equipado com um detector de ionização de chama (DIC) e uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (0,25 mm × 30 m, 0,25 µm de espessura de revestimento). As condições operacionais foram as seguintes: as temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C e 290 °C, respectivamente; hélio foi usado como gás carreador a uma taxa de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; a coluna foi aquecida de 60 °C a 250 °C com uma taxa de 3 °C min<sup>-1</sup>. A relação de divisão foi de 1:10. A análise GC-EM foi realizada em um instrumento Shimadzu™ GCMS-QP2010 e a mesma coluna foi utilizada para a análise CG-DIC. As condições operacionais foram as mesmas do GC-DIC. O perfil foi obtido em 70 eV no intervalo de 32 Da a 420 Da.

#### 4.4 Caracterização Físico-química das Folhas da *P. hispidum* e da Holocelulose Extraída



**Figura 11:** Representação esquemática das etapas de extração e caracterização das folhas *in natura* e holocelulose. **Fonte:** O Autor.

#### 4.4.1 Extração da Holocelulose

A extração da holocelulose foi realizada após a extração do óleo essencial das folhas *in natura* da *P. hispidum*. Foram utilizadas 73,0 g da biomassa resultante do procedimento de extração do óleo essencial. Uma vez que o processo de hidrodestilação utilizou apenas água como solvente a 80 °C, tornou-se desnecessária a limpeza da amostra a quente. O pré-tratamento da biomassa foi concluído após a lavagem da mesma em uma solução de álcool etílico e acetona 95:5 (v/v) por 1 h sob refluxo.

A metodologia para a extração da holocelulose foi realizada empregando-se um tratamento químico na biomassa. Foi preparada uma solução 5% NaOH. Em seguida, 73,0 g de amostra foi imersa nesta solução em um erlenmeyer de 1 L a 80 °C por 2 h sob agitação (BHATNAGAR; SAIN, 2005; TAMILSELVI *et al.*, 2019). O procedimento foi realizado por 6 h, consistindo em três repetições do mesmo procedimento. Ao fim desta etapa, a amostra foi neutralizada através de lavagem com água destilada. Em seguida, a amostra foi seca em estufa a 45 °C.

A etapa final para obtenção da holocelulose consistiu no branqueamento da amostra resultante após o procedimento alcalino. A amostra foi inserida em um erlenmeyer de 2 L contendo 1,0 g de clorito de sódio, 1,0 mL de ácido acético glacial e 100 mL de água destilada para cada 3 g de amostra (CAMPBELL; KIM; KOCH, 2007; TAMILSELVI *et al.*, 2019). O procedimento foi realizado a 70 °C sob agitação magnética e repetido três vezes a cada 1 h, em triplicata. A amostra foi neutralizada com água destilada e seca em estufa a 45 °C.

A etapa anterior foi adaptada na tentativa de retirar impurezas ainda remanescentes. O branqueamento da amostra resultante após o procedimento alcalino foi realizado em triplicata. A amostra foi inserida em um erlenmeyer de 2 L contendo 2,0 g de clorito de sódio, 1,0 mL de ácido acético glacial e 100 mL de água destilada para cada 3 g de amostra a temperatura ambiente (CAMPBELL; KIM; KOCH, 2007; TAMILSELVI *et al.*, 2019). O procedimento foi realizado por 48 h, onde o fornecimento dos reagentes (levando em consideração a proporção reagente/amostra descrito anteriormente) foi repetido três vezes em intervalos de 1 h. Após 3 h, o procedimento continuou sob agitação mecânica até o fim do tempo estipulado. Então, a amostra foi neutralizada com água destilada e seca em estufa a 45 °C.

#### 4.4.2 Caracterização Química

##### 4.4.2.1 Determinação do Teor de Umidade (%TU)

A determinação do teor de umidade (%TU) foi realizada utilizando-se um analisador de umidade modelo i-Thermo 163 L com lâmpada alógena (**Figura 12**). As medidas foram realizadas utilizando-se 1,0 g de folhas trituradas e secas num intervalo de 25 °C a 105 °C.

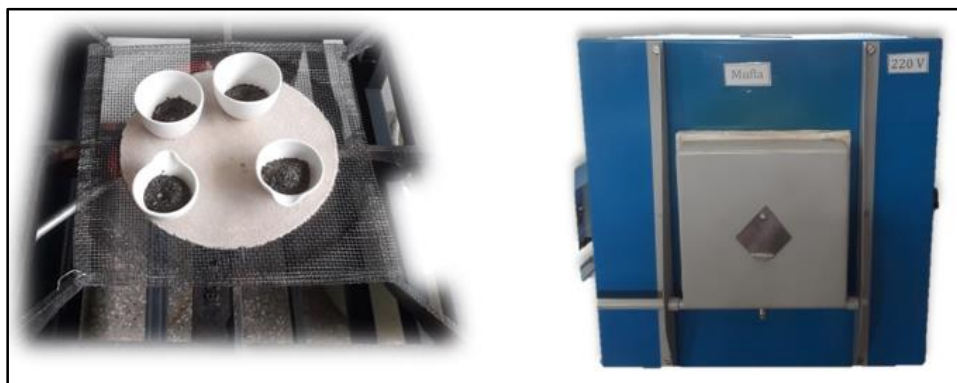


**Figura 12:** Balança para determinação de umidade. **Fonte:** O Autor.

##### 4.4.2.2 Determinação do Teor de Cinzas (%TCZ)

Este procedimento teve como finalidade determinar a quantidade de material inorgânico presente na amostra, seja este material proveniente da própria amostra ou de um ambiente externo. O procedimento foi realizado adaptando-se a metodologia da [Norma TAPPI T211 om-02 \(2002\)](#), reduzindo o tempo de caracterização e riscos envolvidos. Os cadinhos utilizados no procedimento foram aquecidos em mufla Cienlab por 1 h a 600 °C. Em seguida, foram resfriados no dessecador para posterior determinação de suas massas. A massa de 2,0 g de folhas trituradas foi depositada nos cadinhos previamente tarados e, em seguida, carbonizados em folha de amianto em fogão industrial. O material carbonizado foi aquecido em mufla a 9,6 °C min<sup>-1</sup> até atingir 600 °C. Ao atingir a temperatura desejada, o tempo de 3 h foi cronometrado para análise. Em

seguida, a amostra foi resfriada em dessecador até a temperatura ambiente, tendo então a sua massa aferida.



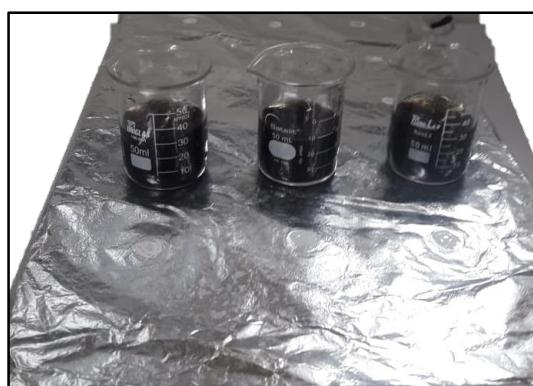
**Figura 13:** No lado esquerdo estão representados os cadinhos com o material orgânico carbonizado antes de ser inserido na mufla. No lado direito está representado a parte frontal da mufla utilizada. **Fonte:** O Autor.

Obtendo a massa final da amostra calcinada, o cálculo para determinar o teor de cinzas foi obtido através da **Equação 3**, onde  $P_{cz}$  é a massa da amostra calcinada e  $P_i$  representa massa da amostra inicial.

$$\%TCZ = \frac{P_{cz}}{P_i} * 100 \quad \text{Eq.3}$$

#### 4.4.2.3 Determinação do Teor de Componentes Solúveis em Água Fria (%TSAF)

Este procedimento teve como finalidade determinar, em porcentagem, os componentes da amostra que são solubilizados em meio aquoso, tais como açúcares de baixa massa molecular, pigmentos, taninos, minerais inorgânicos e polissacarídeos. Esta metodologia foi baseada na [Norma TAPPI TI m-59](#) e [NBR7988](#), com adaptações. Foram utilizados 2,0 g de folhas trituradas em uma solução de água destilada 1,0 g/100,0 mL sob agitação constante por 48 h. Em seguida, a amostra foi lavada com água destilada e filtrada a vácuo para a retirada de materiais solúveis remanescentes. O material resultante da lavagem foi seco em estufa a 105 °C até atingir massa constante. Em seguida foi resfriado em dessecador, tendo então sua massa aferida.



**Figura 14:** Procedimento de agitação em temperatura ambiente em funcionamento. **Fonte:** O Autor.

Com o valor da massa final da amostra foi possível realizar o cálculo do %TSAF através da **Equação 4**, onde  $P_i$  representa a amostra inicial e  $P_f$  é a amostra após o procedimento.

$$\%TSAF = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100 \quad \text{Eq.4}$$

#### 4.4.2.4 Determinação do Teor de Extrativos

Este procedimento teve como objetivo quantificar os componentes que não estão presentes na estrutura da parede celular da amostra e que são removidos quando a mesma entra em contato com solventes polares/apolares. Em geral, os componentes retirados neste procedimento possuem baixa ou média massas moleculares, tais como fenóis, resinas, glicosídeos, ácidos e/ou ésteres graxos, ceras, taninos e açúcares. O procedimento foi realizado em triplicata utilizando-se como referência a [Norma TAPPI 204 cm-97 \(2007\)](#) adaptada para a obtenção do teor de extrativos.

Foram utilizadas 15 g de amostra pré-tratada e inserida no sistema de extração Soxhlet (**Figura 15**). A primeira etapa consistiu na utilização dos solventes hexano/etanol (2:1) que foram aquecidos até a temperatura de ebulição. Este procedimento teve duração de 6 h. Na segunda etapa o solvente utilizado foi apenas o etanol, e o procedimento foi realizado nas mesmas condições do procedimento anterior, mudando apenas o tempo de duração que foi de 4 h contínuas. A terceira etapa de extração consistiu na utilização de água destilada como solvente, onde a amostra foi imersa em banho maria a 100 °C por 1 h. Em seguida, a amostra resultante foi levada a estufa a (105 ± 5) °C e resfriada em dessecador a temperatura ambiente para posterior aferição de massa.



**Figura 15:** Sistema de extração soxhlet em funcionamento. **Fonte:** O Autor.

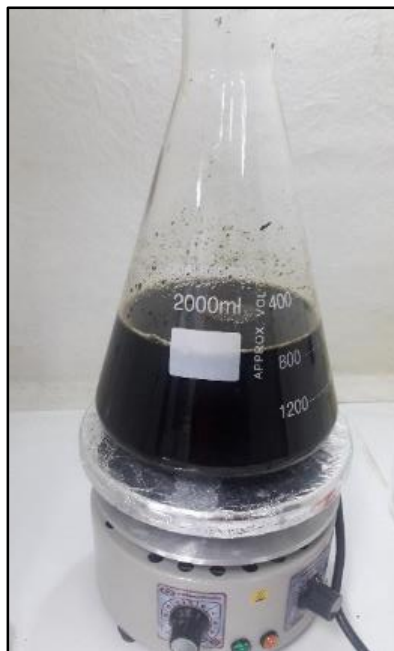
O cálculo do teor de extrativos foi realizado utilizando a **Equação 5**, onde  $P_i$  é a massa inicial pré-tratada e  $P_e$  é a massa final ao fim do procedimento.

$$\%TE = \frac{P_i - P_e}{P_i} * 100 \quad \text{Eq. 5}$$

#### 4.4.2.5 Determinação do Teor de Lignina (%TL)

A metodologia utilizada para a determinação do teor de lignina insolúvel presente na parede celular das folhas da *P. hispidum* foi baseada na [Norma TAPPI T 222 om-22 \(2006\)](#), com adaptações. A massa de 1,0 g de amostra resultante dos processos de extração feitos anteriormente foi adicionada à 17 mL de ácido sulfúrico. A mistura resultante ficou sob agitação mecânica por 3 h a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 425 mL de água destilada na mistura para diluição de ácido sulfúrico a 4%. A mistura foi inserida em um sistema de refluxo por 4 h.

Para a obtenção do valor de lignina insolúvel presente na amostra sem extrativos (**Figura 16**), foi realizada a filtragem em funil sinterizado. O material retido foi levado a estufa a  $(105 \pm 5) ^\circ\text{C}$  e resfriado em dessecador a temperatura ambiente para, em seguida, realizar a pesagem. Este procedimento foi realizado em triplicata.



**Figura 16:** Sistema de extração de lignina. **Fonte:** O Autor.

A obtenção do teor de lignina insolúvel foi realizada através da **Equação 6**, onde  $P_{li}$  é a massa obtida ao final do procedimento, enquanto  $P_i$  é a massa inicial da amostra sem extrativos.

$$\%TL = \frac{P_l}{P_i} * 100 \quad \text{Eq. 6}$$

#### 4.4.2.6 Determinação do Teor de Holocelulose (%THL)

A holocelulose é composta por carboidratos presentes na parede celular dos materiais vegetais presentes na natureza, dentre eles estão as cadeias de celulose e a hemicelulose. Para determinar o teor de holocelulose foi realizado um processo oxidativo em meio ácido para eliminar a lignina presente na amostra através da adaptação da [Norma TAPPI T223 cm-01 \(2001\)](#). Foram utilizados 3,0 g de amostra sem extrativos, inseridas em um erlenmeyer com 120 mL de água destilada. Para acidificar o meio reacional foi utilizado 0,1 mL de ácido acético e 2,5 g de clorito de sódio para realizar a oxidação da lignina. A reação ocorreu a 70 °C por 3 h sob agitação mecânica. A mesma quantidade de ácido acético e clorito de sódio foi depositada mais duas vezes em um intervalo de 1 h, totalizando 3 h de reação oxidativa. Após o fim do procedimento inicial, o sistema foi resfriado a 10 °C em um banho de gelo por 30 min, e o material resultante

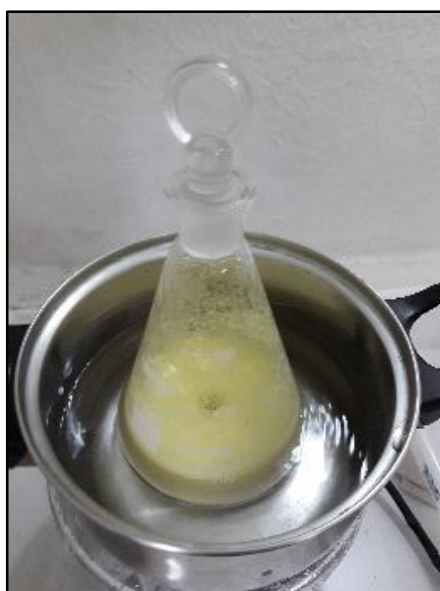
foi filtrado e lavado até o pH do material e da água se aproximarem. Ao atingir a neutralidade, o material foi lavado com acetona e etanol.

Em seguida, a amostra foi seca em estufa a 90 °C até atingir massa constante e, em seguida, foi resfriada em um dessecador. A **Equação 7** foi utilizada para determinar o teor de holocelulose, onde  $P_i$  é a massa inicial da amostra sem extrativos e  $P_{hl}$  é a massa final da amostra oxidada e livre de lignina.

$$\%THL = \frac{P_{hl}}{P_i} * 100 \quad \text{Eq. 7}$$

#### 4.4.2.7 Determinação do Teor de Celulose (%TC)

A determinação do teor de celulose foi realizada em triplicata e baseada na [Norma TAPPI T203 cm-99 \(1999\)](#), utilizando-se 1,0 g de amostra sem extrativos imersa em uma solução de 50 mL de ácido nítrico e ácido acético, a qual foi preparada utilizando 73 mL de ácido acético e 9 mL de ácido nítrico, e completada com água destilada até atingir 100 mL. A mistura composta pela amostra e solventes foi inserida num sistema de refluxo e banho maria a 100 °C (**Figura 17**). Atendida a ebulição, foram cronometrados 30 min para completar a reação, e então a mistura foi resfriada em temperatura ambiente e filtrada com funil sinterizado à vácuo. Por fim, a celulose resultante do procedimento foi lavada com 500 mL de água destilada e 25 mL de etanol. Após a lavagem, a amostra ainda inserida no funil foi levada a estufa para secagem até massa constante a 90 °C e então resfriada até atingir a temperatura ambiente, em um dessecador.



**Figura 17:** Sistema de extração de celulose. **Fonte:** O Autor.

Para a determinação do teor de celulose foi utilizada a **Equação 8**, onde  $P_i$  é a massa inicial da amostra sem extrativos e  $P_c$  é a massa resultante da celulose ao finalizado o procedimento.

$$\%TC = \frac{P_c}{P_i} * 100 \quad \text{Eq. 8}$$

#### 4.4.2.8 Determinação do Teor de Hemicelulose (%THEM)

A determinação do teor de hemicelulose (**Equação 9**) se deu pela subtração dos teores de celulose e holocelulose encontrados anteriormente. Essa determinação é possível devido a holocelulose possuir teores tanto de celulose quanto de hemicelulose, tornando-se possível estimar o teor de hemicelulose indiretamente.

$$\%THEM = \%THL - TC\% \quad \text{Eq. 9}$$

#### 4.4.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR, na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , foram obtidos no laboratório HUB Tecnologia e Informação (UEA) utilizando-se o espectrofotômetro Shimadzu-IR Prestige-21, em temperatura ambiente.

#### 4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise microestrutural das folhas *in natura* de *P. hispidum* e da holocelulose extraída e liofilizada foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Laboratório Temático de Microscopia Óptica e Eletrônica do Instituto Nacional de

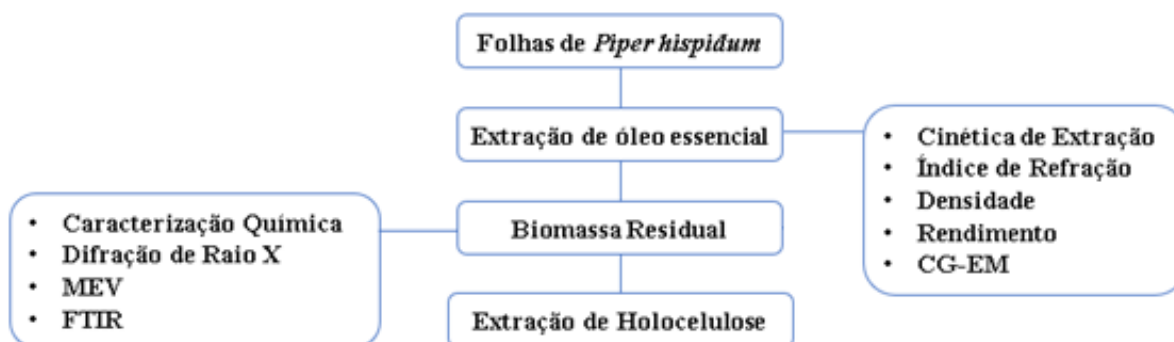
Pesquisas da Amazônia (INPA). As amostras foram inseridas em fitas de carbono e recobertas por uma fina camada de ouro. As imagens foram obtidas a 25°C.

#### 4.4.5 Difração de Raios X (DRX)

Os padrões de DRX foram obtidos utilizando-se um difratômetro Empyrean, operando com 40 kV, 40 mA e radiação de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ). Os dados foram coletados utilizando passo de  $0,03^\circ$  e 3s/passos no intervalo de  $10^\circ$  a  $60^\circ$  em  $2\theta$ .

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos estão divididos conforme o diagrama da **Figura 18**.



**Figura 18:** Representação esquemática das técnicas utilizadas para caracterização dos materiais obtidos.  
**Fonte:** O Autor.

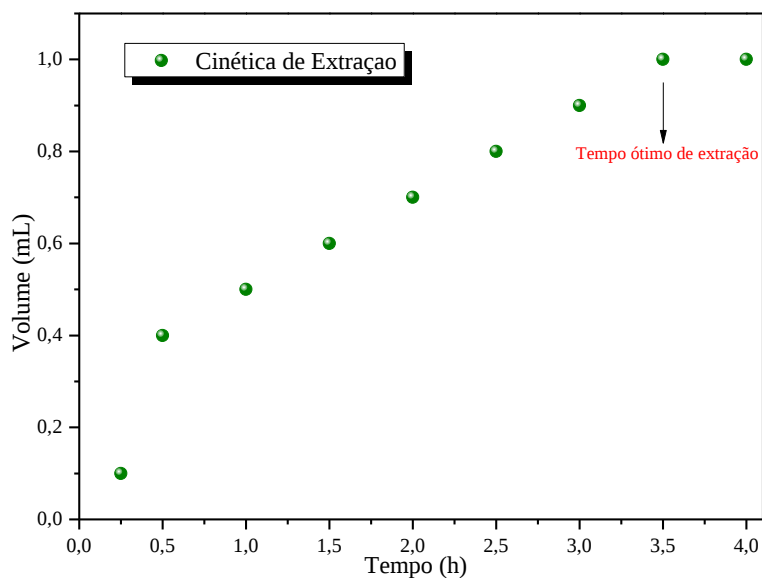
A ordem das extrações e a caracterizações dos materiais foram guiadas de acordo com as características das amostras. Sendo assim, após a coleta das folhas *in natura* e extração do óleo essencial, a biomassa residual foi tratada como prioridade devido a sua

suscetibilidade à degradação, enquanto o óleo essencial foi armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$  para evitar oxidação ou volatilização.

## 5.1 Caracterizações Físicas do Óleo Essencial *in natura*

### 5.1.1 Rendimento, Densidade, Índice de Refração e Cinética Química

O processo de hidrodestilação do óleo essencial foi realizado por 4 h, e a cinética de extração foi determinada e representada pela **Figura 19**. É possível observar o início da condensação em 0,25 h, e o tempo ótimo de extração após 3,5 h. O índice de refração do óleo essencial foi estimado em  $(1,49 \pm 0,01)$  e a densidade calculada foi de  $(0,86 \pm 0,01) \text{ g cm}^{-3}$ .



**Figura 19:** Cinética de extração do óleo essencial evidenciando o volume (mL) de óleo essencial extraído com relação ao tempo (h) de extração. **Fonte:** O Autor.

O rendimento de óleo essencial (% m/m) foi de 1,2 %. Este valor se encontra acima do intervalo de rendimentos máximos encontrados na literatura. Os rendimentos

relatados variam de 0,1 a 0,3 %, pois ocorrem influências diretas das condições de cultivo e do período de desenvolvimento, além do procedimento de extração (BARDELLI; KIRIZAWA; SOUSA, 2008; POTZERNHEIM; BIZZO; VIEIRA, 2006; SIMEONE *et al.*, 2011). Os componentes voláteis aumentam em temperaturas mais altas e em períodos secos, entre agosto e novembro, explicando o elevado rendimento. Levando em consideração o horário da coleta, às 16h30min, o rendimento superior ao esperado pode ser explicado devido à redução da temperatura, aumentando a concentração de constituintes químicos.

### 5.1.2 Caracterização Química do Óleo Essencial por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

De acordo com a caracterização do óleo essencial da espécie *P. hispidum* mostrada na **Tabela 1** foram identificados 23 constituintes. Dentre eles, 70,3% são monoterpenos hidrocarbonetos, 0,7% monoterpenos oxigenados, 19,5% sesquiterpenos hidrocarbonetos e 3,9% são sesquiterpenos oxigenados. Os constituintes majoritários identificados foram  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineno e terpinoleno, totalizando 59,1%.

**Tabela 1:** Constituintes químicos de óleo essencial da espécie *P. hispidum*.

| <i>Piper hispidum</i> |                   |                       |                                  |      |
|-----------------------|-------------------|-----------------------|----------------------------------|------|
| IR <sub>Cal</sub>     | IR <sub>Lit</sub> | Substância            | Fórmula                          | A%   |
| 925                   | 921               | triciclano            | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>  | 0,3  |
| 932                   | 932               | $\alpha$ -pineno      | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>  | 1,1  |
| 976                   | 974               | $\beta$ -pineno       | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>  | 0,8  |
| 985                   | 981               | 6-metil-5-heten-2-ona | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O | 0,7  |
| 990                   | 988               | mirceno               | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>  | 1,5  |
| 1005                  | 1002              | $\alpha$ -felandreno  | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>  | 0,6  |
| 1010                  | 1008              | $\delta$ -3-careno    | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>  | 0,3  |
| 1016                  | 1014              | $\alpha$ -terpineno   | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>  | 17,0 |
| 1023                  | 1020              | <i>p</i> -cimeno      | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>  | 5,3  |
| 1027                  | 1025              | $\beta$ -felandreno   | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>  | 1,3  |
| 1058                  | 1054              | $\gamma$ -terpineno   | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>  | 34,1 |
| 1088                  | 1086              | terpinoleno           | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>  | 8,0  |

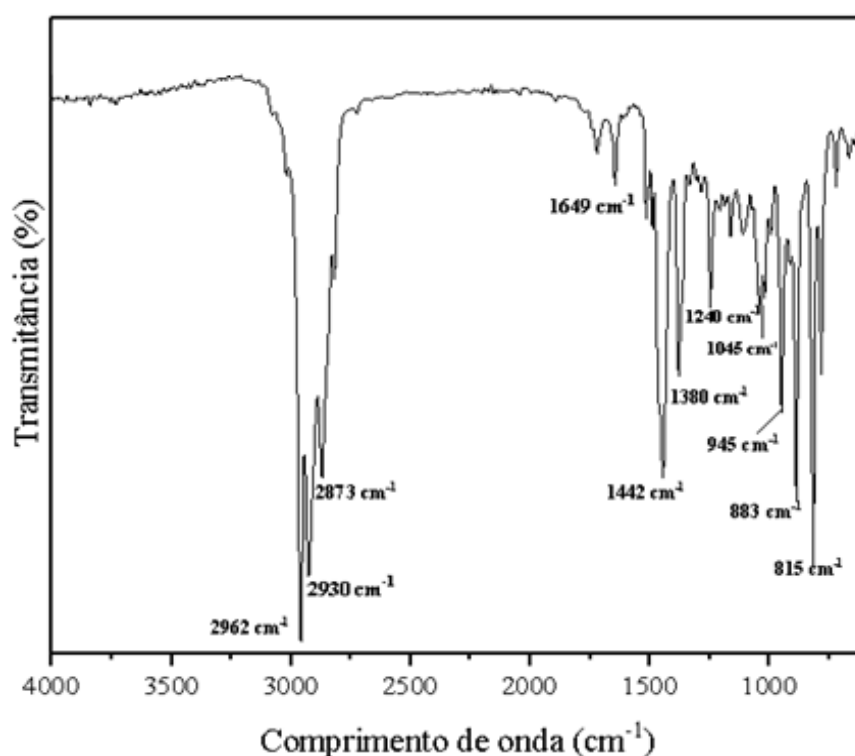
|                            |      |                                    |                                   |             |
|----------------------------|------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------|
| 1373                       | 1374 | $\alpha$ -copaeno                  | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | 0,3         |
| 1416                       | 1417 | ( <i>E</i> )- $\beta$ -cariofileno | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | 3,9         |
| 1435                       | 1439 | aromadendreno                      | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | 1,0         |
| 1449                       | 1452 | $\alpha$ -humuleno                 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | 0,3         |
| 1472                       | 1476 | $\beta$ -chamigreno                | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | 1,0         |
| 1482                       | 1489 | $\beta$ -selineno                  | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | 5,6         |
| 1491                       | 1498 | $\alpha$ -selineno                 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | 6,3         |
| 1497                       | 1500 | $\alpha$ -muuroleno                | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | 0,3         |
| 1521                       | 1522 | $\delta$ -cadineno                 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | 0,8         |
| 1637                       | 1638 | <i>epi</i> - $\alpha$ -cadinol     | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | 0,7         |
| 1650                       | 1658 | selin-11-en-4-ol                   | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O | 3,2         |
| <b>Total Identificados</b> |      |                                    |                                   | <b>94,4</b> |

Alguns dos constituintes químicos presentes no cromatograma são reportados em literatura apresentando atividade biológica. (DA SILVA *et al.*, 2014) utilizaram espécies de Piper, incluindo a *P. hispidum*, obtidas na Amazônia, para avaliar atividades citotóxicas, antifúngicas, antioxidantes e anticolinesterásicas. Todos os óleos extraídos das diferentes espécies apresentaram atividades biológicas, e dentre os constituintes caracterizados estavam  $\delta$ -3-careno (9,1%),  $\alpha$ -copaeno (7,3%),  $\beta$ -cariofileno (10,5%),  $\alpha$ -humuleno (9,5%) e  $\beta$ -sileneno (5,1%). (EL-AKHAL *et al.*, 2014) observaram que os constituintes majoritários da espécie *Origanum majorana* (Lamiaceae) foram 4-terpineno (28,9%),  $\gamma$ -terpineno (18,6%) e  $\alpha$ -terpineno (12,7%). Foram realizados ensaios larvicidas para avaliar o potencial do óleo essencial frente a espécie *Culex pipiens* e foram obtidas concentrações letais CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, respectivamente, de 258,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 580,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . (SÁNCHEZ PÉREZ *et al.*, 2014) avaliaram o potencial do óleo essencial da *P. hispidum* no controle de bactérias patogênicas de plantas apresentando atividade antibacteriana contra *X. campestris* e *X. albilineans*. A composição do óleo essencial indicou 101 componentes, dentre eles o  $\beta$ -pineno (8,2%),  $\alpha$ -pineno (4,8%),  $\gamma$ -terpineno (0,16%) e  $\alpha$ -humuleno (0,15%). (ZHU; TIAN, 2011) avaliaram a eficácia do óleo essencial extraído da *Blumea martiniana* contra *Anopheles anthropophagus* e observaram atividades larvicidas

com  $CL_{50}$  próximo a  $46,9-29,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Dentre os constituintes caracterizados estavam o linalol (10,4%), germacreno (9,1%), borneol (6,2%) e  $\gamma$ -terpineno (5,4%).

### 5.1.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Foram obtidos espectros de FTIR do óleo essencial extraído das folhas da espécie *P. hispidum* com objetivo de conhecer o perfil das suas funções orgânicas através das bandas expostas na **Figura 20**.



**Figura 20:** Espectro de FTIR (4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ ) do óleo essencial extraído das folhas da *P. hispidum*.

No espectro do óleo essencial *in natura* foram observadas bandas em diversos comprimentos de onda, as quais estão relacionadas aos modos vibracionais das ligações moleculares dos constituintes químicos do óleo essencial. As bandas encontradas entre 1500 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  são de complexas descrições. Pelo fato de o óleo essencial apresentar uma mistura de componentes, algumas bandas podem estar sobrepostas, o que dificulta a sua interpretação. Por outro lado, a riqueza de grupos funcionais presentes nas pequenas moléculas dos constituintes dos óleos essenciais traz dificuldades de interpretação. No entanto, foi possível encontrar bandas gerais, que descrevem os

principais grupos funcionais presentes. As bandas intensas presentes em  $2962\text{ cm}^{-1}$ ,  $2930\text{ cm}^{-1}$  e  $2873\text{ cm}^{-1}$  são referentes à ligação  $\text{-CH}$  do grupo metileno. A banda em  $1649\text{ cm}^{-1}$  indica a vibração da ligação  $\text{C}=\text{C}$ . A ligação  $\text{C-OH}$  é detectada na vibração em  $1442\text{ cm}^{-1}$ . O grupo  $\text{-CH}_3$  é indicado pela banda vibracional em  $1380\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1240\text{ cm}^{-1}$  é referente a vibração das ligações  $\text{C-O-C}$ . Os grupos  $\text{C-O}$  e  $\text{C-H}$  são observado nas bandas vibracionais em  $1045\text{ cm}^{-1}$  e  $945\text{ cm}^{-1}$  (ALEMDAR; SAIN, 2008; KAUSHIK; SINGH, 2011; REN *et al.*, 2006).

## 5.2 Holocelulose

### 5.2.1 Caracterização Química

Foram realizados procedimentos baseados nas normas utilizadas para a caracterização química de materiais lignocelulósicos e determinação dos teores percentuais dos componentes presentes na parede celular. Tais normas são utilizadas, em geral, para caracterizar madeiras e madeiras macias e, ao compararmos os teores médios encontrados neste trabalho com aqueles reportados na literatura, foi observada certa discrepância, como mostra a **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Caracterização química das folhas da *P. hispidum*

| Componente | Teores médios (%) | Desvio Padrão | (IBACH, 2012) |
|------------|-------------------|---------------|---------------|
| %TU        | 10,0              | $\pm 1,0$     | ---           |
| %TCZ       | 7,3               | $\pm 0,1$     | 0,5           |
| %TSAF      | 20,0              | $\pm 5,0$     | ---           |
| %TE        | 30,0              | $\pm 4,0$     | 5,2           |
| %TL        | 6,0               | $\pm 1,0$     | 28,8          |
| %TC        | 4,2               | $\pm 0,6$     | 44,6          |
| %THEM      | 18,0              | $\pm 3,0$     | 30,7          |
| %THL       | 22,0              | $\pm 3,0$     | 61,5          |

Teores médios: %TU = percentual de teor de umidade; %TCZ = percentual de teor de cinzas; %TSAF = percentual de teor de solúveis em água fria; %TE = percentual de teor de extrativos; %TL = percentual de teor de lignina; %TC = percentual de teor de celulose; %THEM = percentual de teor de hemicelulose; %THL = percentual de teor de lignina.

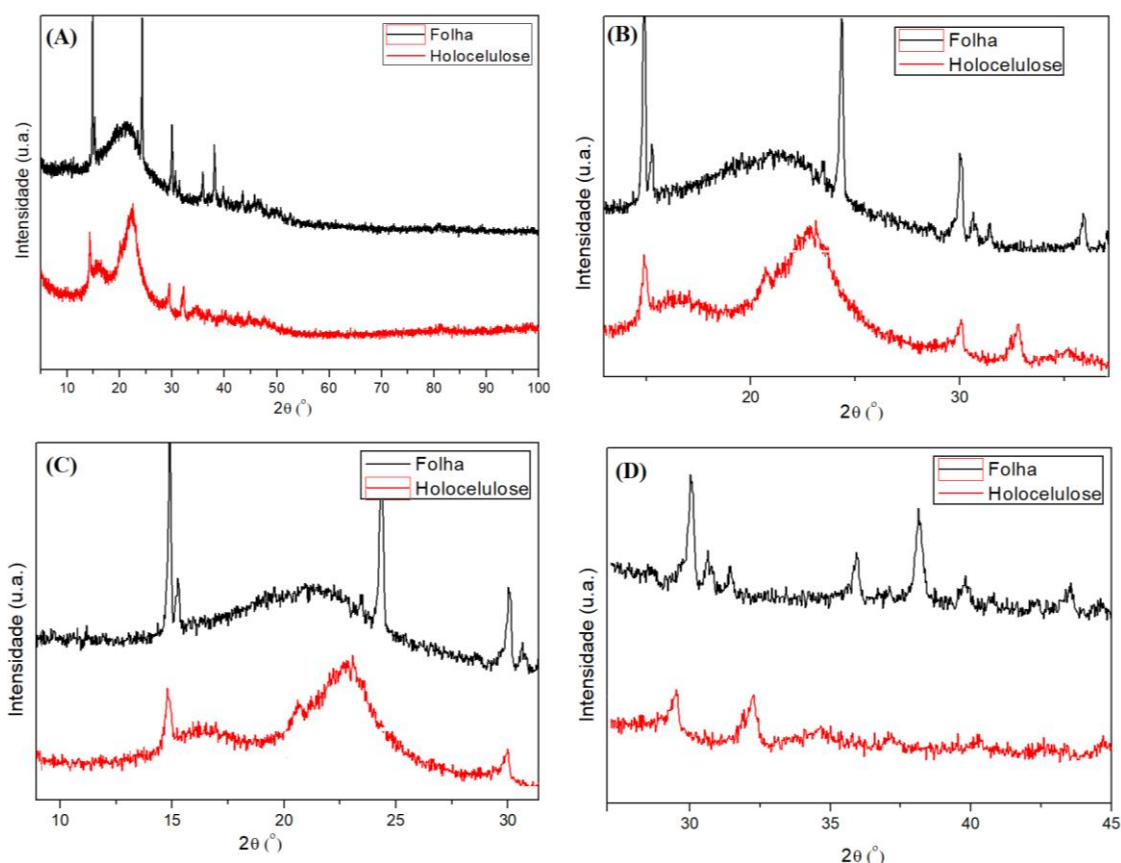
Deve-se ressaltar a possibilidade dos valores de %TSAF serem afetados pela lavagem prévia das folhas para posteriores análises. As folhas foram lavadas em água corrente para a retirada de possíveis microrganismos. Porém, a mesma foi rápida e superficial enquanto a determinação de %TSAF durou 48 h. O conhecimento deste teor se faz necessário devido a lignina ser um polímero complexo que possui grande impacto na extração de celulose, ditando a facilidade da extração da mesma. Quanto menor o teor de lignina na parede celular do material vegetal, mais fácil é a remoção da hemicelulose e celulose presentes. Embora a diferença entre os valores encontrados e o reportado em literatura seja significativa, é facilmente justificada, pois a amostra utilizada tem como origem folhas, enquanto os valores reportados na literatura se referem à madeira de troncos de árvores. Logo é esperado maiores teores dos componentes em sua parede celular. É possível também que os teores médios de uma mesma espécie se alterem quando considerada a composição do solo, sazonalidade e clima (REHINAN; RASHID; SHAH, 2004). Esse resultado extrapola os 100% quando somados, e pode ter sido influenciado pela presença de constituintes ainda não identificados e não totalmente retirados ao longo do processo de extração, interferindo nos resultados obtidos. A presença dessa fase considerada como impureza foi verificada pela técnica de DRX e eliminada conforme será discutido mais adiante.

### 5.2.2 *Extração de Holocelulose*

A holocelulose foi extraída a partir da biomassa residual. Após a extração do óleo essencial, a massa do resíduo gerado foi de  $(73,0 \pm 2,6)$  g. A partir dessa quantidade de biomassa foi realizada a primeira etapa para a extração de holocelulose e retirada de lignina em meio básico. A massa de material obtida após a eliminação de lignina foi de  $(34,7 \pm 1,2)$  g. Em seguida, foi realizada a segunda etapa, que consistiu na retirada de lignina residual para o branqueamento da holocelulose, resultando em  $(11,5 \pm 0,9)$  g. O rendimento total encontrado após estes procedimentos foi de 14,4%. O rendimento obtido pode ser considerado alto devido à quantidade de material originalmente presente da biomassa.

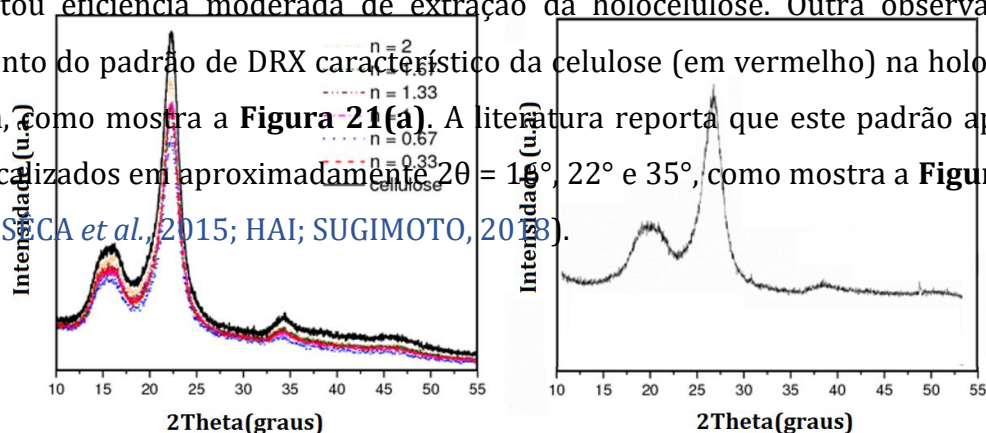
### 5.2.3 Difração de Raios X (DRX)

A técnica de DRX foi utilizada, principalmente, para verificar a presença da celulose contida na holocelulose extraída da biomassa de rejeito, além da verificação do halo não cristalino presente no padrão de DRX da holocelulose, referente à hemicelulose. A **Figura 21 (a)** mostra os padrões de DRX das folhas *in natura* da *P. hispidum* (em preto) e da holocelulose extraída (em vermelho). Observa-se que o padrão de DRX das folhas *in natura* é constituído por um pico alargado entre  $2\theta = 13 - 30^\circ$ , com picos estreitos distribuídos ao longo de todo padrão, até aproximadamente  $2\theta = 50^\circ$ . Esse fato sugere que existe uma fase de elevada cristalinidade nas folhas. A determinação qualitativa da fase cristalina que compõe este padrão de DRX é complexa, uma vez que os materiais *in natura* possuem diversos constituintes cristalinos naturais incorporados em suas estruturas, como por exemplo os macro e micronutrientes (VYAVAHARE *et al.*, 2019). No entanto, observa-se que estes picos estreitos presentes no padrão de DRX das folhas *in natura* aparecem em menor quantidade e em menores intensidades no padrão de DRX da holocelulose (**Figura 21(b-d)**), mostrando que o método de extração proposto foi, em parte, efetivo.



**Figura 21:** Difrátogramas de Raios X das folhas da *P. hispidum* (preto) e da holocelulose extraída (vermelho).

A **Figura 21(b-d)** evidencia a diminuição das intensidades dos picos localizados em  $2\theta = 14,8^\circ$  e  $30,0^\circ$ . Por outro lado, os picos localizados em  $2\theta = 24,4^\circ$ ,  $36,0^\circ$  e  $38,0^\circ$  desapareceram no padrão de DRX da holocelulose. A diminuição de intensidade e o desaparecimento de picos de difração do padrão de DRX estão relacionados com a eficiência do método de extração da holocelulose. Observa-se que o método proposto apresentou eficiência moderada de extração da holocelulose. Outra observação é o surgimento do padrão de DRX característico da celulose (em vermelho) na holocelulose extraída, como mostra a **Figura 21(a)**. A literatura reporta que este padrão apresenta picos localizados em aproximadamente  $2\theta = 14^\circ$ ,  $22^\circ$  e  $35^\circ$ , como mostra a **Figura 22(a-b)** (FONSÊCA *et al.*, 2015; HAI; SUGIMOTO, 2018).

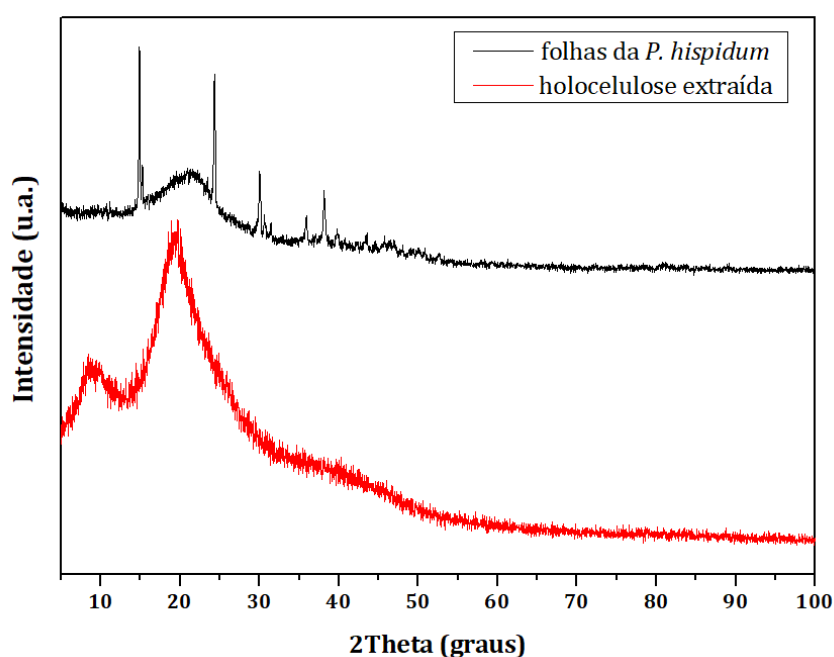


**Figura 22:** Padrões de DRX da celulose (a) em pó adquirida comercialmente e (b) extraída das cascas da *X. sorbifolia* através de tratamentos químicos. **Fonte:** (Fonsêca *et al.*, 2015; Hai & Sugimoto, 2018).

A **Figura 22(a)** mostra os padrões de DRX da celulose em pó adquirida comercialmente da empresa Wako Pure Chemical Industry Ltda., com modificação superficial através da introdução de 3-hexiltiofeno em diferentes concentrações (FONSÊCA *et al.*, 2015), e a **Figura 22(b)** mostra o padrão de DRX da celulose extraída das cascas da *X. sorbifolia* através de tratamentos químicos convencionais (HAI; SUGIMOTO, 2018).

Sabe-se que a hemicelulose e a lignina possuem estrutura não cristalina e, então, sua contribuição no padrão de DRX pode ser observada através do *background* abaixo dos picos de difração. Por outro lado, a celulose possui estrutura semicristalina, com picos bem definidos e localizados em  $2\theta = 16^\circ$ ,  $22^\circ$  e  $35^\circ$ , como mostra a **Figura 22(a-b)**. Dessa forma, ao compararmos os difratogramas da folha *in natura* e da holocelulose extraída, é possível observar o surgimento do perfil de DRX característico da celulose. Porém, o padrão de DRX da holocelulose ainda mostra a presença de fase(s) cristalina(s) naturais referentes aos constituintes residuais como, por exemplo, macro e micronutrientes. O perfil da celulose no padrão de DRX, embora mascarado, apresenta os dois picos característicos, dos três comumente reportados na literatura ([FRENCH, 2014](#); [MELIKOĞLU; BILEK; CESUR, 2019](#)). O terceiro pico, que deveria aparecer em torno de  $2\theta = 35^\circ$ , ainda está mascarado pelas impurezas residuais que permanecem no material.

Dessa forma, a próxima etapa desta análise consistiu em uma nova adaptação desta mesma metodologia afim de modificar alguns parâmetros, tais como a concentração de clorito de sódio, temperatura e tempo de procedimento, utilizados na etapa final, para verificar o impacto na redução das impurezas residuais apresentadas nos difratogramas anteriores. Ao mudarmos os parâmetros da etapa final de 1g para 2g de clorito de sódio para cada 1g de amostra e a retirada a etapa de aquecimento, porém com o prolongamento do tempo que antes era totalizado em 3h foi aumentado para 48h no total. O resultado obtido desta adaptação pode ser avaliado na **Figura 23**.

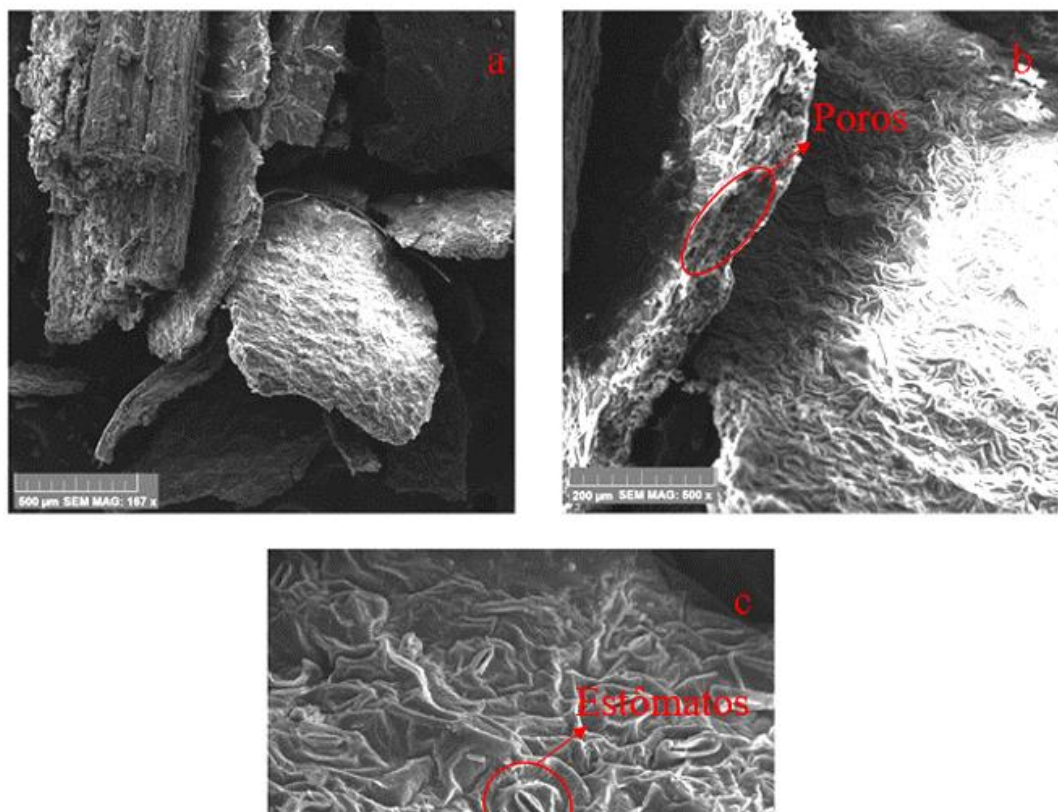


**Figura 23:** Padrões de DRX das folhas da *P. hispidum* e da holocelulose tratada por 48 h.

O padrão de DRX da holocelulose mostrado na **Figura 23** é o resultado da adaptação da etapa final na metodologia de extração. Ao avaliarmos este difratograma e compararmos ao difratograma das folhas *in natura*, podemos concluir o sucesso da adaptação uma vez que os picos intensos e estreitos relativos à presença de impureza não são mais visualizados. É possível observar os picos característicos da celulose em  $2\theta = 5-15^\circ$ ,  $16-30^\circ$  e  $35-45^\circ$ . Devido ao desaparecimento dos picos referentes às impurezas apresentadas nos difratogramas anteriores foi possível dar continuidade a pesquisa e utilizar a holocelulose extraída como material para desenvolvimento das pastilhas com propriedades biodefensivas.

#### 5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

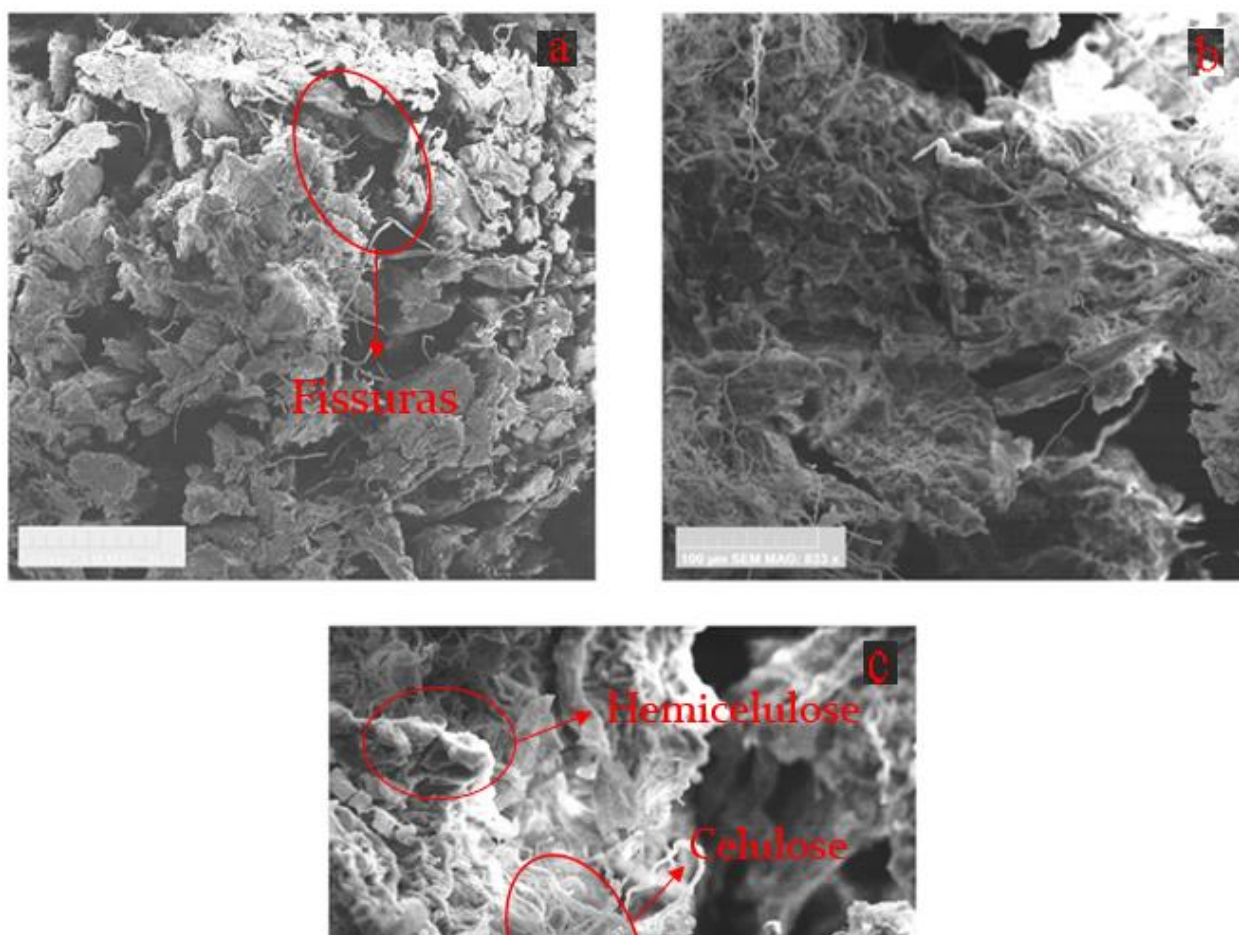
A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica versátil que possibilita a observação das morfologias que constituem os materiais. Aqui, especificamente, foi possível avaliar o impacto da metodologia de extração da holocelulose através da análise morfológica das folhas secas e do material resultante do processo de extração, conforme mostram as **Figuras 24 e 25**.



**Figura 24:** Imagens de MEV das folhas pré-tratadas da *P. hispidum* em diferentes resoluções.

A **Figura 24** (500  $\mu\text{m}$ ; 167X) mostra a morfologia da folha seca, revelando uma superfície rugosa, além de poros na superfície lateral (**Figura 24(b)**) (BHARDWAJ *et al.*, 2018; GANCEDO *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2018). A **Figura 24(c)** (50  $\mu\text{m}$ ; 1,67kX) apresenta a vista frontal dos estômatos presentes na folha, dispostos ao longo de uma superfície não plana resultante do procedimento de secagem (GANCEDO *et al.*, 2018).

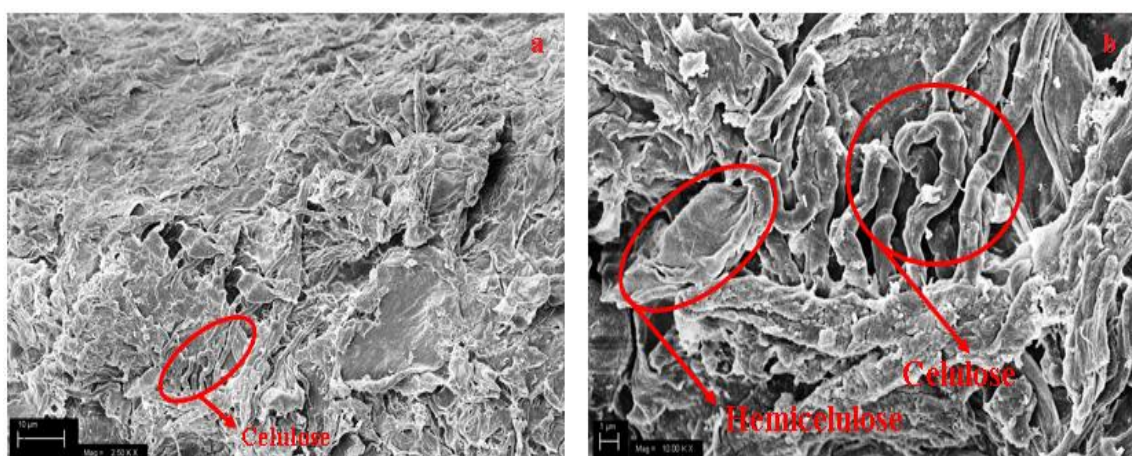
A partir das imagens do material resultante do processo de extração, foi possível verificar mudanças significativas em sua morfologia, quando comparada com as folhas secas (**Figura 25**).



**Figura 25:** Morfologia da holocelulose obtida após extração em diferentes resoluções.

A **Figura 25(a)** (500  $\mu\text{m}$ ; 167x) mostra uma superfície irregular com diversas fissuras, indicando a eliminação de impurezas que constituem o material (eliminação parcial, conforme mostrou os dados de DRX), expondo as cadeias de celulose e hemicelulose (PHINICHKA; KAENTHONG, 2018; WANG *et al.*, 2018). Esta exposição está relacionada com a formação de fibras, conforme observado na **Figura 25(c)**. Tais fibras podem ser formadas pelo entrelaçamento entre os constituintes celulose e hemicelulose (PENG *et al.*, 2012). Não foi possível observar com clareza a presença de macro ou micronutrientes nas imagens observadas, mesmo sendo detectados pela técnica de DRX.

Após a otimização do método de extração da holocelulose foram realizadas novas caracterizações morfológicas, como mostra a **Figura 26**.

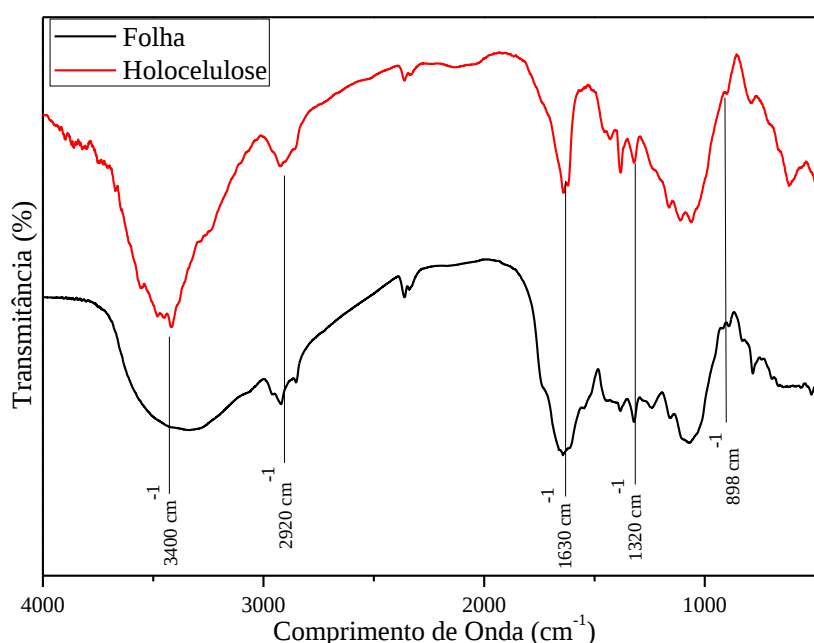


**Figura 26:** Morfologia da holocelulose obtida após extração com método otimizado.

A **Figura 26(a)** (10  $\mu\text{m}$ ; 2.50 kX) mostra uma superfície sem padrão organizacional definido, característica de materiais amorfos. No entanto, ainda é possível observar a presença de fibras de celulose. Ao aumentarmos a resolução, notou-se que o mesmo padrão se repetiu na **Figura 26b** (1  $\mu\text{m}$ ; 10 kX). No entanto, as fibras de celulose ficaram mais nitidamente observadas, estando entrelaçadas e camadas de hemicelulose. Dessa forma, a técnica de MEV permitiu sugerir a presença das duas fases (celulose e hemicelulose) no material recuperado da biomassa de rejeito do processo de extração do óleo essencial. Esse resultado corroborou com as informações obtidas anteriormente pela técnica de DRX.

### 5.2.5 A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Foram obtidos espectros de FTIR tanto para a folha seca quanto para a holocelulose extraída, conforme ilustra a **Figura 27**.



**Figura 27:** Espectro de FTIR (4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ ) da folha de *P. hispidum* e holocelulose extraída.

Ambos os espectros apresentaram uma banda alongada em  $3400\text{ cm}^{-1}$ , indicando a presença de grupos hidroxilas referentes às ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares e à presença de umidade na amostra (ALEMDAR; SAIN, 2008; REN *et al.*, 2006; SHAHABI-GHAHFARROKHI *et al.*, 2015). Porém, como a holocelulose extraída foi submetida ao processo de liofilização, observou-se em seu espectro uma banda mais definida, corroborando com a retirada parcial da umidade, além da verificação de bandas pouco intensas, as quais são atribuídas aos estiramentos dos grupos -OH da celulose (SHELTAMI *et al.*, 2012; YADAV; SAINI; MAJI, 2017).

A eliminação parcial da lignina pelo processo de extração foi observada a partir da diminuição das intensidades do ombro localizado em  $1730\text{ cm}^{-1}$ , referente à ligação dos grupos carboxílicos *trans*-coniferílicos e *trans*-*p*-cumarílico (ALEMDAR; SAIN, 2008; REN *et al.*, 2006). A banda em  $1636\text{ cm}^{-1}$  indica, geralmente, a presença de grupos hidroxilas, que constituem a estrutura molecular da celulose (KAUSHIK; SINGH, 2011; XIAO; SUN; SUN, 2001). Observou-se a banda referente à ligação glicosídica em  $898\text{ cm}^{-1}$ , a qual tornou-se mais definida após o processo de extração, indicando a exposição da celulose e hemicelulose ao longo da extração (ALEMDAR; SAIN, 2008; REN *et al.*, 2006; XIAO; SUN; SUN, 2001). O mesmo aconteceu para as bandas em  $1162\text{ cm}^{-1}$  e  $1116\text{ cm}^{-1}$  indicando, respectivamente, o estiramento assimétrico do grupo C1-O-C5 e C-O presentes nas cadeias laterais das arabinoxilanas e cadeias de celulose (REN *et al.*, 2006). As bandas em  $1420\text{ cm}^{-1}$  e  $1380\text{ cm}^{-1}$  apontaram os estiramentos de CH<sub>2</sub> e O-H presentes na estrutura molecular da celulose (ALEMDAR; SAIN, 2008; XIAO; SUN; SUN, 2001). Em  $1320\text{ cm}^{-1}$  a celulose foi observada a partir do estiramento CH<sub>2</sub> no C-6 das unidades de glicose (REN *et al.*, 2006). A presença da celulose e lignina também foi apontada em  $2920\text{ cm}^{-1}$ , indicando os estiramentos C-H presentes em suas estruturas. As bandas entre  $1540$  e  $1420\text{ cm}^{-1}$  são referentes às vibrações aromáticas presentes na lignina da folha seca, as quais tiveram suas intensidades reduzidas após o processo de extração (ALEMDAR; SAIN, 2008; KAUSHIK; SINGH, 2011; REN *et al.*, 2006).

## CAPÍTULO 2 – Microencapsulação do Óleo Essencial

### 6 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 6.1 Microencapsulação

A encapsulação é um procedimento que está correlacionado a duas fases, uma interna (*core*) e uma externa (*shell*). A fase interna está relacionada ao material que deverá ser encapsulado, geralmente um ativo (MARISA RIBEIRO; ESTEVINHO; ROCHA, 2019). A fase externa é referente ao material que irá encapsular a fase interna, conhecida como material de transporte, agente encapsulante, material de parede ou agente carreador. Uma vez formado o sistema encapsulado, temos como resultados micro ou nanocápsulas. Partículas formadas que tenham tamanho médio entre 10 a 1000 nm são denominadas como nanocápsulas, enquanto partículas com tamanho médio entre 1 a 1000  $\mu\text{m}$  são denominadas microcápsulas (NASRI *et al.*, 2020; RAZA *et al.*, 2020).

As micropartículas são divididas em dois tipos devido às suas características internas e morfológicas: *microcápsulas* e *microesferas*. As microesferas podem ter as substâncias ativas encapsuladas e adsorvidas tanto no interior da partícula quanto na

parede da mesma. As microcápsulas podem ser mononucleares, quando constituídas por uma partícula simples, ou polinucleares, quando existe um grupo de partículas no interior das partículas revestidas. Para formação de micropartículas são usados materiais conhecidos como agentes encapsulantes, tais como: naturais (isolado protéico, gelatina, cera, sacarose e quitosana), semissintéticos (derivados de celulose e glicerol, gliceril mono ou dipalmitato) e sintéticos (polímeros de ácido acrílico e copolímeros) (YE; GEORGES; SELOMULYA, 2018). Algumas características importantes no momento de decidir quais materiais utilizar como agente encapsulante são baixa viscosidade a temperaturas elevadas, fácil manuseio, baixa higroscopicidade, boas características organolépticas, baixo custo e fácil acesso (RAZA *et al.*, 2020). Quanto aos agentes encapsulados, são utilizados comumente para microencapsulação vitaminas, corantes, fármacos, extratos e óleos essenciais que possuam alguma atividade biológica de interesse (RAZA *et al.*, 2020).

O principal motivo de realizar o processo de microencapsulação é a proteção do ativo encapsulado, prolongando sua vida útil e armazenamento. Quanto ao encapsulado, o agente ativo é protegido de tal forma que evita a volatilização e oxidação, efeitos que sofreriam quando expostos em outras condições. Outra vantagem importante da microencapsulação é o controle da liberação do ativo ao longo do tempo, permitindo diversas aplicações (NASRI *et al.*, 2020; OZKAN *et al.*, 2019; RAZA *et al.*, 2020).

Os métodos para realizar a microencapsulação são diversos. Além disso, a escolha dos agentes encapsulantes e ativo afetam diretamente a estabilidade, funcionalidade e estrutura das micropartículas. Os métodos mais utilizados na literatura são divididos conforma e a **Tabela 3**:

**Tabela 3:** Métodos disponíveis na literatura para microencapsulação (JYOTHI *et al.*, 2010; LUCAS *et al.*, 2020; MAULIDNA *et al.*, 2020; OZKAN *et al.*, 2019; TARONE; CAZARIN; MAROSTICA JUNIOR, 2020).

| Métodos de Microencapsulação                                                                              |                                                                     |                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Métodos Físicos                                                                                           | Métodos Físico-Químicos                                             | Métodos Químicos                   |
| <i>Spray drying</i> , <i>Pan coating</i> , Leito fluidizado e Extrusão centrífuga com múltiplos orifícios | Separação de fases, Emulsificação seguida da evaporação do solvente | Inclusão molecular e polimerização |

## 6.2 Soro Proteico

A indústria de laticínios geralmente tem como subproduto o soro do leite, sendo a parte aquosa da coagulação que ocorre durante a produção de queijo e caseína. É um líquido opaco de coloração amarelada (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010). O soro do leite possui um alto grau de substâncias orgânicas presentes em sua composição, sendo caracterizado como um poluente de água devido à demanda biológica de oxigênio (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). Com o objetivo de evitar o descarte deste material há um amplo desenvolvimento em aplicações na indústria alimentícia.

O soro do leite contém cerca de 20% das proteínas totais do leite bovino. As duas principais frações proteicas do soro do leite são a  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina, contidas em maior concentração e constituem, aproximadamente, 70% das proteínas totais do soro (ATRA *et al.*, 2005). Em menores quantidades são encontradas também imunoglobulina, glicomacropeptídeo, lactoferrina, lisozima e lactoperoxidase (METSÄMUURONEN; NYSTRÖM, 2009). Existem alguns produtos derivados do leite disponíveis comercialmente, como o concentrado proteico de soro de leite (*Whey Protein Concentrate* - WPC) obtido pela remoção dos constituintes não proteicos do soro do leite formando um produto seco, contendo de 35% até 80% do teor proteico; e o isolado proteico de soro de leite (*Whey Protein Isolate* - WPI) que é a forma mais pura das proteínas de soro do leite e contém entre 80 e 95% de proteínas. O WPC e WPI possuem ótimas aplicações industriais devido à alta solubilidade, ampla faixa de pH, higroscopicidade e características geleificantes (BAUMAN *et al.*, 2006; WANDREY, C.; BARTKOWIAK, 2010).

Devido às suas propriedades promissoras, o soro de leite é usado como objeto de estudo em indústrias, pois são altamente emulsificantes e podem ser aplicados em microencapsulação (BAUMAN *et al.*, 2006). (ZHANG *et al.*, 2020) produziram microcápsulas a partir de WPI e clorofila através do método de pulverização. Foram utilizadas diferentes proporções de WPI com o intuito de otimizar a solubilidade em água. (SHI; LEE, 2020) realizaram a microencapsulação da tributirina revestida com WPI utilizando o método de *spray drying*, modificando as propriedades do material seco.

## 7 METODOLOGIA

### 7.1 Microencapsulação contendo Isolado Proteico de Soro de Leite – WPI

Foram pesados 20 g de material de parede (WPI) e hidratado em 75 g de água destilada por 12 h. Uma vez hidratado o WPI, foram pesadas 5 g de óleo essencial da espécie *P. hispidum*, e em seguida misturado ao WPI. A mistura resultante foi submetida à homogeneização em um agitador mecânico ultra Turrax Gehaka (modelo ULTRA DU-15) por 10 min a 18.000 rpm. Após a formação da emulsão, a mesma foi armazenada em tubos plásticos (50 mL) e congelados. Uma vez congelada a emulsão, o material passou pelo processo de secagem no por liofilização em um Liofilizador Terroni (modelo Enterprise I) por 36 h.

### 7.2 Estabilidade das Emulsões

A estabilidade da emulsão formada pela mistura de WPI e óleo essencial da *P. hispidum* foi avaliada para observar em quanto tempo ocorreu desestabilidade indicada por separação de fases. O teste foi realizado em triplicata, e as emulsões foram inseridas em provetas de 5 mL e armazenadas em capela com baixa luminosidade por 24 h para observação.

### 7.3 Teor de Óleo Superficial e Eficiência de Encapsulação

A estimativa da Eficiência de encapsulação (EE) do óleo essencial pelo agente carreador WPI foi adaptada a partir do método descrito por (BAE; LEE, 2008). Em um tubo falcon de 15 mL foi inserida 1 g de material microencapsulado e 10 mL de hexano. Foram realizadas três lavagens utilizando 10 mL de hexano com a massa de material microencapsulado constante. Para cada 10 mL de hexano foi aplicado um processo mecânico no vórtex por 2 min. Após o processo mecânico, a solução foi retirada e inserida na placa de Petri. Uma vez finalizada a terceira lavagem e inserção na placa, o solvente foi evaporado em capela e então a placa de Petri foi teve sua massa aferida para a determinação do teor de óleo superficial. A determinação da EE foi realizada pela

diferença de massa entre a quantidade total de óleo utilizado na síntese e o teor de óleo superficial de acordo com a **Equação 10** (NASRI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020).

$$EE\% = \frac{OT - OL}{OT} \times 100 \quad \text{Eq. 10}$$

onde EE é a eficiência de encapsulação em porcentagem; OL a quantidade de óleo livre nos sistemas e OT é a quantidade de óleo total.

## 7.4 Higroscopicidade

A higroscopicidade das micropartículas foi determinada de acordo com a adaptação do método proposto por (CAI; CORKE, 2000). Cerca de 1 g em pó das micropartículas foram colocadas num recipiente contendo uma solução saturada de NaCl (75,29% de humidade relativa), a 25 °C durante 80 h. Em seguida, as amostras tiveram suas massas aferidas, e a higroscopicidade foi determinada como a massa, em gramas, da humidade adsorvida.

## 7.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR, na faixa de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, foram obtidos no laboratório HUB Tecnologia e Informação (UEA) utilizando o espectrofotômetro Shimadzu-IR Prestige-21, em 25°C.

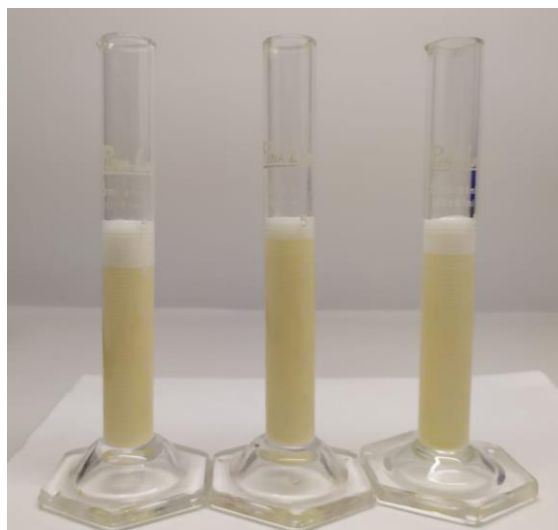
## 7.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Micrografias das folhas *in natura* da *P. hispidum* e da holocelulose extraída e liofilizada foram obtidas por MEV no Laboratório Temático de Microscopia Óptica e Eletrônica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As amostras foram inseridas em fitas de carbono e recobertas por uma fina camada de ouro. As imagens foram obtidas a 25°C.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Micropartículas Encapsulantes

As emulsões produzidas para a obtenção das micropartículas tiveram suas estabilidades testadas em até 24 h, uma vez que esta estabilidade é necessária até o congelamento das mesmas para posterior liofilização. A Figura 28 mostra o teste da estabilidade da emulsão formada após o processo mecânico.



**Figura 28:** Teste da estabilidade da emulsão formada após o processo mecânico. **Fonte:** O Autor.

As emulsões apresentaram boa estabilidade por um período de 24 h. Caso as emulsões desestabilizassem poderiam ser observados eventos como floculação e sedimentação, onde o ativo encapsulado seria liberado e as micropartículas perderiam sua eficácia após a liofilização. Porém, foi possível realizar a liofilização com o material estável, sendo obtidas as micropartículas mostradas na **Figura 29**.



**Figura 29:** Micropartículas obtidas após a liofilização das emulsões formadas a partir de WPI e *P. hispidum*.  
**Fonte:** O Autor.

As micropartículas obtidas apresentam coloração amarelada e eram inodoras. Foi obtido um rendimento de 15,5% das microcápsulas liofilizadas em relação à emulsão produzida anteriormente.

## 8.2 Eficiência de Encapsulação e Teor de Óleo Essencial

Após a produção da emulsão formada por WPI e óleo essencial da *P. hispidum* foi realizado o procedimento de secagem por liofilização. Para confirmar o sucesso na obtenção das micropartículas e encapsulação do ativo foi estimada a eficiência de encapsulação e o teor de óleo superficial, como mostra a **Tabela 4**.

**Tabela 4:** Eficiência de encapsulação e teor de óleo superficial das micropartículas de WPI contendo óleo essencial da espécie *P. hispidum*.

| Amostra                  | EE (%) $\pm$ DP | Teor de OS (g) $\pm$ DP |
|--------------------------|-----------------|-------------------------|
| <b>Micropartículas 1</b> | 98,4 $\pm$ 0,01 | 0,0783 $\pm$ 0,01       |
| <b>Micropartículas 2</b> | 98,2 $\pm$ 0,01 | 0,0896 $\pm$ 0,01       |
| <b>Micropartículas 3</b> | 99,7 $\pm$ 0,01 | 0,0124 $\pm$ 0,01       |

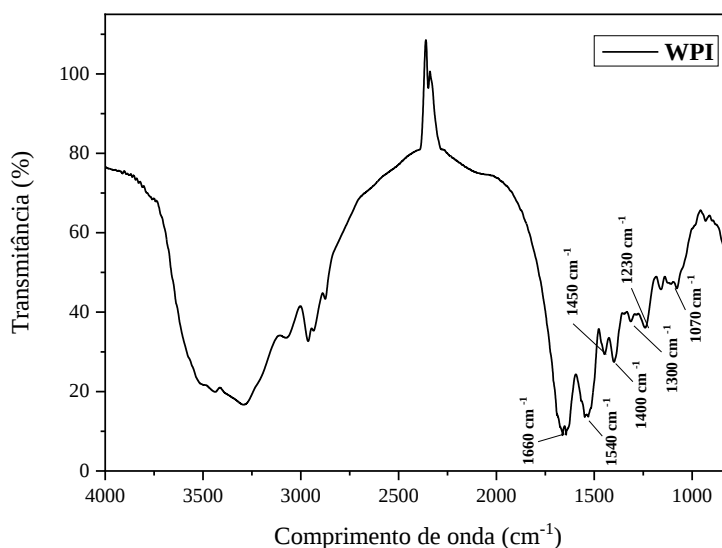
EE(%) = eficiência de encapsulação em porcentagem; OS = óleo superficial; DP = desvio padrão.

De acordo com a **Tabela 4**, podemos concluir que todos os sistemas desenvolvidos apresentaram valores elevados de EE. Este resultado está relacionado ao baixo teor de

óleo superficial, pois quanto maior os valores de EE, menor a quantidade de óleo não encapsulado. Os valores altos de EE apontaram a eficácia do WPI como agente encapsulante, além dos valores próximos a 98% indicarem a reprodutibilidade do método de produção das micropartículas. (ZHANG *et al.*, 2020) realizaram a microencapsulação de clorofila utilizando 15% de WPI como agente encapsulante e obtiveram EE entre 98,34% e 99,76 %. Embora tenham usado 5% a menos na concentração de WPI, os valores de EE foram bem próximos aos encontrados neste presente trabalho. (MEHYAR *et al.*, 2014) realizaram a microencapsulação do óleo essencial de cardamomo utilizando 15% e 30% de WPI como agente encapsulante e obtiveram EE = 98,5%. Os valores elevados de EE quando utilizado o WPI como material de parede podem estar relacionados à algumas regiões hidrofóbicas em sua estrutura. De acordo com os resultados deste trabalho e dos resultados dos trabalhos aqui citados, a EE elevada utilizando WPI como agente encapsulante pode estar relacionada às características hidrofóbicas do agente encapsulado. Devido estas características ocorre interação apolar entre o agente encapsulado e regiões hidrofóbicas da proteína que atua como agente encapsulante (MEHYAR *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2020).

### **8.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A **Figura 30** mostra as bandas referentes aos grupos funcionais do WPI.



**Figura 30:** Espectros de FTIR das micropartículas de WPI contendo os óleos essenciais da espécie *P. hispidum*.

A banda em  $1660\text{ cm}^{-1}$  indica o estiramento da vibração do grupo  $\text{-C=O}$  referente a amida I. A presença da amida II é indicada pela banda em  $1540\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da vibração  $\text{-N-H}$ , enquanto a amida III é indicada pela banda em  $1300\text{ cm}^{-1}$ . A banda em  $1450\text{ cm}^{-1}$  indica a presença da função  $\delta\text{-CH}_2$ . A banda em  $1400\text{ cm}^{-1}$  pode ser referente tanto à função  $\text{-OOC}$  quanto ao estiramento  $\text{-CH}_3$ . Em  $1230\text{ cm}^{-1}$  é indicada a presença do grupo  $\text{-C-C}$ , e em  $1074\text{ cm}^{-1}$  o grupo  $\text{-C-N}$  (TAN; ZHONG; LANGRISH, 2020; ZHANG *et al.*, 2019, 2020). As bandas acima de  $3000\text{ cm}^{-1}$  podem ser referentes à presença de água tanto na atmosfera quanto na amostra devido à sua facilidade em absorver água, como também pela presença de grupos amina característicos do WPI. A presença de grupos  $\text{-CH}$  foi verificada pela presença da banda na região entre  $2900\text{ cm}^{-1}$  e  $2970\text{ cm}^{-1}$  (GHALESHAHI; RAJABZADEH, 2020).

#### 8.4 Higroscopicidade

O modelo utilizado para o cálculo da higroscopicidade foi o de primeira ordem [ $q = q_e(1 - e^{-kt})$ ] e, levando em consideração os valores obtidos de  $R^2$  próximos de 1, o ajuste

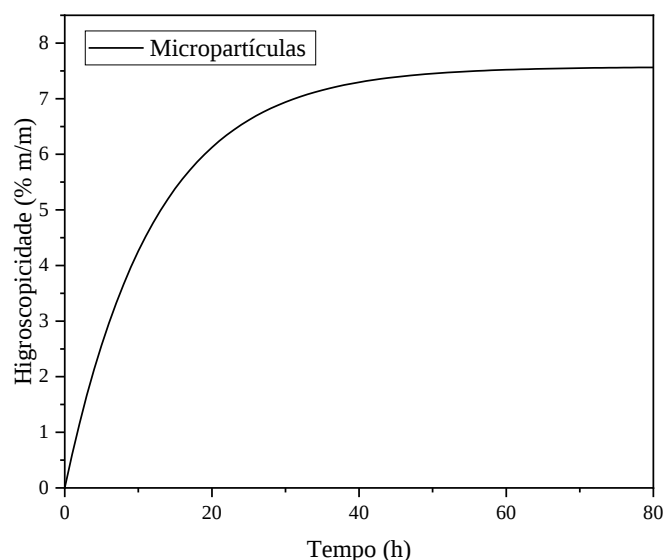
foi bem sucedido. Os valores de  $q_e$  estão relacionados às unidades absorvidas em micropartículas no equilíbrio (SILVA *et al.*, 2018b).

**Tabela 5:** Coeficientes para a adsorção de água das micropartículas de WPI a 25 °C em umidade relativa de 75%.

| Parâmetros   | Micropartículas 1 | Micropartículas 2 |
|--------------|-------------------|-------------------|
| $q_e \pm DP$ | $7,6 \pm 0,5$     | $1,034 \pm 0,004$ |
| $K \pm DP$   | $0,083 \pm 0,008$ | $17 \pm 2$        |
| $R^2 \pm DP$ | $0,98 \pm 0,02$   | $0,98 \pm 0,01$   |

$q$  = quantidade de água adsorvida no equilíbrio;  $k$  = constante do modelo.

A **Figura 31** mostra o gráfico da absorção de água das micropartículas ao longo do tempo, sendo possível observar que as micropartículas apresentaram rápida absorção de água nas primeiras 25 h e redução antes de 35 h. Porém, houve um equilíbrio após 40 h de experimento. É possível observar que a curva rápida adsorção de água na primeira hora, com redução da taxa até o equilíbrio (SILVA *et al.*, 2018b).



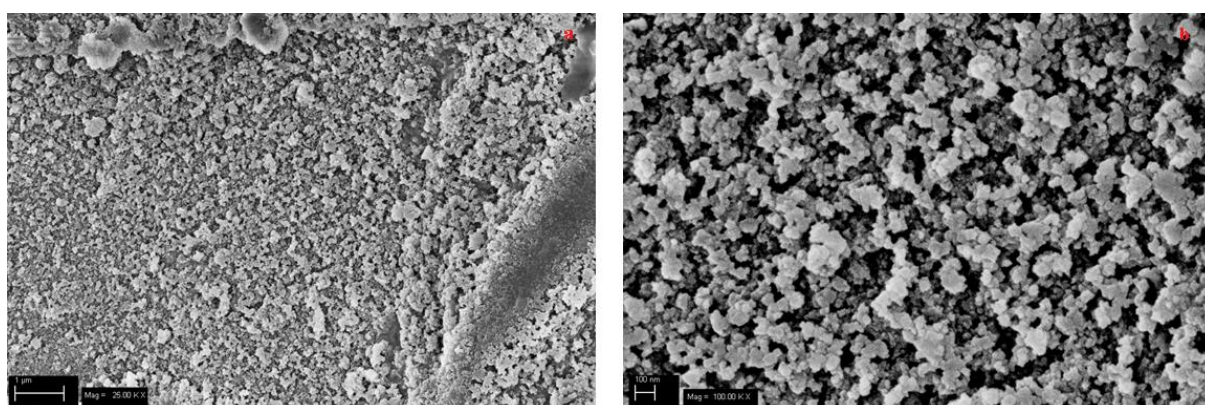
**Figura 31:** Perfil de higroscopicidade de micropartículas a 25 °C e umidade relativa de 75%.

Inicialmente, a absorção de umidade ocorreu devido ao preenchimento dos poros na superfície das micropartículas, enquanto a etapa de redução da velocidade por volta de 35 h foi devido à captação máxima de água nas micropartículas. (SILVA *et al.*, 2018b)

avaliaram a higroscopicidade, em atmosfera com umidade relativa em 75%, de diferentes biopolímeros usados como materiais de parede. Foram observados maiores valores de  $q_e$  para goma arábica em 21,95 e menores valores para dextrin, 11,67. (PEREYRA-CASTRO *et al.*, 2018) utilizaram isolado de proteína de soja para encapsular *Salvia hispanica* e avaliaram a higroscopicidade do material obtido por diferentes métodos. Foram observados valores de  $q_e$  máximo de 14,04 e mínimo de 11,29. As características das micropartículas obtidas neste trabalho possuem valores de  $q_e$  menores que os observados na literatura em condições semelhantes. Valores menores de  $q_e$  indicam boas características das micropartículas para armazenamento, tais como tamanho de partículas, baixa rugosidade e diferença de porosidade. Por outro lado, valores altos de  $q_e$  indicam um provável intumescimento das micropartículas e aglomeração, levando ao processo de oxidação lipídica e perda do ativo encapsulado (FERNANDES *et al.*, 2013; PEREYRA-CASTRO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018b). Valores baixos de  $q_e$ , como os obtidos neste trabalho, podem indicar uma prolongação de vida útil do material formado a partir das micropartículas obtidas, desde que bem armazenadas.

## 8.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para observar as morfologias das microcápsulas formadas. É possível avaliar a formação das micropartículas de WPI contendo óleo essencial na **Figura 32**.



**Figura 32:** Microcápsulas de WPI com óleo essencial da *P. hispidum* encapsulado.

A **Figura 32a** (1  $\mu\text{m}$ ; 25kX) mostra uma superfície contendo diversas partículas formadas, porém há uma variação em seus formatos e diâmetros. Esta variação pode ser avaliada de maneira mais precisa na **Figura 32b**. Nesta, as partículas se dispõem em diferentes maneiras, algumas possuem regularidade em diâmetro e estão isoladas, enquanto outras possuem diâmetros variados e formam pequenos aglomerados. Os aglomerados formados podem ser resultado da desfiguração da amostra visto que a mesma é formada de material orgânico pouco resistente a altas temperaturas.

## **CAPÍTULO 3 – Avaliação da Eficiência Larvicida das Pastilhas Contendo Óleo Essencial Encapsulado**

### **9 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **9.1 *Aedes aegypti***

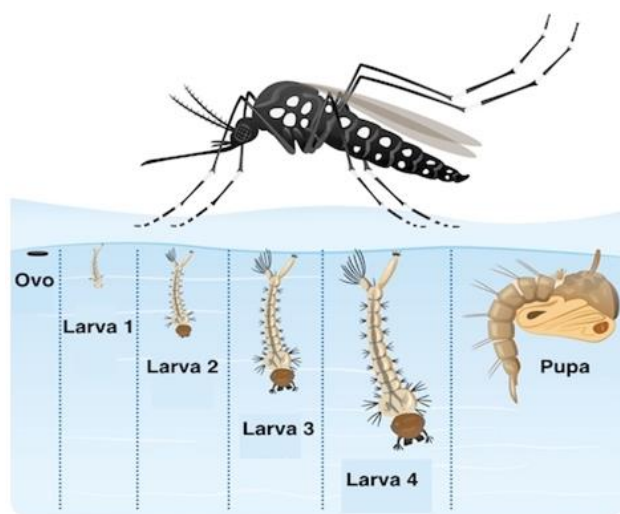
O aumento do desmatamento no Brasil nas últimas décadas intensificou a adaptação na área urbana de mosquitos vetores de doenças, incluindo a *Aedes aegypti*. A Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta o *A. aegypti* como o principal vetor na transmissão da zika, dengue, chikungunya e febre amarela. Esta espécie está em contato com mais da metade da população mundial devido à característica dita como “oportunista”, pois este vetor se adapta de acordo com as mudanças feitas pelo ser humano em ambientes naturais. Estas adaptações estão relacionadas ao acúmulo de água, tais como fossas sépticas, poças criadas a partir da chuva, materiais descartados, pratos sob vasos de plantas, canteiros de obra, calhas e outros. Além disso, o estágio larval pode ser estendido ou acelerado de acordo com a temperatura da água e o volume disponível onde o ovo foi depositado.

O *A. aegypti* é o principal vetor de transmissão da dengue. A transmissão do vírus para seres humanos ocorre através de picadas de mosquitos fêmeas infectados. Até o momento não há vacina para combater o vírus da dengue. No entanto, é possível controlar a reprodução do mosquito e diminuir a densidade populacional da espécie (GUBLER, 2011; KLOWDEN, 2007). Um dos meios comumente utilizados para o controle do mosquito é o uso de inseticida, e dentre os disponíveis está o organofosfato temefós utilizado em programas de saúde pública. Embora efetivo, seu uso contínuo acarreta na contribuição para o desenvolvimento de cepas resistentes (DIAS; MORAES, 2014; KONISHI, 2011; POLSON *et al.*, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2009). Uma alternativa para contornar este problema é a utilização de materiais tecnológicos a base de produtos naturais que sejam ecológicos, sustentáveis, econômicos e com baixa toxicidade em mamíferos. Dentre as abordagens disponíveis na literatura estão os métodos de origem botânica usados no controle de vetores, tais como a utilização de óleos essenciais (DIAS; MORAES, 2014).

### 9.1.1 Ciclo de Vida

O *A. aegypti* possui um ciclo de vida em quatro etapas: ovo, larva, pupa e adulto. Cada estágio possui características únicas adquiridas devido à sua facilidade em se adaptar para sobreviver em ambientes adversos. Os fatores que podem afetar os ciclos

são temperatura, disponibilidade de alimentos e quantidade de larvas disponíveis no local de reprodução.



**Figura 33:** Ciclo da vida do *A. aegypti* **Fonte:** <http://plagas-urbanas.com/>.

#### 9.1.1.1 Ovo

Os ovos do *A. aegypti* possuem forma alongada, medindo cerca de 0,4 mm. São depositados próximos à água, em geral na parede do ambiente escolhido para início do ciclo da espécie. Quando depositados, sua coloração é embranquecida e escurecem rapidamente até adquirirem uma cor escura mostra a **Figura 34** (SUMAN *et al.*, 2011).



**Figura 34:** Ovos do *A. aegypti* em meio aquoso. **Fonte:** <http://www.dnpm.gov.br/>

Os ovos depositados são resistentes à baixa umidade, possuindo capacidade de resistir em ambientes secos por até 450 dias e eclodem quando em contato com água. Devido à resistência dos ovos, a espécie pode ser dispersa facilmente, processo conhecido como dispersão passiva (SUMAN *et al.*, 2011).

#### 9.1.1.2 Larvas

A fase larval do *A. aegypti* é responsável pelo período de alimentação e crescimento da espécie. É uma fase que possui quatro etapas, e o período pode variar dependendo das condições onde se encontra, tais como temperatura, disponibilidade de alimento e quantidade de larvas no mesmo espaço. Em baixas temperaturas e com alimentos reduzidos, o quarto estágio pode ser prolongado por semanas antes de entrar no estágio de pupa.



**Figura 35:** Larva do *A. aegypti* em meio aquoso. **Fonte:** <http://www.dnpm.gov.br/>

Esta é a fase do ciclo na qual a espécie é mais vulnerável, fato evidenciado pela sua fotofobia: uma vez em contato com luz, a larva se locomove para o fundo do ambiente buscando refúgio.

#### 9.1.1.3 Pupa

A fase de pupa é o estágio de transição entre a fase larval e a fase adulta, podendo ser observada na **Figura 36**. A espécie nessa fase é bastante resistente, não se alimenta e se mantém na superfície da água utilizando tubos respiratórios para se manter viva e facilitar o escape no momento em que entrar na fase adulta.



**Figura 36:** Pupa do *A. aegypti* em meio aquoso. **Fonte:** <http://www.dnpm.gov.br/>

#### 9.1.1.4 Adulto

A fase adulta é responsável pela reprodução da espécie, dispersão e transmissão de doenças, embora a dispersão da espécie seja mais efetiva nas fases enquanto ovo e larva, tornando mais eficiente o combate nestas fases. O espécime adulto é bem característico devido à sua coloração escura com faixas brancas, como mostra a **Figura 37**.



**Figura 37:** Fase adulta do *A. aegypti*. **Fonte:** <http://www.dnpm.gov.br/>

O macho se distingue da fêmea, pois possui antenas plumosas e palpos mais longos. As fêmeas se alimentam de seiva e mais frequentemente de sangue mostrando preferência pelo homem (antropofilia). O *A. aegypti* adulto pode ficar vivo por até 35 dias na natureza.

## 9.2 Liberação Controlada

Estudos voltados para produção de tecnologia envolvendo princípios ativos são cada vez mais explorados e seu desenvolvimento está nos diferentes métodos de liberação com intuito de melhorar sua precisão e facilitar sua aplicação (DARMAWAN *et al.*, 2016).

O sistema convencional de liberação de princípios ativos pode ser descrito por drogas em formas de pílulas, onde uma vez ingeridas a concentração do ativo aumenta significativamente. O aumento abrupto da concentração pode fugir do nível de eficácia e atingir níveis de toxicidade. A variação de concentração que ocorre neste sistema poderá levar a concentrações que estariam abaixo da necessária para ação terapêutica. Porém, em sistemas de liberação controlada, a concentração do ativo atinge o nível necessário para sua efetividade e se mantém sem grandes variações na concentração. Os estudos envolvendo fármacos e princípios ativos, em geral, utilizam sistemas de liberação controlada com o intuito de otimizar e prolongar sua ação terapêutica ou mesmo liberar uma concentração mínima ou máxima (ARIFIN; LEE; WANG, 2006).

Dentre os vários sistemas estudados para liberação controlada estão os que possuem matrizes baseadas em ativo/polímero, apresentando ótimos resultados além de possuírem diversidade em aplicações e mecanismos de liberação. Os mecanismos de liberação são diversos e podem variar de acordo com o sistema em que está sendo aplicado o produto. Fatores como temperatura, pH, concentração e agitação possuem impacto direto nos resultados da liberação, podendo alterar o mecanismo de liberação.

Para entender os mecanismos de liberação estão disponíveis alguns modelos matemáticos e cinéticos que auxiliam na previsão de como ocorre a liberação dos princípios ativos a partir dos agentes carreadores. A liberação a base de polímeros pode ser condicionada por alguns mecanismos, tais como intumescimento da matriz polimérica, difusão do ativo através do polímero intumescido e/ou erosão do polímero. O intumescimento da matriz polimérica ocorre quando há um relaxamento das cadeias do polímero em contato com o meio aquoso (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). A superfície deformada pelo contato com o meio aquoso é responsável pelas mudanças físicas de erosão, difusão e intumescimento.

É possível propor qual mecanismo de liberação está ocorrendo através de modelos matemáticos. Alguns deles são:

- i. Ordem Zero: Neste modelo são representadas dissoluções de princípios ativos que não se dissociam e são liberados lentamente, uma vez que a área da partícula não se modifica (DASH *et al.*, 2010).
- ii. 1° Ordem: Este modelo indica a possível absorção de substâncias ou sua eliminação. A liberação do ativo a partir das microcápsulas liberam uma determinada quantidade de princípio ativo proporcional à quantidade restante no seu interior, ao longo do tempo, de modo que a quantidade de princípio ativo liberada vai diminuindo com o tempo (DASH *et al.*, 2010) .
- iii. Higuchi: Neste modelo são representados os sistemas de liberação de princípios ativos hidrossolúveis e pouco solúveis, integrado em matrizes semissólidas e/ou sólidas (DASH *et al.*, 2010).
- iv. Korsmeyer e Peppas: Este modelo representa a liberação de princípios ativos de matrizes poliméricas, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando possa estar envolvido mais de um tipo de mecanismo de liberação (transporte Fickiano e/ou difusão anômala) (RITGER; PEPPAS, 1987).

## 10 METODOLOGIA

### 10.1 Produção de Pastilhas

Foram produzidos protótipos de pastilhas a base de holocelulose com 0,6 g de material e aplicando 0,5 ton por 3 min a 25 °C. As pastilhas finais foram desenvolvidas numa proporção 1:1 com massa final de 0,6 g por 3 min a 25 °C, porém com ajustes de força aplicada de acordo com a estrutura do pastilhador utilizado (modelo EZ Presses).



**Figura 38:** Pastilhador. **Fonte:** O Autor.

## 10.2 Teste de Dispersão

As pastilhas foram inseridas em soluções com três pH diferentes (6, 7 e 8) e alíquotas foram retiradas para avaliar a turbidez da solução. O experimento foi realizado em triplicata e o equipamento utilizado para a avaliação foi um turbidímetro digital microprocessado de bancada modelo ITTB1000.

## 10.3 Bioensaio Piloto

Os bioensaios investigativos das atividades larvicidas foram realizados seguindo o protocolo da [World Health Organization, \(2005\)](#) com modificações do Laboratório de Malária e Dengue (LMD) - INPA. Para a realização dos bioensaios pilotos com as larvas do *A. aegypti* foram preparadas separadamente soluções estoques utilizando 30 mg do óleo essencial solubilizado 1 mL de dimetilsulfóxido, posteriormente agitadas em vórtex por 1 min.

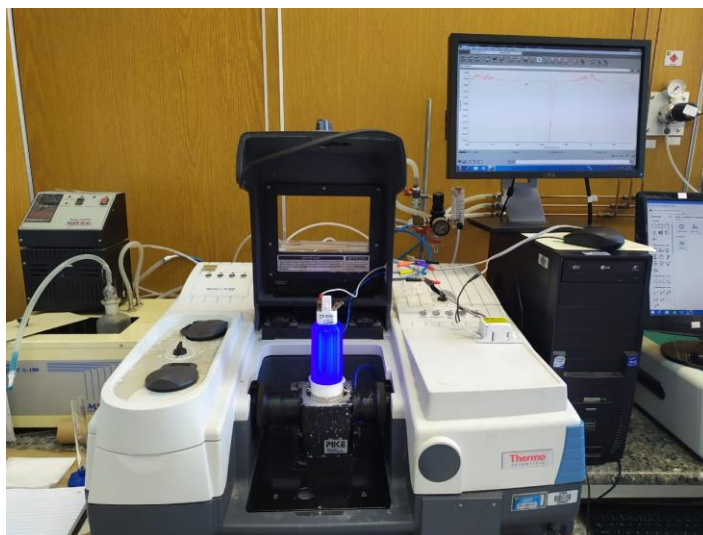
Os estudos foram realizados em sala climatizada com temperatura de  $(22,6 \pm 3) ^\circ\text{C}$  e 81% de umidade relativa. Primeiramente, foram utilizados grupos de 10 larvas de 2º instar ( $n = 150$ ) e concentrações pilotos de 500 a  $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O controle negativo foi constituído de 9 mL de água e 1 mL de DMSO e 10 larvas ( $n = 30$ ), enquanto o controle positivo continha 9,95 mL de água de torneira,  $0,5 \mu\text{L}$  de temefós e 10 larvas ( $n = 30$ ). Os testes foram realizados em triplicata.

#### 10.4 Bioensaio Dose-Resposta

Os bioensaios foram realizados conforme a descrição do bioensaio piloto, porém com algumas alterações. Grupos de 50 larvas ( $n = 250$ ) foram distribuídas separadamente em seis copos (300 mL) contendo inicialmente 10 mL de água de torneira, com ajuste de volume final 250 mL contendo as concentrações de dose-resposta de 130 a 55  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O controle negativo foi constituído de 249 mL de água e 1 mL de dimetilsufóxido e 50 larvas ( $n = 250$ ), enquanto o controle negativo continha 249,95 mL de água de torneira, 0,5  $\mu\text{L}$  de temefós e 50 larvas ( $n = 250$ ). Os testes foram realizados em quintuplicada com cinco repetições.

#### 10.5 Liberação Controlada Qualitativa

A verificação da liberação controlada do óleo essencial foi avaliada qualitativamente por FTIR. Os espectros de FTIR, na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , foram obtidos no Centro de Células a Combustível e Hidrogênio – CCCH (IPEN) utilizando o espectrofotômetro Nicolet 6700 com detector de MCT refrigerado com  $\text{N}_2$  líquido e acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR) MIRacle Pike com cristal SeZn recoberto com diamante.



**Figura 39:** Espectrofotômetro de FTIR/ATR. **Fonte:** O Autor.

## 10.6 Liberação Controlada Quantitativa

O ensaio de liberação controlada quantitativa foi avaliada em três sistemas com pH 6, 7 e 8. Cada sistema consistiu em uma solução tampão ajustado para o pH de interesse cujo volume foi de 250 mL em erlenmeyer. O experimento foi monitorado a partir do momento em que a pastilha contendo o ativo de interesse foi inserido no sistema sob agitação. Foram coletadas amostras em diferentes intervalos de tempo até 24 h. Os dados a partir das amostras retiradas dos diferentes sistemas foram avaliados no espectrofotômetro UV-vis (Global Trade Technology).

## 11 RESULTADOS

### 11.1 Bioensaios

Os resultados do teste piloto após 72 h de avaliação da atividade larvicida do óleo essencial da espécie *P. hispidum* apresentaram concentração de 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo letal para 21 larvas (70%), enquanto a dose de 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi letal para apenas 1 larva (3%), como mostra a **Tabela 6**.

**Tabela 6:** Resultado do teste piloto com óleo essencial da *P. hispidum* após 72 h.

| Teste Piloto                            |                              |
|-----------------------------------------|------------------------------|
| Concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Total de mortos (%) $\pm$ DP |
| 500                                     | 100 $\pm$ 0                  |
| 250                                     | 100 $\pm$ 0                  |
| 125                                     | 70 $\pm$ 0                   |
| 62,5                                    | 3 $\pm$ 0                    |
| 31,25                                   | 0 $\pm$ 0                    |
| CN                                      | 0 $\pm$ 0                    |
| CP                                      | 100 $\pm$ 0                  |

DP = desvio padrão; CN = controle negativo (1 mL DMSO); CP = controle positivo (0,5  $\mu\text{L}$  temefós).

A partir desses resultados, novas concentrações de 130 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram usadas para os testes de dose-resposta e os resultados de 24 h e 48 h estão mostrados na **Tabela 7 e 8**. Não houve mortalidade em 72 h.

Bioensaios utilizando o óleo essencial da *P. hispidum* avaliando a letalidade frente as larvas do *A. aegypti* foram realizados em concentrações definidas a partir dos resultados indicados no teste piloto. Atividades larvicida podem ser observadas em 24 h e 48 h a partir de concentrações em 55  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com letalidade de 1,6% das 50 larvas. Em concentrações de 70  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram observadas atividades baixas atingindo letalidades de 22,0% em 24 h, e 25,2% em 48 h. A atividade atingiu 100% de letalidade em 48 h com concentrações de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto em 24 h na mesma concentração foi observada letalidade em 97,0%. Em concentrações de 130  $\mu\text{g mL}^{-1}$  as letalidades em 24 h e 48 h foram 100%.

(DIAS; MORAES, 2014) definem que as amostras são consideradas efetivas (ativas) quando capazes de matar aproximadamente 100% das larvas a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Se levarmos esta informação como parâmetro, é possível classificar o óleo essencial de *P. hispidum* como ativo e ótimo em desempenho como larvicida (**Tabela 7**).

**Tabela 7:** Resultado dos bioensaios de dose resposta com óleo essencial da *P. hispidum* após 24 h.

| Concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Bioensaios                   |                              |
|-----------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                                         | 24 h                         | 48 h                         |
|                                         | Total de mortos (%) $\pm$ DP | Total de mortos (%) $\pm$ DP |
| 130                                     | 100 $\pm$ 0                  | 100 $\pm$ 0                  |
| 115                                     | 100 $\pm$ 0                  | 100 $\pm$ 0                  |
| 100                                     | 97 $\pm$ 1                   | 100 $\pm$ 0                  |
| 85                                      | 71 $\pm$ 1                   | 79 $\pm$ 1                   |
| 70                                      | 22 $\pm$ 1                   | 25 $\pm$ 2                   |
| 55                                      | 1,6 $\pm$ 0,8                | 2 $\pm$ 1                    |
| CN                                      | 0 $\pm$ 0                    | 0 $\pm$ 0                    |
| CP                                      | 100 $\pm$ 0                  | 100 $\pm$ 0                  |

DP = desvio padrão; CN = controle negativo (1 mL DMSO); CP = controle positivo (0,5  $\mu\text{L}$  temefós).

Os bioensaios após 24 h indicaram  $\text{CL}_{50}$  e  $\text{CL}_{90}$  maiores que os resultados em 48 h, porém a diferença não foi significativa. Os resultados baixos de  $\text{CL}_{50}$  e  $\text{CL}_{90}$  indicam que há uma suscetibilidade das larvas, e que o óleo essencial possui elevada toxicidade. Os valores do intervalo de confiança são baixos, acarretando pouca variação no valor das concentrações letais. Os valores de máximos no intervalo de confiabilidade ainda ficaram abaixo de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tanto para a  $\text{CL}_{50}$  quanto para a  $\text{CL}_{90}$ .

**Tabela 8:** Concentrações letais a 50% (CL<sub>50</sub>) e 90% (CL<sub>90</sub>) no controle de larvas de *A. aegypti* com óleo essencial da *P. hispidum* após 24 h e 48 h.

| Concentrações Letais (µg mL <sup>-1</sup> ) |             |             |
|---------------------------------------------|-------------|-------------|
|                                             | 24 h        | 48 h        |
| CL <sub>50</sub>                            | 77,7        | 75,8        |
| IC95%                                       | 75,9 – 79,6 | 73,3 – 78,3 |
| CL <sub>90</sub>                            | 93,3        | 89,4        |
| IC95%                                       | 90,5 – 96,9 | 85,9 – 94,5 |
| x <sup>2</sup>                              | 4,7         | 9,2         |

CL = concentração letal; IC = intervalo de confiança; x<sup>2</sup> = *qui-quadrado*.

(DIAS; MORAES, 2014) afirmam que um óleo essencial ou um constituinte químico presente em sua constituição podem apresentar atividade larvicida forte (CL<sub>50</sub> < 50 µg mL<sup>-1</sup>), moderada (50 µg mL<sup>-1</sup> < CL<sub>50</sub> < 100 µg mL<sup>-1</sup>) ou atividade fraca (CL<sub>50</sub> > 100 µg mL<sup>-1</sup>). Na busca para entender a relação entre a atividade dos óleos essenciais e seus constituintes, alguns autores realizaram testes isolando constituintes majoritários de diferentes espécies e observaram que na maioria dos casos os óleos essenciais eram tão ativos quanto seus constituintes majoritários. Também observaram maior atividade larvicida em espécies ricas em constituintes fenilpropanóides e hidrocarbonetos monoterpenos. Ao observarmos os resultados de CG-EM do óleo essencial extraído a partir das folhas da espécie *P. hispidum* reportados no **Capítulo 1**, é possível concluir que os constituintes majoritários são predominantemente monoterpenos totalizando 70,3 %. Dentro eles estão o  $\gamma$ -terpineno (34,1 %) e  $\alpha$ -terpineno (17,0 %) apresentando maior porcentagem na composição química entre monoterpenos e sesquiterpenos.

Cheng e colaboradores (2009) avaliaram a variação da atividade inseticida através do óleo essencial extraído das folhas da espécie *Cryptomeria japonica* e observaram que  $\delta$ -3-careno (CL<sub>50</sub> = 25,3 µg mL<sup>-1</sup>), terpinoleno (CL<sub>50</sub> = 32,1 µg mL<sup>-1</sup>),  $\alpha$ -terpineno (CL<sub>50</sub> = 28,1 µg mL<sup>-1</sup>) e  $\gamma$ -terpineno (CL<sub>50</sub> = 26,8 µg mL<sup>-1</sup>) contribuíram para a atividade inseticida do óleo essencial devido às suas presenças na composição química e grande potencial larvicida.

É possível sugerir a partir dos resultados apresentados que o óleo essencial da *P. hispidum* possui uma efetiva atividade larvicida com possível origem na quantidade de monoterpenos em sua composição, dos constituintes majoritários com ótima atividade larvicida já testada em trabalhos reportados na literatura e/ou pelo sinergismo dos constituintes majoritários e minoritários em sua composição otimizando sua atividade.

Com resultados favoráveis, é possível empregar este óleo essencial em uma tecnologia possibilitando a preservação de sua qualidade, armazenamento e efetividade a longo prazo, visando sua empregabilidade como agente biodefensivo.

## 11.2 Pastilhas

As pastilhas contendo óleo essencial microencapsulado foi o objetivo final desta pesquisa. Sua produção foi esquematizada e refinada ao longo de todo o trabalho e houve diversas alterações. Inicialmente, a produção das pastilhas foi feita em protótipos antes da produção do material microencapsulado, contando apenas com a holocelulose extraída do rejeito das folhas de *P. hispidum* após a extração do óleo essencial. O primeiro protótipo foi desenvolvido a base unicamente de holocelulose, utilizando 0,6 g de material e aplicando 0,5 tonelada de força por 3 min a 25 °C.

Foram realizados testes de dispersão para verificar o tempo da dispersão das pastilhas de holocelulose em meio aquoso, considerando diferentes pH. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados podem ser observados na **Tabela 9**.

**Tabela 9:** Teste de dispersão da holocelulose em diferentes pH.

| Tempo (h)  | Média da Turbidez (NTU) |      |      | DP     |
|------------|-------------------------|------|------|--------|
|            | pH 8                    | pH 7 | pH 6 |        |
| <b>1</b>   | 0,33                    | 0,14 | 0,20 | ± 0,01 |
| <b>2</b>   | 0,36                    | 0,30 | 0,24 | ± 0,01 |
| <b>24</b>  | 0,38                    | 0,30 | 0,24 | ± 0,01 |
| <b>48</b>  | 0,38                    | 2,00 | 1,71 | ± 0,01 |
| <b>72</b>  | 0,40                    | 3,40 | 3,30 | ± 0,01 |
| <b>288</b> | 0,40                    | 3,40 | 3,90 | ± 0,01 |
| <b>312</b> | 0,41                    | 3,40 | 4,10 | ± 0,01 |

DP = desvio padrão.

Os resultados foram avaliados de acordo com a turbidez dos sistemas ao longo do tempo, a qual está relacionada com a dispersão das partículas de holocelulose em água. As pastilhas, quando inseridas na solução sob agitação, sofrem intumescimento resultando em uma variação de volume que chega a ser até três vezes superior ao seu tamanho original, como apresentado na **Figura 40**. Porém, sua dispersão ao longo do tempo é lenta, especialmente em pH = 8. Em até 24 h a pastilha em solução de pH 8 é a que melhor se dispersa segundo os valores de turbidez, pois em 1 h a turbidez que era

0,33 NTU passou para 0,38 NTU em 24 h. No entanto, a pastilha em solução de pH 7 apresentou apenas 0,14 NTU em 1 h e 0,24 NTU em 24 h. Porém, após 24 h, os valores de turbidez se modificaram, e a pastilha em pH 6 passou a apresentar melhor dispersão, com valores de turbidez entre 0,24 NTU e 4,1 NTU. Até 312 h a pastilha em pH = 6 continuou apresentando os melhores valores de turbidez e, neste intervalo, todas as pastilhas estavam dispersas no sistema.



**Figura 40:** Pastilha de holocelulose em solução.

Embora os resultados de dispersão com a pastilha em meio ácido tenham sido promissores quando comparados com as inseridas em meio neutro e básico, o tempo para sua dispersão em água ainda é elevado. Como alternativa, optou-se por inserir glucose na holocelulose extraída, na proporção 1:1. As pastilhas produzidas estão mostradas na **Figura 41**.



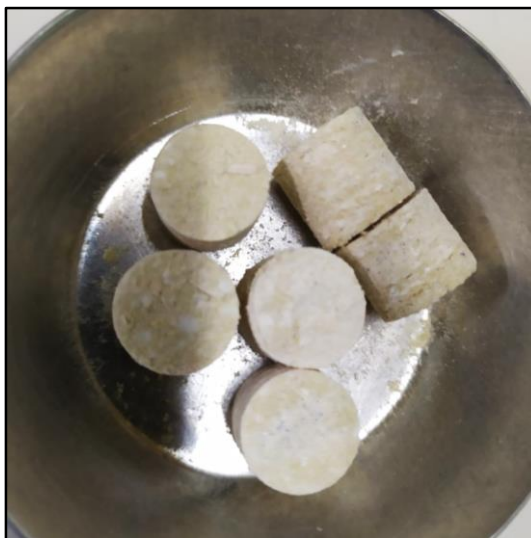
**Figura 41:** Pastilhas produzidas com holocelulose e glucose (1:1).

A glucose foi utilizada como um facilitador na dispersão da pastilha em solução. O tempo máximo de dispersão foi observado para 0,5 h sem agitação do sistema, independente do pH da solução. As etapas posteriores visaram a incorporação dos

bioativos microencapsulados nas pastilhas para avaliar a liberação dos mesmos. O tempo de dispersão mais curto foi otimizado devido a escolha do agente encapsulante.

Devido ao limite de volume no pastilhador para a produção das pastilhas, foi escolhido um material para encapsular o ativo que apresentasse propriedades tão boas quanto as da glucose em solução no que se refere a boa dispersão das pastilhas. O material ideal foi WPI, pois apresentou propriedades funcionais como geleificação, formação de espuma e alta emulsificação (XIAO; QI; WICKHAM, 2018). Levando em consideração suas propriedades emulsificantes e capacidade de retenção de água, a glucose foi então excluída da produção da pastilha e o WPI substituiu seu papel na otimização de dispersão das pastilhas.

Quando aplicada 0,5 ton para formar a pastilha contendo holocelulose e ativo microencapsulado, ocorria a ruptura das micropartículas encapsulantes, acarretando a exposição do óleo essencial. A produção das pastilhas continuou em uma proporção de 1:1 e em 25 °C, porém a aplicação de força no pastilhador foi alterada até condições ideais. As pastilhas após otimização do pastilhador podem ser observadas na **Figura 42**.



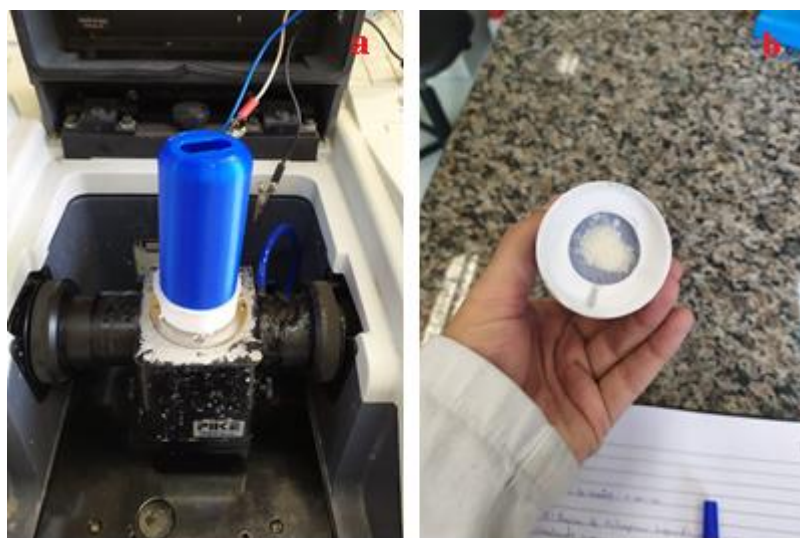
**Figura 42:** Pastilhas contendo proporção 1:1 de holocelulose e ativo microencapsulado.

As pastilhas apresentaram eficiente homogeneização dos componentes ao longo da sua superfície. É possível observar (**Figura 42**) duas colorações ao longo das pastilhas, as regiões de coloração amarelada representam a holocelulose e as regiões de coloração branca representam as micropartículas contendo óleo essencial encapsulado. A ideia por trás das disposições dos componentes está na característica antes observada da holocelulose de intumescimento, onde a pastilha irá multiplicar seu tamanho e o ativo

microencapsulado será liberado progressivamente desde a superfície até o núcleo da pastilha devido à emulsificação do agente encapsulante. Por fim, foi avaliado o tempo de dispersão das pastilhas em diferentes pH (6, 7 e 8). As pastilhas não apresentaram variações significativas no tempo de dispersão quando o pH foi modificado. Todas as pastilhas atingiram dispersão total em 1,5 h. Houve um aumento de 1 h no tempo total de dispersão em comparação com o protótipo anterior (utilizando glucose), porém essa variação não afeta negativamente a eficiência da aplicação das pastilhas.

### 11.3 Liberação Controlada Qualitativa

Para avaliar qualitativamente o perfil de liberação do ativo encapsulado foi empregada a técnica de FTIR, montando-se um sistema *in situ* para que a avaliação ocorresse em tempo real e com fotoexposição (**Figura 43**). Na **Figura 43a** está demonstrado o suporte para lâmpada germicida compacta (7.5 W e 254 nm) enquanto na **Figura 43b** está presente o suporte impresso em 3D onde está fixo uma dupla camada de Nylon com 200 fios por polegada para armazenar o ativo microencapsulado.



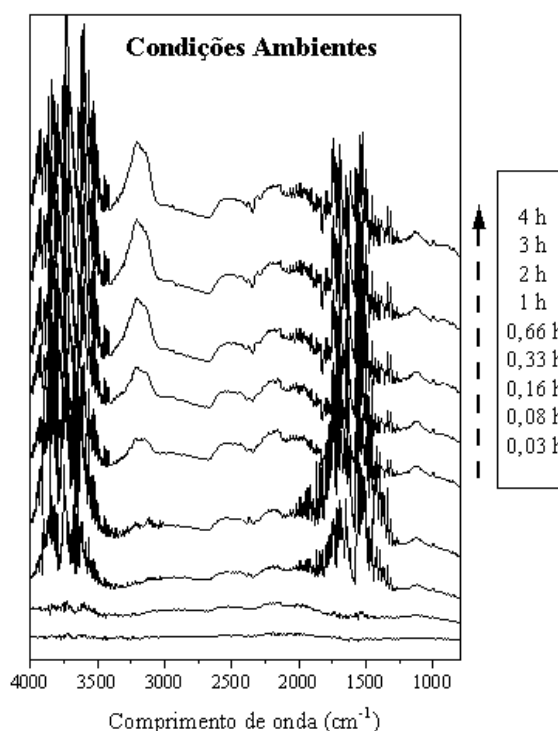
**Figura 43:** (a) suporte PVC para acoplar lâmpada UVC; (b) suporte impresso em 3D para fixar no equipamento espectroscópico.

A liberação foi avaliada em três condições diferentes, porém todas tiveram uma duração total de 4 h:

- 1) Primeiramente foi realizada a liberação *in situ* em condições ambientes: 10 mL de água deionizada e 0,1 g de ativo microencapsulado.

- 2) Foi realizada a liberação *in situ* em três pH (6, 7 e 8) ajustados utilizando-se tampões fosfato.
- 3) Foi realizada a liberação *in situ* em três pH (6, 7 e 8) ajustados utilizando tampões fosfato com fotoexposição.

No **Capítulo 1** está presente o espectro de FTIR do óleo essencial da *P. hispidum* evidenciando as bandas características e suas funções orgânicas presentes especificamente na região entre 1700 a 800  $\text{cm}^{-1}$ . No **Capítulo 2** está presente o espectro de FTIR do WPI, em especial as bandas referentes às aminas primária e secundária em sua composição (1660  $\text{cm}^{-1}$  e 1540  $\text{cm}^{-1}$ ). A partir destas bandas, foi possível avaliar a progressão dos perfis tanto do óleo essencial quanto do WPI ao longo do tempo.

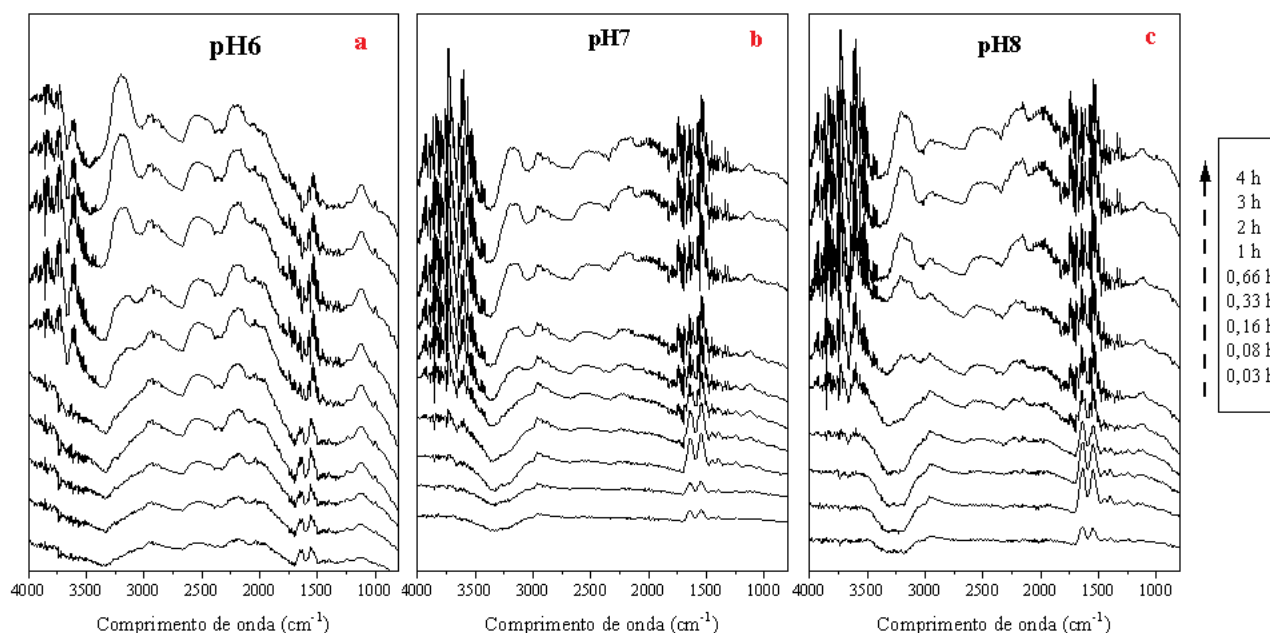


**Figura 44:** Espectros de FTIR da liberação controlada *in situ* em condições ambientes.

A liberação em condição ambiente está demonstrada na **Figura 44**. A duração da liberação ocorreu durante 4 h seguidas, avaliando-se ao longo do tempo a exposição do óleo essencial em solução. Em 0,03 h não foi possível observar nem o perfil do óleo essencial e nem do WPI, pois foi realizada a limpeza do perfil da solução. Em 0,16 h foi possível ver as bandas das aminas de WPI, indicando a emulsificação do material na solução. No entanto, as bandas apresentaram ruído excessivo devido a sobreposição de

materiais no detector. Estes ruídos são provenientes do óleo essencial que está sendo liberado, causando sobreposição de bandas. A partir de 0,33 h não foi mais possível identificar de forma clara o perfil das aminos, mas apenas os ruídos causados pela detecção do óleo essencial. É possível sugerir através dos espectros que, ao entrar em contato com a solução, o intervalo de tempo que ocorreu a emulsificação do material de parede e a liberação do ativo foi curto.

Com o intuito de avaliar o comportamento da liberação do ativo em diferentes meios foram empregados três sistemas com diferentes pH (**Figura 45**). Diferente do sistema em condições ambientes onde foi utilizada água deionizada, foi empregada agora soluções tampões ajustadas em pH 6, 7 e 8.

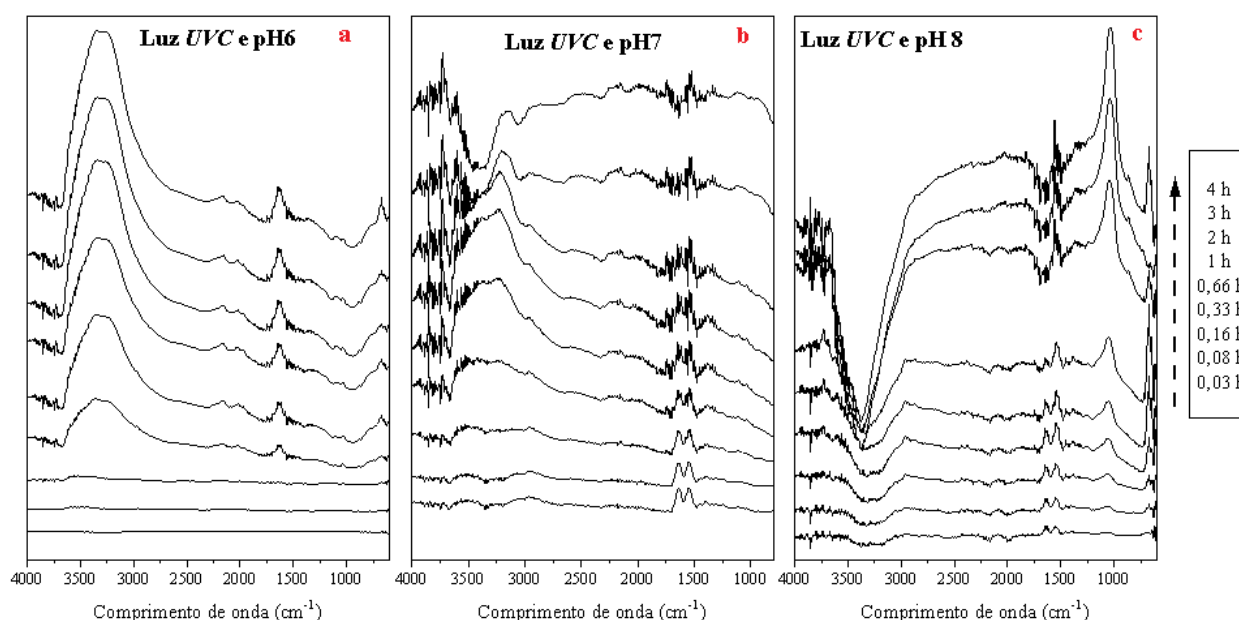


**Figura 45:** Espectros de FTIR da liberação controlada *in situ* em diferentes pH.

A liberação em pH 6, 7 e 8 em 0,03 h apresentou o perfil das aminos primária e secundária ( $1660\text{ cm}^{-1}$  e  $1540\text{ cm}^{-1}$ ), de forma distinta aos espectros observados na liberação em condições ambientes, onde estão isentas as bandas de interesse. Na região entre  $3500\text{ cm}^{-1}$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$  para todos os pH estão presentes vales que se intensificam ao longo do tempo. Este evento está relacionado ao consumo das espécies antes presentes na superfície do cristal. No caso, pode ter ocorrido a homogeneização do óleo essencial e material de parede na solução substituindo as espécies anteriores, fato que é corroborado pelas bandas características do WPI presentes entre 0,03 h a 0,66 h onde é possível observar os perfis das aminos. Após 0,66 h o ativo de interfere no perfil das aminos se faz

presente. Nos espectros do sistema em pH 6 ocorreu uma transição menos ruidosa dos perfis em comparação aos outros sistemas. Porém, para todos os sistemas é possível observar os desaparecimentos dos perfis de WPI e bandas em  $1230\text{cm}^{-1}$  e  $1040\text{cm}^{-1}$  referentes ao óleo essencial surgem de forma progressiva. É possível observar que houve nos três sistemas um intervalo maior entre a emulsificação do material de parede e liberação do óleo essencial em solução. Em 1 h o óleo essencial estava presente em solução em quantidade suficiente para ocultar o perfil característico do WPI.

Para avaliar o comportamento da liberação do óleo essencial em diferentes meios e condições foram empregados três sistemas com diferentes pH e com fotoexposição (Figura 46).



**Figura 46:** Espectros de FTIR de liberação controlada *in situ* em diferentes pH e com incidência de luz ultravioleta C (UVC).

O sistema em pH 6 com fotoexposição é bem distinto quando comparado com os outros sistemas. Entre 0,03 h e 0,16 h não houve a ocorrência de nenhuma banda característica dos perfis do material de parede e ativo. Após 0,33 h na região entre  $3500\text{cm}^{-1}$  e  $3000\text{cm}^{-1}$  surgiu uma banda que se tornou intensa ao longo do experimento. Sua origem pode estar diretamente relacionada à uma possível interação ou mesmo ligação química entre os componentes presentes no sistema devido o fornecimento energético por fotoexposição. O perfil das aminas primária e secundária não foi observado e as

bandas referentes ao ativo são pouco intensas ou inexistentes. Assim, uma possível degradação pode ter ocorrido para o não aparecimento dos perfis esperados.

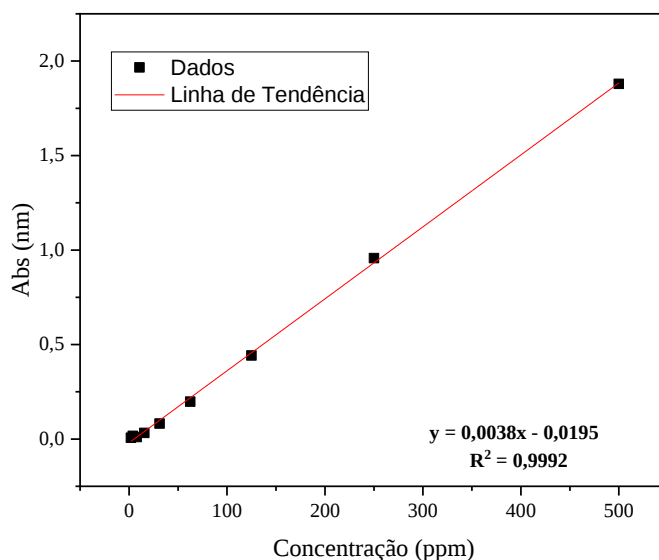
Em pH 7 com fotoexposição o espectro em 0,03 h apresentou as bandas características das aminas primária e secundária e são possíveis de observar sem descaracterização até 0,33 h. Após esse intervalo, a detecção do ativo interferiu no perfil do WPI. Entre  $3600\text{ cm}^{-1}$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$  ocorreram dois eventos ao longo do tempo, além do surgimento de uma banda intensa em até 2 h. Porém, após este intervalo, a banda foi substituída por um vale até o fim do experimento. É possível que, com o fornecimento energético, ocorresse interação ou ligação entre os componentes no sistema e após 2 h o resultado desse evento tenha sido degradado. As bandas do óleo essencial são possíveis de serem observadas em  $1400\text{ cm}^{-1}$ ,  $1230\text{ cm}^{-1}$  e  $1040\text{ cm}^{-1}$ , porém pouca intensas.

Diferentemente do sistema em pH 6, o sistema em pH 8 apresentou eventos de consumo de espécies na região entre  $3600\text{ cm}^{-1}$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$ . É possível que o fornecimento energético tenha acelerado o processo de emulsificação e liberação do óleo essencial, acarretando a substituição das espécies presentes na superfície do cristal. As bandas de WPI referentes às aminas presentes em sua composição são observadas desde o início do experimento até 1 h. Após esse intervalo ocorreu uma descaracterização do seu perfil. O perfil do ativo em  $1040\text{ cm}^{-1}$  foi observado desde o primeiro espectro e se tornou bastante intenso ao longo do tempo.

Dentre os sistemas com fotoexposição, o que apresentou melhor perfil de liberação controlada foi em pH 8, pois foi possível observar tanto o perfil do agente encapsulante quanto do óleo essencial durante o experimento em intervalos longos de tempo, embora tenha ocorrido uma aceleração da liberação do ativo apontada pela banda em  $1040\text{ cm}^{-1}$  que se tornou bastante intensa em 4 h.

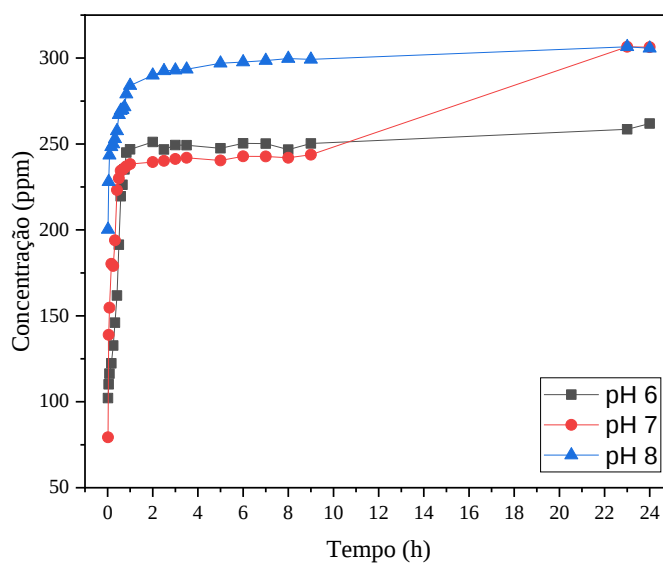
#### **11.4 Liberação Controlada Quantitativa**

Os dados de liberação controlada quantitativa foram mensurados por UV-vis empregando-se uma curva de calibração do óleo essencial da *P. hispidum*. A reta obtida através das diluições apresentou  $R^2 = 0,9992$ .



**Figura 47:** Curva de calibração do óleo essencial da *P. hispidum* utilizado na liberação controlada.

As liberações do óleo essencial da *P. hispidum* microencapsulado por WPI foi realizada em diferentes pH e medida dinamicamente em diferentes momentos. Todos os dados obtidos nos perfis de liberações levam em consideração a eficiência de encapsulação das micropartículas utilizadas nas pastilhas (**Figura 48**).



**Figura 48:** Liberação controlada em diferentes pH do óleo essencial da *P. hispidum* microencapsulado por WPI.

Os sistemas no ponto inicial apresentaram diferentes concentrações, indicando que o pH do sistema influenciou diretamente na velocidade em que o ativo foi liberado. O sistema em pH 7 é o que apresentou menor concentração de óleo liberada, cerca de  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  no ponto inicial. O sistema com pH 8 apresentou concentração de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  no ponto inicial. Todos os sistemas apresentaram uma rápida liberação na primeira hora de monitoramento e atingiram um ponto de equilíbrio após 2 h de liberação e se prolongaram até 8 h. No entanto, os equilíbrios ocorrem em diferentes concentrações.

O sistema em pH 6 manteve seu equilíbrio em aproximadamente  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em pH 7 o sistema entrou seu equilíbrio em cerca de  $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O sistema em pH 8 foi o que apresentou maiores valores de concentração desde o início da liberação e alcançou o *pseudo*-equilíbrio em  $290 \mu\text{g mL}^{-1}$  e aumentou progressivamente até  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$  e então se manteve estável, o que pode ser confirmado pela concentração no tempo de 24 h. O sistema em pH 7 apresentou uma faixa de equilíbrio até 8 h e um salto nas concentrações em 23 h e 24 h. Diferentemente dos sistemas em pH 7 e pH 8, o sistema em pH 6 apresentou menor progresso após 8 h de liberação, atingindo a concentração de  $255 \mu\text{g mL}^{-1}$  após 24 h. Levando em consideração os outros dois sistemas, é possível supor que o sistema de pH 6 atingiria uma concentração de  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$  em sua liberação, assim como os outros sistemas, indicando que o sistema em pH mais ácido apresentou liberação mais lenta que em meios neutros e básicos. Esta afirmação se reforça quando avaliamos o perfil de liberação do sistema em pH 8, apresentando elevada concentração desde o primeiro ponto de coleta.

Embora tivessem sido verificadas diferenças nas concentrações durante a liberação dos diferentes sistemas, todos apresentaram concentrações acima de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  após 24 h de liberação do ativo. Estes são dados que possibilitam ampla aplicação das pastilhas no controle das larvas do *A. aegypti*, visto que o mesmo apresentou  $\text{CL}_{50} = 77,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $\text{CL}_{90} = 93,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  em 24 h, de acordo com os bioensaios.

Para entender o mecanismo de liberação de princípios ativos encapsulados são realizados estudos para avaliar os parâmetros cinéticos da liberação e determinar um modelo que melhor se encaixa no material. A liberação do óleo essencial da *P. hispidum* a partir das pastilhas produzidas foi ajustada a alguns modelos matemáticos, conforme mostra a **Tabela 10**.

**Tabela 10:** Modelos e coeficientes de liberação controlada do óleo essencial da *P. hispidum*.

| Modelos de Liberação Controlada |                |       |       |       |
|---------------------------------|----------------|-------|-------|-------|
| Modelos                         | Coeficientes   | pH    |       |       |
|                                 |                | 6,0   | 7,0   | 8,0   |
| <b>Korsmeyer-Peppas</b>         | k              | 203,9 | 210,0 | 271,2 |
|                                 | n              | 0,11  | 0,10  | 0,05  |
|                                 | R <sup>2</sup> | 0,70  | 0,82  | 0,93  |
| <b>Higuchi</b>                  | k              | 89,2  | 88,8  | 104,5 |
|                                 | R <sup>2</sup> | 0     | 0     | 0     |
| <b>1ª ordem</b>                 | k              | 333,9 | 333,3 | 374,5 |
|                                 | R <sup>2</sup> | 0     | 0     | 0     |
| <b>Ordem zero</b>               | k              | 18,2  | 18,2  | 21,2  |
|                                 | R <sup>2</sup> | 0     | 0     | 0     |

*n* = expoente de liberação; R<sup>2</sup> = coeficiente de regressão.

O modelo que melhor se ajustou ao mecanismo de liberação controlada de acordo os dados dispostos na **Tabela 10** foi o modelo de Korsmeyer e Peppas, pois apresentou valores de R<sup>2</sup> mais próximos de 1. Dentre os diferentes sistemas que se encaixaram no modelo de Korsmeyer e Peppas, destacou-se o sistema em pH 8, apresentando um alto valor de R<sup>2</sup> = 0,93. Quando avaliamos os valores do parâmetro expoente difusional (*n*), é possível estimar o mecanismo de liberação dos sistemas. Os valores encontrados para todos os sistemas em diferentes pH estão abaixo de 0,45. Valores de *n* < 0,45 são regidos pelos mecanismos de difusão clássica ou Fickiana (RITGER; PEPPAS, 1987; SAHOO; CHAKRABORTI; BEHERA, 2012). Liberações controladas de ativos que se encaixam no modelo Fickiano possuem cinética caracterizada pela difusividade, onde o relaxamento das cadeias poliméricas do material de parede é menor que a velocidade de difusão do solvente. Como resultado, ocorre uma rápida liberação do ativo e, em seguida, o equilíbrio é atingido. Este fenômeno correspondeu ao perfil de liberação demonstrado pelos três sistemas na **Figura 48**. Os demais modelos matemáticos não demonstraram nenhuma correspondência com as curvas experimentais de liberações do ativo a partir das pastilhas, uma vez que os valores do coeficiente de regressão foram iguais a zero.

## 12 CONCLUSÕES

Após a extração do óleo essencial foi possível recuperar a biomassa de rejeito produzida a partir das folhas da espécie *P. hispidum* e aplicá-las na pesquisa através da extração da holocelulose e do desenvolvimento de um sistema de micropartículas contendo óleo essencial para liberação controlada e ação larvicida. O óleo essencial foi extraído das folhas e teve suas propriedades físicas e químicas caracterizadas, assim como a holocelulose. A partir da extração do óleo essencial e holocelulose foram obtidos os rendimentos de, respectivamente, de 1,2% e 14,4%.

A etapa de caracterização dos constituintes da folha foi a que demandou maior investimento de tempo devido à complexidade da metodologia de bancada. Observou-se que os valores percentuais dos constituintes da folha seca ultrapassaram 100% devido à presença de impurezas naturais. Esse fato foi confirmado através da técnica de DRX, sendo possível verificar que a metodologia proposta para a extração da holocelulose foi moderadamente eficaz, uma vez que o padrão de DRX do material extraído ainda evidenciava uma fase cristalina desconhecida, mas que provavelmente pode ser atribuída aos macro e micronutrientes naturais existentes na folha. Portanto, foi realizada a modificação da metodologia de extração e as impurezas residuais foram retiradas totalmente.

Os bioensaios do óleo essencial apresentaram resultados  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  abaixo de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em 24 h e 48 h. Estes resultados indicam uma ótima atividade larvicida e confirmam a eficácia do mesmo para aplicação em tecnologias frente ao vetor *A. aegypti*.

Foram desenvolvidos sistemas baseados em WPI para agirem como agentes carreadores do óleo essencial. Em seguida, essas micropartículas sólidas foram incorporadas à holocelulose previamente extraída para o desenvolvimento das pastilhas. Foram também realizados testes preliminares de dispersão de pastilhas de holocelulose em água. Esses testes foram importantes pois mostraram que a holocelulose pura não apresentou boa dispersão, sendo necessário um tempo demasiadamente grande para que isso acontecesse. A alternativa escolhida foi a adição de um agente encapsulante (WPI) que apresentou características hidrofílicas, otimizando a dispersão.

A liberação controlada do óleo essencial presente nas pastilhas foi monitorada ao longo do tempo e indicou, através do coeficiente de regressão, que o modelo teórico mais adequado para explicar o sistema foi o modelo de Korsmeyer e Peppas e através dos valores do expoente de liberação foi possível afirmar que a cinética foi regida através do modelo Fickiano. Ao atingir 24 h de liberação foi observado um total de aproximadamente 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para todos os sistemas. Levando em consideração as concentrações letais obtidas nos bioensaios com o óleo essencial puro, é possível afirmar que o material desenvolvido apresenta eficácia para agir como um biodefensivo larvicida no controle de *A. aegypti*.

### 13 REFERÊNCIAS

- AJAO, O. et al. Hemicellulose based integrated forest biorefineries: Implementation strategies. **Industrial Crops and Products**, v. 126, n. October, p. 250–260, 2018.
- ALBIERO, A. L. M. et al. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 379–391, 2008.
- ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues - Wheat straw and soy hulls. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1664–1671, 2008.
- ALVES, N. S. F.; SETZER, W. N.; DA SILVA, J. K. R. The chemistry and biological activities of *Peperomia pellucida* (Piperaceae): A critical review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 232, p. 90–102, 2019.
- ARIFIN, D. Y.; LEE, L. Y.; WANG, C. H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 12–13, p. 1274–1325, 2006.
- ATRA, R. et al. Investigation of ultra- And nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 3, p. 325–332, 2005.
- BAE, E. K.; LEE, S. J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 8, p. 549–560, 2008.
- BARDELLI, K. C.; KIRIZAWA, M.; SOUSA, A. V. G. DE. O gênero. v. 35, n. 4, p. 553–561, 2008.
- BAUMAN, D. E. et al. Major advances associated with the biosynthesis of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1235–1243, 2006.
- BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragment extracts. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 2–3, p. 138–142, 2003.
- BHARDWAJ, A. et al. Microstructural and SEM analysis on thin sheets of  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$  alloy subjected to biaxial and uniaxial tensile tests. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 2, p. 3729–3734, 2018.
- BHATNAGAR, A.; SAIN, M. Processing of cellulose nanofiber-reinforced composites. **Journal of**

**Reinforced Plastics and Composites**, v. 24, n. 12, p. 1259–1268, 2005.

BILIUTA, G.; COSERI, S. Cellulose: A ubiquitous platform for ecofriendly metal nanoparticles preparation. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 383, p. 155–173, 2019.

BOLUK, Y. Acid-base interactions and swelling of cellulose fibers in organic liquids. **Cellulose**, v. 12, n. 6, p. 577–593, 2005.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus betacyanin* pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1248–1252, 2000.

CAMPBELL, A. G.; KIM, W.-J.; KOCH, P. Chemical Variation In Lodgepole Pine With Sapwood/Heartwood, Stem Height, and Variety. **Wood and Fiber Science**, v. 22, n. 1, p. 22–30, 2007.

CAO, J. QIN et al. Pinene-rich essential oils from *Haplophyllum dauricum* (L.) G. Don display anti-insect activity on two stored-product insects. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 140, n. August 2018, p. 1–8, 2019.

CHEN, L. et al. Highly thermal-stable and functional cellulose nanocrystals and nanofibrils produced using fully recyclable organic acids. **Green Chemistry**, v. 18, n. 13, p. 3835–3843, 2016.

CHENG, L. et al. Characterization of physicochemical properties of cellulose from potato pulp and their effects on enzymatic hydrolysis by cellulase. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

CHENG, S. S. et al. Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 465–470, 2009.

CHEON, S. et al. International Journal of Biological Macromolecules Lignin for White Natural Sunscreens. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 549–554, 2019.

DA SILVA, J. K. R. et al. Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 55–60, 2014.

DARMAWAN, S. et al. Characterization of Lignocellulosic Biomass as Raw Material for the Production of Porous Carbon-based. v. 11, p. 3561–3574, 2016.

DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.

DE OLIVEIRA, L. M. et al. Alternative Biodefensive based on the Essential Oil from *Allium sativum* Encapsulated in PCL/Gelatin Nanoparticles. **Journal of Food Engineering and Technology**, v. 8, n. 2, p. 65–74, 2019.

DE SOUZA, E. L. et al. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 2, p. 245–250, 2005.

DEEPA, B. et al. Utilization of various lignocellulosic biomass for the production of nanocellulose: a comparative study. **Cellulose**, v. 22, n. 2, p. 1075–1090, 2015.

DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. **Parasitology Research**, v. 113, n. 2, p. 565–592, 2014.

DOLAN, G. K. et al. Probing adhesion between nanoscale cellulose fibres using AFM lateral force

spectroscopy: The effect of hemicelluloses on hydrogen bonding. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, p. 97–107, 2019.

EL-AKHAL, F. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Origanum majorana* (Lamiaceae) cultivated in Morocco against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 9, p. 746–750, 2014.

FARAG, R. S. et al. Antimicrobial Activity of Some Egyptian Spice Essential Oils. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 9, p. 665–667, 2016.

FENG, Z. et al. Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*: Microencapsulation with carboxymethyl cellulose sodium and microcrystalline cellulose and effects of microencapsulated astaxanthin on yogurt properties. **LWT - Food Science and Technology**, 2018.

FERNANDES, R. V. DE B. et al. Microencapsulation of Rosemary Essential Oil: Characterization of Particles. **Drying Technology**, v. 31, n. 11, p. 1245–1254, 2013.

FONSÊCA, A. F. et al. Extraction and Characterization of Nanocellulose from Corn Stover. **Materials Today: Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 287–294, 2015.

FRENCH, A. D. Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. **Cellulose**, v. 21, n. 2, p. 885–896, 25 abr. 2014.

GABRIEL DE OLIVEIRA, E. C. M. et al. Control of a Proportional Hydraulic System. **Intech open**, v. 2, p. 64, 2015.

GABRIELII, I. et al. Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n. 4, p. 367–374, 2000.

GANCEDO, N. C. et al. Morpho-anatomical characters of *Limonium brasiliense* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 5, p. 513–519, 2018.

GHALESHAHI, A. Z.; RAJABZADEH, G. The influence of sodium alginate and genipin on physico-chemical properties and stability of WPI coated liposomes. **Food Research International**, v. 130, October 2019, p. 108966, 2020.

GIBIS, M. et al. Influence of molecular weight and degree of substitution of various carboxymethyl celluloses on unheated and heated emulsion-type sausage models. **Carbohydrate Polymers**, v. 159, p. 76–85, 2017.

GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21 st century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4 SUPPL., p. 3–11, 2011.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 375–384, 2010.

HAI, T. A. P.; SUGIMOTO, R. Surface functionalization of cellulose with poly(3-hexylthiophene) via novel oxidative polymerization. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, n. August 2017, p. 221–227, 2018.

IBACH, R. E. **Biological properties of wood**. [s.l: s.n.].

JAIN, R. K.; SJÖSTEDT, M.; GLASSER, W. G. Thermoplastic xylan derivatives with propylene oxide. **Cellulose**, v. 7, n. 4, p. 319–336, 2000.

JIA, Q. et al. Production of furfural from xylose and hemicelluloses using tin-loaded sulfonated diatomite as solid acid catalyst in biphasic system. **Bioresource Technology Reports**, v. 6, n. February, p. 145–151, 2019.

- JYOTHI, N. V. N. et al. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187–197, 2010.
- KAPLAN, D. L. **Macromolecular Systems - Materials Approach**. [s.l: s.n.].
- KAUSHIK, A.; SINGH, M. Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from wheat straw using steam explosion coupled with high shear homogenization. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 1, p. 76–85, 2011.
- KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.
- KLOWDEN, M. J. Making generalizations about vectors: Is there a physiology of “the mosquito”? **Entomological Research**, v. 37, n. 1, p. 1–13, 2007.
- KONDO, T. et al. Hydrogen bond formation in regioselectively functionalized 3-mono-O-methyl cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 15, p. 2600–2604, 2008.
- KONISHI, E. Issues related to recent dengue vaccine development. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4 SUPPL., p. 63–71, 2011.
- LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Progress in Polymer Science Chemical modification of lignins : Towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 7, p. 1266–1290, 2014.
- LEI, Z. et al. Thermal pyrolysis characteristics and kinetics of hemicellulose isolated from Camellia Oleifera Shell. **Bioresource Technology**, v. 282, p. 228–235, 2019.
- LIMA, E. P. et al. *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará State | Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 259–263, 2006a.
- LIMA, I. O. et al. Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 199–203, 2006b.
- LIU, L.; WANG, Y.; LU, A. Effect of electrolyte on regenerated cellulose film as gold nanoparticle carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 210, n. August 2018, p. 234–244, 2019.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: Polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.
- LUCAS, J. et al. A new approach for the microencapsulation of curcumin by a spray drying method, in order to value food products. **Powder Technology**, v. 362, p. 428–435, 2020.
- MACHADO, S. M. F. et al. Leaf oils of two Brazilian Piper species: *Piper arboreum* Aublet var. *latifolium* (C.DC) Yuncker and *Piper hispidum* Sw. **Journal of Essential Oil Research**, v. 6, n. 6, p. 643–644, 1994.
- MAHMOOD, N. et al. Depolymerization of lignins and their applications for the preparation of polyols and rigid polyurethane foams : A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 60, p. 317–329, 2016.
- MAHMUD, M. M. et al. Preparation of different polymorphs of cellulose from different acid hydrolysis medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 969–976, 2019.
- MAIA, J. G. S. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 4, p. 269–272, 1998.

MAIA S., J. G.; ANDRADE A., E. H. Data base of the amazon aromatic plants and their essential oils. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 595–622, 2009.

MANIAN, A. P.; PHAM, T.; BECHTOLD, T. Regenerated cellulosic fibers. **Handbook of Properties of Textile and Technical Fibres**, p. 329–343, 2018.

MAR, J. M. et al. Lippia origanoides essential oil: An efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. June 2017, p. 292–297, jan. 2018.

MARISA RIBEIRO, A.; ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F. Microencapsulation of polyphenols - The specific case of the microencapsulation of *Sambucus Nigra* L. extracts - A review. **Trends in Food Science and Technology**, n. February, p. 1–14, 2019.

MAULIDNA et al. Microencapsulation of ginger-based essential oil (*Zingiber cassumunar* roxb) with chitosan and oil palm trunk waste fiber prepared by spray-drying method. **Case Studies in Thermal Engineering**, v. 18, p. 100606, 2020.

MEHYAR, G. F. et al. Stability of Cardamom (*Elettaria Cardamomum*) Essential Oil in Microcapsules Made of Whey Protein Isolate, Guar Gum, and Carrageenan. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 10, p. C1939–C1949, 2014.

MELIKOĞLU, A. Y.; BILEK, S. E.; CESUR, S. Optimum Alkaline Treatment Parameters for the Extraction of Cellulose and Production of Cellulose Nanocrystals from Apple Pomace. **Carbohydrate Polymers**, v. 215, n. March, p. 330–337, 2019.

METSÄMUURONEN, S.; NYSTRÖM, M. Enrichment of  $\alpha$ -lactalbumin from diluted whey with polymeric ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 337, n. 1–2, p. 248–256, 2009.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. D. F.; MARCONCINI, J. M. Procedimentos para Análise Lignocelulósica. **EMBRAPA**, 2010.

NASRI, R. et al. Sardinelle protein isolate as a novel material for oil microencapsulation: Novel alternative for fish by-products valorisation. **Materials Science and Engineering: C**, p. 111164, 2020.

OLIVEIRA, L. M. DE et al. Controlled release of *Licaria puchury-major* essential oil encapsulated in PCL/gelatin-based colloidal systems and membranes. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 7, n. 2, p. 23–29, 2019.

OZKAN, G. et al. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. **Food Chemistry**, v. 272, n. February 2018, p. 494–506, 2019.

PENG, B. et al. Cellulose-based materials in wastewater treatment of petroleum industry. **Green Energy and Environment**, 2019.

PENG, H. et al. Physicochemical characterization of hemicelluloses from bamboo (*Phyllostachys pubescens* Mazel) stem. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 41–50, 2012.

PEREYRA-CASTRO, S. C. et al. Microfluidization and atomization pressure during microencapsulation process: Microstructure, hygroscopicity, dissolution and flow properties. **Lwt**, v. 96, p. 378–385, 2018.

PERRY, R. . et al. **Chemical Engineers' Handbook, 7th ed.** [s.l: s.n.].

PHINICHKA, N.; KAENTHONG, S. Regenerated cellulose from high alpha cellulose pulp of steam-exploded sugarcane bagasse. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 7, n. 1, p. 55–

65, 2018.

PINO, J. A. et al. Composition of the essential oil of piper hispidum sw. from cuba). **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 459–460, 2004.

POLSON, K. A. et al. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 31–38, 2011.

POTZERNHEIM, M. C. L. et al. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 42, p. 25–31, 2012.

POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de Piper coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). v. 16, n. 2, p. 246–251, 2006.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48–68, 2012.

PROPERTIES, C. Acid-insoluble lignin in wood and pulp (Reaffirmation of T 222 om-02 ). 2006.

RAZA, Z. A. et al. Recent developments in chitosan encapsulation of various active ingredients for multifunctional applications. **Carbohydrate Research**, v. 492, p. 108004, 2020.

REHINAN, Z. U.; RASHID, M.; SHAH, W. H. Insoluble dietary fibre components of food legumes as affected by soaking and cooking processes. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 245–249, 2004.

REN, J.-L.; SUN, R.-C. Hemicelluloses. In: **Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels**. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2010. p. 73–130.

REN, J. L. et al. Two-step preparation and thermal characterization of cationic 2-hydroxypropyltrimethylammonium chloride hemicellulose polymers from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 11, p. 2579–2587, 2006.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37–42, 1987.

ROOPAN, S. M. International Journal of Biological Macromolecules An overview of natural renewable bio-polymer lignin towards nano and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 508–514, 2017.

SAHOO, S.; CHAKRABORTI, C. K.; BEHERA, P. K. Development and Evaluation of Gastroretentive Controlled Release Polymeric Suspensions Containing Ciprofloxacin and Carbopol Polymers. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 4, p. 2268–2284, 2012.

SÁNCHEZ PÉREZ, Y. et al. Composición química del aceite esencial de *Piper hispidum* Sw. y actividad antimicrobiana sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson. **Revista de Protección Vegetal**, v. 29, n. 3, p. 185–191, 2014.

SANTOS, A. O. et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204–208, 2008.

SANTOS, M. R. A. DOS et al. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 2, p. 319–324, 2011.

SHAHABI-GHAHFARROKHI, I. et al. Preparation and characterization of nanocellulose from beer

industrial residues using acid hydrolysis/ultrasound. **Fibers and Polymers**, v. 16, n. 3, p. 529–536, 2015.

SHARMA, A. et al. Commercial Application of Cellulose Nano-composites - A review. **Biotechnology Reports**, p. e00316, 2019a.

SHARMA, A. et al. Commercial Application of Cellulose Nano-composites - A review. **Biotechnology Reports**, n. 2018, p. e00316, 2019b.

SHELDON, R. A. et al. Valorization of Biomass: Deriving More Value from Waste. **Science**, v. 337, n. 6095, p. 695–699, 2012.

SHELTAMI, R. M. et al. Extraction of cellulose nanocrystals from mengkuang leaves ( *Pandanus tectorius* ). **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 772–779, 2012.

SHI, X.; LEE, Y. Encapsulation of tributyrin with whey protein isolate (WPI) by spray-drying with a three-fluid nozzle. **Journal of Food Engineering**, v. 281, p. 109992, 2020.

SILVA, L. S. et al. Encapsulation of Piper aduncum and Piper hispidinervum essential oils in gelatin nanoparticles: a possible sustainable control tool of *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 2, p. 685–695, 2019.

SILVA, R. S. et al. Physicochemical properties of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) powders with different carbohydrate biopolymers. **Lwt**, v. 94, n. April, p. 79–86, 2018b.

SIMEONE, M. L. F. et al. Chemical composition of essential oils from ripe and unripe fruits of *Piper amalago* L. var. medium (Jacq.) yunck and *Piper hispidum* Sw.). **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 5, p. 54–58, 2011.

SUMAN, D. S. et al. Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with egg surface morphology and morphometrics using scanning electron microscopy. **Arthropod Structure and Development**, v. 40, n. 5, p. 479–483, 2011.

SUN, C. et al. Middle Jurassic Ginkgo leaves from the Daohugou area , Inner Mongolia , China and their implication for palaeo-CO<sub>2</sub> reconstruction. **Palaeoworld**, v. 27, n. 4, p. 467–481, 2018.

TAJIMA, H. et al. Observation of *in vitro* cellulose synthesis by bacterial cellulose synthase with time-resolved small angle X-ray scattering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 765–777, 2019.

TAMILSELVI, A. et al. Extraction of cellulose from renewable resources and its application in leather finishing. **Journal of Cleaner Production**, 2019.

TAN, S.; ZHONG, C.; LANGRISH, T. Pre-gelation assisted spray drying of whey protein isolates (WPI) for microencapsulation and controlled release. **Lwt**, v. 117, n. September 2019, p. 108625, 2020.

TAPPI. Alpha- , beta- and gamma-cellulose in pulp. **Test Methods T 203 cm-99. Atlanta: Technical Association of the Pulp and Paper Industry**, p. 5–9, 1999.

TAPPI. Solid mineral fuels — Determination of gross calorific value by the bomb calorimetric method and calculation of net calorific value. **TAPPI test methods**, v. 1995, p. 1–173, 2002.

TAPPI 204 CM-97. TAPPI 204 cm-97. **TAPPI-Technical Association of the Pulp and Paper Industry**, 2007.

TARONE, A. G.; CAZARIN, C. B. B.; MAROSTICA JUNIOR, M. R. Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation. **Food Research International**, v. 133, p. 109092, 2020.

- TERRETT, O. M.; DUPREE, P. Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 97–104, 2019.
- THIANGTHAM, S.; RUNT, J.; MANUSPIYA, H. Sulfonation of dialdehyde cellulose extracted from sugarcane bagasse for synergistically enhanced water solubility. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, n. December 2018, p. 314–322, 2019.
- THIS, S. T 223 cm-01. p. 1–5, 2001.
- VYAVAHARE, G. et al. Strategies for crystal violet dye sorption on biochar derived from mango leaves and evaluation of residual dye toxicity. **Journal of Cleaner Production**, v. 207, p. 296–305, 2019.
- WANDREY, C.; BARTKOWIAK, A. . H. S. E. **Encapsulation technologies for active food ingredients and foods processing**. New York: [s.n.].
- WANG, W. et al. All cellulose composites based on cellulose diacetate and nanofibrillated cellulose prepared by alkali treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, n. September 2017, p. 297–304, 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. **World Health Organization Communicable Disease Control, Prevention and Eradication Who Pesticide Evaluation Scheme**, p. 1–41, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Temephos in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers Background document for development of. **World Health Organisation**, p. 1–15, 2009.
- XIAO, B.; SUN, X. F.; SUN, R. C. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicellulose, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. **Polymer Degradation and Stability**, v. 74, p. 307–319, 2001.
- XIAO, Y.; QI, P. X.; WICKHAM, E. D. Interactions, induced by heating, of whey protein isolate (WPI) with sugar beet pectin (SBP) in solution: Comparisons with a dry-state Maillard reaction. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 61–71, 2018.
- YADAV, C.; SAINI, A.; MAJI, P. K. Energy efficient facile extraction process of cellulose nanofibres and their dimensional characterization using light scattering techniques. **Carbohydrate Polymers**, v. 165, p. 276–284, 2017.
- YANG, Y. et al. International Journal of Biological Macromolecules Thermoalkaliphilic laccase treatment for enhanced production of high-value benzaldehyde chemicals from lignin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 200–208, 2019.
- YE, Q.; GEORGES, N.; SELOMULYA, C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, p. 167–179, 2018.
- YIN, X. et al. Cavities spatial distribution confined by microcrystalline cellulose particles determines tablet disintegration patterns. **Powder Technology**, v. 339, p. 717–727, 2018.
- ZHANG, L.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. The formation of – structures in lignin biosynthesis — are there two different pathways ? †. p. 3621–3624, 2003.
- ZHANG, Z. et al. Effect of inlet air drying temperatures on the physicochemical properties and antioxidant activity of whey protein isolate-kale leaves chlorophyll. **Journal of Food Engineering**, v. 245, n. October 2018, p. 149–156, 2019.
- ZHANG, Z. H. et al. Preparation and characterization of whey protein isolate-chlorophyll

microcapsules by spray drying: Effect of WPI ratios on the physicochemical and antioxidant properties. **Journal of Food Engineering**, v. 267, n. September 2019, p. 109729, 2020.

ZHU, L.; TIAN, Y. JUAN. Chemical composition and larvicidal effects of essential oil of *Blumea martiniana* against *Anopheles anthropophagus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 5, p. 371–374, 2011.

ZHU, Y.; LI, Z.; CHEN, J. Key Laboratory of Biomass Chemical Engineering of Ministry of Education , Department of. **Green Energy and Environment**, 2019.