

LUIZA ALVES MENDES

**OTIMIZAÇÃO NO PREPARO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Psidium* PARA APLICAÇÃO LARVICIDA,
HERBICIDA E CITOGENOTÓXICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Renata Pereira Lopes Moreira

Coorientadores: Marcia F. da Silva Ferreira
Róbson Ricardo Teixeira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M538o
2023
Mendes, Luiza Alves, 1992-
Otimização no preparo de complexos de inclusão de óleos essenciais das folhas de *Psidium* para aplicação larvicida, herbicida e citogenotóxica / Luiza Alves Mendes. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (193 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Renata Lopes Moreira Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.696>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Produtos químicos agrícolas - Aplicação. 2. *Psidium*.
3. Essências e óleos essenciais. I. . II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 632.90284


LUIZA ALVES MENDES

**OTIMIZAÇÃO NO PREPARO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Psidium* PARA APLICAÇÃO LARVICIDA,
HERBICIDA E CITOGENOTÓXICA**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de outubro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 LUIZA ALVES MENDES
Data: 06/11/2023 09:20:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Luiza Alves Mendes
Autora

Documento assinado digitalmente
 RENATA PEREIRA LOPES MOREIRA
Data: 06/11/2023 16:40:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Renata Pereira Lopes Moreira
Orientadora

À Simone, Romulo, Tawan, Gerusa e Felipe, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, saúde, pelas oportunidades e todas as coisas que Ele me proporciona. À Ele toda honra e glória;

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica (PPAG) e ao Laboratório de Nanomateriais e Química Ambiental (LaNaQua) pela oportunidade;

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) pela oportunidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro deste trabalho;

À prof.^a Dra. Renata Pereira Lopes Moreira, pela orientação, ensinamentos, por ser uma pessoa tão maravilhosa, que me acolheu, incentivou, inspirou e acreditou em mim. Não posso deixar de escrever que você fez por mim muito mais do que o papel de orientadora, me auxiliando em todo o doutorado, e principalmente no início, orando comigo e literalmente enxugando as minhas lágrimas, e no final, por toda a confiança em mim e por me permitir viver novas oportunidades na docência. Você inspira a todos os seus alunos a serem dedicados, comprometidos, honestos e a trabalhar em equipe. Certamente olhar para trás e ver todo o crescimento do grupo me dá muito orgulho de fazer parte dele. Como você sempre diz: “Uma vez LaNaQua, sempre LaNaQua” e assim será, pois levo para sempre lembranças muito boas que vivi nesse grupo;

À prof.^a Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira, pela coorientação desde 2015, em que tive o privilégio de ser sua orientada. Por me ensinar sobre a escrita científica e me apresentar o universo dos óleos essenciais, por ser tão dedicada e competente em tudo que faz, por me receber no laboratório no final do doutorado, por estar presente em todo tempo e pela confiança em mim. Você é um exemplo que procuro seguir;

Ao prof. Dr. Róbson Ricardo Teixeira, por ser um coorientador muito presente e sempre disponível para ajudar. Tenho muito orgulho de ser sua coorientada, pois você é um excelente profissional e ser humano. Muito obrigada por todos os aprendizados e por me inspirar;

À prof.^a Dra. Milene Miranda Praça-Fontes, pelas contribuições nesse trabalho, disponibilidade em ajudar, pela parceria de sempre, sendo uma inspiração para mim. Obrigada por sua amizade, por todos os conselhos e ensinamentos;

Ao prof. Dr. Tércio da Silva de Souza, por participar da minha formação desde 2015, sendo meu coorientador durante o mestrado e me ensinar sobre os óleos essenciais e por todos os outros aprendizados, sendo uma referência nessa área e um excelente professor. Obrigada pela disponibilidade em sempre ajudar;

À prof.^a Dra. Patricia Fontes Pinheiro, por todos os ensinamentos e amizade. Obrigada pelo seu incentivo para que eu estudasse na UFV e por todos os outros aprendizados durante esses anos de convívio;

Ao prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo pelas contribuições na qualificação que permitiram o melhor desenvolvimento e escrita da tese, por sua experiência com nanomateriais e pelos ensinamentos;

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite e participado desse momento, pois suas experiências e contribuições são de grande importância para o meu crescimento pessoal e profissional;

Ao doutorando Rafael Resende Assis Silva por desde o início me ensinar sobre os complexos de inclusão, pela disponibilidade e excelência em tudo que você faz! Muito obrigada pela parceria e amizade;

À doutoranda Loren Cristina Vasconcelos e a prof.^a Dra. Milene Miranda Praça Fontes, por me auxiliarem tanto nos experimentos com as plantas invasoras. Obrigada pela amizade, por tantos ensinamentos e parceria;

Aos professores Dr. Gustavo Ferreira Martins e Dr. Eugênio Eduardo de Oliveira, que me auxiliaram nos experimentos com *Aedes aegypti*;

Aos graduandos Gabriela Camila Pinto e Gabriel da Silva Souza por auxiliarem em experimentos, pela amizade e apoio;

À minha mãe, Simone (*in memoriam*), e ao meu pai, Romulo, por todo amor, orações, investimento de tempo, financeiro, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a estudar. Vocês são meus maiores exemplos em tudo;

Ao meu marido, Tawan, por todo auxílio desde a graduação, mestrado e doutorado, que sempre participou de tudo, nos experimentos em campo, nas edições de figuras e muito mais. Obrigada por fazer parte desse trabalho, pelo seu amor, cuidado e por não me deixar desanimar! Sem você esse trabalho não seria concluído;

À Gerusa pela amizade, por sempre me incentivar a estudar, me dar muitas orientações e fazer parte da minha vida desde a graduação. Obrigada pela paciência comigo e por me ensinar tantas coisas;

À Felipe, Mari e vó Evanilde (*in memoriam*), por estarem presentes na minha vida, pelo incentivo, pelo amor e por acreditarem em mim;

Aos meus sogros, Paulo e Miriam, pelo incentivo, orientações e orações;

Às minhas amigas Josiane, Gabriella, Gilza, Thays, Mariana, Thalita e Alessandra pelo apoio e incentivo;

Aos amigos do laboratório LaNaQua (UFV): Luana, Camilla, Aline, Gustavo, Arthur, Lucas, Jessica, Guilherme, Tiago, Stefania, Guilherme Bousada, Kleryton, Gabriela, Gabriel, Gabriel Souza, Fijamo, Iterlandes, Noemí e Gessica;

Aos amigos do laboratório de Genética e Melhoramento (UFES): Gilza, Jônatas, Vinícius, Ramon, Thais, Layra, Matheus, Diego, Gabriel e Soninha;

A todos que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

MENDES, Luiza A., D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Otimização no preparo de complexos de inclusão de óleos essenciais das folhas de *Psidium* para aplicação larvicida, herbicida e citogenotóxica.** Orientadora: Renata Pereira Lopes Moreira. Coorientadores: Marcia Flores da Silva Ferreira e Róbson Ricardo Teixeira.

O mosquito *Aedes aegypti* é um transmissor de doenças como a dengue e outras arboviroses, que impactam a saúde de muitas pessoas ao redor do mundo. Uma outra preocupação de relevância global é a agricultura sustentável, pois os herbicidas sintéticos causam impactos ambientais e geram resistência de plantas invasoras devido ao seu uso excessivo. Uma solução comum a essas duas problemáticas é o uso dos óleos essenciais (OEs), como uma alternativa sustentável e ambientalmente amigável. Os OEs apresentam atividades biológicas relacionadas a sua composição química e podem ser obtidos através das folhas de plantas, como do gênero *Psidium* (Myrtaceae). Destacam-se as espécies *Psidium guajava* (cultivar Século XXI - SEC), *Psidium cattleianum* (CAT) e *Psidium gaudichaudianum* (GAU), que possuem nos OEs o β -cariofileno (β -CAR) como seu principal composto majoritário. Apesar dos OEs serem promissores para muitas aplicações, algumas características físico-químicas podem limitar o seu uso em ambientes aquosos e quando expostos ao ar livre. Por isso, para ampliar as aplicações dos OEs, foram utilizados métodos de proteção para formar complexos de inclusão (CIs). Para isso, foi utilizada a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), que é derivada do amido. Os métodos físicos utilizados foram maceração (KN) e liofilização (FD), sendo que o mais eficiente para formar CI com o OE da SEC foi o KN. Tendo em vista que os OEs das espécies de *Psidium* possuem composição química similar, o método KN foi selecionado como o mais promissor. Utilizando o OE da CAT e o método KN, um delineamento composto central foi realizado a fim de otimizar o preparo dos CIs. A eficiência de complexação (EC) obtida para o CI da CAT foi de 94,9%. Considerando o método otimizado, o CI da GAU foi obtido nas condições determinadas: proporção molar do OE e HP β CD de 1:1 e tempo de maceração de 35 min. A EC foi de 91,5 e 83,9%, para o OE da GAU e o β -CAR, respectivamente. Os CIs obtidos para SEC, CAT, GAU e β -CAR foram caracterizados por espectroscopia na região do UV-Vis, FTIR, TGA, DLS e XRD para comprovar a

complexação com a HP β CD. Para o CI da CAT foi realizada a liberação controlada com solução aquosa de DMSO 1% (v v⁻¹) e acetonitrila. A liberação do OE da CAT em água foi lenta e simulou as condições do experimento com atividade larvicida em *Aedes aegypti*. Em relação a essa aplicação, os OEs da SEC e CAT em DMSO apresentaram CL₅₀ de 51,49 e 81,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O OE da SEC foi mais tóxico para as larvas de *A. aegypti* do que a CAT. Porém, o rendimento de extração do OE da CAT (0,79% m m⁻¹) foi mais que o dobro comparado à SEC (0,30% m m⁻¹). A CL₅₀ em larvas de *A. aegypti* para o CI da SEC foi 77,54 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (KN) e a atividade larvicida para o método FD ocorreu somente com concentrações acima de 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A CL₅₀ para o CI otimizado da CAT foi de 134,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sendo assim, os CIs são menos eficientes para matar as larvas de *A. aegypti* do que o OE em DMSO. No entanto, ao comparar a eficiência dos CIs com o OE sem DMSO, todos os CIs tiveram atividade larvicida superior. Isso ocorre porque o OE não complexado é pouco eficiente para matar as larvas, pois é insolúvel em água e facilmente degradado por condições ambientais. Em relação ao OE da GAU, o β -CAR e seus respectivos complexos foram utilizados quanto a atividade herbicida em *Bidens pilosa* e *Lolium multiflorum* nas concentrações de 187,5 a 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, avaliando as variáveis germinação, crescimento radicular e crescimento da parte aérea. De forma geral, o CI GAU foi mais tóxico que o CI do β -CAR. Na maioria das concentrações avaliadas, o OE e o β -CAR apresentaram toxicidade igual ou maior que os respectivos CIs. A citogenotoxicidade foi avaliada em células meristemáticas da raiz da planta modelo *Lactuca sativa*. Verificou-se a redução do índice mitótico e o aumento de anormalidades cromossômicas, evidenciando ação aneugênica e clastogênica do OE da GAU, do β -CAR e dos CIs. De forma geral, os resultados obtidos para todos os CIs produzidos evidenciaram que estes possuem potencial para serem explorados comercialmente, visto que foi obtido um produto sólido, com alta estabilidade térmica e que mantém a constituição química do OE mais estável. Além disso, houve sucesso nas aplicações propostas dos CIs produzidos.

Palavras-chave: Goiabeira. Araçá. Produto natural. Encapsulamento. Planejamento experimental. Dengue. Erva daninha.

ABSTRACT

MENDES, Luiza A., D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023. **Optimization in the preparation of complexes including essential oils from *Psidium* leaves for larvicidal, herbicide and cytogenotoxic application.** Adviser: Renata Pereira Lopes Moreira. Co-advisers: Marcia Flores da Silva Ferreira and Róbson Ricardo Teixeira.

The *Aedes aegypti* mosquito is a vector for diseases such as dengue and other arboviruses, impacting the health of many people around the world. Another globally significant concern is sustainable agriculture, as synthetic herbicides cause environmental impacts and lead to resistance in invasive plants due to their excessive use. A common solution to these two issues is the use of essential oils (EOs) as a sustainable and environmentally friendly alternative. EOs exhibit biological activities linked to their chemical composition and can be obtained from plant leaves, such as those from the *Psidium* genus (Myrtaceae). Notable species include *Psidium guajava* (Século XXI cultivar - SEC), *Psidium cattleianum* (CAT), and *Psidium gaudichaudianum* (GAU), which feature β -caryophyllene (β -CAR) as their primary major compound. Despite the promising applications of EOs, some physicochemical characteristics can limit their use in aqueous environments and when exposed to outdoor conditions. Therefore, to expand the applications of EOs, protection methods were employed to form inclusion complexes (ICs). In this regard, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD), derived from starch, was used. Physical methods used included kneading (KN) and freeze-drying (FD), with KN proving to be the most efficient in forming ICs with SEC EO. Given that the EOs from *Psidium* species share a similar chemical composition, the KN method was selected as the most promising. Using CAT EO and the KN method, a central composite design was conducted to optimize CI preparation. The complexation efficiency (CE) obtained for CAT IC was 94.9%. Considering the optimized method, the GAU IC was obtained under determined conditions: using a molar ratio of EO to HP β CD of 1:1 and macerating for a total of 35 minutes. The CE was 91.5% and 83.9% for GAU EO and β -caryophyllene (β -CAR), respectively. The ICs obtained for SEC, CAT, GAU, and β -CAR were characterized using UV-Vis spectroscopy, FTIR, TGA, DLS, and XRD to confirm complexation with HP β CD. For the CAT IC, controlled release was performed using a 1% (v v⁻¹) aqueous solution of DMSO and acetonitrile. The release of the CAT EO in water was slow and simulated the conditions of the larvicidal activity experiment on *Aedes aegypti*.

Concerning this application, the EOs from SEC and CAT in DMSO exhibited LC₅₀ values of 51.49 and 81.73 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The SEC EO was more toxic to *A. aegypti* larvae than CAT. However, the extraction yield of CAT EO (0.79% m m⁻¹) was more than twice that of SEC (0.30% m m⁻¹). The LC₅₀ for *A. aegypti* larvae for the SEC IC was 77.54 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (KN), and larvicidal activity for the FD method occurred only at concentrations above 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The optimized LC₅₀ for the CAT IC was 134.44 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Therefore, the ICs are less efficient at killing *A. aegypti* larvae compared to the EO in DMSO. However, when comparing the efficiency of ICs with EO without DMSO, all ICs showed superior larvicidal activity. This occurs because the non-complexed EO is inefficient in killing the larvae, as it is insoluble in water and easily degraded by environmental conditions. Regarding the GAU EO, β -CAR and their respective complexes were tested for herbicidal activity on *Bidens pilosa* and *Lolium multiflorum* at concentrations ranging from 187.5 to 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, assessing germination, root growth, and aboveground growth variables. Overall, the GAU IC was more toxic than the β -CAR IC. At most evaluated concentrations, the EO and β -CAR exhibited equal or greater toxicity than their respective ICs. Cytogenotoxicity was assessed in meristematic root cells of the model plant *Lactuca sativa*. A reduction in the mitotic index and an increase in chromosomal abnormalities were observed, indicating aneugenic and clastogenic effects of the GAU EO, β -CAR, and ICs. In general, the results obtained for all produced ICs demonstrated their potential for commercial exploitation, given that a solid product was obtained with high thermal stability, maintaining the EO's chemical composition more stable. Additionally, the proposed applications of the produced ICs were successful.

Keywords: Guava tree. Araçá. Natural product. Encapsulation. Experimental design. Dengue. Weed.

LISTA DE SIGLAS

A _{rel}	Área relativa do composto no cromatograma
<i>A. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
AC	Alterações cromossômicas
AN	Alterações nucleares
ANOVA	Análise de variância
ATR	Reflectância total atenuada
β -CAR	Beta-cariofileno
β CD	Beta-ciclodextrina
CA	Crescimento aéreo
CAT	<i>Psidium cattleyanum</i>
CD	Ciclodextrina
CGTase	Ciclodextrina glicosiltransferase
CI	Complexo de inclusão
CL ₅₀	Concentração letal média necessária para matar 50% da população
CL ₉₀	Concentração letal média necessária para matar 90% da população
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CR	Crescimento radicular
DBC	Delineamento em blocos casualizados
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Eficiência de complexação
EC _c	Eficiência de complexação corrigida
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FD	Liofilização
FPP	Farnesil difosfato
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

G	Germinação
GAU	<i>Psidium gaudichaudianum</i>
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GGPP	Geranilgeranil difosfato
GPP	Geranil difosfato
HP β CD	2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina
IM	Índice mitótico
IPP	Isopentenil difosfato
IR	Índice de retenção
K	Constante de estabilidade
KN	Maceração
L4	Larvas de 4 ^o instar
MEP	2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato
MMS	Metanossulfonato de metila
MVA	Mevalonato
MH	Monoterpeno hidrocarboneto
MO	Monoterpeno oxigenado
OE	Óleo essencial
OE _{ext}	Óleo essencial extraído do complexo de inclusão
OE _{adic}	Óleo essencial adicionado inicialmente no complexo de inclusão
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Coeficiente de partição
P _{CI}	Perda de massa do complexo de inclusão
P _{HPβCD}	Perda de massa da HP β CD
<i>P. guajava</i>	<i>Psidium guajava</i>
<i>P. cattleyanum</i>	<i>Psidium cattleyanum</i>
<i>P. gaudichaudianum</i>	<i>Psidium gaudichaudianum</i>
PDI	Índice de polidispersão
PIB	Produto interno bruto
PZ	Potencial Zeta

RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde
RM β CD	Metil-beta-ciclodextrina randomizada
SB β CD	Sulfo-butil-éter-beta-ciclodextrina
SEC	Século XXI
SH	Sesquiterpeno hidrocarboneto
SO	Sesquiterpeno oxigenado
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TGA	Análise termogravimétrica
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UV-Vis	Espectroscopia na região do ultravioleta e visível
V	Volume molecular
XRD	Difração de raios X
2,4-DNFH	2,4-Dinitrofenilhidrazina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2.	OBJETIVO.....	19
2.1.	Objetivo geral.....	19
2.2.	Objetivos específicos.....	19
CAPÍTULO 1. Revisão da literatura.....		20
1.1.	Goiabeira.....	21
1.2.	Araçá.....	22
1.3.	Óleo essencial.....	24
1.4.	Encapsulamento.....	28
1.5.	Química supramolecular.....	31
1.6.	Ciclodextrina.....	31
1.6.1.	2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina.....	34
1.7.	Técnicas de preparação dos complexos de inclusão.....	36
1.7.1.	Complexo de inclusão com secagem por liofilização (<i>freeze-drying</i>).....	37
1.7.2.	Complexo de inclusão com maceração (<i>kneading</i>).....	38
1.8.	Técnicas analíticas de caracterização dos complexos de inclusão.....	39
1.9.	Atividade larvicida dos óleos essenciais em <i>Aedes aegypti</i>	42
1.9.1.	<i>Aedes aegypti</i>	42
1.9.2.	Atividade larvicida dos óleos essenciais.....	45
1.10.	Ciclo celular e alterações cromossômicas.....	46
1.10.1.	Plantas invasoras.....	49
CAPÍTULO 2. Preparação de complexos de inclusão do óleo essencial de <i>Psidium guajava</i> L. em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina pelos métodos de liofilização e maceração para aplicação como larvicida em <i>Aedes aegypti</i> L.....		51
RESUMO.....		52
1.	INTRODUÇÃO.....	53
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.1.	Padrões e reagentes.....	54
2.2.	Coleta e extração do óleo essencial das folhas de <i>P. guajava</i>	54
2.3.	Determinação da densidade absoluta e rendimento da extração do óleo essencial.....	55
2.4.	Perfil cromatográfico do óleo essencial.....	56
2.5.	Teste de classificação de aldeídos e/ou cetonas no óleo essencial.....	57
2.6.	Preparação dos complexos de inclusão.....	57
2.6.1.	Complexo de inclusão com secagem por liofilização (<i>freeze-drying</i>).....	57
2.6.2.	Complexo de inclusão com maceração (<i>kneading</i>).....	58
2.7.	Caracterização dos complexos de inclusão.....	58
2.7.1.	Curva analítica.....	58
2.7.2.	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	59

2.7.3.	Análise termogravimétrica.....	60
2.7.4.	Análise de tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta por DLS...	60
2.7.5.	Difratometria de raios X.....	60
2.7.6.	Microscopia eletrônica de transmissão.....	61
2.8.	Atividade larvicida.....	61
2.9.	Análise estatística.....	62
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
3.1.	Caracterização dos complexos de inclusão.....	66
3.1.1.	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	66
3.1.2.	Análise termogravimétrica.....	68
3.1.3.	Análise de tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta por DLS...	71
3.1.4.	Difratometria de raios X.....	73
3.1.5.	Curva analítica e eficiência de complexação.....	74
3.1.6.	Microscopia eletrônica de transmissão.....	76
3.2.	Atividade larvicida.....	78
4.	CONCLUSÃO.....	80
	REFERÊNCIAS.....	80

CAPÍTULO 3. Otimização no preparo do complexo de inclusão do óleo essencial de <i>Psidium cattleyanum</i> S. em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina pelo delineamento composto central rotacional para aplicação como larvicida em <i>Aedes aegypti</i> L....	85
RESUMO.....	86
1. INTRODUÇÃO.....	87
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	88
2.1. Padrões e reagentes.....	88
2.2. Coleta e extração do óleo essencial das folhas de <i>P. cattleyanum</i>	88
2.3. Determinação da densidade absoluta e rendimento da extração do óleo essencial.....	89
2.4. Perfil cromatográfico do óleo essencial.....	90
2.5. Preparação dos complexos de inclusão.....	91
2.6. Caracterização dos complexos de inclusão.....	93
2.6.1. Curva analítica.....	93
2.6.2. Análise termogravimétrica.....	94
2.6.3. Avaliação da estabilidade térmica do complexo de inclusão.....	94
2.6.4. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	94
2.6.5. Análise de tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta por DLS...	95
2.6.6. Difratometria de raios X.....	95
2.7. Liberação controlada.....	95
2.8. Atividade larvicida.....	96
2.9. Análise estatística.....	97
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
3.1. Otimização do preparo de complexos de inclusão.....	100
3.2. Eficiência de complexação.....	102
3.3. Caracterização dos complexos de inclusão.....	104

3.3.1.	Estabilidade térmica.....	104
3.3.2.	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	108
3.3.3.	Análise de tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta por DLS...	110
3.3.4.	Difratometria de raios X.....	111
3.4.	Liberção controlada.....	112
3.5.	Atividade larvica.....	115
4.	CONCLUSÃO.....	117
	REFERÊNCIAS.....	117

CAPÍTULO 4. Atividade herbica e citogenotóxica de complexos de inclusão do óleo essencial das folhas de <i>Psidium gaudichaudianum</i> e β -cariofileno em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.....	123
---	-----

RESUMO.....	124
1. INTRODUÇÃO.....	126
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	128
2.1. Padrões e reagentes.....	128
2.2. Coleta e extração do óleo essencial das folhas de <i>P. gaudichaudianum</i> ..	128
2.3. Determinação da densidade absoluta e rendimento da extração do óleo essencial.....	129
2.4. Perfil cromatográfico do óleo essencial.....	129
2.5. Preparação dos complexos de inclusão.....	131
2.6. Caracterização dos complexos de inclusão.....	131
2.6.1. Curva analítica.....	131
2.6.2. Análise termogravimétrica.....	132
2.6.3. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	133
2.7. Avaliação da atividade herbica.....	133
2.8. Análise de citotoxicidade.....	134
2.9. Análise estatística.....	135
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	135
3.1. Preparo dos complexos de inclusão e caracterizações.....	138
3.2. Atividade herbica.....	147
3.3. Atividade citogenotóxica.....	157
4. CONCLUSÃO.....	162
REFERÊNCIAS.....	163

3. CONCLUSÃO GERAL.....	169
4. REFERÊNCIAS.....	170
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	182
6. APÊNDICE.....	183

1. INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Psidium guajava* L., conhecida popularmente como goiabeira, pertence à família Myrtaceae e é a planta mais relevante dentro do seu gênero (SILVA *et al.*, 2021). Isso porque *P. guajava* é uma árvore frutífera amplamente cultivada pelo mundo, possuindo facilidade de adaptação a climas tropicais e subtropicais. Além da importância comercial da goiabeira, esta possui ação fitoterápica comprovada, pois está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS) (MARMITT *et al.*, 2015). Outra potencialidade de aplicação da *P. guajava* se deve a presença de óleo essencial (OE), pois ele contém a composição química responsável por atividades biológicas, como: larvicida, inseticida, fitotóxica, citogenotóxica, entre outras (LIMA *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2022; VASCONCELOS *et al.*, 2021). Uma característica morfológica interessante e marcante de espécies da família Myrtaceae é a presença de plantas com estruturas produtoras de OEs (PADOVAN *et al.*, 2014).

Os OEs são produtos do metabolismo secundário de plantas, os quais desempenham importante papel ecológico. Podem ser obtidos a partir de flor, erva, broto, folha, fruta, galho, casca, semente, rizoma e raiz (ASBAHANI *et al.*, 2015). Neste trabalho os OEs foram obtidos das folhas, que é o mais interessante do ponto de vista econômico, pois durante a produção da *P. guajava* sucessivas podas periódicas são realizadas nas árvores. Com isso, geralmente, grande quantidade de material vegetal é desperdiçada (BATISTA *et al.*, 2015). Desta forma, aproveitar um material que seria descartado na natureza e agregar valor ao obter os OEs se torna relevante.

Todas as plantas do gênero *Psidium* que não são da espécie *P. guajava* são popularmente conhecidas como araçá. A *Psidium cattleianum* S. é uma delas, que pode ser considerada a mais amplamente estudada ao longo dos anos (SILVA *et al.*, 2021). Isso pode ser atribuído a *P. cattleianum* conter frutos com qualidade de interesse comercial, além de possuir importância na indústria farmacêutica, pois apresenta atividade antioxidante, antifúngica e antimicrobiana (CASTRO *et al.*, 2015; MEDINA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2007; SCUR *et al.*, 2016). Outras espécies, como a *Psidium gaudichaudianum* P. & F., ainda são pouco exploradas, o que representa uma oportunidade de conhecer, desenvolver e potencializar as aplicações dessa planta. Uma vantagem da obtenção de OEs utilizando as araçás ao invés das

goiabeiras é que, de forma geral, estas possuem maior rendimento de OE foliar (MENDES *et al.*, 2017, 2023). Comumente, os OEs de *Psidium* apresentam majoritariamente compostos de natureza sesquiterpênica, sendo o β -cariofileno o principal deles. Logo, ao utilizar o β -cariofileno com a mesma finalidade do OE de *Psidium*, pode-se verificar se ocorre sinergismo dos compostos ou se o β -cariofileno é o mais importante.

Dentre as aplicações dos OEs de *Psidium*, citadas anteriormente, destaque é dado a atividade larvicida em *Aedes aegypti*, além de herbicida, ainda não relatada na literatura, e citogenotóxica, que foram alvo deste trabalho. O *A. aegypti* é um vetor de arbovírus, como a dengue, e a principal estratégia para controlar a propagação de larvas e mosquitos são produtos químicos sintéticos como os piretroides (YANG *et al.*, 2020). Porém, apesar da sua eficácia no combate ao *A. aegypti*, estudos mostram que seu uso contínuo tem gerado insetos resistentes, sendo necessários o uso de métodos alternativos, como a utilização de OEs (SMITH; KASAI; SCOTT, 2016). Outra aplicação relevante dos OEs ocorre em plantas invasoras que crescem de forma espontânea e indesejada em plantações de milho e trigo, por exemplo, causando perda da produtividade da cultura e prejuízo econômico (EL-ALAM *et al.*, 2020; PAINI *et al.*, 2016).

Dessa forma, os OEs possuem múltiplas aplicações biológicas, porém apesar da sua eficácia *in vitro*, estes possuem solubilidade aquosa limitada e suscetibilidade à degradação quando expostos a fatores ambientais (MOSSA, 2016). Com isso, os OEs não podem ser aplicados na prática, como por exemplo em possíveis criadouros de larvas ou em plantações agrícolas, pois não se solubilizam em água e volatilizam facilmente. Dessa forma, métodos para proteger os OEs desses fatores externos têm sido desenvolvidos como forma de ampliar as suas aplicações e gerar interesse na sua obtenção à nível industrial. Estes métodos vão desde formulações de emulsões, cápsulas até complexos de inclusão. Os complexos de inclusão com oligossacarídeos, como a 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP β CD), apresentam vantagens em relação aos outros métodos, pois podem ser biodegradáveis, são solúveis em água e não necessitam da utilização de surfactantes para serem produzidos.

Diante do que foi apresentado e considerando as potencialidades dos OEs das espécies de *Psidium*, o objetivo inicial deste trabalho foi obter os OEs foliares de *P. guajava*, *P. cattleyanum* e *P. gaudichaudianum*, além do β -cariofileno. A partir deles, produzir complexos de inclusão com alta eficiência de complexação e utilizar técnicas

analíticas para confirmar que eles foram preparados corretamente. Por fim, aplicá-los de forma eficiente em larvas de *A. aegypti* e em plantas invasoras.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Obter complexos de inclusão (CIs) dos óleos essenciais (OEs) das folhas das espécies *P. guajava*, *P. cattleyanum*, *P. gaudichaudianum* e β -cariofileno em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) e avaliar a atividade larvicida em *A. aegypti*, herbicida em plantas invasoras e citogenotóxica em planta modelo.

2.2. Objetivos específicos

Identificar e quantificar os compostos químicos dos OEs das folhas da cultivar Século XXI da *P. guajava*, *P. cattleyanum*, *P. gaudichaudianum* e β -cariofileno por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia a gás com detector de ionização de chama (GC-FID).

Estudar a variabilidade quali e semiquantitativa da composição química dos OEs.

Obter o CI do OE da *P. guajava* em HP β CD por meio de dois métodos físicos: liofilização e maceração. Avaliar o melhor método de preparo dos CIs para os OEs de *Psidium* e otimizá-lo por meio do delineamento composto central rotacional.

Utilizar técnicas analíticas para confirmar a complexação e caracterizar o CI obtido (UV-Vis, FTIR, TGA, DLS, XRD e TEM).

Verificar a liberação do OE de *P. cattleyanum* complexado por meio de uma membrana de diálise nos meios: solução aquosa com DMSO e em acetonitrila.

Avaliar a atividade larvicida dos OEs de *P. guajava* e *P. cattleyanum* dos CIs em *A. aegypti*.

Avaliar a atividade herbicida do OE de *P. gaudichaudianum* e β -cariofileno em plantas invasoras *Lolium multiflorum* e *Bidens pilosa* e citogenotóxica em células meristemáticas da raiz da planta modelo *Lactuca sativa*.

CAPÍTULO 1

Revisão da literatura

1.1. Goiabeira

As goiabeiras (*Psidium guajava* Linnaeus) pertencem à família Myrtaceae, que compreende cerca de 370 gêneros e 14000 espécies, que se distribuem predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (“WCSP”, 2023). As goiabeiras são classificadas como árvores de tamanho médio, perenes e frutíferas (Fig. 1). Suas folhas apresentam cerca de 20 cm de comprimento, com pecíolo curto e nervuras na parte inferior. Possuem flores hermafroditas e geralmente brancas (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006). O fruto da goiabeira é constituído por casca, polpa e semente.



Figura 1. Cultivar Século XXI da espécie *Psidium guajava*.

Fonte: O autor.

O Brasil está entre os principais produtores mundiais de goiaba e a maior parte da produção do país é destinada à indústria de alimentos para produzir doces, sucos, geleias e polpa congelada (VITTI; LIMA; MARTINES FILHO, 2020). *Psidium* é originário da palavra “psídion”, que significa morder, em referência ao sabor agradável dos frutos (FRANZON *et al.*, 2009). Além de ser rica em antioxidantes e vitaminas, a goiabeira é considerada uma planta medicinal, contribuindo com o tratamento de diversas doenças: distúrbios respiratórios e gastrointestinais, anti-inflamatório, antidiarreico, anti-hipertensivo, entre outras (BARBALHO *et al.*, 2012; JOSEPH,

2011). A ação fitoterápica da planta pode ser atribuída à presença dos compostos biologicamente ativos.

No entanto, para utilizar as plantas de forma mais eficiente é imprescindível estudá-las de forma aprofundada dentro do reino vegetal. Deve-se considerar que, dentro de uma espécie de planta, existem grandes quantidades de variedades ou cultivares. Cada uma delas possui características únicas, pois em toda a estrutura da planta a composição química dos diferentes tecidos é variável para cada cultivar. Alguns fatores contribuem para essa diferenciação, podendo ser genéticos, ambientais, estágio de desenvolvimento, tipo de tecido e os tratamentos pré e pós-colheita da planta (KÜLHEIM *et al.*, 2015; MORAIS, 2009). Todavia, o controle genético parece ser de longe a fonte dominante de variação dentro de uma espécie (MANGANARIS *et al.*, 2018). Assim, a genética da planta deve ser estudada, visto que cada cultivar terá particularidades que a distingue das demais. Com isso, é possível direcionar o uso das plantas de acordo com as maiores concentrações dos princípios ativos e com outras características de interesse dos produtores, como produtividade e resistência.

Ao estudar a espécie *Psidium guajava* verifica-se a existência de muitas cultivares registradas. Porém, as mais plantadas no Brasil, segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), são: Paluma, Pedro Sato, Rica, Século XXI, variações da Cortibel (Estado do Espírito Santo), Tailandesa, Ogawa, Sassaoka e Kumagai (FLORI, 2016). Neste trabalho foi utilizada a variedade Século XXI.

1.2. Araçá

Psidium cattleianum Sabine é uma planta que pertence à família Myrtaceae e é conhecida popularmente como araçazeiro, produzindo frutos denominados como goiaba morango ou araçá (Fig. 2) (CASTRO *et al.*, 2015). Essa espécie é nativa do Brasil, podendo ser encontrada tipicamente nos estados da Bahia ao Rio Grande do Sul (PEREIRA *et al.*, 2018). No entanto, *P. cattleianum* se naturalizou em locais como o Havaí e muitas ilhas do Caribe, podendo assim ser encontrada pelo mundo em regiões de clima tropical, como América do Sul e América Central (PATEL, 2012).

P. cattleianum é uma árvore ou arbusto frutífero de pequeno porte, cujos frutos são ricos em vitamina C, com casca de coloração geralmente amarela ou vermelha, possuem 2,2 a 5 cm de diâmetro com polpa branca e numerosas sementes (PEREIRA

et al., 2018). Suas folhas são perenes, brilhantes e resistentes (PATEL, 2012). Essa espécie possui importância comercial atribuída aos seus frutos utilizados na indústria alimentícia (SANTOS *et al.*, 2007). Além disso, *P. cattleianum* possui importância na indústria farmacêutica, pois apresenta atividade antioxidante, antifúngica e antimicrobiana (CASTRO *et al.*, 2015; MEDINA *et al.*, 2011; SCUR *et al.*, 2016).



Figura 2. *Psidium cattleianum*.

Fonte: O autor.

Psidium gaudichaudianum Proença & Faria é uma planta que pertence à família Myrtaceae e é conhecida como araçá, assim como a *P. cattleianum* (Fig. 3). *P. gaudichaudianum* é uma espécie nativa do Brasil pouco conhecida (SILVA *et al.*, 2021). O estudo dessas plantas é imprescindível para o desenvolvimento da espécie e seu uso sustentável. Além disso, as espécies de araçá têm uma quantidade de OE foliar superior as goiabeiras, o que as torna mais viável economicamente para essa finalidade (MENDES *et al.*, 2017, 2022, 2023).

Uma das grandes vantagens da utilização de espécies de *Psidium* é sua adaptabilidade a locais sob condições de estresse abiótico, incluindo escassez de água e temperaturas extremas (MEDINA *et al.*, 2011). Apesar disso, existem muitas espécies de *Psidium* ainda pouco exploradas em escala comercial e, muitas das vezes, a produção é pequena e limitada a determinada região, como é o caso da *P. cattleianum* e *P. gaudichaudianum* (FRANZON *et al.*, 2009). No entanto, os frutos de *P. cattleianum* são considerados os melhores entre as espécies de araçazeiro

(VIEIRA *et al.*, 2006). Dessa forma, seu desenvolvimento e exploração contribuem para a expansão da cultura e descoberta de novas aplicações.



Figura 3. *Psidium gaudichaudianum*.

Fonte: O autor.

1.3. Óleo essencial

Ao longo da história da humanidade há vários registros da utilização de plantas aromáticas em atividades, como: cerimônias e adornos religiosos; formulação de remédios; insumos naturais para as indústrias de perfumaria e química (SANGWAN *et al.*, 2001). A utilização de plantas e de seus derivados com ação repelente e inseticida é tão antiga quanto a civilização humana, com relatos milenares no mundo todo, como na China, Índia e no Tibete (BARROS; FEITOSA, 2019). A quantidade de plantas aromáticas sendo utilizadas vem aumentando ao longo dos anos, como consequência do desenvolvimento agrícola e dos recursos genéticos para o cultivo comercial (CHRISTAKI *et al.*, 2020; GIANNENAS *et al.*, 2020).

As goiabeiras são árvores aromáticas e a partir de suas folhas é possível obter o OE. Os OEs são produzidos e armazenados nas plantas em estruturas secretoras, chamadas de tricomas glandulares (BISWAS *et al.*, 2009). Os OEs fazem parte do metabolismo secundário das plantas, contribuindo para a sua proteção, uma vez que atraem polinizadores e dispersam predadores devido à sua volatilidade e composição química (KNAAK; FIUZA, 2010). Os metabólitos primários são fundamentais à manutenção das funções vitais da planta, enquanto os metabólitos secundários são

compostos de distribuição restrita, sem função evidente na manutenção do ciclo vital da planta (BARROS; FEITOSA, 2019). No entanto, o OE possui importância ambiental para a planta e essa propriedade desperta interesse no estudo dos seus compostos químicos. Além disso, os OEs e seus constituintes são considerados um dos bioativos naturais mais importantes das plantas (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2018).

Os OEs são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos na maioria das vezes por mono e sesquiterpenos. Por serem formados majoritariamente por hidrocarbonetos, possuindo natureza hidrofóbica e densidade geralmente menor que a da água, os OEs são separados da fase aquosa por decantação. Os OEs podem ser biossintetizados em diferentes órgãos vegetais, como: flor, erva, broto, folha, fruta, galho, casca, semente, rizoma e raiz (ASBAHANI *et al.*, 2015).

Os constituintes comumente encontrados nos extratos vegetais ou OEs são derivados, principalmente da via biossintética de ácidos graxos, fenilpropanoides ou isoprenoides (DAVIET; SCHALK, 2010). Este último da origem a maior classe de metabólitos secundários das plantas, os terpenos, que exibem uma ampla diversidade de estruturas e propriedades biológicas (DAVIET; SCHALK, 2010).

Os terpenos são derivados da condensação de duas unidades de isopreno, que possuem cinco carbonos: isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) (BANDEIRA *et al.*, 2011). Existem duas vias que levam a esses precursores: mevalonato (MVA) e 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), ambos com esqueleto isoprênico (TRAPP; CROTEAU, 2001) (Fig. 4). A síntese do IPP ocorre a partir do acetil-CoA, que forma o intermediário MVA (LANGE *et al.*, 2000). A via do MVA é encontrada em fungos, animais e no citosol das plantas, enquanto a rota do MEP é usada por bactérias e em plastídeos vegetais (DAVIET; SCHALK, 2010; LANGE *et al.*, 2000). O IPP e DMAPP podem se condensar dando origem ao geranyl difosfato (GPP), que possui 10 carbonos e é precursor da síntese dos monoterpenos (C₁₀). Através do GPP, novas condensações com essas unidades isoprênicas podem ocorrer dando origem ao farnesil difosfato (FPP), que possui 15 carbonos e é um precursor dos sesquiterpenos (C₁₅) (HARADA; MISAWA, 2009). A adição de outra molécula de IPP forma o geranylgeranyl difosfato (GGPP), que contém 20 carbonos e é precursor dos diterpenos (C₂₀). Por fim, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀), respectivamente. Os terpenos que possuem apenas carbono e hidrogênio podem ser classificados como hidrocarbonetos. Enquanto os que possuem

o oxigênio, além do carbono e hidrogênio, podem ser chamados de hidrocarbonetos oxigenados.

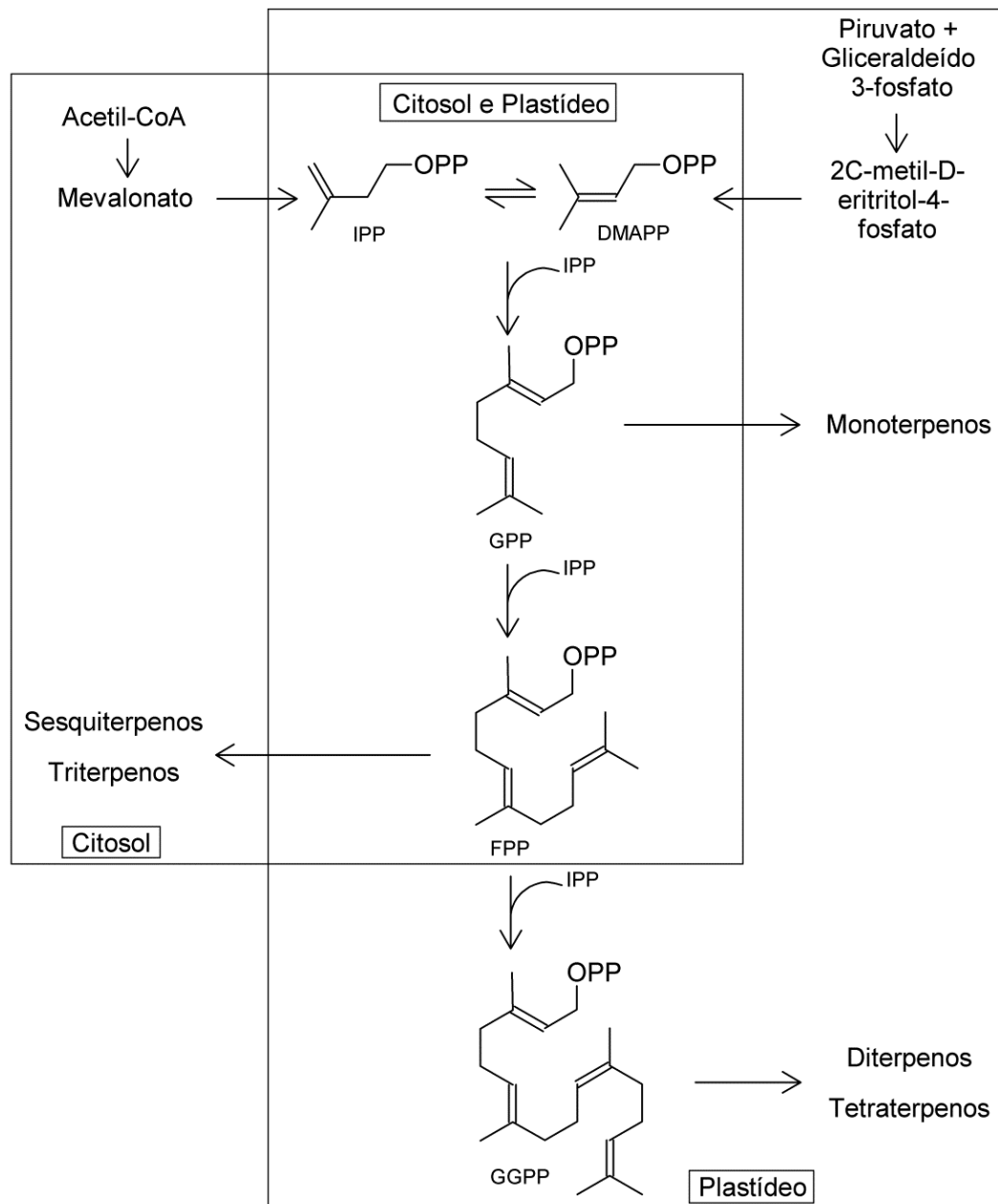


Figura 4. Via de síntese de terpenos em plantas.

Fonte: Adaptado de Trapp e Croteau (2001).

Ao avaliar os OEs das cultivares dentro de uma espécie, é possível observar variação intraespecífica na composição química. Mendes *et al.* (2018) ao estudarem a composição química dos OEs das folhas de 21 genótipos de goiabeiras, verificaram variações quali e quantitativas. Variações qualitativas podem ocorrer como consequência de um redirecionamento da via metabólica para produção de diferentes compostos dependendo da necessidade da planta. Dessa forma, sempre que

possível, é importante fazer a distinção do genótipo ou cultivar que está sendo utilizada, contribuindo para uma melhor comparação de resultados com outros trabalhos. Haja vista que a composição intraespecífica varia significativamente.

Diversos métodos podem ser realizados para extrair os OEs, mas geralmente é utilizada a hidrodestilação. Para o emprego dessa técnica é necessário apenas um aparelho Clevenger (ampola, trap e balão de fundo redondo) e uma manta aquecedora (Fig. 5). A hidrodestilação é um excelente método de extração, pois proporciona um bom rendimento, é mais simples e rápida, com menor custo do que outras técnicas para a obtenção de OEs (CHARLES; SIMON, 1990).



Figura 5. Aparelho Clevenger utilizado para hidrodestilação.

Fonte: O autor.

O estudo dos OEs bem como a sua aplicação tem despertado interesse de pesquisadores em várias áreas por ser produto natural e possuir inúmeros benefícios. Na literatura, são encontrados trabalhos que utilizaram os OEs na medicina, farmácia, biologia, como cosméticos, alimentos, entre outros. Eles apresentaram atividade citotóxica, antimicrobiana, antioxidante (KALLELI *et al.*, 2019; MOTHANA *et al.*, 2019; YAZGAN; OZOGUL; KULEY, 2019), anti-inflamatória (ALOLGA *et al.*, 2019), antibacteriana (JAMIL *et al.*, 2016; OKOH; OKOH; OKOH, 2019; OLUGU *et al.*, 2019),

anticancerígena (TIAN *et al.*, 2019), inseticida (GALLI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019), larvicida (MENDES *et al.*, 2017), na conservação de alimentos (AMIRI *et al.*, 2019; FALOWO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019), na fragrância de perfumes (CHEN *et al.*, 2019) e tecidos (STAN *et al.*, 2019). Essas aplicações estão relacionadas diretamente aos compostos bioativos dos OEs, sua concentração e ao sinergismo com os outros constituintes, dependendo da aplicação direcionada (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2018).

Mesmo com o aumento da utilização dos OEs, a comercialização desses produtos naturais poderia ser ainda maior (BARROS; FEITOSA, 2019). O principal motivo que impossibilita esse crescimento no mercado é que muitos deles não apresentam padronização e controle de qualidade nas formulações, fatores estes que dificultam o registro fito-químico (BARROS; FEITOSA, 2019). Ainda, é necessário que o OE apresente constituição química estável. Sendo assim, para a inserção dos OEs de forma segura no mercado é imprescindível cada vez mais estudos das cultivares, dos compostos químicos presentes nos OEs, suas concentrações, mecanismos de ação, aplicabilidade e segurança aos seres vivos.

1.4. Encapsulamento

Os OEs são compostos voláteis e facilmente degradados, o que pode comprometer seus princípios ativos. Dessa forma, os OEs podem sofrer oxidação, volatilização e modificação na composição química quando expostos ao aquecimento e luz (ASBAHANI *et al.*, 2015). A oxidação de compostos nos OEs pode levar à formação de produtos diferentes, alguns dos quais podem afetar o aroma e a qualidade do óleo essencial. Para proteger os OEs de fatores externos, aumentar a estabilidade e solubilidade em meio aquoso, além de criar resistência física e gerar liberação controlada do material em determinado solvente, pode ser realizado o encapsulamento (GUPTA; VARIYAR, 2016; HONG; PARK, 1999).

Para o uso do OE como larvicida em *A. aegypti*, por exemplo, é importante que ele esteja solubilizado e estável em meio aquoso por tempo suficiente para que os ovos eclodam, as larvas se desenvolvam e sejam mortas (GUPTA; VARIYAR, 2016; P. FERREIRA *et al.*, 2019). Além disso, com o OE protegido, ocorre a integridade de sua composição química e, por consequência, de suas bioatividades e isso pode permitir sua comercialização com maior tempo de prateleira.

Sendo assim, o encapsulamento é um dos métodos mais eficientes para a formulação de OEs bioativos, isso porque, além das vantagens citadas anteriormente, pode mascarar odores desagradáveis e permitir sua utilização em medicamentos, alimentos, entre outros (ASSADPOUR; JAFARI, 2019; WADHWA *et al.*, 2017). Nesse processo, o material é envolvido por um revestimento ou é incorporado a uma matriz homogênea ou heterogênea, formando pequenas cápsulas ou complexos de inclusão (SAGALOWICZ; LESER, 2010; YAN *et al.*, 2018). As interações entre o material de revestimento e o OE podem formar emulsões, cápsulas e complexos de inclusão (KFOURY *et al.*, 2019). O sistema de encapsulamento a ser utilizado é selecionado de acordo com o uso pretendido, que pode variar dependendo do tamanho, forma ou natureza dos componentes que serão encapsulados (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016).

O revestimento utilizado para encapsular um determinado composto é comumente constituído de lipídios ou polímeros, sendo chamado de carreador ou material de parede (CORRÊA-FILHO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019). O encapsulamento à base de lipídios possui algumas desvantagens, como: menor capacidade de encapsulação e baixa solubilidade em água (DAS *et al.*, 2019; EKAMBARAM; SATHALI; PRIYANKA, 2012; SHETTA; KEGERE; MAMDOUH, 2019). Diante disso, muitos polímeros de origem natural, chamados de biopolímeros, têm sido utilizados para encapsular materiais como os OEs (SHETTA; KEGERE; MAMDOUH, 2019).

Os biopolímeros são materiais oriundos de fontes renováveis, como: quitosana, quitina, albumina, globulina, maltodextrina e amido (PRAKASH *et al.*, 2018). O amido é um polissacarídeo que possui importância nutricional e industrial, pois é fonte de carbono e energia (VAN DER VEEN *et al.*, 2000). Ele se encontra amplamente distribuído em diversas espécies vegetais, como carboidrato de reserva, sendo abundante em grãos de cereais, raízes e tubérculos (WALTER; SILVA; EMANUELLI, 2005). O amido é uma mistura de dois polissacarídeos: amilose e amilopectina. A amilose é formada por unidades de glicose, D-glicopiranosose, unidas por ligações α -(1,4) glicosídicas, originando uma cadeia linear (Fig. 6). Enquanto a amilopectina é formada por D-glicopiranosose unidas em α -(1,4) e α -(1,6), formando uma estrutura ramificada (DENARDIN; SILVA, 2009). As proporções em que estas estruturas aparecem podem variar dependendo da fonte de amido, da variedade de uma espécie e na mesma variedade, de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta (DENARDIN; SILVA, 2009).

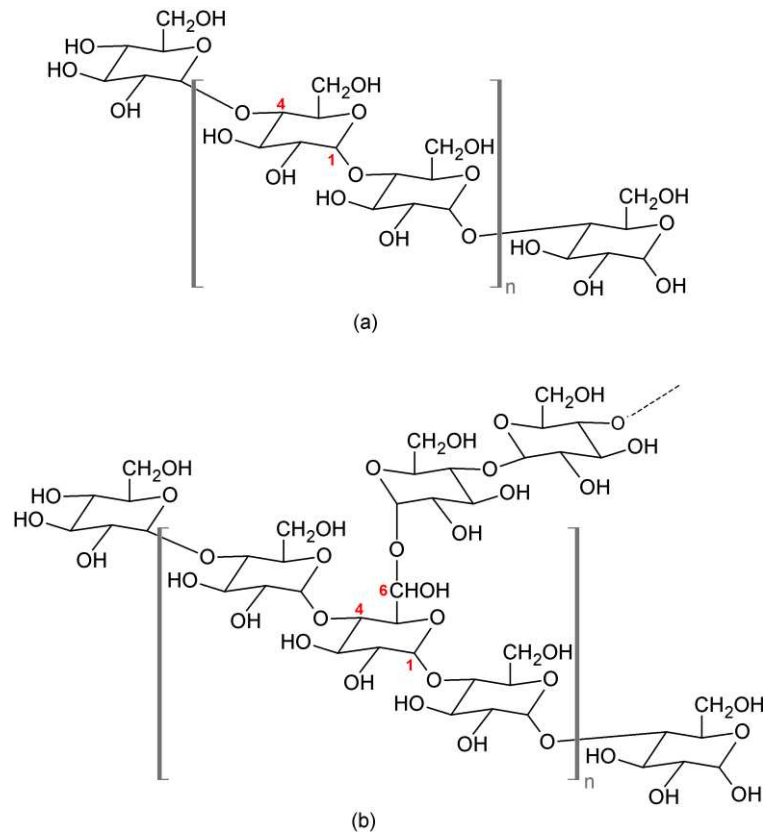


Figura 6. Estrutura da amilose (a) e da amilopectina (b).

Fonte: Adaptado de Corradini *et al.* (2005).

É possível modificar enzimaticamente o amido em ciclodextrina (CD) através da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), que permite a formação de cavidades hidrofóbicas e superfície hidrofílica (CHAROENLAP *et al.*, 2004). Para isso, ocorre uma reação de ciclização, com ataque às cadeias de glicose com extremidades não redutoras (Fig. 7) (SCHMID, 1989). De acordo com a clivagem, ciclos maiores podem ser formados a partir de quantidades superiores de unidades de glicose, formando oligossacarídeos. Assim, as CDs podem formar complexos de inclusão com os OEs e fazem parte das aplicações da química supramolecular, que possibilita a formação de nano ou microestruturas (OGOSHI; HARADA, 2008).

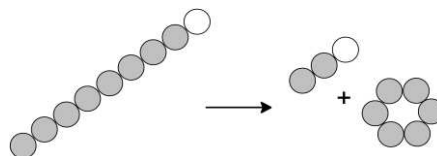


Figura 7. Representação esquemática da reação de ciclização do amido catalisada pela CGTase. A esfera cinza representa a molécula de glicose sem extremidade redutora; a esfera branca representa a molécula de glicose com extremidade redutora.

Fonte: Adaptado de Van der Veen *et al.* (2000).

1.5. Química supramolecular

A química supramolecular é definida como a "química além da molécula" e se baseia na associação de moléculas, visando a obtenção de uma determinada propriedade ou funcionalidade (ARAKI; TOMA, 2002; GODOY NETTO; FREM; MAURO, 2008). Trata-se da formação de estruturas organizadas de alta complexidade, resultantes da associação de duas ou mais espécies químicas, que podem estar unidas por interações intermoleculares como: ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals (GODOY NETTO; FREM; MAURO, 2008). As CDs estão entre as moléculas mais importantes estudadas pela química supramolecular, pois são capazes de formar complexos de inclusão com muitas substâncias, que passam a ter suas propriedades alteradas pela complexação (VENTURINI *et al.*, 2008; VILLALONGA; CAO; FRAGOSO, 2007). Assim, a capacidade que as CDs tem em interagir com os compostos presentes nos OEs, que se hospedam em suas cavidades, permite transformá-los para trazer benefícios e ampliar suas aplicações (VENTURINI *et al.*, 2008).

1.6. Ciclodextrina

As CDs foram isoladas pela primeira vez em 1891 como produtos de degradação do amido (VENTURINI *et al.*, 2008). A CD é um oligossacarídeo e um agente complexante formado, geralmente, por 6, 7 ou 8 unidades (α , β ou γ -CD, respectivamente) de D-glicopiranosose ligadas por ligações α -(1,4) glicosídicas (Fig. 8) (VAN DER VEEN *et al.*, 2000).

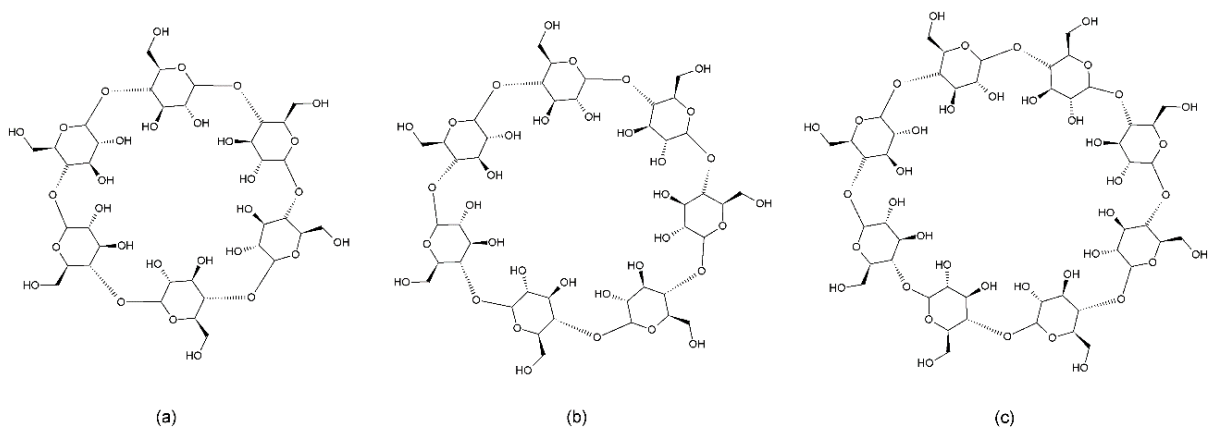


Figura 8. Estrutura da α (a), β (b) ou γ (c) ciclodextrina.

Fonte: Adaptado de Varan *et al.* (2017).

As CDs têm uma estrutura de um cone truncado e oco (Fig. 9) (VARAN *et al.*, 2017). Nele, as hidroxilas primárias e secundárias estão orientadas preferencialmente para a parte externa, sendo capazes de formar ligações de hidrogênio em água (MARQUES, 2010). As hidroxilas primárias ficam na parte mais estreita do cone e as secundárias na borda mais larga (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; HARADA; TAKASHIMA; YAMAGUCHI, 2009). Sendo assim, a superfície da CD é hidrofílica enquanto o interior do cone, com polaridade mais baixa, pode ser considerado uma cavidade hidrofóbica (VARAN *et al.*, 2017). A parte interna é revestida por anéis contendo hidrocarbonetos e éter, que estão interligados por ligações glicosídicas com o oxigênio. Quando o interior da cavidade da CD é preenchido por uma molécula de um composto hidrofóbico, forma-se o complexo de inclusão (CI) (SUGANYA; ANURADHA, 2017).

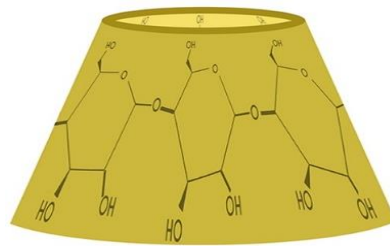


Figura 9. Forma geométrica da ciclodextrina.

Fonte: Adaptado de Varan *et al.* (2017).

Sendo assim, os CIs podem ser solúveis em água e conter compostos mais apolares em seu interior. Os compostos aprisionados ou compostos ativos são chamados de hóspedes e os que aprisionam são chamados de hospedeiros. Geralmente, utilizando a CD, a estequiometria molar entre hospedeiro e hóspede é de 1:1 (CIOBANU; LANDY; FOURMENTIN, 2013; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; GALVÃO *et al.*, 2019; HERRERA *et al.*, 2019; KFOURY *et al.*, 2019; MAGALHÃES *et al.*, 2020; MARRETO *et al.*, 2008; PANDIYAN; MATHEW; MUNUSAMY, 2019).

Para produzir a CD, os amidos de milho e batata são as fontes mais utilizadas (MARQUES, 2010). Como a maioria das CDs possuem baixa toxicidade ao meio ambiente e aos seres humanos, além de serem biodegradáveis, são muito utilizadas pelas indústrias farmacêutica e alimentícia (SU *et al.*, 2019; VAHEDIKIA *et al.*, 2019). As CDs são capazes de solubilizar fármacos pouco solúveis em meio aquoso e entregá-los à membrana lipofílica, através da difusão passiva, em que os fármacos se difundem através da membrana celular de uma região de alta concentração,

complexado na CD, para outra de baixa concentração (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018). Assim, é possível desenvolver uma formulação tópica que atue na liberação do composto ativo.

As diferenças físico-químicas entre as CDs estão apresentadas na Tabela 1 e demonstram que o aumento da quantidade de anéis é diretamente proporcional aos diâmetros interno e externo e a massa molar. As alturas do cone são as mesmas para as CDs. Em relação a solubilidade em água, a β -CD tem menor valor e a γ -CD é a mais solúvel. As constantes de estabilidade (K) dos CIs foram obtidas através da literatura publicada utilizando as 3 CDs com diferentes hóspedes na razão molar 1:1 (CONNORS, 1995). Os dados obtidos demonstraram que os CIs com a β -CD são mais estáveis do que a α e γ -CD. Esses parâmetros auxiliam na escolha da CD a ser utilizada de acordo com a finalidade desejada.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da α , β e γ -ciclodextrina.

	Tipo de ciclodextrina		
	α -CD	β -CD	γ -CD
Diâmetro da cavidade / Å	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Diâmetro externo / Å	14,6	15,4	17,5
Altura do cone truncado / Å	7,9	7,9	7,9
Massa molar / g mol ⁻¹	972	1134	1296
Solubilidade em água / mg mL ⁻¹ ; 25 °C	145	18,5	232
K _{1:1} / L mol ^{-1a}	130	490	350

^aValor médio da constante de estabilidade de complexos de inclusão na razão molar 1:1 (hóspede:CD) em soluções aquosas a 25 °C.

Fonte: Adaptado de Varan *et al.* (2017), Brewster; Loftsson (2007) e Connors (1995).

Em solução aquosa, a cavidade da CD, que é mais apolar em relação a superfície, é ocupada por moléculas de água, estas podem ser facilmente substituídas por um hóspede que seja menos polar, considerando que a interação apolar-apolar é mais favorável (VENTURINI *et al.*, 2008). Além disso, as moléculas de água possuem elevada entalpia, e quando substituídas por moléculas hóspedes de menor entalpia, contribuem para a estabilização do complexo de inclusão, pois promovem alívio da tensão de conformação da CD (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; VENTURINI *et al.*, 2008). Sendo assim, a complexação de compostos apolares se trata de um processo energeticamente viável por promover uma alteração favorável de entalpia, aumento da entropia e redução da energia total do sistema (BREWSTER; LOFTSSON, 2007;

DE LIMA; ALVES; DE SANTANA, 2012). Devido a essas vantagens e a simplicidade para formar os CIs, as CDs vem sendo cada vez mais utilizadas. As forças de Van der Waals, envolvendo interações dipolo-induzido e dipolo-dipolo, e ligações de hidrogênio entre hóspede e hospedeiro, também contribuem para formação e estabilização dos CIs (DE LIMA; ALVES; DE SANTANA, 2012).

1.6.1. 2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina

As CDs naturais (α , β e γ -CD) possuem solubilidade aquosa variável, o que significa que alguns CIs formados poderão precipitar em água ao invés de serem solubilizados (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). Assim, ao longo dos anos, o uso das CD naturais vem dando espaço aos seus derivados semissintéticos. O tamanho da cavidade da α -CD é insuficiente para complexar muitos medicamentos e a γ -CD é de alto custo (VARAN *et al.*, 2017). A β -CD possui solubilidade relativamente baixa, porém forma CIs de alta estabilidade com tamanho da cavidade adequada para complexar compostos com massa molar entre 200 e 800 g mol⁻¹ (TAO *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2013). Sendo assim, ela é muito utilizada e pode ter a sua estrutura modificada para aumentar a solubilidade. As CDs modificadas mais utilizadas são: 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), sulfo-butil-éter- β -CD (SB β CD) e metil- β -CD randomizada (RM β CD), que apresentam solubilidade em água de aproximadamente 600, 500 e 500 mg mL⁻¹, respectivamente (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). Estes valores são maiores do que as solubilidades das CDs naturais que foram apresentados na Tabela 1. Além disso, apresentam maior capacidade de inclusão e maior estabilidade, devido às alterações das suas propriedades físico-químicas originais (DE LIMA; ALVES; DE SANTANA, 2012).

Ciobanu, Landy e Fourmentin (2013) formaram CIs com 13 compostos voláteis utilizando α , β e γ -CD e HP β CD. A capacidade de complexação utilizando esses hospedeiros foi comparada e a HP β CD teve maior eficiência de complexar, além de possuir maior solubilidade em água quando comparada com as demais. Isso ocorre porque a presença de grupos hidroxipropil estende a região hidrofóbica da cavidade da β -CD, podendo aumentar a estabilidade do complexo (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018). Além disso, é importante ressaltar que na formação do CI apenas a parte lipofílica da molécula pode se encaixar na cavidade da HP β CD (Fig. 10) (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018; MARQUES, 2010).

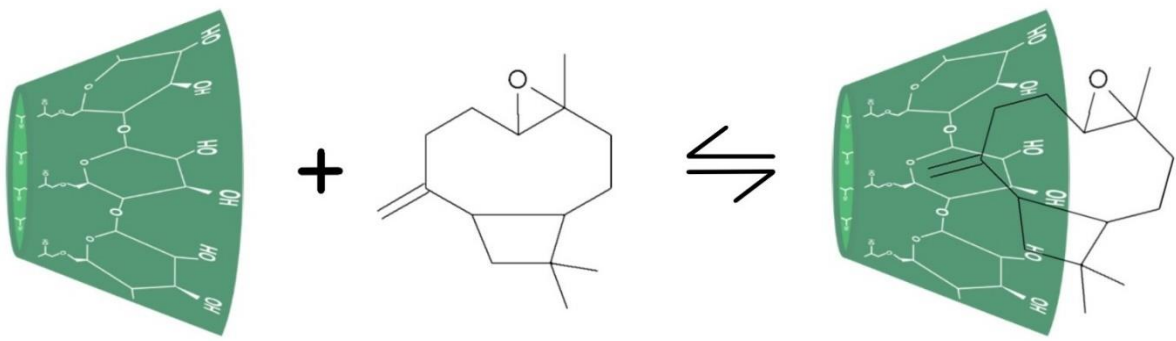


Figura 10. Complexação da HP β CD com o óxido de cariofileno, um composto comumente encontrado em óleos essenciais.

Fonte: O autor.

Considerando a alta eficiência para complexar e a estabilidade do complexo formado, a HP β CD vem sendo muito utilizada (Fig. 11). Os grupos OH dos carbonos 2, 3 e 6 da CD podem sofrer modificação estrutural sem o risco de eliminar a cavidade central (MARQUES, 2010). No entanto, os grupos OH no carbono 6 da CD são os mais reativos, interagindo mais com o hóspede (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). Por esse motivo, para obter melhor complexação da HP β CD com os compostos que serão incluídos, as modificações nas CDs geralmente ocorrem no carbono ligado as hidroxilas primárias. O número de radicais 2-hidroxipropil nos anéis da β -CD pode ser variável dependendo do fabricante do reagente, podendo ser uma ou mais substituições.

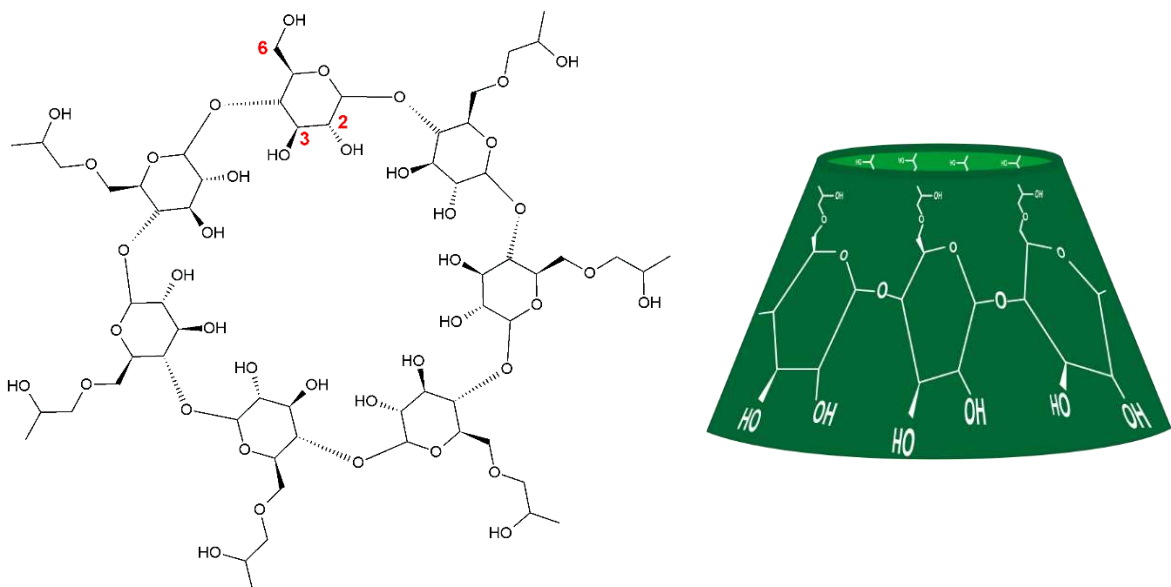


Figura 11. Estrutura da 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Fonte: O autor.

1.7. Técnicas de preparação dos complexos de inclusão

A formação dos CIs pode ser considerada uma técnica simples. Quando ocorre a mistura de OE e HP β CD, ao realizar algum método físico como macerar ou agitar, pode favorecer a complexação. Para produzir complexos de inclusão com óleos essenciais permitindo sua aplicação, diversos métodos são utilizados. Estes podem ser divididos em métodos químicos: polimerização em emulsão; métodos físico-químicos: coacervação, encapsulação lipossômica; métodos físicos: gelificação iônica, liofilização (*freeze-drying*), secagem por pulverização (*spray-drying*), maceração (*kneading*) (BRASILEIRO, 2011; FAVARO-TRINDADE; DE PINHO; ROCHA, 2008; SHAH *et al.*, 2016).

Dessa forma, quando as moléculas de OE são incorporadas as cavidades das CDs podem sofrer alterações nas propriedades físico-químicas (SINGH *et al.*, 2010). Os métodos mais utilizados para preparar CIs são: maceração, co-precipitação, liofilização e secagem por pulverização (MARQUES, 2010). Dentre estes, a liofilização e a maceração foram utilizadas para a realização destes experimentos, conservando o OE aprisionado e produzindo um material sólido.

Em relação ao tamanho da escala micro ou nano para os CIs não há um consenso entre os autores. Alguns pesquisadores consideram que o tamanho nano varia entre 1 e 1000 nm e a escala micro começaria a partir de 1 até 1000 μ m de diâmetro (SUGANYA; ANURADHA, 2017; WHELEHAN; MARISON, 2011). No entanto, outros autores consideram que apenas os CIs com diâmetro entre 1 e 100 nm podem ser considerados nano (JOYE; MCCLEMENTS, 2014). Para a realização deste trabalho, como critério de classificação dos CIs obtidos, em relação ao tamanho, será adotada a escala nanométrica considerando de 1 a 100 nm. É importante ressaltar que para ser considerado nano ou micro material, não basta a amostra ter apenas um tamanho reduzido, é necessário que esta apresente modificação em suas propriedades originais, gerando outras funcionalidades (ZARBIN, 2007).

As principais vantagens de utilizar materiais com tamanho relativamente pequeno está relacionada à elevada área superficial, resultando em maior interação dos compostos com o organismo alvo em que será aplicado. A literatura relata que nanomateriais, como nanocápsulas contendo OE, apresentam melhor atividade antibacteriana e antimicrobiana (ASSIS *et al.*, 2012; SHETTA; KEGERE; MAMDOUH, 2019).

1.7.1. Complexo de inclusão com secagem por liofilização (*freeze-drying*)

O CI pode ser preparado misturando o OE com a HP β CD em água numa proporção definida previamente, e o sistema é deixado sob agitação por certo tempo (RAKMAI *et al.*, 2016). A dispersão formada é levada ao ultra freezer e posteriormente ao liofilizador (Fig. 12). A liofilização é reconhecida como um dos melhores métodos para produzir produtos secos de alta qualidade (CALVO *et al.*, 2011). Essa técnica tem sido aplicada principalmente para a formação de CIs com CD, especialmente a HP β CD (RAKMAI *et al.*, 2016). Ao comparar metodologias de secagem de materiais encapsulados por liofilização e pulverização, concluiu-se que a liofilização é uma técnica mais eficiente, pois conserva melhor o material (ŠEREGELJ *et al.*, 2019). Isso ocorre porque essa técnica possibilita a passagem da água contida nos CIs do estado sólido (congelado) para o gasoso sem passar pelo estado líquido (sublimação). O processo de liofilização consiste na sublimação em três etapas: congelamento e secagem primária e secundária sob alto vácuo. Assim, essa técnica possibilita condições de secagem mais suaves do que a secagem por pulverização, uma vez que utilizam menores temperaturas e vácuo, evitando a oxidação e a modificação da composição química do OE (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016). Portanto, a liofilização é uma técnica adequada para ser utilizada em produtos sensíveis ao calor como os OEs (JOYE; MCCLEMENTS, 2014).



Figura 12. Liofilizador.

Fonte: O autor.

1.7.2. Complexo de inclusão com maceração (*kneading*)

Este método pode ser considerado o mais comum, pois fornece um bom rendimento e possui baixo custo para preparar os CIs (PATIL *et al.*, 2010). Para a realização dessa técnica, inicialmente, o OE é adicionado à CD (Fig. 13A) e misturado sob pressão por um tempo determinado (Fig. 13B). Em seguida, é acrescentada uma pequena quantidade de um solvente, como etanol ou água, formando-se uma pasta do OE com a CD (Fig. 13C) e ao continuar a maceração esta é então seca (Fig. 13D) (MARQUES, 2010). O sólido obtido é levado ao dessecador sob vácuo (Fig. 13E). Ao realizar essa técnica manualmente, a reprodutibilidade pode ser baixa (MARQUES, 2010). Logo, para uma preparação em larga escala seria adequado usar um equipamento automático para padronizar a força e velocidade empregados.

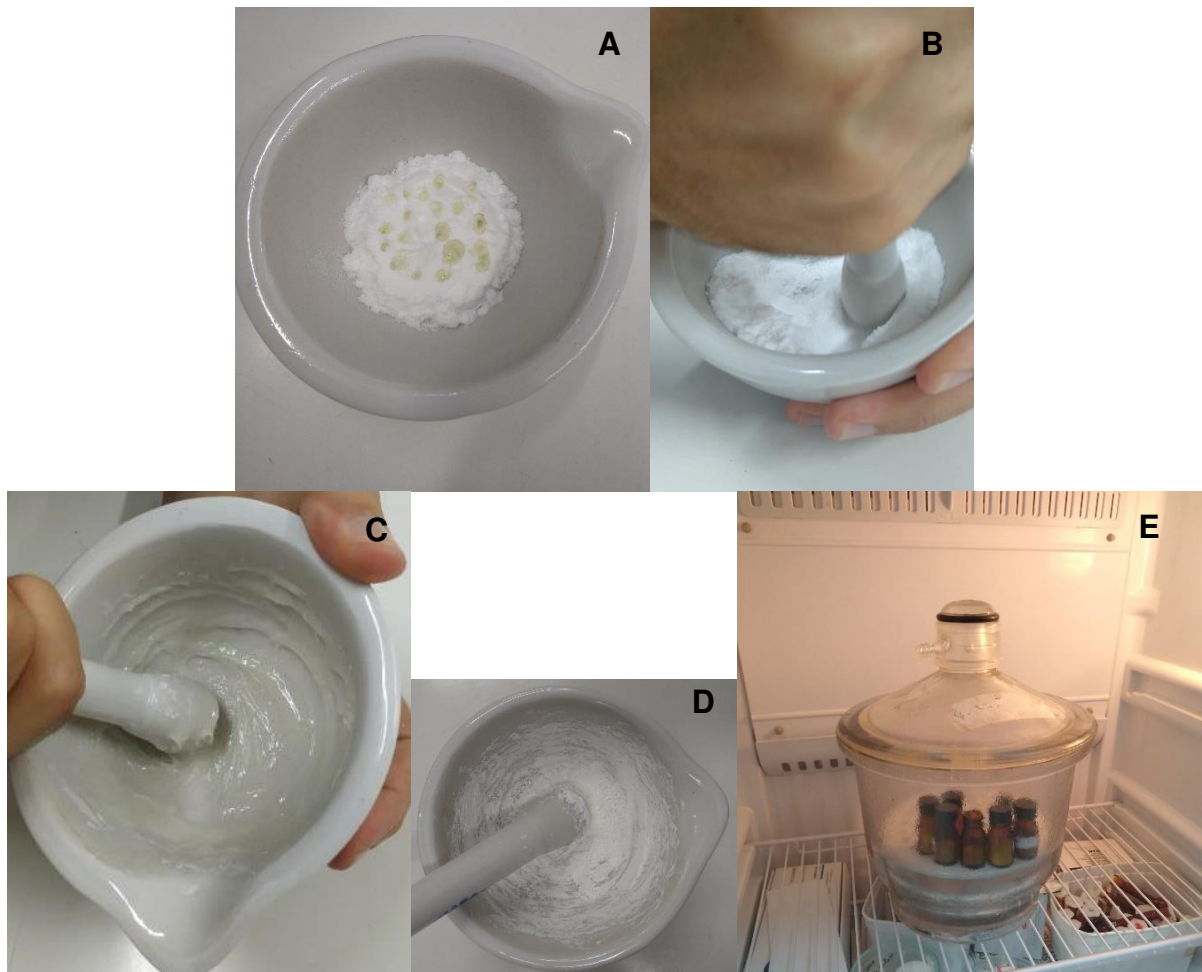


Figura 13. Obtenção do complexo de inclusão utilizando a maceração.

Fonte: O autor.

1.8. Técnicas analíticas de caracterização dos complexos de inclusão

A comprovação da formação dos CIs entre o OE e a HP β CD, bem como sua caracterização, requer o uso de várias técnicas analíticas. As alterações físico-químicas das propriedades dos materiais podem ser observadas quando os compostos presentes no OE são incorporados na cavidade da HP β CD (GOMES *et al.*, 2014). Os resultados obtidos devem ser avaliados em conjunto e, a partir das informações adquiridas, pode-se verificar, por exemplo, a eficiência de complexação, o melhor método físico para formar os CIs, a sua estabilidade térmica, tamanho, entre outros parâmetros.

As principais técnicas analíticas usadas para a caracterização de CIs de OEs em CDs são: espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), espalhamento dinâmico de luz com potencial Zeta (DLS), difratometria de raios-X (XRD) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Todas essas análises não são destrutivas, com exceção da TGA.

A quantificação dos compostos presentes no OE, que foram aprisionados na HP β CD após o processo de complexação, pode ser determinada através da espectroscopia na região do UV-Vis (WANG; JIANG; LI, 2009). Essa técnica tem sido amplamente utilizada para caracterizar e quantificar analitos em diversas áreas, como: agrícola, farmacêutica e biomédica (SÁNCHEZ ROJAS; BOSCH OJEDA, 2009). Para uso dessa técnica, são preparadas soluções de concentrações crescentes do OE em um solvente adequado, posteriormente, é realizada a leitura da absorvância nos comprimentos de onda (λ) desejados, normalmente de 190 à 800 nm. A partir da absorvância obtida no λ de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$), a curva analítica pode ser construída, cujos pontos são submetidos a regressão linear pelo Método dos Mínimos Quadrados. Com o OE removido do CI, pode ser realizada a leitura utilizando o espectrofotômetro no $\lambda_{\text{máx}}$ e, finalmente, o valor de absorvância obtido é utilizado na equação da regressão linear obtida para encontrar a concentração do OE. Desse modo, é possível quantificar os compostos ativos complexados.

A FTIR utilizando a região do infravermelho médio pode ser empregada para detectar as vibrações das ligações químicas presentes nas moléculas e, portanto, fornece informações sobre grupos funcionais dos compostos presentes na amostra. Essa técnica permite a análise quali e quantitativa dos compostos orgânicos, pois

cada ligação, com o momento dipolar diferente de zero, possui modos de vibração característicos e dão origem a bandas no espectro na região do infravermelho em números de onda específicos e com intensidade proporcional à concentração (BARBOSA, 2007). Alterações na forma, posição e intensidade das bandas de absorção ou ainda a observação de novas bandas no espectro podem indicar a formação dos CIs (WADHWA *et al.*, 2017).

Para verificar a estabilidade térmica das amostras de OE, da HP β CD e dos CIs a TGA pode ser realizada. A complexação do OE na HP β CD pode ser confirmada com a maior temperatura de degradação dos CIs em relação ao OE. Assim, a proteção térmica é verificada com o retardo da perda de massa dos CIs.

As medidas realizadas pela técnica DLS são realizadas para determinar o diâmetro hidrodinâmico das partículas e a distribuição de tamanhos ou índice de polidispersão (PDI) utilizando as amostras de HP β CD e dos CIs. Além disso, outra caracterização que pode ser realizada é a medida do potencial Zeta (ζ) (PZ). O PZ mede o potencial elétrico no plano de cisalhamento, que fica entre a camada Stern ou plano interno de Helmholtz e a camada difusa das partículas (Fig. 14) (ATTARD; ANTELMÍ; LARSON, 2000; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

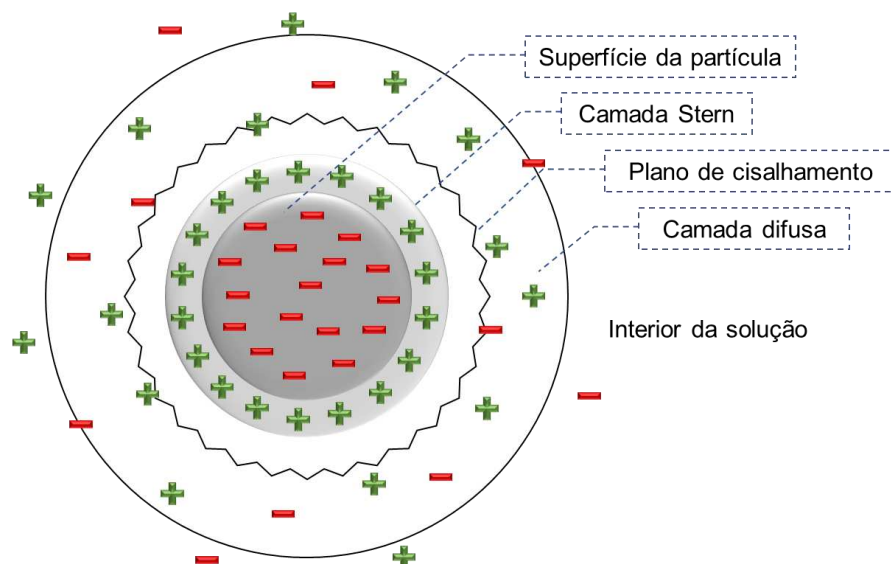


Figura 14. Esquema da distribuição de cargas na vizinhança de uma partícula carregada na interface sólido-líquido.

Fonte: Adaptado de Jafelicci Junior; Varanda (1999).

A análise de PZ é realizada quando as partículas (HP β CD ou CIs) estão sob ação de um campo elétrico e alguns contra-íons são atraídos para a superfície da

partícula, estes formam uma camada chamada de Stern (CODAY *et al.*, 2015). Os contra-íons têm uma alta concentração próxima à superfície da partícula, que gradualmente diminui com o distanciamento. O equilíbrio dinâmico desses contra-íons forma a camada difusa ou dupla camada, em que são repelidos pela camada Stern (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). O PZ é medido na dupla camada ou plano de cisalhamento, sendo uma medida indireta do potencial elétrico da superfície da partícula (CODAY *et al.*, 2015).

O valor do PZ, em módulo, é uma grandeza diretamente proporcional a estabilidade física da suspensão contendo a amostra, pois altos valores indicam maior intensidade de forças repulsivas, proporcionando a diminuição de agregação do material em função das colisões que podem ocorrer com as partículas adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Logo, ao comparar o valor do PZ, em módulo, de duas partículas diferentes, geralmente, a que apresentar o maior valor terá menor tamanho das partículas devido à menor formação de aglomerados.

A medida do PDI indica se a distribuição dos diâmetros das partículas em solução é muito variável ou não. Esse parâmetro vai de 0 a 1; um sistema com $PDI \leq 0,1$ é considerado altamente monodisperso, valores entre 0,1 e 0,4 são moderadamente polidispersos e $> 0,4$ são altamente polidispersos (BHATTACHARJEE, 2016).

Com o objetivo de caracterizar o perfil cristalográfico de amostras e comprovar a ocorrência de eventos associados a alguma reação ou interação química pode ser realizada a XRD (GAO *et al.*, 2019b). Essa técnica permite avaliar possíveis alterações do difratograma da HP β CD em relação ao perfil cristalino apresentado pelo CI formado pela HP β CD com o OE. Considerando que o OE, que se apresenta no estado líquido, não possui padrão de difração, qualquer variação do difratograma pode indicar a complexação. Isso porque a introdução de moléculas mais volumosas poderá organizar melhor a HP β CD para complexar o OE (MAGALHÃES *et al.*, 2020). Dessa forma, a formação de complexos de inclusão pode ser comprovada pela alteração de certos picos, como: deslocamento, mudança na forma, desaparecimento ou aparecimento de alguns novos picos (CHAUDHARY; PATEL, 2013; WADHWA *et al.*, 2017).

A TEM é uma outra técnica que permite auxiliar na confirmação da formação de CIs de OE em CD. As imagens obtidas podem exibir o tamanho das partículas de uma amostra, seu formato, se há a tendência de formar aglomerados, e até permitir a

identificação do OE dentro da HP β CD, de acordo com as variações das tonalidades de cinza (OZDEMIR *et al.*, 2018). As regiões mais escuras podem representar o feixe de elétrons sendo barrado e regiões mais claras podem exibir onde há maior quantidade de elétrons transmitidos, assim, pode-se inferir que existem diferentes materiais nos CIs (PIRES *et al.*, 2019b). Tons mais claros podem estar relacionados ao OE e cores mais escuras a HP β CD, sendo um indicativo de que a complexação ocorreu.

1.9. Atividade larvicida em *Aedes aegypti*

1.9.1. *Aedes aegypti*

O arbovírus é um vírus que usa artrópodes, a exemplo dos mosquitos, como seu principal vetor de transmissão (CLETON *et al.*, 2012). Dessa forma, o vírus é transmitido principalmente aos seres humanos através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes* que estão infectados (Fig. 15). Quando um mosquito não infectado pica uma pessoa com a doença, após o período de incubação do vírus, passa a ser um vetor por toda a sua vida e essa transmissão é chamada de horizontal (FERREIRA-DE-LIMA; LIMA-CAMARA, 2018). Outra forma de transmissão do vírus é a vertical que se refere à transferência de alguns arbovírus do progenitor feminino infectado para alguma parte de sua prole no ovário ou durante a oviposição (FERREIRA-DE-LIMA; LIMA-CAMARA, 2018).

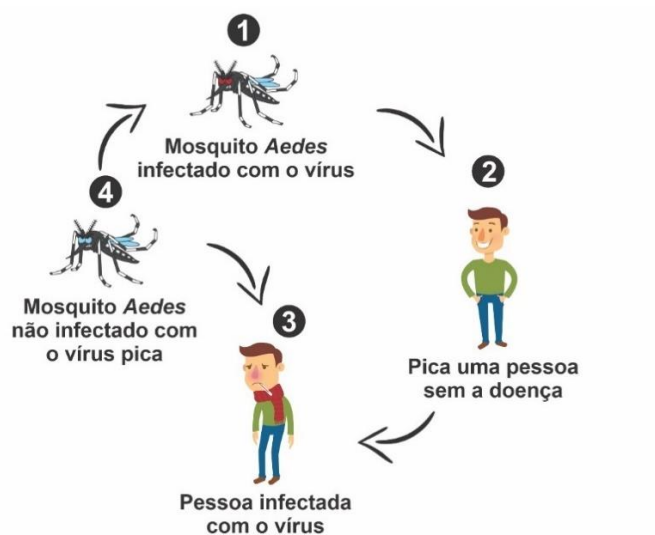


Figura 15. Ciclo de transmissão de doenças transmitidas pelo arbovírus.

Fonte: O autor.

Os mosquitos do gênero *Aedes* pertencem à classe Insecta, ordem Diptera e a família Culicidae. O *Aedes aegypti* L. é nativo do continente africano, porém, atualmente, encontra-se disseminado predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com destaque para: Américas, África, Ásia e Oceania (BARROS; FEITOSA, 2019; COSME *et al.*, 2020). O aumento de sua proliferação e, conseqüentemente, das doenças virais transmitidas pelo mosquito *Aedes* estão intimamente associadas à crescente urbanização e às mudanças climáticas (WHO, 2017).

A dengue, uma das doenças transmitidas pelo mosquito do gênero *Aedes*, causa cerca de 22.000 mortes por ano no mundo e já alcançou mais de 100 países (KABIR *et al.*, 2021). Aproximadamente metade da população mundial vive atualmente em áreas ambientalmente adequadas para a transmissão da dengue (MESSINA *et al.*, 2019). Foram feitas projeções da distribuição global da dengue em 2050 e 2080 (Fig. 16). As previsões realizadas se basearam na análise de um conjunto de variáveis para caracterizar com precisão a distribuição da dengue. Estas foram: (1) adequação da temperatura para a transmissão da dengue; (2) precipitação anual cumulativa; (3) umidade relativa mínima; (4) produto interno bruto (PIB) per capita; (5) densidade da população humana; (6) adequação ambiental para o *Aedes aegypti* (MESSINA *et al.*, 2019).

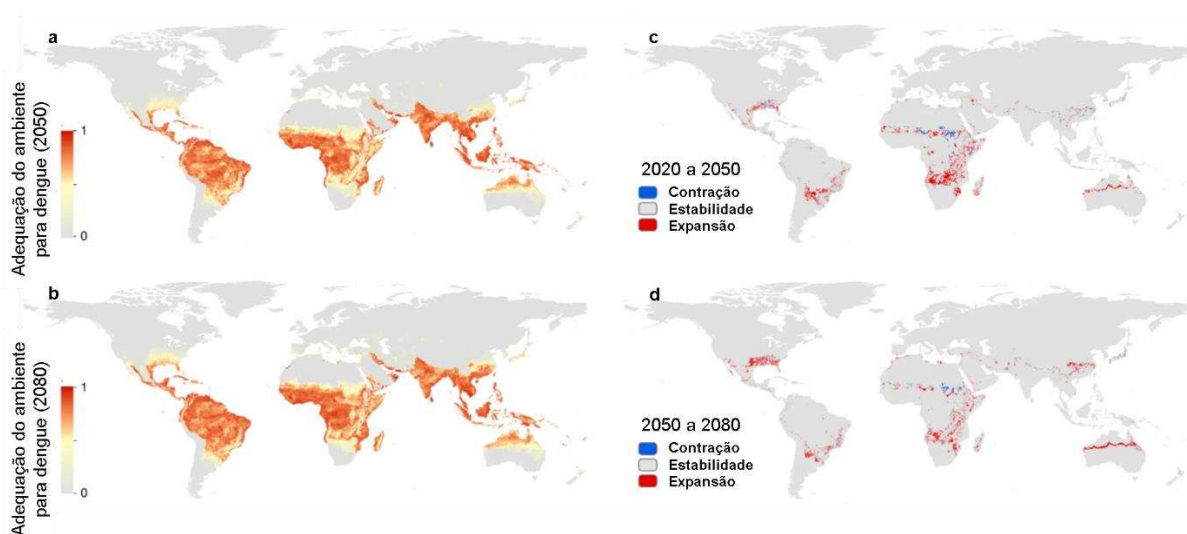


Figura 16. Dados de adequação do ambiente para a dengue projetados para 2050 (a) e 2080 (b). Áreas classificadas como possível contração, estabilidade e expansão da dengue de 2020 a 2050 (c) e de 2050 a 2080 (d).

Fonte: Adaptado de MESSINA *et al.* (2019).

A adequação ambiental é definida como a probabilidade condicional de observar dengue em uma média de longo prazo, dado o estado do meio ambiente no local (MESSINA *et al.*, 2019). Este parâmetro varia de 0 a 1, sendo 0 um ambiente totalmente desfavorável para o mosquito *Aedes* e 1 totalmente favorável à sua sobrevivência e proliferação.

Pode-se ver na Figura 16 o resultado que prevê altos níveis de adequação ambiental para a dengue em muitas áreas dentro das zonas tropicais e subtropicais em 2050 e 2080, que já são regiões endêmicas, com destaque para América do Sul, Sudeste Asiático e África Central. Esse crescimento será em grande parte impulsionado pelo aumento populacional e fatores climáticas favoráveis, como aquecimento global e aumento das chuvas (MESSINA *et al.*, 2019). A dengue é causada por cinco sorotipos diferentes (NDII *et al.*, 2021). As pessoas que foram infectadas por um sorotipo ganham imunidade vitalícia àquele sorotipo, contudo, têm maior chance de contrair as formas mais perigosas da dengue na infecção secundária (NDII *et al.*, 2021).

As formas evolutivas do *A. aegypti* passam por quatro fases: ovo, quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e mosquito. O período de cada fase de desenvolvimento depende de características intrínsecas de cada espécie (fatores endógenos) e das condições ambientais (fatores exógenos, como temperatura e sombreamento adequados, chuva, predadores, entre outros) (BARROS; FEITOSA, 2019). Em condições favoráveis o ovo pode eclodir em até 48 h, porém, em condições desfavoráveis, como a falta de água, pode demorar até cerca de 450 dias (BARROS; FEITOSA, 2019; BRASIL, 2001).

Após a eclosão dos ovos, originam-se as larvas e depois as pupas, que não se alimentam e podem ser machos ou fêmeas (TIMERMAN; NUNES; LUZ, 2012). Para obter oxigênio atmosférico, as larvas posicionam-se na interface da água com o ar e adquirem posição corporal perpendicular em relação à superfície da água. A fase larvária é um período de alimentação e crescimento, em que a larva se alimenta principalmente de material orgânico acumulado nas paredes e fundo dos recipientes onde estiver (BRASIL, 2001). Em condições ótimas, o período entre a eclosão do ovo, passagem pelos quatro estágios de desenvolvimento da larva e transformação em pupa é de cerca de cinco dias (BRASIL, 2001).

O estado pupal dura, geralmente, de dois a três dias até evoluir para o mosquito (BRASIL, 2001). A principal fonte de alimentação dos mosquitos é da seiva de plantas,

no entanto, as fêmeas do *A. aegypti* são hematófagas, sendo uma ingestão de proteína necessária para a formação dos ovos (BRASIL, 2001). As fêmeas dos mosquitos alimentam-se do sangue de animais invertebrados, com maior predileção pelo homem, principalmente durante o dia. Os machos vivem poucos dias, mas as fêmeas podem chegar a 100 dias de vida e durante esse tempo, uma única fêmea pode colocar até 300 ovos (BARROS; FEITOSA, 2019).

1.9.2. Atividade larvicida

A busca por larvicidas naturais, aplicados em *A. aegypti*, como os OEs, vem crescendo pela elevada disponibilidade de muitas plantas, que são biodegradáveis, com baixo custo e baixa toxicidade em organismos não alvo. Atualmente são utilizados principalmente larvicidas sintéticos com grupos de compostos da classe dos piretroides e organofosforados, como o temefós, sendo o seu uso excessivo causador de resistência das larvas de mosquitos (LIMA *et al.*, 2011; SIVABALAKRISHNAN *et al.*, 2023). Por isso, métodos alternativos são necessários de serem estudados e utilizados para essa finalidade, como os OEs.

Quando as larvas entram em contato com o OE tóxico, os sintomas que a maioria delas apresentam são: excitação, convulsão e hiperatividade (DIAS; MORAES, 2014). Uma pesquisa utilizando o OE em atividade larvicida em *A. aegypti* constatou que a letalidade se deu por um modo de ação neurotóxico, com ataque ao sistema neuromuscular (AZEVEDO *et al.*, 2018). Não se sabe ao certo se a toxicidade se deve ao contato ou a ingestão do produto ou aos dois.

Outro trabalho realizado utilizando o OE em larvas de *A. aegypti* em estágio L4 constatou toxicidade neurocomportamental incluindo: coordenação prejudicada, movimentos alterados, mordida agressiva ao sifão, incapacidade de subir à superfície da água, tremores e paralisia (KABIR *et al.*, 2013). Todos esses sintomas relatados foram observados nos experimentos realizados.

As larvas são usadas preferencialmente em relação aos adultos por diferentes razões. Em termos de controle populacional, as larvas são alvos fáceis para os inseticidas, pois não voam e vivem em grupos, podendo ser encontradas e exterminadas em grande número de uma só vez. As larvas de primeiro e segundo instar são muito pequenas em comparação com o terceiro e quarto instar. Logo, as larvas maiores são mais fáceis de manusear e de contar em ensaios toxicológicos. Além disso, L4 é o último estágio antes da pupação, que é um período de transição

para a idade adulta. Durante a transição, as larvas estão sob a ação de diferentes reguladores de crescimento que podem interferir na passagem para o adulto, e vários inseticidas atuam na transição do adulto em estágio L4. Por essas razões, larvas em estágio mais avançado de desenvolvimento são utilizadas em bioensaios (Fig. 17).



Figura 17. Experimento larvicida com *A. aegypti* em estágio L4.

Fonte: O autor.

Para comparar a atividade larvicida do OE em solvente e do OE complexado com HP β CD, alguns trabalhos foram selecionados. Em todos eles foram observados que o OE contido nos CIs apresentou valor de CL₅₀ (concentração letal para matar 50% da população) próximo ao OE não complexado nos experimentos larvicidas em *A. aegypti* (GALVÃO *et al.*, 2015, 2019; PANDIYAN; MATHEW; MUNUSAMY, 2019). As avaliações de mortalidade ocorreram após 24 h de exposição do OE ou do CI às larvas. Além disso, os CIs são formados de um oligossacarídeo derivado do amido, que pode ser uma fonte de alimentação para as larvas, podendo favorecer a mortalidade das mesmas através de um mecanismo de “cavalo de Troia” (P. FERREIRA *et al.*, 2019).

1.10. Ciclo celular e alterações cromossômicas

A germinação de sementes e o crescimento das plantas ocorre através do desenvolvimento correto das células, a partir de sua reprodução e multiplicação. Os três processos fundamentais para o desenvolvimento do ciclo das células eucarióticas são: Mitose, citocinese e intérfase (Fig. 18). Cada um desempenha um papel importante na divisão e reprodução das células. O ciclo celular eucariótico ocorre com o crescimento das células e replicação cromossômica, através da segregação dos cromossomos e divisão celular (AMABIS; MARTHO, 2009).

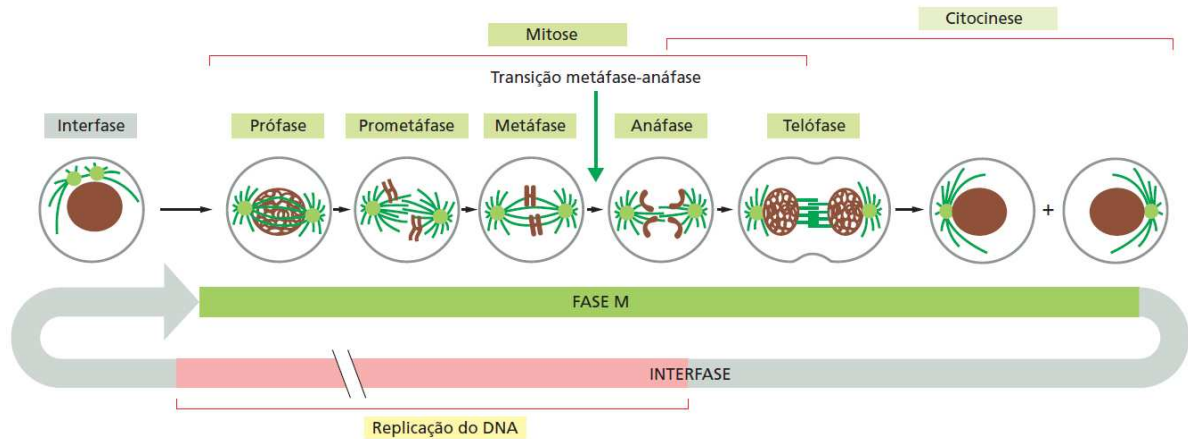


Figura 18. Os eventos da divisão celular eucariótica vistos sob o microscópio.

Fonte: ALBERTS (2017).

Os cromossomos das células eucarióticas são longos fios constituídos por uma molécula de DNA associada a diversas proteínas, em um arranjo altamente complexo (AMABIS; MARTHO, 2009). Os processos de divisão nuclear (mitose) e divisão celular (citocinese), coletivamente chamados de fase M, normalmente ocupam somente uma pequena fração do ciclo celular (Fig. 18) (ALBERTS, 2017). A fase M ocorre com a segregação dos cromossomos e divisão celular da cópia dos cromossomos em duas células-filhas geneticamente idênticas. A mitose contém cinco etapas: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase (Fig. 18). Uma mudança brusca no estado bioquímico da célula ocorre na transição da metáfase à anáfase (ALBERTS, 2017). A célula pode fazer uma pausa antes desse ponto de transição, mas, uma vez ultrapassado esse ponto, a célula continua até o fim da mitose e atravessa a citocinese, chegando à interfase (ALBERTS, 2017). A anáfase é uma etapa muito importante, pois é onde ocorre a segregação das cromátides. A outra parte do ciclo, muito mais longa, é conhecida como interfase, que é a fase de crescimento e duplicação do DNA (ALBERTS, 2017). Esses processos trabalham em conjunto para garantir a reprodução e o crescimento adequados das células.

A citotoxicidade celular mede o efeito tóxico de uma substância, como o OE, sob as células. Para avaliar a citotoxicidade pode-se utilizar o índice mitótico. Esse parâmetro corresponde à razão entre o número de células em divisão e o número total de células observadas por lâmina, que são 1000 (ALBERTS, 2017). A redução do índice mitótico pode indicar alterações de ação química no crescimento, desenvolvimento e multiplicação celular, e como consequência, a germinação e o crescimento das plantas são afetados (ALBERTS, 2017). Assim, podem surgir

anormalidades cromossômicas, que são mudanças na estrutura e/ou número de cromossomos.

A presença de alterações cromossômicas demonstra o efeito genotóxico de substâncias. O mecanismo de ação dessas substâncias na célula pode ser aneugênico (interfere no fuso mitótico causando erros durante a segregação) ou clastogênico (induz a quebra no DNA). As cinco anormalidades cromossômicas mais comuns podem ser por ação aneugênica (c-metáfase, cromossomo aderente e cromossomo não orientado) ou clastogênica (ponte e quebra cromossômica) (Fig. 19) (PARVAN *et al.*, 2020).

A presença de alterações nucleares demonstra o efeito mutagênico, sendo as principais: núcleo condensado ou micronúcleo, que ocorrem por efeito aneugênico. Essas alterações celulares são manifestadas na germinação, crescimento radicular e aéreo da planta, assim é avaliado a atividade herbicida ou fitotóxica. Normalmente utilizam-se células de plantas modelo como alface (*Lactuca sativa* L.), que possuem alta sensibilidade, um baixo número de cromossomos e estes são relativamente longos, o que facilita a visualização microscópica (SANTIAGO *et al.*, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2017).

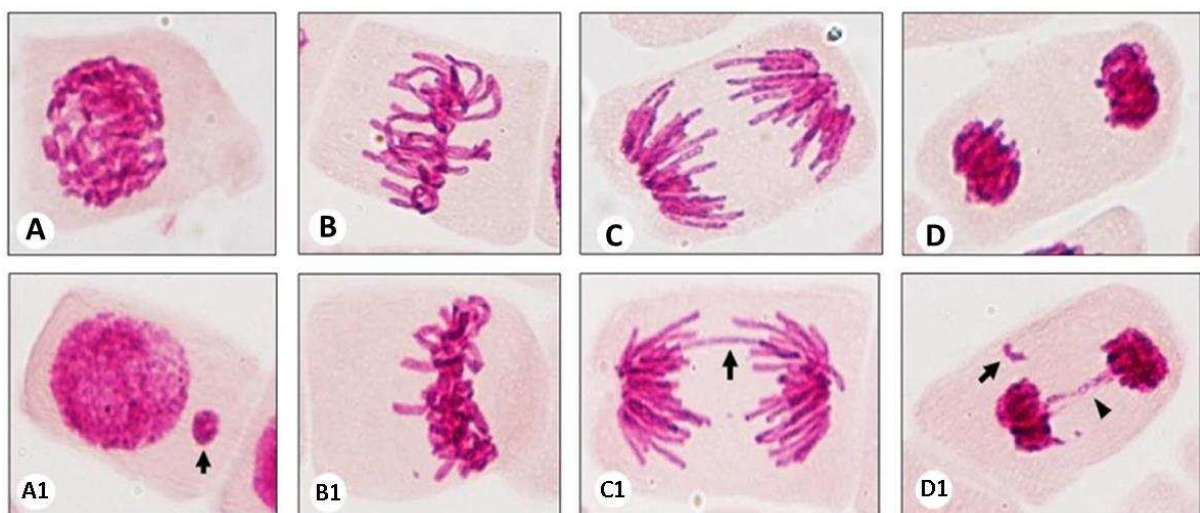


Figura 19. Ciclo celular: prófase (A), metáfase (B), anáfase (C) e telófase (D). Anormalidades cromossômicas: prófase com micronúcleo (A1), metáfase com cromossomo aderente (B1), anáfase com ponte cromossômica (C1), telófase com quebra e ponte cromossômica (D1).

Fonte: Adaptado de SANTOS; SOMMAGGIO; MARIN-MORALES (2022).

1.11. Plantas invasoras

As plantas invasoras ou ervas daninhas são plantas que crescem espontaneamente, como por exemplo *Lolium multiflorum* e *Bidens pilosa* L. Essas espécies crescem, florescem, invadem e dominam os ecossistemas naturais e plantações agrícolas, por isso geralmente são indesejáveis (DIAS; NOZARI; SANTARÉM, 2017).

Bidens pilosa pertence à família Asteraceae e é popularmente conhecida como picão preto (Fig. 20) (DIAS; NOZARI; SANTARÉM, 2017). Essa espécie é nativa da América do Sul e atualmente é encontrada em muitos países tropicais e subtropicais do mundo (BORGES *et al.*, 2013). *B. pilosa* é conhecida como uma planta invasora que afeta o crescimento agrícola de culturas de feijão, milho e sorgo (SOUZA; VELINI; MAIOMONI-RODELLA, 2003).

Lolium multiflorum é conhecida como azevém e pertence à família Poaceae (Fig. 21). Essa espécie é uma gramínea anual comum no oeste dos Estados Unidos e em regiões mais frias, como o sul do Brasil (FIRESTONE; JASIENIUK, 2012). Embora o azevém seja utilizado como espécie forrageira durante o inverno, ele pode se constituir em planta invasora em culturas como trigo e milho (ROMAN *et al.*, 2004).



Figura 20. *Bidens pilosa*.

Fonte: Flora de Santa Catarina (encurtador.com.br/aciCU).

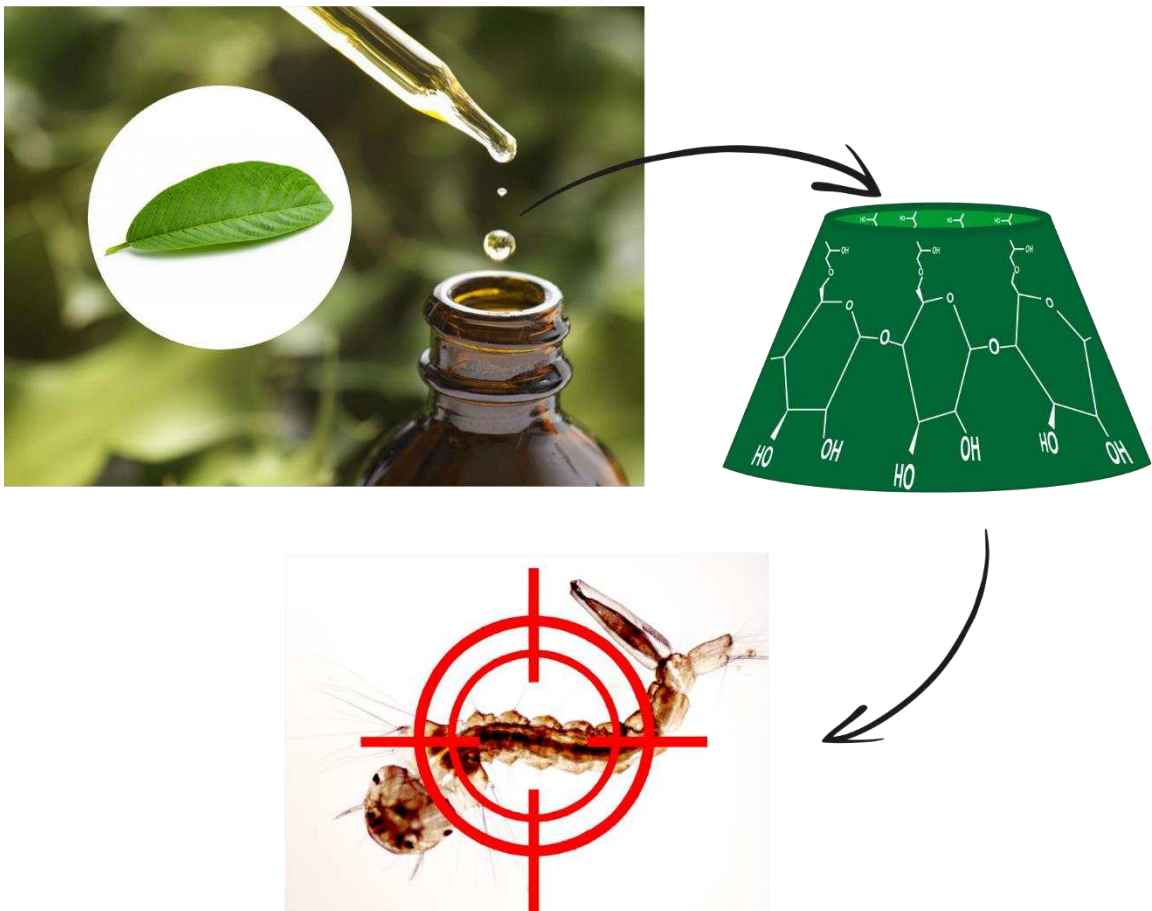


Figura 21. *Lolium multiflorum*.

Fonte: Flora campestre (encurtador.com.br/mpuJ0).

CAPÍTULO 2

Preparação de complexos de inclusão do óleo essencial de *Psidium guajava* L. em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina pelos métodos de liofilização e maceração para aplicação como larvicida em *Aedes aegypti* L.



RESUMO

Os produtos naturais, como os óleos essenciais (OEs), têm sido cada vez mais utilizados para controlar a proliferação de larvas de *Aedes aegypti*, sendo o OE da cultivar Século XXI (SEC) da espécie *Psidium guajava* promissora para essa finalidade. No entanto, a baixa solubilidade aquosa e instabilidade ao calor, luz e oxigênio do OE impedem a sua aplicação de forma mais ampla. Para superar essas limitações foram preparados complexos de inclusão (CIs) do OE da cultivar SEC com o oligossacarídeo 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP β CD) pelos métodos físicos de maceração (KN) e liofilização (FD), e estes foram utilizados como larvicidas em *A. aegypti*. A complexação foi comprovada através das técnicas analíticas: UV-Vis, FTIR, TGA, DLS, XRD e TEM. Os CIs obtidos possuem tamanho nanométrico com diâmetro de aproximadamente 80 e 40 nm, para KN e FD, respectivamente, grande estabilidade térmica e tendência de aglomeração em solução aquosa. A eficiência de complexação foi de 78,6% e 50,8% para KN e FD, respectivamente. A atividade larvicida em *A. aegypti* do OE em DMSO foi de 51,49 e 64,51 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente. Para o CI obtido por KN, a toxicidade foi de 77,54 e 107,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente. O CI pelo método de FD apresentou toxicidade com concentrações acima de 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo as larvas totalmente mortas com 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dessa forma, FD não foi tão eficiente quanto o método KN para formação de CI e atividade larvicida. No entanto, os CIs, principalmente o obtido por KN, possibilitam o uso de OE em criadouros de larvas de *A. aegypti*, sendo, portanto, produtos potenciais a serem explorados comercialmente.

Palavras-chave: Encapsulamento. Nanomateriais. Produtos naturais. Goiabeira. Dengue.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são misturas de compostos voláteis (principalmente mono e sesquiterpenoides, benzenoides e fenilpropanoides) que se originam do metabolismo secundário das plantas. Eles têm sido amplamente estudados e utilizados com êxito na indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentícia (DAMASCENO *et al.*, 2019). Como os OEs são produtos naturais facilmente obtidos e com múltiplas possibilidades de aplicação, conhecer a sua composição química e utilizá-lo de forma eficiente são relevantes do ponto de vista econômico e social.

Uma das utilizações dos OEs é como larvicida no combate ao *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (SARMA *et al.*, 2019). Os métodos de controle da propagação do *A. aegypti* são urgentes, uma vez que esta espécie é um vetor de patógenos, como dengue, chikungunya e Zika vírus. Nos últimos anos, o uso convencional de produtos químicos tem dado espaço a materiais de origem botânica. Muitos fitoquímicos de várias espécies de plantas são avaliados quanto à sua ação larvicida e repelente contra mosquitos, incluindo *A. aegypti* (GOVINDARAJAN *et al.*, 2018).

Os OEs das folhas da goiabeira (*Psidium guajava* L.) demonstraram atividade larvicida promissora contra o *A. aegypti* (MENDES *et al.*, 2017). Os OEs das variedades de *P. guajava* apresentam variação significativa na composição química e, dentre cinco cultivares estudadas, o OE mais promissor no combate às larvas de *A. aegypti* foi oriundo de folhas da cultivar Século XXI (SEC) (MENDES *et al.*, 2017).

No entanto, apesar dos OEs serem potencialmente nocivos a estes organismos, algumas limitações inviabilizam seu uso direto em meio aquoso e exposição ao ar livre devido à baixa solubilidade aquosa, alta volatilidade e instabilidade na presença de calor, luz e oxigênio (MOSSA, 2016). Além disso, os componentes ativos são perdidos ou degradados durante seu armazenamento. Uma das alternativas para proteger o OE, aumentar a sua vida útil e estabilizar os compostos bioativos, é o encapsulamento (ASBAHANI *et al.*, 2015).

Dessa forma, a utilização dos OEs protegidos é uma alternativa viável e eficiente, pois esse processo favorece a solubilização dos OEs no ambiente, aumenta sua estabilidade física, preserva o material contra reações de oxidação e diminui a volatilidade dos constituintes (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016). Neste contexto, utilização das ciclodextrinas, que são oligossacarídeos cíclicos produzidos pela degradação enzimática do amido, têm sido amplamente utilizadas devido à sua fonte natural

renovável e capacidade de formar complexos de inclusão (CIs) (PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011). Além disso, alguns CIs de ciclodextrinas são solúveis em água, facilitando a sua aplicação para a eliminação de larvas de *A. aegypti* (GALVÃO *et al.*, 2015, 2019; HAMMOUD *et al.*, 2020; MAGALHÃES *et al.*, 2020). Um desses oligossacarídeos é a 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina (HP β CD), que é eficiente na proteção de OEs e na formação de CIs em nanoescala.

Considerando as premissas mencionadas anteriormente, a presente investigação teve como objetivo produzir CIs do OE da cultivar SEC de *P. guajava* com HP β CD com utilizando duas técnicas, maceração (KN) e liofilização (FD). Além disso, os CIs obtidos foram caracterizados e a eficiência de complexação das duas técnicas foi comparada. Por fim, os materiais obtidos foram aplicados em ensaios larvicidas contra *A. aegypti*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Padrões e reagentes

Os reagentes utilizados foram: 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP β CD, Acros Organics), hexano (C₆H₁₄, 95%, Didática SP), 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH, 99%, Ultrapure Chemicals do Brasil), ácido sulfúrico (H₂SO₄, 98,08%, Alphatec), álcool etílico (C₂H₅OH, 95%, Didática SP), álcool isopropílico (C₃H₇OH, 99,8%, Merck), acetonitrila (C₂H₃N, 99,9%, Sigma-Aldrich) e dimetilsulfóxido (DMSO, 99,9%, Neon).

No preparo das soluções utilizou-se água tipo 1, obtida pelos sistemas Milli-Q (Millipore Corporation) e PURELAB (PURELAB Ultra MK2).

2.2. Coleta e extração do óleo essencial das folhas de *P. guajava*

As folhas da goiabeira SEC foram obtidas no município de Alegre, no estado do Espírito Santo, situado na latitude sul (20° 45'), longitude oeste (41° 31') e altitude de 254 metros. O pomar experimental utilizado nesse estudo está localizado no município de Alegre desde julho de 2013, sendo mantido sob condições naturais, sem quaisquer tratamentos culturais, como: irrigação, sombreamento e podas. O experimento foi instalado com delineamento em blocos casualizados (DBC) no município de Alegre-ES, sendo três blocos. As folhas foram coletadas em janeiro de 2020 às 9 h da manhã. Foram realizadas coletas em torno da copa utilizando folhas que estavam entre jovens

e velhas de todas as plantas e blocos, de forma a tornar aleatória qualquer diferença entre elas. O material foi armazenado em sacos de papel e as folhas foram secas à sombra e em temperatura ambiente (~25 °C) por cerca de uma semana. Na sequência, as folhas foram armazenadas em freezer a -9 °C até a extração do OE.

A cultivar Século XXI de *Psidium guajava* foi obtida de plantas adultas no Viveiro Frucafé, certificado pelo Ministério da Agricultura do Brasil (<http://sistemas.agricultura.gov.br/>). Uma amostra de SEC foi coletada, seca e depositada no herbário RB do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB00887286, encurtador.com.br/auwAO).

O OE foi obtido através de hidrodestilação em aparelho Clevenger, durante quatro horas de extração, de acordo com a metodologia recomendada pela Farmacopeia Brasileira para óleos voláteis (SOUSA, 2019). Nas extrações, realizadas várias vezes, foram utilizadas cerca de 100 g de folhas secas em aproximadamente 1500 mL de água tipo 1 (PURELAB Ultra MK2) em balão de fundo redondo de 2000 mL. Os vapores de água e OE se misturaram e, após o resfriamento, ocorreu a condensação das moléculas, que foram separadas por diferença de solubilidade e densidade. A mistura de OE e água foi colocada em eppendorf, centrifugada à 10000 rpm por 10 min e o OE foi removido com micropipeta e armazenado em freezer a -20 °C, protegido de luminosidade.

2.3. Determinação da densidade absoluta e rendimento da extração do óleo essencial

A densidade absoluta do OE da cultivar SEC da espécie *P. guajava* foi obtida através da pesagem, em triplicata, de 100 µL do óleo em micropipeta. Foi utilizada balança analítica (ATX224, Shimadzu, São Paulo) com quatro casas decimais.

O rendimento das extrações do OE foi determinado, em triplicata, pela razão entre a massa do OE extraído e a massa da planta seca, de acordo com a Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa do óleo essencial (g)}}{\text{massa da planta seca (g)}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 1})$$

2.4. Perfil cromatográfico do óleo essencial

A identificação e a semiquantificação dos constituintes do OE das folhas foram realizadas utilizando a cromatografia a gás com detector de ionização de chama (GC-FID QP2010SE, Shimadzu, Japão) e cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS QP2010SE, Shimadzu, Japão) de acordo com a metodologia de Mendes *et al.* (2017). Essas análises foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Agronomia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Para essas caracterizações, as seguintes condições foram adotadas: o gás arraste utilizado foi o He para os dois detectores com fluxo e velocidade linear de 2,80 mL min⁻¹ e 50,80 cm seg⁻¹ (GC-FID) e 1,98 mL min⁻¹ e 50,90 cm seg⁻¹ (GC-MS), respectivamente; a temperatura do injetor foi de 220 °C na razão split de 1:30; coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm); fase estacionária Rtx[®]-5MS (0,25 µm de espessura do filme); a temperatura do forno teve a seguinte programação: temperatura inicial de 40 °C, a qual permaneceu por 3 min e em seguida a temperatura foi aumentada gradativamente a 3 °C min⁻¹ até atingir 180 °C, em que permaneceu por 10 min, tendo um tempo total de análise de 59,67 min; as temperaturas que foram utilizadas nos detectores FID e MS são de 240 e 200 °C, respectivamente (SOUZA *et al.*, 2017). A amostra utilizada foi retirada do vial em um volume de 1 µL de uma solução de 3% de OE em hexano 95%.

As análises por GC-MS foram realizadas em um equipamento por impacto eletrônico com energia de 70 eV; velocidade de varredura de 1000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos seg⁻¹ e fragmentos detectados de 29 a 400 (*m/z*). As análises por GC-FID foram realizadas por uma chama formada por H₂ e ar atmosférico com temperatura de 300 °C. Foram utilizados fluxos de 40 mL min⁻¹ e 400 mL min⁻¹ para H₂ e ar, respectivamente.

A identificação dos componentes dos OEs foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos com os disponíveis no banco de dados da espectroteca (Wiley 7, NIST 05 e NIST 05s) e pelo índice de retenção (IR). Para o cálculo do IR, foi utilizada uma mistura de alcanos saturados C₇-C₄₀ (Supelco, Estados Unidos) submetida sob as mesmas condições cromatográficas do OE e foi obtido o tempo de retenção ajustado de cada composto através do GC-FID. Em seguida, os IR calculados para cada composto foram comparados com os da literatura (ADAMS, 2007; EL-SAYED, 2019; LINSTROM; MALLARD, 2018).

O percentual relativo de cada composto do OE foi calculado através da razão entre a área integral dos picos e a área total de todos os constituintes da amostra com área relativa acima de 5%. Esses dados foram obtidos pelas análises realizadas em GC-FID.

2.5. Teste de classificação de aldeídos e/ou cetonas no óleo essencial

A maioria dos compostos carbonílicos (aldeídos-cetonas) podem ter a carbonila identificada pela reação com 2,4-DNFH (ENGEL *et al.*, 2012). O preparo da solução de 2,4-DNFH foi realizado de acordo com Engel *et al.* (2012). Assim, 2,4-DNFH (3,0 g) foi dissolvido em H₂SO₄ concentrado (15 mL). Em seguida, água tipo 1 (Millipore Corporation) (23 mL) foi adicionada lentamente. Com a mistura sob agitação, foi adicionado álcool etílico 95% (75 mL) e após o resfriamento da solução, esta foi filtrada. Em seguida, uma alíquota de 1 mL do reagente 2,4-DNFH foi removida e 3 gotas de OE foram adicionadas sob agitação. Após 15 min da reação, observou-se se havia a formação de um precipitado amarelo avermelhado, cujo teste positivo indica a presença de aldeído e/ou cetona.

2.6. Preparação dos complexos de inclusão

2.6.1. Complexo de inclusão com secagem por liofilização (*freeze-drying*)

O CI do OE de *P. guajava* em HP β CD foi preparado pelo método de inclusão molecular e a secagem pelo método de FD, de acordo com Santos *et al.* (2015), com adaptações. O OE e a HP β CD foram dispersos em água na razão molar 1:1 (OE:HP β CD). Para isso, foi utilizada a massa molar média do OE, considerando os compostos identificados com suas proporções, obtendo a concentração de 0,0393 mmol mL⁻¹ do OE e da HP β CD. Dessa forma, foram pesados em triplicata cerca de 0,8 g do OE e 4,64 g de HP β CD para a formação dos CIs. A cada repetição foi adicionado 100 mL de água tipo 1 (Millipore Corporation), e a mistura foi submetida a agitação de 500 rpm por 48 h em ausência de luz e temperatura de 25 °C. Posteriormente, a dispersão foi congelada a -80 °C por 24 h seguida da secagem do material em liofilizador (FreeZone 2.5, Labconco, Estados Unidos), nas condições de pressão a 0,005 mBar e temperatura de -52 °C por 48 h. Os CIs obtidos foram armazenados em frascos âmbar e acondicionados em sacos plásticos de polietileno

náilon sob vácuo à -20 °C. O liofilizador foi utilizado no Laboratório de Embalagens (LABEM) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.6.2. Complexo de inclusão com maceração (*kneading*)

Os CIs obtidos pelo método de KN também foram realizados seguindo a metodologia de Santos *et al.* (2015), com algumas adaptações. O OE e o material complexante foram adicionados nas razões molares de 1:1 (OE:HP β CD), utilizando cerca de 0,8 g do OE e 4,64 g de HP β CD, em triplicata. A mistura foi manualmente misturada sob pressão por 10 min utilizando almofariz e pistilo. Em seguida, foi adicionado 2 mL de álcool etílico 95% para formar uma pasta homogênea, e logo após a mistura foi macerada por 40 min. Os CIs produzidos foram mantidos a 5 °C em dessecador sob vácuo por 72 h. Posteriormente, os CIs foram armazenados em frascos âmbar e acondicionados em sacos plásticos de polietileno náilon sob vácuo à -20 °C.

2.7. Caracterização dos complexos de inclusão

2.7.1. Curva analítica

Para determinar a eficiência de complexação (EC) foi obtida uma curva analítica do OE utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (UV1800, Shimadzu, Japão). Essa análise foi realizada no Laboratório de Embalagens (LABEM) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O equipamento utilizado possui resolução de 0,5 nm e foram utilizadas cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. As análises foram feitas no modo de varredura na faixa de 190 a 800 nm.

Para essa análise foram preparadas, em triplicata, dez soluções padrão com concentrações crescentes do OE em acetonitrila (1,46 a 18,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Foram obtidos os valores de absorbâncias em 193 nm para construção da curva, cujos pontos foram submetidos a regressão linear pelo Método dos Mínimos Quadrados. Foram realizadas leituras no UV-Vis em duplicata.

A fim de quantificar a concentração do OE removido dos CIs, 50 mg dos materiais, obtidos por KN e FD, foram dissolvidos em 100 mL de acetonitrila 99,9% e

o sistema foi mantido ao abrigo de luz sob agitação a 500 rpm por 48 h. Esse procedimento foi realizado em triplicata e adaptado de Hill; Gomes; Taylor (2013). Em seguida, as amostras foram centrifugadas em centrífuga (4K-15, Sigma, Alemanha) a 3000 G (3635 rpm) por 15 min a 25 °C para decantar a HPβCD, deixando apenas o OE solúvel em acetonitrila. As soluções contendo o OE em solvente foram submetidas a análise UV-Vis, monitorando-se 193 nm. As concentrações do OE (mg mL⁻¹) foram determinadas pela curva analítica, sendo que a partir delas foi possível determinar as massas de OE extraídas. As EC foram determinadas utilizando a Equação 2:

$$EC (\%) = \frac{OE_{ext} (mg)}{OE_{adic} (mg)} \times 100\% \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que **OE_{ext}** é a massa do OE extraído do CI (mg) e **OE_{adic}** é a massa do OE adicionada no início do processo de complexação (mg).

Além disso, também foi realizada a correção da EC, considerando-se a fração do OE que pudesse estar na parte externa da HPβCD. Essa correção foi realizada por meio da análise termogravimétrica dos CIs, que se refere à variação da massa na faixa de temperatura que ocorre a degradação do OE (110 a 180 °C). A temperatura inicial de 110 °C foi adotada para garantir que a massa referente a água, ou de outros solventes voláteis, presentes nos CIs, não interferisse nos cálculos.

A Equação 3 foi utilizada para a determinação da eficiência complexação corrigida (EC_c):

$$EC_c(\%) = EC (\%) - [P_{CI} (\%) - P_{HP\beta CD} (\%)] \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que **P_{CI}** é da perda de massa do CI (%) e **P_{HPβCD}** é a perda de massa da HPβCD (%), ambos no intervalo de temperatura entre 110 e 180 °C.

2.7.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A HPβCD, o OE e os CIs foram submetidos às análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram obtidos através do método de reflectância total atenuada (ATR) (Nicolet 6700, Thermo Scientific, EUA) com cristal de germânio na região do infravermelho médio, com número de onda no intervalo entre 4000 e 700 cm⁻¹, com 32 varreduras e resolução

de 4 cm^{-1} . Essa análise foi realizada no LABEM do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

2.7.3. Análise termogravimétrica

A medida da estabilidade térmica foi realizada por meio de análise termogravimétrica (TGA) com auxílio de um analisador térmico DTG (60H, Shimadzu, Japão). Cerca de 4 mg da HP β CD, do OE e dos CIs foram pesados em microbalança analítica (Mettler Toledo, XP26, Brasil). Em seguida, as amostras foram colocadas, individualmente, em cadinho de alumina e aquecidas na faixa de temperatura de 30 a 450 °C em uma razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, com tempo total de análise de cerca de 45 min. Foi utilizada atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL min^{-1} . A TGA dos CIs foi realizada em duplicata. Essa análise foi realizada no LABEM do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

2.7.4. Análise de tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta por DLS

Por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizadas as medidas de tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (PZ) da HP β CD e dos CIs. Para isso foi utilizado o Zetasizer Nano ZS (Zen 3600, Malvern Instruments, Reino Unido), uma célula DTS 1070 com dois eletrodos, sem a presença de bolhas de ar e na temperatura de 25 °C. As amostras foram diluídas em água tipo 1 (Millipore Corporation), com pH igual a 6,0, até a concentração de 1 mg mL^{-1} . Essa análise foi realizada no LABEM do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

2.7.5. Difractometria de raios X

O padrão de difração de raios X (XRD) da HP β CD e dos CIs foi obtido a partir de um difratômetro de raios X (D8-Discover, Bruker, Alemanha). Foi utilizado um alvo de cobre com K_α com comprimento de onda de $1,5418 \text{ \AA}$, tensão de aceleração de 40 kV e corrente do filamento de 40 mA. A taxa de varredura foi de $0,05 \text{ seg}^{-1}$ no intervalo de 5 a 60°. Essa análise foi realizada no Laboratório de Difração e Espalhamento de Raios X do Departamento de Física da UFV.

2.7.6. Microscopia eletrônica de transmissão

Utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (TEM) (Tecnai G2-20 -FEI SuperTwin 200 kV) foi analisada a morfologia da HP β CD e dos CIs. Para isso, os CIs e a HP β CD foram diluídos em álcool isopropílico e colocados em banho ultrassônico por 10 min. Em seguida, as amostras foram adicionadas sobre uma *grid* de cobre do tipo Holey Carbon (SPI) de 300 *mesh* e armazenadas em dessecador até a análise. Os diâmetros das partículas foram medidos utilizando o programa ImageJ (<https://imagej.net/Welcome>). Essa análise foi realizada no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

2.8. Atividade larvicida

A atividade larvicida do OE de *P. guajava* e dos CIs foi realizada com larvas de *A. aegypti* de quarto instar (L4) (PPCampos strain, Campos dos Goytacazes, RJ) obtidas a partir de uma colônia de sucessivas gerações mantidas no insetário do Departamento de Biologia Geral da UFV. Os ovos foram eclodidos e as larvas mantidas em água decolorada, sendo alimentadas diariamente com ração de tartaruga (Reptolife, Alcon Pet, Camboriú, SC), sob temperatura controlada (28 ± 3 °C) e fotoperíodo de 12 h até L4, sendo este o tamanho ideal para a realização dos ensaios de ação larvicida seguindo a metodologia adaptada descrita por Consoli; Oliveira (1994) e WHO (2005).

Os ensaios larvicidas foram realizados com 25 larvas por tratamento. Os tratamentos corresponderam ao OE em DMSO (1), CIs (2) e OE sem solvente (3). Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata em incubadora, sob condições controladas (28 ± 3 °C; fotoperíodo de 12 h).

Para o experimento (1), soluções do OE em DMSO 1% (v v⁻¹) foram preparadas nas concentrações: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As larvas foram separadas e distribuídas em frascos de vidro contendo 50 mL das soluções. Nesse experimento, o controle negativo foi uma solução aquosa de DMSO 1% (v v⁻¹).

Os experimentos com os CIs (2) foram realizados de maneira semelhante ao descrito anteriormente, mas nenhum solvente orgânico foi adicionado e o controle negativo foi HP β CD em água. Para o CI obtido por KN, as

concentrações adotadas foram: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para o CI obtido por FD foi realizada a atividade larvicida com 600, 800 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para o experimento larvicida com o OE (3) foram utilizadas as concentrações de 10 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em água, à semelhança dos tratamentos com os CIs (2). Os experimentos com o controle negativo foram realizados simultaneamente com os tratamentos, utilizando quatro repetições. A verificação da mortalidade foi realizada 24 h após o início de cada ensaio. Foram consideradas mortas as larvas que não apresentaram movimento ou não responderam aos estímulos com a pipeta de Pasteur.

2.9. Análise estatística

A obtenção dos parâmetros estatísticos, como: análise de variância e regressão linear, foi realizada utilizando o Programa Minitab, versão 17. Para encontrar os valores da concentração letal média para matar 50% da população (CL_{50}) e para matar 90% da população (CL_{90}) das larvas de *A. aegypti*, foi utilizado o modelo Probit com distribuição normal a 95% de significância utilizando o Programa Minitab, versão 17.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hidrodestilação foi usada para extrair o OE das folhas da cultivar SEC da espécie *P. guajava*. O rendimento da extração foi de 0,30% (m m^{-1}) e a densidade do OE foi de 0,8883 g cm^{-3} . Outros estudos envolvendo a mesma cultivar obtiveram rendimento do OE de 0,35% (MENDES *et al.*, 2017), 0,32% (SOUZA *et al.*, 2017) e 0,11% (DE LIMA *et al.*, 2010). Embora ocorram essas variações, o rendimento do OE obtido neste trabalho está na faixa esperada, conforme o que está relatado na literatura para os OEs com utilização comercial, que está entre 0,30 e 3,86% (FADEL *et al.*, 2020).

A composição química dos principais compostos voláteis identificados no OE da cultivar SEC, determinada por cromatografia gasosa, está representada na Tabela 1 (Fig. 1). Dentre estes, existem seis compostos com área relativa entre 7,2 e 32,2%. Os compostos são formados, majoritariamente, por sesquiterpenos, representando mais de 80% dos constituintes identificados,

tendo apenas um monoterpeneo oxigenado, o 1,8-cineol. Os majoritários encontrados foram β -cariofileno, globulol e 1,8-cineol, considerando a área relativa no cromatograma superior a 10%.

Tabela 1. Identificação dos compostos presentes no óleo essencial da cultivar Século XXI da espécie *Psidium guajava*.

n	Composto ^a	IR _{cal} ^b	IR _{tab} ^c	A _{rel} (%) ^d	Massa molar (g mol ⁻¹)	Classificação terpênica ^e
1	1,8-cineol	1028	1026	10,9	154,25	MO
2	β -cariofileno	1417	1417	32,2	204,36	SH
3	β -selineno	1483	1489	7,2	204,36	SH
4	α -selineno	1493	1498	7,9	204,36	SH
5	β -nerolidol	1565	1561	9,1	222,37	SO
6	globulol	1582	1590	17,1	222,37	SO
Total identificado				84,4		

^aCompostos majoritários listados na ordem de eluição utilizando coluna Rtx[®]-5MS. ^bÍndice de retenção calculado através de dados obtidos por amostra de alcanos saturados (C₇-C₄₀). ^cÍndice de retenção tabelado (ADAMS, 2007; EL-SAYED, 2016; NIST, 2011). ^dCompostos com área relativa > 5% foram identificados. ^eClassificação terpênica: Monoterpeneo oxigenado (MO), sesquiterpeneo hidrocarboneto (SH), sesquiterpeneo oxigenado (SO).

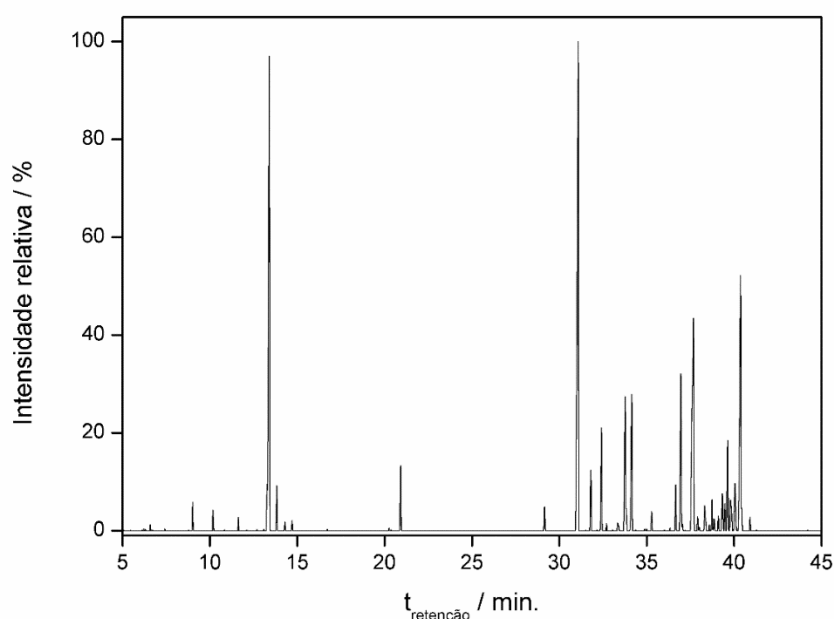


Figura 1. Cromatograma do óleo essencial da cultivar Século XXI da espécie *Psidium guajava*.

O composto β -cariofileno foi identificado com maior percentual (32,2%), indicando ser um importante metabólito secundário na composição do OE. Este composto é um sesquiterpeno hidrocarboneto de cadeia cíclica insaturada (Fig. 2), sendo comumente encontrado em OEs da cultivar SEC como um composto majoritário (BORAH *et al.*, 2019; DE LIMA *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017). Dessa forma, o β -cariofileno é um importante marcador da cultivar e apresenta atividades biológicas e farmacológicas, que despertam o interesse em obtê-lo, como: anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante (DAHAM *et al.*, 2015), anti-inflamatória (FERNANDES *et al.*, 2007), antiviral para a dengue (PÁJARO-CASTRO *et al.*, 2015), entre outras.

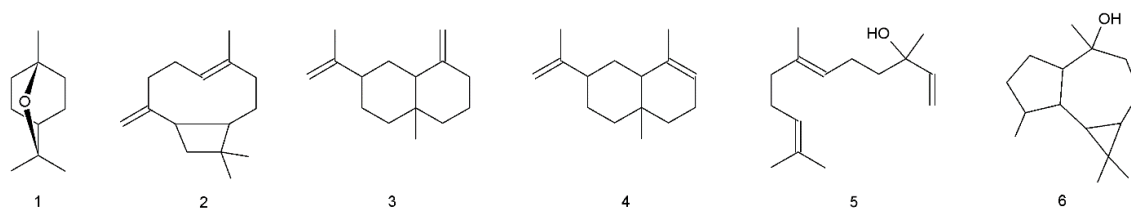


Figura 2. Estruturas químicas dos compostos identificados no óleo essencial da cultivar Século XXI da espécie *Psidium guajava*. 1) 1,8-cineol; 2) β -cariofileno; 3) β -selineno; 4) α -selineno; 5) β -nerolidol; 6) globulol.

Através do coeficiente de partição (P) e volume molecular (V), obtidos pelo *software* Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) (Tabela 2), é possível fazer algumas premissas a respeito das estruturas das moléculas.

O coeficiente de partição representa o equilíbrio de um composto entre duas fases imiscíveis, orgânica e aquosa. Portanto, P representa uma medida importante da hidrofobicidade do composto. Se $\log P = 0$, logo $P = 1$; assim, o composto tem a mesma afinidade pelas duas fases. Se $\log P < 0$, logo $P < 1$; assim, o composto tem uma maior afinidade pela fase aquosa. Por outro lado, se $\log P > 0$, então $P > 1$; assim, o composto tem maior afinidade pela fase orgânica. Através desse parâmetro é possível inferir quais compostos presentes no OE são mais hidrofóbicos, apresentando maior afinidade e melhor inclusão pela região hidrofóbica da cavidade do complexante HP β CD. No entanto, o impedimento estérico das moléculas deve ser considerado. Se o volume

molecular for adequado, pode ocorrer um melhor processo de inclusão na cavidade do HP β CD.

Tabela 2. Compostos presentes no óleo essencial da cultivar Século XXI da espécie *Psidium guajava* com o coeficiente de partição na escala logarítmica (log P) e volume molecular (V).

n	Composto	log P ^a	V (Å ³) ^b
1	1,8-cineol	2,72	166,66
2	β -cariofileno	5,17	229,95
3	β -selineno	5,02	230,51
4	α -selineno	5,24	229,95
5	β -nerolidol	5,06	253,17
6	globulol	4,07	238,72

^aCoeficiente de partição em escala logarítmica. ^bVolume molecular. Fonte: Molinspiration.

O β -cariofileno apresenta log P de 5,17 e volume molecular de 229,95 Å³ (Tabela 2), enquanto o globulol, que é o segundo composto com maior concentração no OE da cultivar SEC, possui log P = 4,07 e V = 238,72 Å³. Sendo assim, β -cariofileno é mais hidrofóbico e tem um volume molecular menor que o globulol, podendo ser melhor complexado na cavidade da HP β CD. Além disso, considerando que as membranas celulares são formadas por substâncias mais apolares, uma hipótese sugerida é que o composto mais apolar tem melhor interação e, conseqüentemente, maior ação tóxica ao organismo alvo, como o *A. aegypti*. Em um trabalho que avaliou a atividade larvicida de OEs em *A. aegypti* em cinco cultivares, incluindo a SEC, verificou-se que esta tinha maior quantidade de β -cariofileno e maior toxicidade do que as demais (MENDES *et al.*, 2017). Dentre os compostos identificados, 1,8-cineol é o menos hidrofóbico, podendo ter menor eficiência de complexação. No entanto, seu volume molecular é menor do que todos os outros compostos, podendo ser melhor complexado. O valor do log P da HP β CD é -11, sendo solúvel em meio aquoso e eficiente agente complexante (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018).

3.1. Caracterização dos complexos de inclusão

3.1.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de FTIR da HP β CD, do OE e dos CIs preparados pelos métodos de FD e KN são mostrados na Fig. 3. Em todos os espectros, observa-se a presença de uma banda larga representada por **a**, que possui número de onda de aproximadamente 3400 cm^{-1} e pode ser atribuída ao estiramento da ligação O-H (BARBOSA, 2007). A banda em 2930 cm^{-1} , também presente em todos os espectros, é atribuída ao estiramento assimétrico de CH_2 . Tanto a HP β CD quanto o OE possuem essas ligações em sua composição química, não sendo possível, somente através dessas bandas, comprovar a formação do CI.

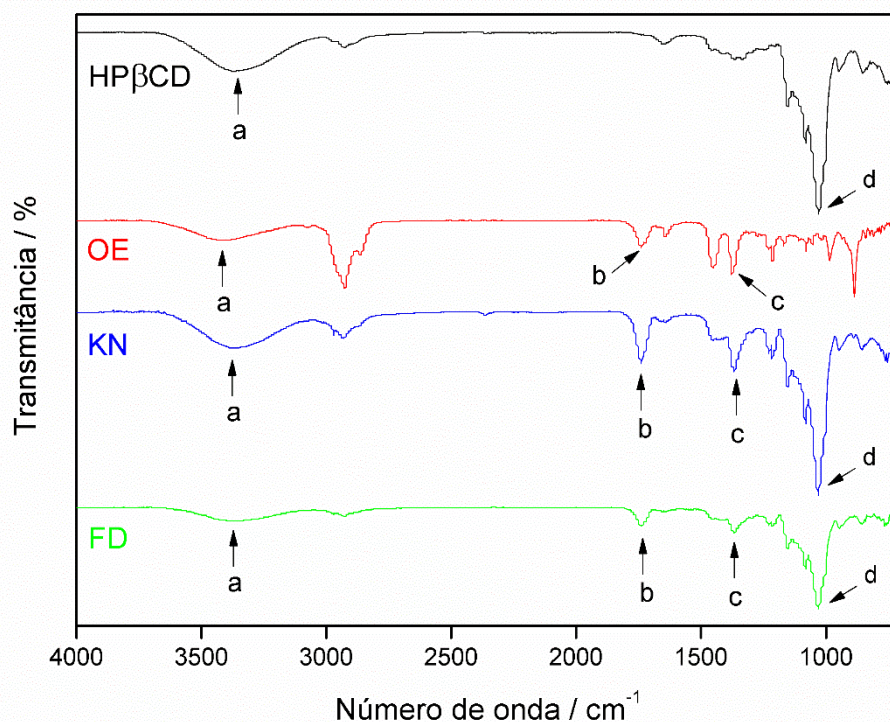


Figura 3. Espectros de FTIR para a HP β CD, óleo essencial da cultivar Século XXI da espécie *Psidium guajava* (OE) e dos complexos de inclusão obtidos por: maceração (KN) e liofilização (FD).

A banda em 1740 cm^{-1} , representada por **b**, está presente nos espectros do OE e nos CIs, mas não é observada no espectro da HP β CD. A banda **b** se refere ao estiramento da carbonila $\text{C}=\text{O}$ (BARBOSA, 2007). Nenhum dos compostos presentes no OE da cultivar SEC (Fig. 2) apresentam o grupo

carbonila, porém, apenas compostos com área relativa acima de 5% foram identificados por cromatografia.

Para comprovar a presença de carbonila de aldeído ou cetona no OE foi realizado um ensaio com 2,4-dinitrofenilhidrazina. A 2,4-DNFH reage com o grupo carbonila de aldeídos e/ou cetonas formando a 2,4-dinitrofenilhidrazona, que é um precipitado amarelo avermelhado, facilmente detectável, pois pequenas quantidades do composto carbonilado levam a um resultado positivo (ENGEL *et al.*, 2012). O precipitado formado, representado por **b** (Fig. 4), após a adição do OE na 2,4-DNFH mostrou que compostos com aldeídos e/ou cetonas estão presentes no OE da cultivar SEC, justificando a presença da carbonila no espectro de FTIR. É relevante destacar que a banda em 1740 cm^{-1} teve a intensidade aumentada para KN, quando comparado ao OE. Isso pode ter ocorrido porque os compostos mais voláteis podem ter evaporado durante o processo de maceração, aumentando a concentração de outros componentes do OE.

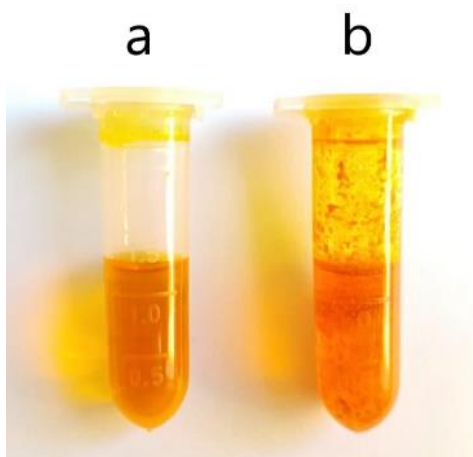


Figura 4. Teste de classificação de aldeídos e/ou cetonas utilizando o óleo essencial (OE) de *Psidium guajava* em 2,4-dinitrofenilhidrazina, sendo: 2,4-DNFH (a) e OE com 2,4-DNFH (b).

Fonte: O autor.

Outra banda muito importante, que indica a complexação do OE, é a banda **c**, com número de onda de 1380 cm^{-1} e que está presente, principalmente, nos espectros do OE e nos CIs. Essa banda é atribuída à frequência vibracional da deformação angular simétrica de CH_3 (BARBOSA, 2007). Como a $\text{HP}\beta\text{CD}$ utilizada possui apenas uma substituição no anel com o radical hidroxipropil,

justifica-se não apresentar uma banda tão significativa nessa região para o espectro quando comparado ao OE e aos CIs. A banda **d** em 1030 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C-O de éter cíclico e está presente no espectro da HP β CD e dos CIs, corroborando com as indicações representadas pelas bandas **b** e **c**, que comprovam a formação dos CIs. O espectro do OE não apresenta a banda **d**, sugerindo que o 1,8-cineol pode ter sido degradado. Outros autores também evidenciaram a presença dessas mesmas bandas no espectro da HP β CD (MAGALHÃES *et al.*, 2020; RAKMAI *et al.*, 2018).

É importante notar que as intensidades das bandas podem indicar que existem maiores quantidades de vibrações no espectro do CI obtido por KN do que por FD, sugerindo que o método de preparo por KN pode ter sido mais eficiente. Porém, as outras técnicas analíticas utilizadas para caracterização devem confirmar essa hipótese. É possível, entretanto, afirmar que houve interação entre o OE e a HP β CD com base nos resultados apresentados pelos espectros de FTIR.

3.1.2. Análise termogravimétrica

A TGA permite determinar a estabilidade térmica de uma amostra em função da variação da massa, quando esta é submetida a uma programação de temperatura (CANEVAROLO JUNIOR, 2003). Pode-se ver na Fig. 5 as curvas termogravimétricas da HP β CD, do OE de *P. guajava* e dos CIs obtidos por KN e FD. A partir desses resultados, é possível observar que o OE sofre degradação a baixas temperaturas e em uma única etapa, pois a massa vai sendo perdida a partir de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, tendo o máximo de degradação em $157\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em $180\text{ }^{\circ}\text{C}$, o analito é totalmente degradado (Fig. 6b).

A HP β CD possui três eventos térmicos de perda de massa (Fig. 6a), também mostrados na Tabela 3. O primeiro ocorre em $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ e corresponde à perda de água que está presente nas cavidades do material ($\Delta m_1 = 18,4\%$). O segundo evento ocorre em $153\text{ }^{\circ}\text{C}$, com uma pequena variação de massa ($\Delta m_2 = 1,6\%$), representando a degradação da HP β CD ou a água que ficou retida na cavidade (BABA OGLU *et al.*, 2017; MAGALHÃES *et al.*, 2020). O terceiro evento ocorre em $355\text{ }^{\circ}\text{C}$ com perda de massa de $76,9\%$, representando a decomposição completa do material (Δm_3). No estado natural, a cavidade

hidrofóbica da HP β CD é preenchida por moléculas de água, o que é energeticamente desfavorável (MARQUES *et al.*, 2019). Ao adicionar compostos mais apolares, como os presentes nos OEs, as moléculas de água são liberadas das cavidades do oligossacarídeo e estas são preenchidas com o OE.

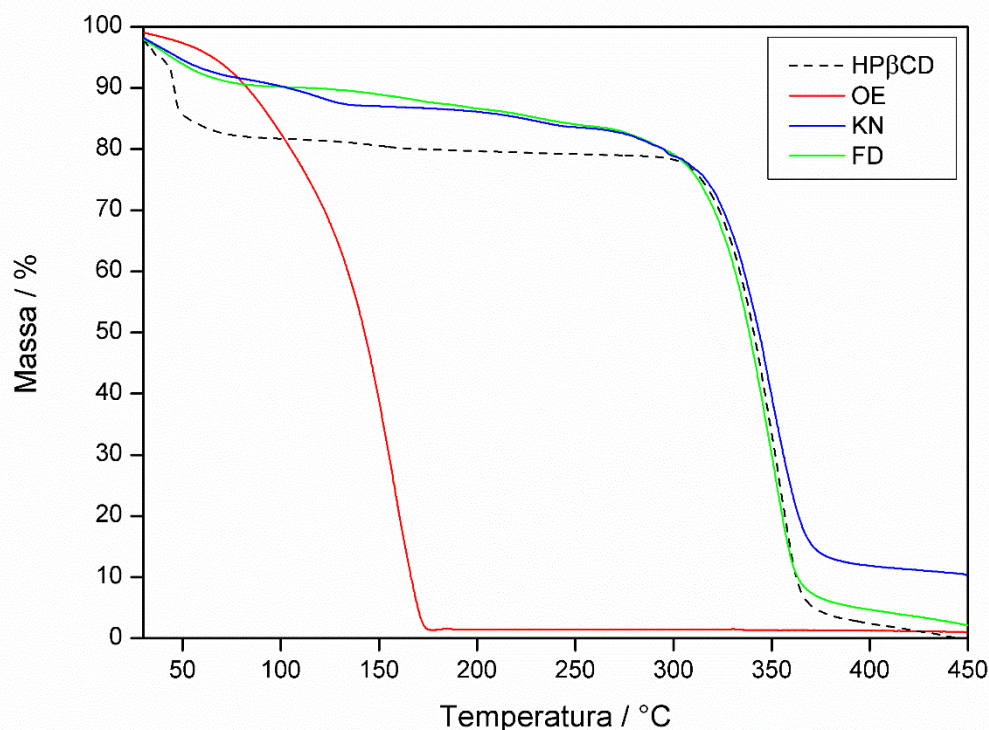


Figura 5. Curvas termogravimétricas da HP β CD, do óleo essencial da cultivar Século XXI de *Psidium guajava* (OE) e dos complexos de inclusão obtidos por maceração (KN) e liofilização (FD).

O processo de perda de massa dos CIs está apresentado na Tabela 3, foi realizado em duplicata e para os dois métodos (KN e FD) pode ser dividido em três etapas (Fig. 6c-6f). A primeira etapa se refere a perda de água por evaporação (Δm_1), a segunda é a degradação do OE externo à HP β CD (não complexado) (Δm_2) (MARQUES *et al.*, 2019) e a terceira é referente a degradação do CI (Δm_3).

A maior perda de massa dos CIs ocorre em maior temperatura (Δm_3) e quando comparado ao OE, pode-se concluir que os CIs apresentam grande estabilidade térmica. O aumento da estabilidade térmica de materiais protegidos foi verificado por outros autores que utilizaram CIs com a HP β CD e realizaram TGA (BABAUGLU *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2019a).

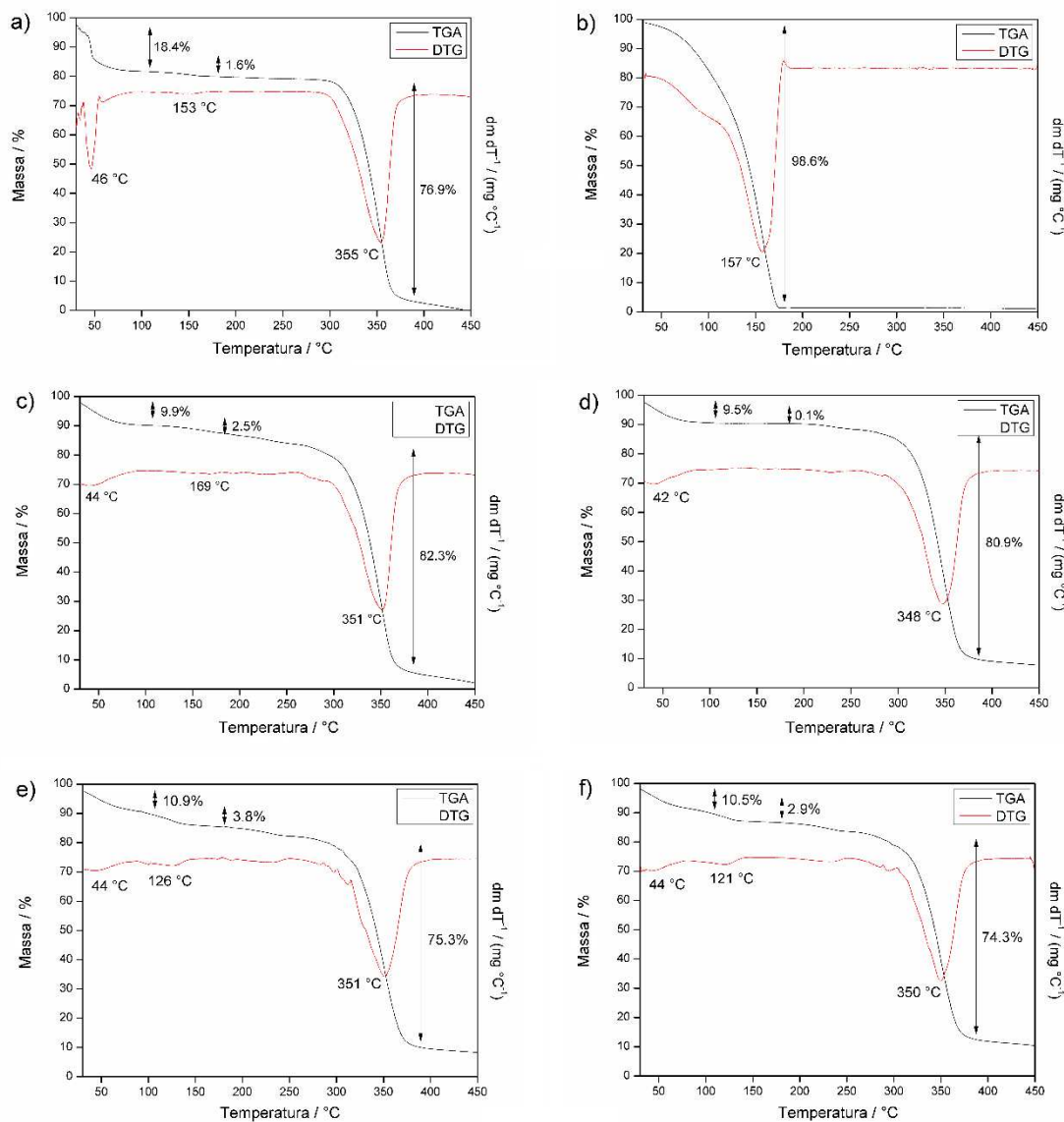


Figura 6. Curva termogravimétrica com derivada: a) HP β CD; b) óleo essencial da cultivar Século XXI da espécie *Psidium guajava*; c) complexo de inclusão obtido por liofilização (FD), repetição 1; d) complexo de inclusão obtido por liofilização (FD), repetição 2; e) complexo de inclusão obtido por maceração (KN), repetição 1; f) complexo de inclusão obtido por maceração (KN), repetição 2.

Além disso, é verificado que a volatilização do OE na parte externa dos CIs praticamente não ocorreu (Δm_2). Sendo assim, a TGA auxilia na comprovação da formação do CI sendo uma técnica imprescindível para indicar a existência de interação entre hóspede e hospedeiro. Constata-se também que o percentual de água perdida pela HP β CD é maior do que nos CIs (Δm_1). Isso

pode ser mais um indicativo de que a complexação foi alcançada, uma vez que durante a preparação dos complexos as moléculas de água na cavidade do hospedeiro foram substituídas por compostos mais apolares, que compõem o OE (ANDRADE *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2019).

Tabela 3. Perda de massa das amostras: HP β CD e dos complexos de inclusão obtidos por maceração (KN) e liofilização (FD).

Amostra	Δm_1 (%) ^a	Δm_2 (%) ^b	Δm_3 (%) ^c
	0-110 °C	110-180 °C	180-390 °C
HP β CD	18,4	1,6	76,9
KN	10,7 \pm 0,2	3,3 \pm 0,4	74,8 \pm 0,5
FD	9,7 \pm 0,2	1,3 \pm 1,2	81,6 \pm 0,7

Variação de massa: ^aperda de água, ^bdegradação da HP β CD ou do OE não complexado ou da água que ficou retida na cavidade e ^cdegradação da HP β CD ou do complexo de inclusão.

3.1.3. Análise de tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta por DLS

A distribuição do tamanho hidrodinâmico e o potencial Zeta são parâmetros importantes na caracterização da HP β CD e dos CIs. Não há um tamanho ideal dos CIs, no entanto, seu tamanho irá determinar as suas potenciais aplicações (KOTRONIA *et al.*, 2017). Como mostrado na Tabela 4, em água, todos os CIs possuem tamanho nanométrico, considerando a escala nano entre 1 e 1000 nm de diâmetro (SUGANYA; ANURADHA, 2017; WHELEHAN; MARISON, 2011). É importante ressaltar que para ser considerado nano ou micro material, não basta a amostra ter apenas um tamanho reduzido, é necessário que esta apresente modificação em suas propriedades originais, gerando outras funcionalidades devido ao aumento da sua área superficial (ZARBIN, 2007). No caso dos CIs, as aplicações dos OEs são ampliadas através dessa nanotecnologia, sendo os CIs veículos imprescindíveis para a utilização larvicida, solubilizando o óleo em meio aquoso, além de gerar maior estabilidade para armazenar o produto.

A HP β CD exibiu diâmetro médio maior do que os CIs obtidos por KN e FD. Esse resultado pode ser justificado pelos valores de PZ obtidos, que representam um indicador da estabilidade dos CIs em suspensão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O CI obtido por KN teve um valor de PZ, em

módulo, maior do que FD, e FD foi maior do que HP β CD. Dessa forma, as partículas obtidas por KN possuem maior intensidade de forças repulsivas e menor tendência de agregação em solução aquosa, portanto, sendo mais estáveis, apresentando assim menor diâmetro médio da partícula. Logo, quanto maior for o PZ, em módulo, menor é o diâmetro da partícula devido a maior estabilidade dos CIs em suspensão, com destaque para KN e FD, que apresentam diâmetros inferiores a HP β CD. Apesar das variações encontradas para o PZ, os baixos valores indicam uma tendência de agregação em solução aquosa e isso pode ser verificado pelas partículas apresentarem o tamanho maior do que o previsto (HILL; GOMES; TAYLOR, 2013; KOTRONIA *et al.*, 2017). A tendência de aglomeração pode ser explicada pela falta de carga líquida na superfície das partículas resultando em forças repulsivas insuficientes para evitar que isso ocorra (HILL; GOMES; TAYLOR, 2013).

Tabela 4. Diâmetro hidrodinâmico da partícula, potencial Zeta e índice de polidispersão da HP β CD e dos complexos de inclusão obtidos por maceração (KN) e liofilização (FD).

Amostra	Diâmetro médio da partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)	Índice de polidispersão (PDI)
HP β CD	611,3 ^a \pm 164,2	-11,2 ^a \pm 2,1	0,52 ^a \pm 0,08
KN	352,0 ^b \pm 99,2	-37,8 ^c \pm 2,7	0,38 ^b \pm 0,08
FD	416,2 ^b \pm 46,7	-25,8 ^b \pm 7,2	0,45 ^{ab} \pm 0,04

Letras iguais entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$.

O PDI representa a distribuição do tamanho das partículas e mede a uniformidade dos tamanhos dos CIs preparados (KOTRONIA *et al.*, 2017). PDI com o valor próximo a zero ($< 0,10$) indica pouca variabilidade no tamanho, sendo um sistema monodisperso, enquanto valores maiores ($> 0,10$) indicam sistemas polidispersos (HILL; GOMES; TAYLOR, 2013). De acordo com os valores encontrados, pode-se concluir que o sistema é polidisperso para todas as partículas. Considerando a tendência de aglomeração, geralmente os agregados não ocorrem de maneira uniforme, podendo gerar variabilidade no tamanho dos CIs, o que justifica os valores de PDI obtidos (HILL; GOMES; TAYLOR, 2013).

3.1.4. Difractometria de raios X

A difratometria de raios X é um método cristalográfico que permite auxiliar a verificação da complexação, isso porque a cristalinidade da molécula hóspede geralmente muda quando ela interage com uma molécula hospedeira (SRINIVASAN; STALIN, 2014). Os difratogramas da HP β CD e dos CIs são mostrados na Fig. 7.

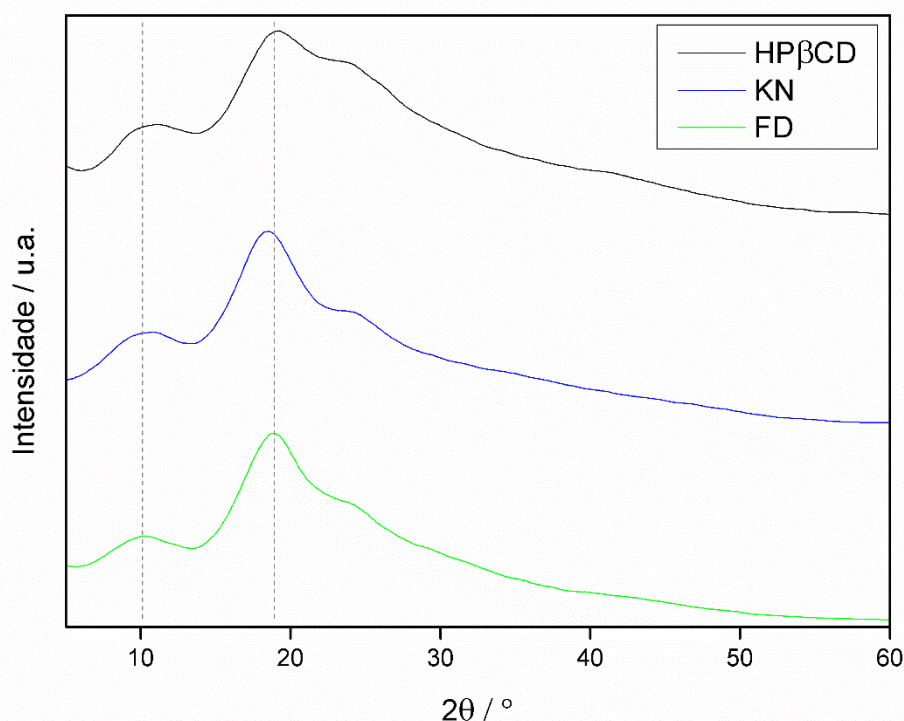


Figura 7. Difrátograma da HP β CD e dos complexos de inclusão obtidos por maceração (KN) e liofilização (FD).

O perfil cristalino da HP β CD apresenta três bandas largas, sendo as bandas com 2θ em torno de 10° e 19° mais evidentes, que são características de compostos amorfos, semelhante ao que foi encontrado por outros trabalhos (GAO *et al.*, 2019b; MAGALHÃES *et al.*, 2020). A falta de cristalinidade da HP β CD pode ser devido à perda de regularidade da molécula ao longo das cadeias oligossacarídicas (RAOOV; MOHAMAD; ABAS, 2013).

Nos difratogramas dos CIs os picos podem ter sua intensidade e posição angular modificadas, em relação ao OE, e isso pode evidenciar, juntamente com as outras técnicas analíticas, a confirmação da complexação (MAGALHÃES *et al.*, 2020). Pode-se ver através dos resultados obtidos que houve a interação do

OE da cultivar SEC com a HP β CD. Os CIs preparados por KN e FD, apesar de manter a estrutura amorfa, exibiram um pequeno estreitamento e alongamento da banda em torno de 19° nos difratogramas, em comparação com a HP β CD, principalmente no caso do CI obtido por KN. Essa alteração das bandas pode ocorrer devido ao aumento da cristalinidade dos compostos quando acontece a complexação, com alterações nos perfis de difração da amostra. Sugere-se assim que a introdução de moléculas mais volumosas poderá organizar melhor os oligossacarídeos para hospedarem o OE (MAGALHÃES *et al.*, 2020).

3.1.5. Curva analítica e eficiência de complexação

Para verificar a EC, foi obtida a curva analítica do OE da cultivar SEC a partir de um espectrofotômetro UV-Vis (Fig. 8). É possível observar que o comprimento de onda de máxima de absorção ocorre em 193 nm e este foi adotado para identificar e quantificar o OE extraído do CI. A curva analítica é mostrada como *insert* da Fig. 8 e a equação da regressão linear obtida foi $y = 59,40x - 0,0280$, com $R^2_{ajustado} = 0,9300$ e $F_{ajuste} = 0,371$ ($p < 0,05$).

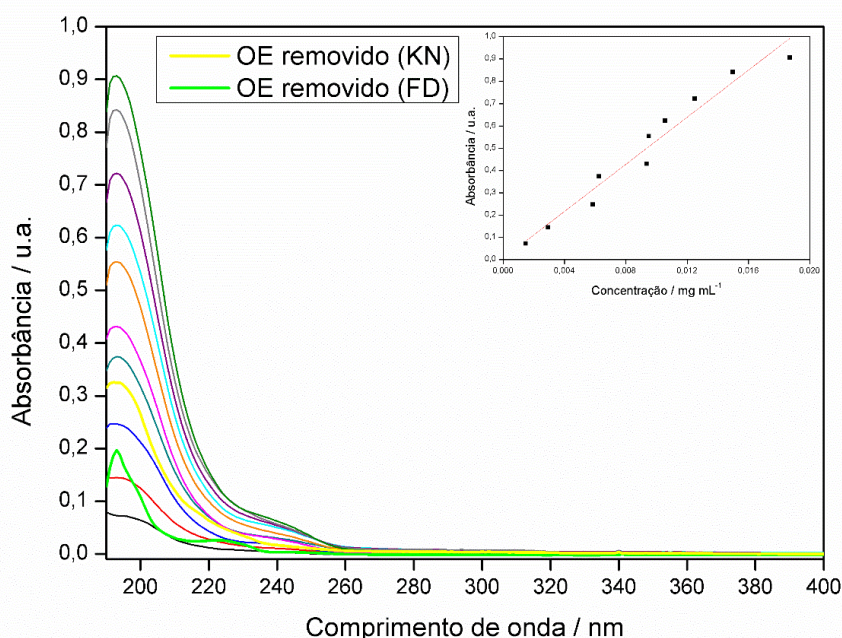


Figura 8. Espectro de absorção no UV-Vis de soluções padrão do óleo essencial (OE) da cultivar Século XXI de *Psidium guajava* em acetonitrila (1,46 a 18,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e do OE removido do complexo de inclusão pelo método de maceração (KN) e liofilização (FD) em acetonitrila. Como *insert* está a curva analítica do OE em acetonitrila ($\lambda_{\text{máx}} = 193 \text{ nm}$).

Ao analisar o espectro do OE extraído da HP β CD pelos dois métodos (Fig. 8) observa-se que o perfil da curva obtida por KN apresenta uma maior concentração de OE no CI, além de possuir um perfil similar ao OE em toda a faixa de comprimento de onda. Isso evidencia que, de forma geral, os compostos presentes no OE foram complexados pelo método KN. Por outro lado, a curva do OE extraído do CI obtido por FD, além de possuir menor concentração, demonstra um aspecto diferente do OE. Assim, pode-se inferir que nem todos os compostos presentes no OE foram complexados na HP β CD pelo método FD.

Para calcular a quantidade de OE aprisionado no hospedeiro, pelos métodos de FD e KN, foi realizado o cálculo da EC (Equação 2 e 3) e os resultados são apresentados na Tabela 5. Foi realizada a correção da EC, visto que uma pequena quantidade de OE foi complexada na parte externa da HP β CD, conforme demonstrado pela TGA.

Tabela 5. Eficiência de complexação com correção para os métodos de maceração (KN) e liofilização (FD).

Método físico	EC (%) ^c	P _{CI} (%) ^d	P _{HPβCD} (%) ^e	EC _c (%) ^f
FD	50,8 ^b \pm 1,3	1,3	1,6	50,8
KN	80,3 ^a \pm 6,9	3,3	1,6	78,6

Letras iguais entre linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$. ^cEficiência de complexação com desvio padrão. ^dPerda de massa do complexo de inclusão. ^ePerda de massa da HP β CD. ^fEficiência de complexação corrigida.

A perda de massa do CI (P_{CI}) e a perda de massa da HP β CD (P_{HP β CD}) foram obtidas através da TGA para o intervalo de temperatura entre 110 e 180 °C (Tabela 3). A partir desses resultados e da Eq. 3 foi possível calcular a EC corrigida. O método de complexação por KN é mais eficiente, com EC_c de 78,6%, enquanto para a FD foi de 50,8%. O desvio padrão maior para o método de KN pode ser justificado por ser uma forma manual de complexação em que a força e a velocidade empregados são variáveis para cada repetição realizada.

Em um trabalho utilizando a complexação do OE das folhas de *P. guajava*, sem distinção de cultivar, em HP β CD pelo método de FD verificou-se que a EC obtida foi de 52,5% (RAKMAI *et al.*, 2018). Além disso, a composição química do OE citado anteriormente foi diferente deste estudo, apresentando majoritariamente limoneno e 1,8-cineol.

Outra investigação de comparação entre os métodos de complexação utilizados nesse trabalho verificou que a EC da HP β CD com o carvacrol, um monoterpeneo oxigenado, foi de 78,09% e 83,74%, para KN e FD, respectivamente, ou seja, o método por FD foi superior (KAMIMURA *et al.*, 2014). Um resultado semelhante foi relatado para o CI da beta-ciclodextrina com o carvacrol, com a EC de 83,8% e 91,3%, para KN e FD, respectivamente (SANTOS *et al.*, 2015).

Para verificar que a HP β CD, que está insolúvel em acetonitrila, não interfere na absorbância do OE extraído do CI, foi realizada a leitura de sua solução no espectrofotômetro UV-Vis (Fig. 9). O pequeno valor de absorbância entre 190 e 200 nm de HP β CD em acetonitrila pode ser devido a absorbância do grupo cromóforo nitrila. Assim, como as leituras espectrofotométricas do complexo de inclusão foram realizadas desconsiderado o branco (acetonitrila), este não teve interferência na quantificação da eficiência de complexação.

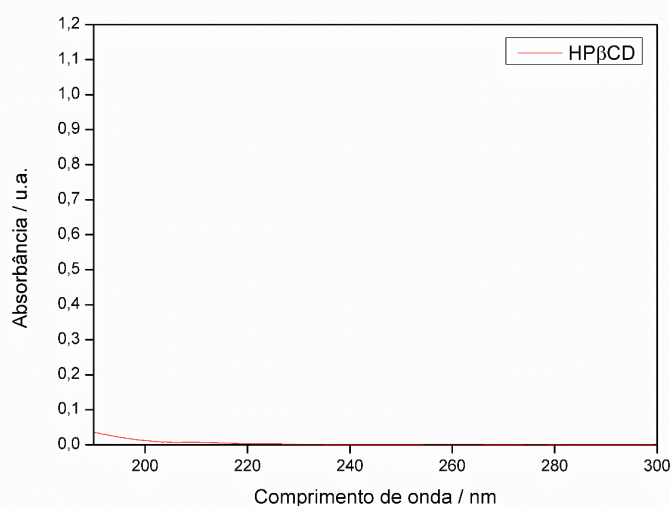


Figura 9. Espectro de absorção no UV-Vis da HP β CD em acetonitrila na mesma quantidade utilizada na maior concentração do complexo de inclusão.

3.1.6. Microscopia eletrônica de transmissão

A TEM fornece imagens que confirmam que ocorreu a complexação do OE na HP β CD (Fig. 10). Ao comparar as diferenças de imagem entre HP β CD e os CIs, verifica-se que a HP β CD é amorfa, porosa e com cavidades presentes em uma grande extensão (Fig. 10a). Isso foi observado em outros trabalhos que realizaram a microscopia da HP β CD (GAO *et al.*, 2019a; PINHEIRO *et al.*,

2017b). Após a formação dos CIs, o OE entra nas cavidades do hospedeiro formando esferas irregulares com aparência e forma semelhantes para KN e FD, porém, com tamanho distinto (Fig. 10c e 6d). O diâmetro do CI obtido por KN e FD, observado nas imagens, foi de cerca de 80 e 40 nm, respectivamente. Na análise de DLS, verificou-se que o diâmetro dos CIs foi aproximadamente 400 nm, porém os tamanhos observados nas imagens de microscopia foram bem menores, o que confirma que os CIs, em solução aquosa, apresentam tendência de aglomeração, o que não foi observado pela TEM (Fig. 10b). Babaoglu *et al.* (2017) também verificaram menor diâmetro do CI, utilizando HP β CD, medido por TEM do que por DLS. Isso ocorre porque a medida por DLS considera não apenas o tamanho físico da partícula, mas também como ela interage com o líquido ao seu redor.

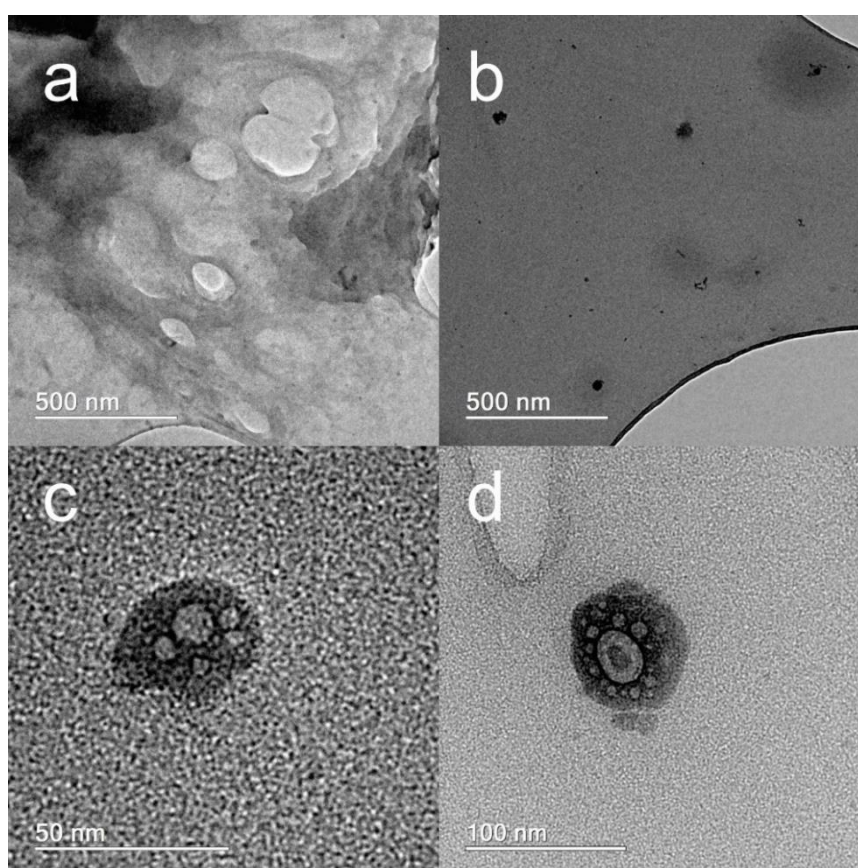


Figura 10. Morfologia por microscopia eletrônica de transmissão: a) HP β CD; b e c) complexo de inclusão obtido por liofilização; d) complexo de inclusão obtido por maceração.

Através das variações das tonalidades de cinza é possível identificar o OE dentro da HP β CD. As regiões mais escuras podem representar o feixe de

elétrons sendo barrado e regiões mais claras mostram onde há maior quantidade de elétrons transmitidos. Assim, pode-se concluir que existem diferentes materiais nos CIs (PIRES *et al.*, 2019b). Tons mais claros podem estar relacionados ao OE e cores mais escuras a HP β CD, confirmando que o OE está dentro das cavidades e que os CIs produzidos estão em nanoescala.

3.2. Atividade larvicida

Os resultados encontrados para a atividade larvicida do OE sem solvente foram aleatórios, sem consistência, pois baixas concentrações eliminaram mais larvas do que as maiores. Além disso, cada réplica experimental apresentou diferenças marcantes em termos de valores de mortalidade. Esses resultados podem ser explicados pela baixa solubilidade aquosa do OE da cultivar SEC, fazendo com que o OE não se misture em solução. Isso significa que o contato direto do OE com as larvas não foi eficiente. Assim, esse contato é uma condição importante para que o OE exerça sua ação tóxica. Logo, a presença de um solvente orgânico é necessária.

A atividade larvicida do OE em DMSO apresentou valores de CL₅₀ e CL₉₀ de 51,49 e 64,51 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 6). Entretanto, para o CI obtido por KN, a toxicidade foi de 77,54 e 107,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente. Os OEs que exibem CL₅₀ inferior a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sob avaliação após 24 h, podem ser classificados como produtos promissores, pois possuem efeito larvicida significativo (RAVI KIRAN *et al.*, 2006). De acordo com este critério, tanto o OE em DMSO quanto o CI obtido por KN são muito eficientes para matar as larvas de *A. aegypti*. Por outro lado, o experimento com o CI obtido pelo método de FD demonstrou ação tóxica com valores de concentração acima de 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, eliminando completamente as larvas a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Portanto, o método FD não foi tão eficiente para complexar compostos bioativos muito significativos para a atividade larvicida em *A. aegypti*.

As curvas de atividade larvicida do OE em DMSO e do CI obtido por KN são apresentadas na Figura 11. Os controles negativos, solução aquosa de DMSO 1% (v v⁻¹) e HP β CD, não tiveram efeito tóxico nas larvas.

Na literatura não existem trabalhos publicados utilizando o CI do OE em HP β CD com atividade larvicida em *A. aegypti*. Em comparação com um estudo que utilizou o CI de β CD com o OE de *Citrus sinensis* contra larvas de *A. aegypti*,

o OE em solvente também teve ação tóxica superior ao CI, ou seja, o OE apresentou valor de CL_{50} inferior (GALVÃO *et al.*, 2015). Por outro lado, outros estudos verificaram que o OE complexado com β CD teve toxicidade superior ao OE. Isso ocorreu para o OE de *Lippia gracilis* e da mistura dos OEs de *Illicium verum* e *Trachyspermum ammi*, e os autores justificaram esse resultado como uma melhora na solubilidade aquosa do OE complexado (GALVÃO *et al.*, 2019; PANDIYAN; MATHEW; MUNUSAMY, 2019).

Tabela 6. Toxicidade do óleo essencial da cultivar SEC de *Psidium guajava* e do complexo de inclusão obtido por maceração (KN) em larvas de *Aedes aegypti*.

	n ^a	CL ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^b	CL ₉₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^c	p-valor ^d
OE em DMSO 1%	1000	51,49 (50,02-52,97)	64,51 (62,44-67,06)	<0,001
KN	1500	77,54 (75,31-79,76)	107,29 (104,08-110,97)	<0,001

^aNúmero de larvas utilizadas. ^bConcentração letal média necessária para matar 50% da população com intervalo de confiança. ^cConcentração letal média necessária para matar 90% da população com intervalo de confiança. ^dp<0,05.

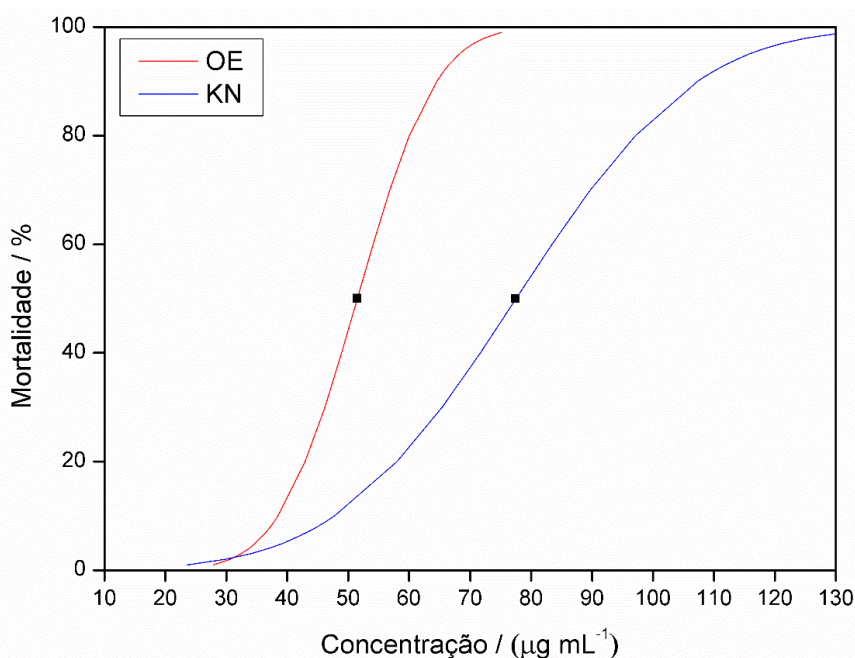


Figura 11. Curvas de mortalidade das larvas após 24 h de exposição ao óleo essencial da cultivar Século XXI da espécie *Psidium guajava* (OE) e do complexo de inclusão obtido por maceração (KN). Os pontos pretos representam os valores de CL_{50} (concentração letal média necessária para matar 50% da população) ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que o CI do OE da cultivar SEC por KN teve ação tóxica em larvas de *A. aegypti* inferior ao OE em DMSO. Isso pode ter ocorrido pelo fato do OE estar protegido sendo necessário a ingestão do produto pelas larvas, como se fosse um “cavalo de Troia”, em que as larvas se alimentam e se intoxicam (FERREIRA *et al.*, 2019). Outra hipótese sugerida é que alguns compostos bioativos não foram complexados ou foram complexados em menores quantidades do que estariam presentes no OE. No entanto, devido à instabilidade do OE à luz e ao calor, ele não pode ser aplicado em recipientes contendo água, que são potenciais criadouros de larvas, e nem fora das casas, portanto, o CI é mais adequado. Além disso, é importante considerar que o OE sem solvente não pode ser utilizado, não podendo assim ter sua toxicidade comparada com o CI, sendo o CI, seja por KN ou FD, eficiente para matar larvas de *A. aegypti*.

4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos por diferentes técnicas analíticas, pode-se concluir que a complexação do OE da cultivar SEC da espécie *P. guajava* em HP β CD empregando os métodos de KN e FD foi bem-sucedida. Porém, o método por KN apresentou maior EC e melhor atividade larvicida em *A. aegypti* quando comparado ao método FD. Os CIs obtidos apresentaram diâmetro em nanoescala, com estabilidade térmica superior ao OE. A atividade larvicida do OE com solvente em *A. aegypti* foi a que mais se destacou, apresentando menor valor de CL₅₀, seguida pelo CI obtido por KN e FD. Entretanto, o OE sem solvente não pode ser aplicado para essa finalidade, devido à sua baixa solubilidade em água e ineficiência como larvicida. Dessa forma, os CIs apresentam-se como produtos com potencial aplicação e comercialização por serem ambientalmente seguros e ecologicamente corretos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. EUA: Allured Publishing Corporation, 2007.

ANDRADE, T. A. *et al.* Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of Hyptis martiusii Benth essential oil in β -cyclodextrin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 201–207, maio 2017.

ASBAHANI, A. E. *et al.* Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, abr. 2015.

BABAOGLU, H. C. *et al.* Encapsulation of clove essential oil in hydroxypropyl beta-cyclodextrin for characterization, controlled release, and antioxidant activity. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 5, p. e13202, out. 2017.

BARBOSA, L. C. DE A. **Espectroscopia no Infravermelho**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2007.

BORAH, A. *et al.* Chemical Composition of Leaf Essential Oil of *Psidium guajava* L. from North East India. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 22, n. 1, p. 248–253, 2 jan. 2019.

CANEVAROLO JUNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2003.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Editora FIOCRUZ, 1994.

DAHAM, S. *et al.* The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of Aquilaria crassna. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808–11829, 26 jun. 2015.

DAMASCENO, C. S. B. *et al.* Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils in the Family Lauraceae: A Systematic Review of the Literature. **Planta Medica**, v. 85, n. 13, p. 1054–1072, set. 2019.

DE LIMA, R. K. *et al.* Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 41–44, mar. 2010.

EL-SAYED, A. M. **The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals**. Disponível em: <<http://www.pherobase.com>>. Acesso em: 27 maio. 2020.

ENGEL, R. G. *et al.* **Química Orgânica Experimental: técnicas de escala pequena**. 3. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

FADEL, H. H. M. *et al.* Correlation between chemical composition and radical scavenging activity of 10 commercial essential oils: Impact of microencapsulation on functional properties of essential oils. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 6815–6827, ago. 2020.

FERNANDES, E. S. *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of Cordia

verbenacea. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, ago. 2007.

FERREIRA, T. P. *et al.* Prolonged mosquitocidal activity of Siparuna guianensis essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. e0007624, 9 ago. 2019.

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

GALVÃO, J. G. *et al.* Lippia gracilis essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes: an environmentally safe formulation to control Aedes aegypti larvae: Lippia gracilis essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes. **Pest Management Science**, v. 75, n. 2, p. 452–459, fev. 2019.

GAO, S. *et al.* Preparation and characterization of cyanazine–hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. **RSC Advances**, v. 9, n. 45, p. 26109–26115, 2019a.

GAO, S. *et al.* Physicochemical properties and fungicidal activity of inclusion complexes of fungicide chlorothalonil with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, p. 111513, nov. 2019b.

GOVINDARAJAN, M. *et al.* High efficacy of (Z)- γ -bisabolene from the essential oil of Galinsoga parviflora (Asteraceae) as larvicide and oviposition deterrent against six mosquito vectors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 11, p. 10555–10566, abr. 2018.

HAMMOUD, Z. *et al.* Drug-in-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-in-lipoid S100/cholesterol liposomes: Effect of the characteristics of essential oil components on their encapsulation and release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 579, p. 119151, abr. 2020.

HILL, L. E.; GOMES, C.; TAYLOR, T. M. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 86–93, abr. 2013.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, jan. 2018.

KAMIMURA, J. A. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 701–709, jul. 2014.

KOTRONIA, M. *et al.* Encapsulation of Oregano (Origanum onites L.) Essential Oil in β -Cyclodextrin (β -CD): Synthesis and Characterization of the Inclusion Complexes. **Bioengineering**, v. 4, n. 4, p. 74, 9 set. 2017.

LINSTROM, P. J.; MALLARD, W. G. **NIST Chemistry WebBook**. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 27 maio. 2020.

MAGALHÃES, T. S. S. DE A. *et al.* Development and Evaluation of Antimicrobial and Modulatory Activity of Inclusion Complex of Euterpe oleracea Mart Oil and β -Cyclodextrin or HP- β -Cyclodextrin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 942, 31 jan. 2020.

MARQUES, C. S. *et al.* β -Cyclodextrin inclusion complexes with essential oils: Obtention, characterization, antimicrobial activity and potential application for food preservative sachets. **Food Research International**, v. 119, p. 499–509, maio 2019.

MENDES, L. A. *et al.* Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 684–689, dez. 2017.

MOSSA, A.-T. H. Green Pesticides: Essential Oils as Biopesticides in Insect-pest Management. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 354–378, 1 maio 2016.

PÁJARO-CASTRO, N. *et al.* Potential interaction of components from essential oils with dengue virus proteins. p. 16, 2015.

PANDIYAN, G. N.; MATHEW, N.; MUNUSAMY, S. Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p. 549–556, jun. 2019.

PARAMERA, E. I.; KONTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 913–922, abr. 2011.

PINHEIRO, J. *et al.* Inclusion Complexes of Copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) Oleoresin and Cyclodextrins: Physicochemical Characterization and Anti-Inflammatory Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2388, 18 nov. 2017.

PIRES, F. Q. *et al.* Lipid nanoparticles as carriers of cyclodextrin inclusion complexes: A promising approach for cutaneous delivery of a volatile essential oil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, p. 110382, out. 2019.

RAKMAI, J. *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 219–225, jan. 2018.

RAOOV, M.; MOHAMAD, S.; ABAS, M. Synthesis and Characterization of β -Cyclodextrin Functionalized Ionic Liquid Polymer as a Macroporous Material for the Removal of Phenols and As(V). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 1, p. 100–119, 23 dez. 2013.

RAVI KIRAN, S. *et al.* Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2481–2484, dez. 2006.

RODRÍGUEZ, J. *et al.* Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p. 41–59, maio 2016.

SANTOS, E. H. *et al.* Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 583–592, jan. 2015.

SARMA, R. *et al.* Combinations of Plant Essential Oil Based Terpene Compounds as Larvicidal and Adulticidal Agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9471, dez. 2019.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, out. 2003.

SILVA, J. A. A. *et al.* Repellency of selected *Psidium guajava* cultivars to the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Crop Protection**, v. 84, p. 14–20, jun. 2016.

SOUSA, V. D. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. v. 2

SOUZA, T. DA S. DE *et al.* Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38–44, fev. 2017.

SRINIVASAN, K.; STALIN, T. Study of inclusion complex between 2,6-dinitrobenzoic acid and β -cyclodextrin by ¹H NMR, 2D ¹H NMR (ROESY), FT-IR, XRD, SEM and photophysical methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 130, p. 105–115, set. 2014.

SUGANYA, V.; ANURADHA, V. Microencapsulation and Nanoencapsulation: A Review. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 3, 25 mar. 2017.

TAO, F. *et al.* Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 247–255, nov. 2014.

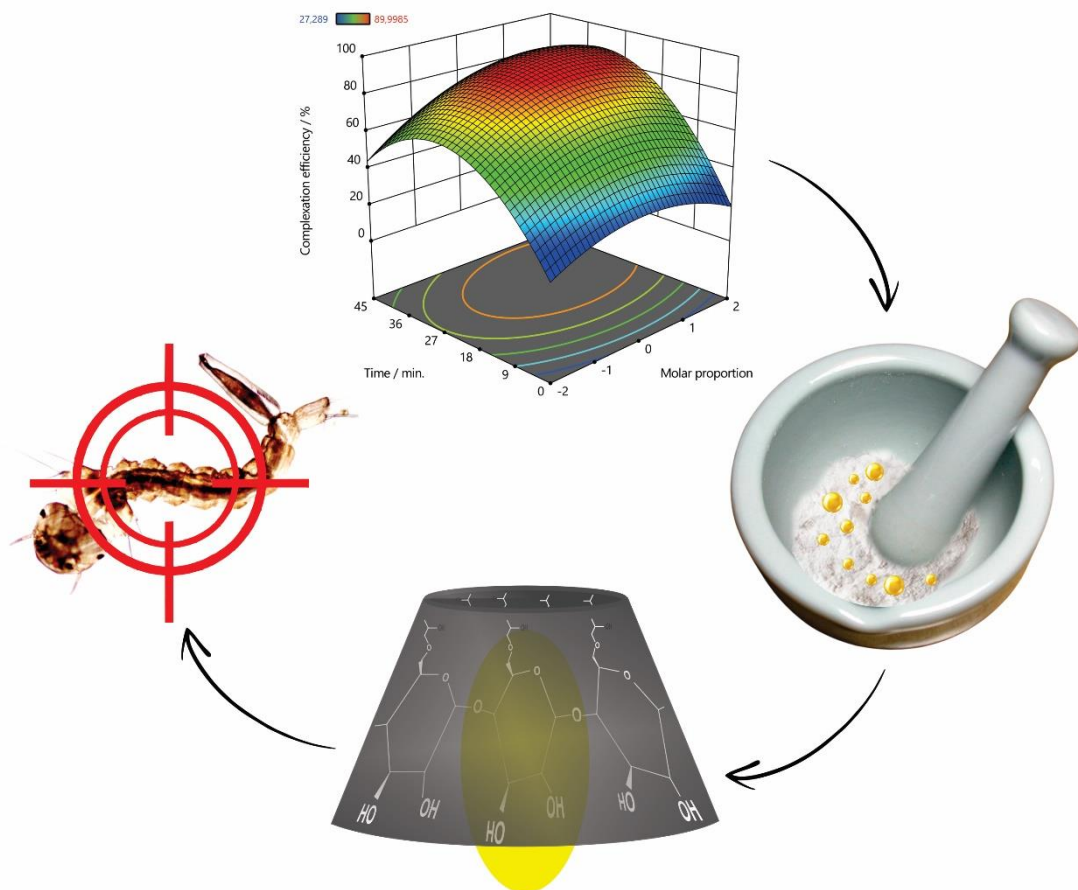
WHELEHAN, M.; MARISON, I. W. Microencapsulation using vibrating technology. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 8, p. 669–688, dez. 2011.

WHO. **GUIDELINES FOR LABORATORY AND FIELD TESTING OF MOSQUITO LARVICIDES**. [s.l.] World Health Organization, 2005.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469–1479, dez. 2007.

CAPÍTULO 3

Otimização no preparo do complexo de inclusão do óleo essencial de *Psidium cattleianum* S. em 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina pelo delineamento composto central rotacional para aplicação como larvicida em *Aedes aegypti* L.



RESUMO

Descreve-se na presente investigação a preparação do complexo de inclusão (CI) do óleo essencial (OE) de *Psidium cattleianum* (CAT) em 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina (HP β CD) e a avaliação larvicida do OE e do CI em *Aedes aegypti*. O OE foi extraído das folhas de CAT com rendimento de 0,79% (m m⁻¹) e é constituído majoritariamente por sesquiterpenos, sendo o β -cariofileno o principal componente (34,2%). Para obter condições otimizadas para a preparação do CI, através do método físico de maceração, foram variados os parâmetros razão molar OE/HP β CD e o tempo de maceração. A melhor razão molar de OE:HP β CD foi de 1:1,14 e o tempo de maceração correspondeu a 30 min. A eficiência de complexação utilizando as condições otimizadas foi de (94,9 \pm 1,7)%. O CI preparado foi caracterizado por espectroscopia na região UV-Vis, FTIR, TGA, DLS e XRD para comprovar a interação do OE com a HP β CD. A liberação do OE no CI foi avaliada em meio aquoso utilizando DMSO 1% (v v⁻¹) e acetonitrila. O OE foi liberado lentamente no meio aquoso, que foi utilizado para simular o ambiente aquático em que as larvas de *A. aegypti* se desenvolvem. A atividade larvicida do OE da CAT em DMSO foi de 81,73 e 102,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente. Para o CI, a toxicidade foi de 134,44 e 168,69 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente. Embora a atividade larvicida do OE seja maior em relação ao CI, este último apresenta grande estabilidade térmica e alta solubilidade em água. Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo apontam para o fato de que o CI preparado a partir do OE da CAT pode representar uma boa alternativa para o controle de larvas de *A. aegypti*.

Palavras-chave: Complexo de inclusão. Araçá. Óleo essencial. Dengue.

1. INTRODUÇÃO

Dengue, chikungunya e Zika são arboviroses transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), que é uma espécie invasora de maior sucesso no mundo (COSME *et al.*, 2020). Por impactar à saúde de muitas pessoas, representando um ônus social e econômico, tentativas de erradicação desse vetor são realizadas ao longo dos anos (NDII *et al.*, 2021). O controle do *A. aegypti* na fase larval é uma ferramenta importante para diminuir as infecções transmitidas por este vetor. Para isso, produtos químicos sintéticos, como os piretroides, têm sido utilizados como principal estratégia para controlar a disseminação de larvas e mosquitos (YANG *et al.*, 2020). No entanto, apesar de sua eficácia no combate ao *A. aegypti*, estudos têm demonstrado que o uso contínuo desses agentes químicos tem gerado insetos resistentes, sendo necessária a utilização de métodos alternativos, como o emprego de óleos essenciais (OEs) com efeito larvicida (AZEEM *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2017; SMITH *et al.*, 2016).

A espécie *Psidium cattleianum* S. (CAT) pertence à família Myrtaceae e é conhecida popularmente como araçazeiro, produzindo frutos denominados como goiaba morango ou araçá (CASTRO *et al.*, 2015). Essa espécie é nativa do Brasil e possui importância comercial, que é atribuída aos seus frutos utilizados na indústria alimentícia (PEREIRA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2007).

Além disso, CAT apresenta atividades antioxidantes, antifúngicas e antimicrobianas (CASTRO *et al.*, 2015; MEDINA *et al.*, 2011; SCUR *et al.*, 2016). Essas bioatividades têm sido atribuídas principalmente aos altos níveis de compostos fenólicos, minerais, ácidos graxos, açúcares, carotenoides e aos OEs (PEREIRA *et al.*, 2018). Embora não existam publicações sobre a atividade larvicida da CAT em *A. aegypti*, o OE de suas folhas provavelmente apresenta esse efeito, uma vez que outras espécies do mesmo gênero, como *Psidium guajava* L., possuem atividade larvicida promissora (MENDES *et al.*, 2017).

Apesar do efeito larvicida em *A. aegypti* estar presente em diversos OEs, eles têm baixa solubilidade em água, são voláteis e instáveis na presença de calor, luz e oxigênio (MOSSA, 2016). Para superar essas limitações, tecnologias têm sido desenvolvidas, ampliando assim suas potenciais aplicações. Dessa forma, é possível produzir complexos de inclusão (CIs) dos OEs com

oligossacarídeos cíclicos, sendo as ciclodextrinas as mais frequentemente utilizadas (JANSOOK *et al.*, 2018). A 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina (HP β CD), que é derivada do amido, possui alta solubilidade em água e têm sido utilizada para a preparação de CI contendo OE. A síntese do CI pode ser otimizada para alcançar níveis de eficiência de complexação próximos a 100%. Logo, quase todo o OE utilizado é incorporado às cavidades da HP β CD. Para isso pode ser utilizado um planejamento estatístico multivariado, que é pouco utilizado na literatura para essa finalidade, e pode proporcionar a economia de reagentes e a síntese do CI contendo mais OE.

Considerando as premissas, o objetivo desta investigação foi obter o CI do OE das folhas de CAT utilizando HP β CD e otimizar o processo de complexação. O CI foi caracterizado por diferentes técnicas analíticas e teve sua atividade larvicida avaliada em *A. aegypti*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Padrões e reagentes

Os reagentes utilizados foram: 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina (HP β CD, Oakwood Chemical, Estill, SC, USA), álcool etílico (C₂H₅OH, 95%, Didática, São Paulo, SP, Brasil), acetonitrila (C₂H₃N, 99,9%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), dimetilsulfóxido (DMSO, 99,9%, Neon, Suzano, SP, Brasil) e acetona (C₃H₆O, 99,5%, Alphatec).

No preparo das soluções utilizou-se água tipo 1, obtida pelos sistemas Milli-Q (Millipore Corporation) e PURELAB (PURELAB Ultra MK2).

2.2. Coleta e extração do óleo essencial das folhas de *P. cattleyanum*

As plantas de *P. cattleyanum* fazem parte de uma coleção que se encontra em campo no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES). As amostras vegetais foram coletadas em julho de 2020 às 9h da manhã no município de Alegre, no estado do Espírito Santo, situado na latitude sul (20° 45'), longitude oeste (41° 31') e altitude de 254 metros.

A *Psidium cattleianum* Sabine foi obtida de plantas adultas no Viveiro Frucafé, certificado pelo Ministério da Agricultura do Brasil (<http://sistemas.agricultura.gov.br/>). Uma amostra de *P. cattleianum* foi coletada, seca e depositada no herbário RB do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB00887264, encurtador.com.br/auwAO).

Foram realizadas coletas em torno da copa utilizando folhas que estavam entre jovens e velhas. O material foi armazenado em sacos de papel e as folhas foram secas à sombra e em temperatura ambiente (~25 °C) por cerca de uma semana. Em seguida, as folhas foram armazenadas em freezer a -9 °C até a extração do OE.

O OE foi obtido através de hidrodestilação em aparelho Clevenger, durante quatro horas de extração, de acordo com a metodologia recomendada pela Farmacopeia Brasileira para óleos voláteis (SOUSA, 2019). Nas extrações, realizadas várias vezes, foram utilizadas cerca de 100 g de folhas secas em aproximadamente 1500 mL de água tipo 1 (PURELAB Ultra MK2) em balão de fundo redondo de 2000 mL. Os vapores de água e OE se misturaram e, após o resfriamento, ocorreu a condensação das moléculas, que foram separadas por diferença de solubilidade e densidade. A mistura de OE e água foi colocada em eppendorf, centrifugada à 10000 rpm por 10 min e o OE foi removido com micropipeta e armazenado em freezer a -20 °C, protegido de luminosidade.

2.3. Determinação da densidade absoluta e rendimento da extração do óleo essencial

A densidade absoluta do OE foi determinada através do picnômetro de 10 mL. Foram pesadas as massas do picnômetro vazio e seco, contendo água e com o OE. O cálculo da densidade foi realizado utilizando a Equação 1.

$$d = \frac{m_2 - m_1}{m_3 - m_1} \times (d_{\text{água}} - d_{\text{ar}}) + d_{\text{ar}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo: d = densidade absoluta do OE (g cm⁻³); m_1 = massa do picnômetro seco e vazio (g); m_2 = massa do picnômetro com o OE (g); m_3 = massa do picnômetro com água tipo 1 (Millipore Corporation) (g); $d_{\text{água}}$ = densidade da água a 25 °C (9,97 x 10⁻¹ g cm⁻³); d_{ar} = densidade do ar (1,18 x 10⁻¹ g cm⁻³).

O rendimento das extrações do OE foi determinado, em triplicata, pela razão entre a massa do OE extraído e da massa da planta seca, de acordo com a Equação 2. Foi utilizada balança analítica (ATX224, Shimadzu, São Paulo) com quatro casas decimais.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa do óleo essencial (g)}}{\text{massa da planta seca (g)}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 2})$$

2.4. Perfil cromatográfico do óleo essencial

As análises qualitativa e semiquantitativa dos constituintes do OE das folhas e do OE extraído do CI otimizado foram realizadas utilizando a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japão) de acordo com a metodologia de Mendes *et al.* (2017). Essas análises foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para essas caracterizações, as seguintes condições foram adotadas: o gás arraste utilizado foi o He com fluxo e velocidade linear de 1,80 mL min⁻¹ e 48,40 cm seg⁻¹, respectivamente; a temperatura do injetor foi de 220 °C na razão split de 1:10; coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm); fase estacionária SLB[®]-5MS (0,25 μm de espessura do filme); a temperatura do forno teve a seguinte programação: temperatura inicial de 40 °C, a qual permaneceu por 2 min e em seguida a temperatura foi aumentada gradativamente a 3 °C min⁻¹ até atingir 240 °C, em que permaneceu por 5 min, tendo um tempo total de análise de 73,67 min; a temperatura utilizada no detector foi de 240 °C. A amostra utilizada foi retirada do vial em um volume de 1 μL de uma solução de 1% de OE em acetonitrila.

Além disso, o OE extraído do CI otimizado foi caracterizado por cromatografia nas mesmas condições a fim de identificar os compostos complexados.

A identificação dos componentes dos OEs foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos com os disponíveis no banco de dados da espectroteca (Wiley 7, NIST 05 e NIST 05s) e pelo índice de retenção (IR). Para o cálculo do IR, foi utilizada uma mistura de alcanos saturados C₇-C₄₀ (Supelco, St. Louis, MO, Estados Unidos) submetida sob as mesmas condições cromatográficas do OE e foi obtido o tempo de retenção ajustado de cada

composto. Em seguida, os índices de retenção calculados foram comparados com os da literatura (ADAMS, 2007; EL-SAYED, 2019; LINSTROM; MALLARD, 2018).

O percentual relativo de cada composto do OE foi calculado através da razão entre a área integral dos picos e a área total de todos os constituintes da amostra com área relativa acima de 5%.

2.5. Preparação dos complexos de inclusão

Os CIs foram obtidos pelo método de maceração seguindo a metodologia de Mendes *et al.* (2022), com algumas adaptações. Os CIs foram obtidos pela variação das proporções molares do OE e da HP β CD e dos tempos de maceração. Esses parâmetros foram obtidos através do delineamento composto central rotacional (DCCR) com fatorial 2², contendo 4 pontos no cubo, 4 pontos axiais e 5 pontos centrais para melhor estimativa de erro (Fig. 1). A distância entre cada ponto axial e o ponto central, ou seja, o alfa (α) é 1,41421. A Tabela 1 mostra os 13 experimentos obtidos a partir do DCCR, além dos fatores codificados e decodificados (Eq. 3) em que k é o número de fatores.

$$\alpha = (2^k)^{1/4} \quad (\text{Eq. 3})$$

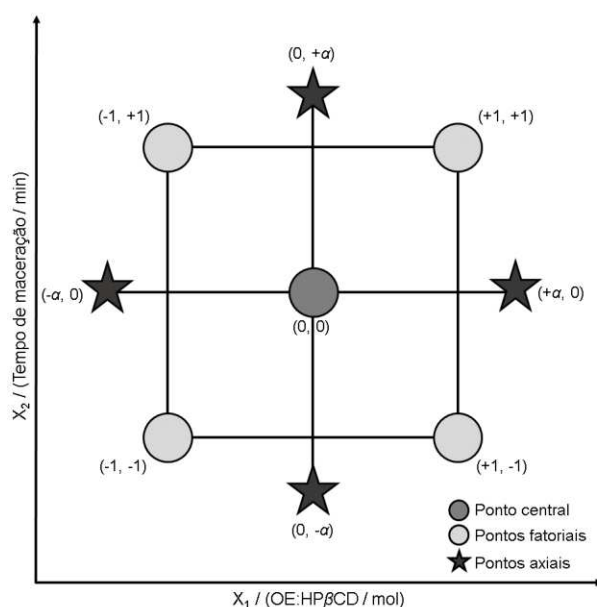


Figura 1. Modelo de planejamento composto central rotacional (DCCR) com fatorial 2² contendo 4 pontos no cubo, 4 pontos axiais e 5 pontos centrais.

Fonte: O autor.

Tabela 1. Delineamento experimental realizado para otimizar a quantidade de óleo essencial de *Psidium cattleianum* complexado em HP β CD.

Tratamento	Variáveis codificadas*		Variáveis decodificadas		
	X ₁	X ₂	OE:HP β CD (mol) ^a	Tempo de maceração (min.)	V _{etanol} (μ L) ^b
1	+1	+1	1,4 : 1	38,4	192
2	-1	+1	1 : 1,4	38,4	384
3	-1	-1	1 : 1,4	7,0	384
4	(+1,41)	0	2 : 1	22,5	136
5	0	0	1 : 1	22,5	272
6	(-1,41)	0	1 : 2	22,5	545
7	0	0	1 : 1	22,5	272
8	0	0	1 : 1	22,5	272
9	0	0	1 : 1	22,5	272
10	0	0	1 : 1	22,5	272
11	0	(+1,41)	1 : 1	45,0	272
12	0	(-1,41)	1 : 1	0,0	272
13	+1	-1	1,4 : 1	7,0	192

^aProporção molar de óleo essencial e HP β CD, respectivamente; ^bVolume de etanol (95%) correspondente a 2 mmol mL⁻¹ de HP β CD.

*(-1) = nível inferior, (0) = nível médio, (+1) = nível superior e $\alpha = (+/-1,41)$; X₁ = OE:HP β CD (mol) e X₂ = tempo de maceração (min.).

Inicialmente a mistura de OE e HP β CD foi manualmente misturada sob pressão por 5 min utilizando almofariz e pistilo, em seguida foi adicionado o etanol e macerado pelos tempos apresentados na Tabela 1. Para avaliar a melhor condição de preparo do CI, a eficiência de complexação (EC) foi determinada por espectroscopia na região do UV-Vis, de acordo com a metodologia descrita a seguir. A partir das respostas foi obtida uma superfície de resposta através do *software* Desing-Expert[®]. O complexo ideal foi preparado em triplicata a partir do resultado da otimização da proporção molar e do tempo de maceração.

2.6. Caracterização do complexo de inclusão

2.6.1. Curva analítica

Para determinar a eficiência de complexação foi obtida uma curva analítica do OE utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Cary 8454, Agilent Technologies, EUA). Essas análises foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O equipamento utilizado possui resolução de 1 nm e foram utilizadas cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. As análises foram feitas no modo de varredura na faixa de 190 a 1100 nm.

Para essa análise foram preparadas, em triplicata, dez soluções padrão com concentrações crescentes do OE em acetonitrila (2,03 a 20,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Foram obtidos os valores de absorbâncias em 193 nm para construção da curva, cujos pontos foram submetidos a regressão linear pelo Método dos Mínimos Quadrados. Foram realizadas leituras em duplicata no espectrofotômetro.

A fim de quantificar a concentração do OE removido dos CIs, 25 mg dos materiais foram dissolvidos em 50 mL de acetonitrila 99,9% e o sistema foi mantido ao abrigo de luz a 580 rpm em mesa agitadora (SL-90/6, Solab, São Paulo) por 48 h. Esse procedimento foi realizado em triplicata e adaptado de Hill; Gomes; Taylor (2013). Na sequência, as amostras foram centrifugadas em centrífuga (206-R, Fanem, São Paulo) a 2857 rpm por 15 min a 25 °C para decantar a HP β CD, deixando apenas o OE solúvel em acetonitrila. As soluções contendo o óleo em solvente foram submetidas a análise UV-Vis, monitorando-se 193 nm. As concentrações do OE (mg mL^{-1}) foram obtidas pela curva analítica, sendo possível determinar as massas de OE extraídas. As eficiências de complexação (ECs) foram determinadas utilizando a Equação 4:

$$EC (\%) = \frac{OE_{ext} (\text{mg})}{OE_{adic} (\text{mg})} \times 100\% \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que **OE_{ext}** é a massa do OE extraído do CI (mg) e **OE_{adic}** é a massa do OE adicionada no início do processo de complexação (mg).

A partir dos resultados de EC, determinou-se como o CI deveria ser preparado a fim de obter um produto otimizado, e este foi preparado,

caracterizado com as demais técnicas analíticas descritas a seguir e aplicado contra larvas de *A. aegypti*.

Também foi construída uma curva analítica do OE em solução aquosa de DMSO 1% (v v⁻¹), para avaliação da liberação controlada. Para essa análise foram preparadas, em triplicata, nove soluções padrão com concentrações crescentes do OE em solução aquosa de DMSO 1% (1,00x10⁻¹ a 1,60 mg mL⁻¹). Foram obtidos os valores de absorbâncias em 232 nm para construção da curva, cujos pontos foram submetidos a regressão linear pelo Método dos Mínimos Quadrados. Foram realizadas leituras em duplicata no espectrofotômetro.

2.6.2. Análise termogravimétrica

A medida da estabilidade térmica foi realizada por meio de análise termogravimétrica (TGA) com auxílio de um analisador térmico DTG (60H, Shimadzu, Japão). Cerca de 4 mg da HP β CD, do OE e do CI otimizado foram pesados em microbalança analítica (Mettler Toledo, XP26, Brasil). Em seguida, as amostras foram colocadas, individualmente, em cadinho de alumina e aquecidas na faixa de temperatura de 30 a 450 °C em uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, com tempo total de análise de cerca de 45 min. Foi utilizada atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL min⁻¹. Essa análise foi realizada no Laboratório de Embalagens (LABEM) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

2.6.3. Avaliação da estabilidade térmica do complexo de inclusão

O CI otimizado e o OE foram aquecidos, em uma placa de porcelana, em um forno (42E, Philco) pré-aquecido por 30 min a 180 °C por 10 min. Posteriormente foi realizada, em duplicata, a análise por FTIR do CI e do OE e espectroscopia UV-Vis do OE extraído do CI para comprovar a proteção térmica.

2.6.4. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A HP β CD, o OE, o CI otimizado e o OE e CI, ambos aquecidos previamente a 180 °C (item 2.6.3), foram submetidos às análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Essa análise foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal

de Viçosa (UFV). O OE aquecido foi volatilizado, gerou-se um resíduo sólido e a este foi adicionada uma gota de acetona. A solução foi levada ao FTIR e após a volatilização do solvente foi realizada a leitura, com o branco sendo acetona.

Foi utilizado um espectrofotômetro de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de germânio (Nicolet 6700, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) na região de 4000 a 700 cm^{-1} , com 32 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

2.6.5. Análise de tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta por DLS

Por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizadas as medidas de tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (PZ) da HP β CD e do CI otimizado. Para isso, foi utilizado o Zetasizer Nano ZS (Zen 3600, Malvern Instruments, Reino Unido), uma célula DTS 1070 com dois eletrodos, sem a presença de bolhas de ar e na temperatura de 25 °C. As amostras foram diluídas em água tipo 1 (Millipore Corporation), com pH igual a 6,0, até a concentração de 1 mg mL^{-1} . Essa análise foi realizada no LABEM do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

2.6.6. Difractometria de raios X

O padrão de difração de raios X (XRD) da HP β CD e do CI otimizado foi obtido a partir de um difratômetro de raios X (D8-Discover, Bruker, Alemanha). Foi utilizado um alvo de cobre com K_{α} com comprimento de onda de 1,5418 Å, tensão de aceleração de 40 kV e corrente do filamento de 40 mA. A taxa de varredura foi de 0,05 seg^{-1} no intervalo de 5 a 60°. Essa análise foi realizada no Laboratório de Difração e Espalhamento de Raios X do Departamento de Física da UFV.

2.7. Liberação controlada

A liberação *in vitro* do OE da CAT complexado na HP β CD foi realizada utilizando uma membrana de diálise (14 kDa, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemanha), de acordo com a metodologia de Babaoglu *et al.* (2017). Os meios de liberação foram solução aquosa de DMSO 1% ($v v^{-1}$) e acetonitrila. Duas avaliações foram realizadas: (1) 400 mg do CI foi disperso em 1,00 mL de

solução aquosa de DMSO 1% ($v v^{-1}$) e (2) 100 mg do CI foi solubilizado em 1,00 mL de água. Essas soluções foram colocadas nas membranas, que foram fechadas e submersas nos meios contendo 135 mL de uma solução aquosa de DMSO 1% (400 mg) para (1), e outro com 135 mL de acetonitrila (100 mg) para (2). O sistema foi submetido a agitação de 200 rpm por 59 h à temperatura ambiente (~ 28 °C). Em determinados intervalos, alíquotas de 2,00 mL foram coletadas para medição espectrofotométrica e em seguida foram devolvidas à solução original. Os comprimentos de onda de 232 e 193 nm foram monitorados, respectivamente, nas soluções aquosas de DMSO 1% para (1), e acetonitrila para (2). Os experimentos foram realizados em duplicata.

Posteriormente, o CI retido no interior da membrana da solução de acetonitrila foi colocado em 50 mL de acetonitrila para quantificar o OE removido do CI, conforme a metodologia do item 2.6.1.

2.8. Atividade larvicida

A atividade larvicida do OE da CAT e do CI foi realizada com larvas de *A. aegypti* de quarto instar (L4) (PPCampos strain, Campos dos Goytacazes, RJ) obtidas a partir de uma colônia de sucessivas gerações mantidas no insetário do Departamento de Biologia Geral da UFV. Os ovos foram eclodidos e as larvas mantidas em água decolorada, sendo alimentadas diariamente com ração de tartaruga (Reptolife, Alcon Pet, Camboriú, SC), sob temperatura controlada (28 ± 3 °C) e fotoperíodo de 12 h até L4, sendo este o tamanho ideal para a realização dos ensaios de ação larvicida, de acordo com Consoli; Oliveira (1994) e WHO (2005).

Os experimentos larvicidas foram realizados com 25 larvas por tratamento. Todos os ensaios foram feitos com cinco repetições em incubadora, sob condições controladas (28 ± 3 °C; fotoperíodo de 12 h).

Para os experimentos com o OE da CAT foram preparadas soluções aquosas com DMSO 1% ($v v^{-1}$) nas concentrações: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com o total de 10 tratamentos. As larvas foram separadas com auxílio da pipeta de Pasteur e, posteriormente, foram distribuídas em recipientes de vidro contendo 50 mL das diluições. Nesse experimento, o controle negativo foi com solução aquosa de DMSO 1% ($v v^{-1}$).

O experimento com o CI foi realizado adicionando-o em água e o controle negativo foi somente HP β CD em água. As concentrações adotadas foram: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com o total de 9 tratamentos.

Os ensaios com o controle negativo foram realizados simultaneamente com os experimentos, utilizando cinco repetições. A verificação da mortalidade foi realizada 24 h após o início de cada ensaio. Foram consideradas mortas as larvas que não apresentaram movimento ou não responderam aos estímulos com a pipeta de Pasteur.

2.9. Análise estatística

A obtenção dos parâmetros estatísticos, como: análise de variância, regressão linear e delineamento experimental da otimização no processo de complexação foi realizada utilizando o Programa Minitab, versão 17. A superfície de resposta foi obtida pelo Programa Design Expert, versão 11. Para encontrar os valores da concentração letal média para matar 50% da população (CL₅₀) e para matar 90% da população (CL₉₀) das larvas de *A. aegypti*, foi utilizado o modelo Probit com distribuição normal a 95% de significância utilizando o Programa SAS ("SAS Institute", 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para caracterização físico-química do OE determinou-se o rendimento da extração e densidade. O rendimento do OE obtido das folhas da CAT foi de 0,79% (m m^{-1}) e densidade de 0,9247 g cm^{-3} . Outros trabalhos encontraram rendimentos similares para os OEs das folhas da mesma planta: 0,8% (ADAM *et al.*, 2011) e 0,51% (PINO *et al.*, 2004). Ao comparar o rendimento do OE da CAT com o da *P. guajava*, espécie com maior relevância comercial do gênero, percebe-se que *P. cattleyanum* possui maior quantidade de OE nas folhas. Os rendimentos dos OEs das folhas da *P. guajava* são em torno de 0,3% (m m^{-1}) dependendo da cultivar avaliada (MENDES *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017). A utilização de outras *Psidium* além da *P. guajava* é agronomicamente favorável, pois contribui para o desenvolvimento da espécie e exploração do OE, agregando valor à cultura e tornando-a mais sustentável. Isso porque pode-se

aproveitar o material vegetal que, eventualmente, é desperdiçado nas podas para o manejo da produção da planta no cultivo comercial.

Foram identificados seis compostos presentes no OE da CAT, sendo mono e sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados (Fig. 2 e Tabela 2). Majoritariamente foram encontrados sesquiterpenos (60,1%) e o principal composto foi o β -cariofileno (34,2%). Outros autores que identificaram o perfil cromatográfico do OE das folhas da CAT também observaram predominantemente sesquiterpenos (ADAM *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2022; CASTRO *et al.*, 2015; CHALANNAVAR *et al.*, 2013; PINO *et al.*, 2004). Apesar de pertencerem à mesma classe terpênica, os trabalhos, citados anteriormente, demonstraram que os OEs da CAT têm compostos majoritários bastante distintos dos encontrados. Isso pode ser justificado pelas plantas apresentarem variações intraespecíficas, influenciadas por fatores fenológicos, sua idade de desenvolvimento, localização de plantio, condições de cultivo, tipo de extração do OE, entre outros fatores (MENDES *et al.*, 2018; SEFIDKON; ABBASI; KHANIKI, 2006; SIFOLA; BARBIERI, 2006; SOUZA *et al.*, 2017).

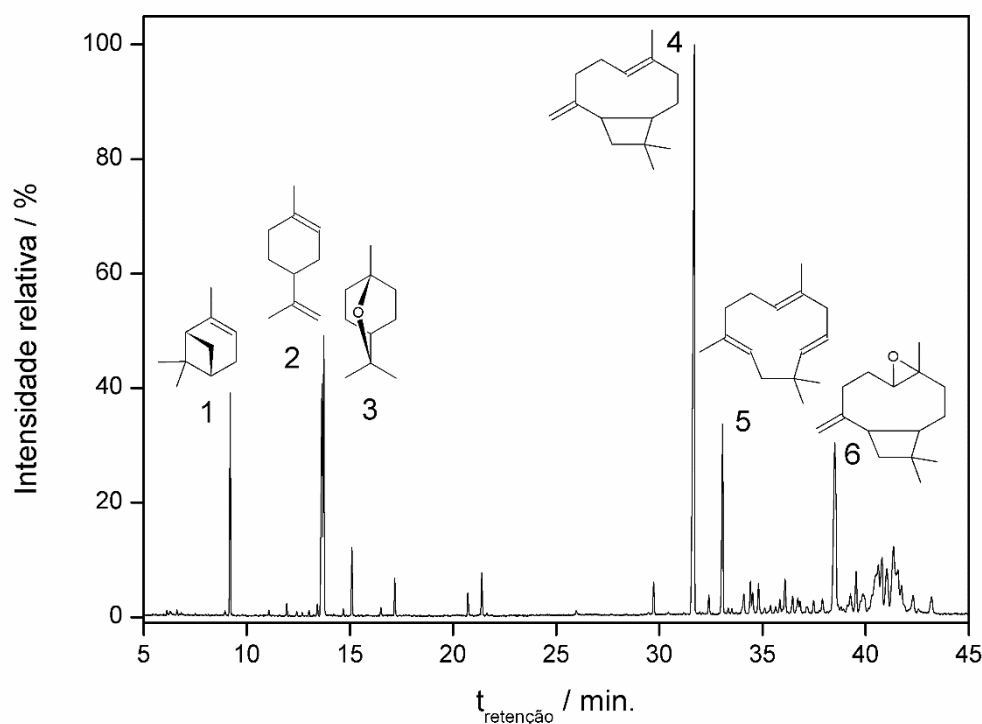


Figura 2. Cromatograma do óleo essencial da espécie *Psidium cattleianum* com as estruturas químicas dos compostos identificados. 1) α -pineno; 2) limoneno; 3) 1,8-cineol; 4) β -cariofileno; 5) α -humuleno; 6) óxido de cariofileno.

De acordo com Tao *et al.* (2014), os CIs utilizando a β -ciclodextrina (β CD) são comumente empregados na indústria farmacêutica, pois devido ao seu grande diâmetro interno e profundidade da cavidade, permite a complexação de medicamentos com massa molar entre 200 e 800 g mol⁻¹. Sendo assim, os sesquiterpenos poderiam ser melhor complexados do que os monoterpenos (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação dos compostos presentes no óleo essencial da espécie *Psidium cattleyanum*.

n	Composto ^a	IR _{cal} ^b	IR _{tab} ^c	A _{rel} (%) ^d	Massa molar (g mol ⁻¹)	Classificação terpênica ^e
1	α -pineno	929	932	10,0	136,24	MH
2	limoneno	1024	1024	14,9	136,24	MH
3	1,8-cineol	1027	1026	9,7	154,25	MO
4	β -cariofileno	1419	1417	34,2	204,36	SH
5	α -humuleno	1452	1452	9,3	204,36	SH
6	óxido de cariofileno	1584	1582	16,6	220,36	SO
Total identificado				94,7		

^aCompostos majoritários listados na ordem de eluição utilizando coluna Rtx[®]-5MS. ^bÍndice de retenção calculado através de dados obtidos por amostra de n-alcenos saturados (C₇-C₄₀). ^cÍndice de retenção tabelado (ADAMS, 2007; EL-SAYED, 2016; NIST, 2011). ^dCompostos com área relativa > 5% foram identificados. ^eClassificação terpênica: Monoterpeno hidrocarboneto (MH), monoterpeno oxigenado (MO), sesquiterpeno hidrocarboneto (SH), sesquiterpeno oxigenado (SO).

Outro parâmetro que pode ser avaliado para inferir quais compostos podem ter maior facilidade de complexação é o diâmetro do composto hóspede e da cavidade do hospedeiro. Considerando que as distâncias das ligações C-C, C=C e C \equiv C são 1,54; 1,33 e 1,20 Å, respectivamente, é possível calcular o diâmetro aproximado dos compostos presentes no OE da CAT (LEAL *et al.*, 2010). Os diâmetros encontrados para os compostos da Tabela 2 variam de 6,16 a 10,57 Å, aproximadamente. Considerando que o diâmetro da cavidade da HP β CD está entre 6,0 e 6,5 Å, alguns compostos precisariam de mais uma molécula de HP β CD para serem totalmente protegidos na cavidade e os

monoterpenos teriam maior facilidade de complexação devido ao menor tamanho (VARAN *et al.*, 2017).

Além disso, outro parâmetro importante consiste na polaridade da molécula hóspede, que também deve ser considerada. A cavidade do hospedeiro (HP β CD) é mais apolar do que a sua superfície, portanto, possui maior afinidade por moléculas mais apolares. No entanto, é importante ressaltar que apenas a parte lipofílica da molécula pode se encaixar na cavidade (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018; MARQUES, 2010).

Dessa forma, quanto menor a molécula hóspede, melhor é a sua complexação, desde que haja semelhança entre a polaridade da molécula complexada e a HP β CD.

3.1. Otimização do preparo de complexos de inclusão

O método de maceração pode ser considerado o mais comum para formar CI, sendo bastante simples, fornece um bom rendimento e possui baixo custo de produção (PATIL *et al.*, 2010). Na Figura 3 são apresentados os resultados de 13 ensaios empregando o planejamento multivariado composto central rotacional (Tabela 1). Os ensaios foram realizados baseados em razões molares (OE:HP β CD) comumente utilizadas por outros autores. Porém, geralmente, a estequiometria molar entre hóspede e hospedeiro utilizando ciclodextrina é de 1:1 (CIOBANU; LANDY; FOURMENTIN, 2013; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; GALVÃO *et al.*, 2019; HERRERA *et al.*, 2019; KFOURY *et al.*, 2019; MAGALHÃES *et al.*, 2020; MARRETO *et al.*, 2008; PANDIYAN; MATHEW; MUNUSAMY, 2019). Outro parâmetro avaliado foi o tempo de maceração para o processo de complexação. Não há registros de trabalhos que utilizem a variação desse parâmetro, sendo geralmente utilizado o tempo em torno de 50 min (BABAOGU *et al.*, 2017; KAMIMURA *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Pode-se observar na Figura 3 que o tempo de maceração é uma variável fundamental na otimização do processo de produção dos CIs, alcançando alta EC, gerando economia de reagentes e tempo para obtenção. Como observado no ensaio 12, tanto não macerar (mistura física), quanto macerar por maior tempo, como observado no ensaio 11, mantendo a proporção molar, são insuficientes para um processo com os mais altos valores de EC do OE da CAT em HP β CD.

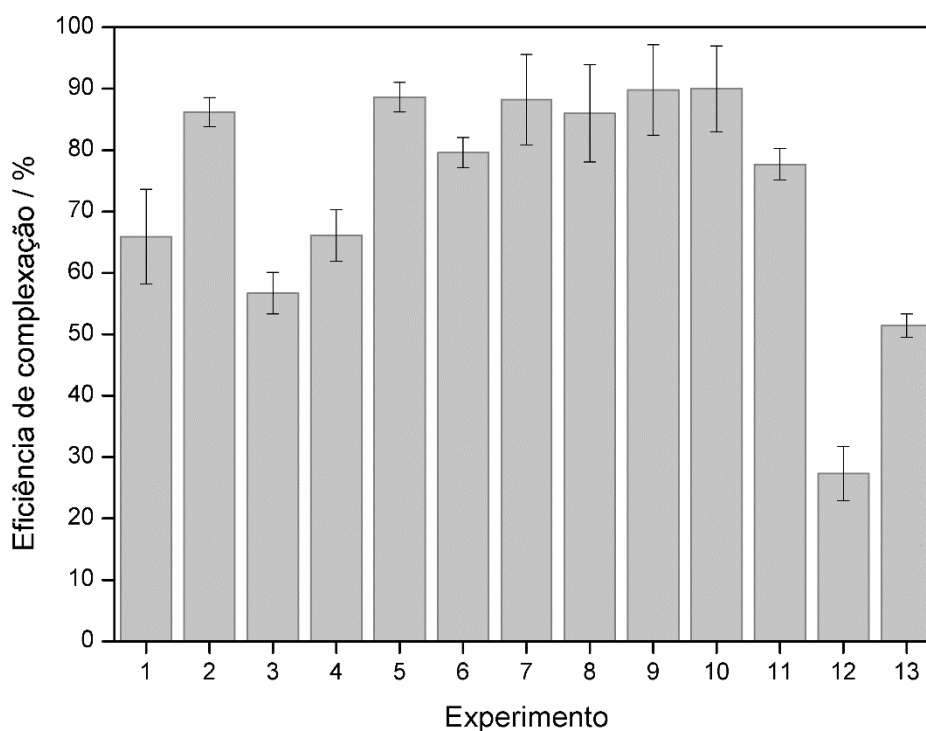


Figura 3. Resultado do delineamento experimental realizado para otimização da eficiência de complexação do óleo essencial de *Psidium cattleianum* em HP β CD.

1) OE:HP β CD (1,4:1), tempo de maceração: 38,4 min; 2) OE:HP β CD (1:1,4), tempo de maceração: 38,4 min; 3) OE:HP β CD (1:1,4), tempo de maceração: 7 min; 4) OE:HP β CD (2:1), tempo de maceração: 22,5 min; 5/7-10) OE:HP β CD (1:1), tempo de maceração: 22,5 min; 6) OE:HP β CD (1:2), tempo de maceração: 22,5 min; 11) OE:HP β CD (1:1), tempo de maceração: 45 min; 12) OE:HP β CD (1:1), tempo de maceração: 0 min; 13) OE:HP β CD (1,4:1), tempo de maceração: 7 min.

Os ensaios 5, 7, 8, 9 e 10 são o ponto central com as repetições (proporção molar 1:1 e tempo de maceração 22,5 min) e geraram CIs com eficiência de complexação superior a 80%. O ensaio 2, proporção molar 1:1,4 (OE:HP β CD) e tempo de maceração 38,4 min, também apresentou alta eficiência de complexação.

Trabalhos que utilizaram a maceração para formar CI do analito com a HP β CD, obtiveram eficiência de 78% (KAMIMURA *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2013) e 97% (BABAUGLU *et al.*, 2017) no processo de preparação. No entanto, apesar da alta eficiência obtida pelos autores, o método pode ser otimizado através da variação dos parâmetros avaliados neste trabalho.

Através dos resultados de EC obtidos, foi possível construir a superfície de resposta (Fig. 4). A equação da regressão do modelo quadrático foi $\hat{Y} = 33,31 + 3,94P + 4,003T - 3,615P^2 - 0,06882T^2$, com $R^2_{ajustado} = 0,9393$ e $F_{ajuste} = 0,010$. Todos os coeficientes (β) foram significativos ($\beta_{proporção} = 0,010$; $\beta_{tempo} = 0,000$; $\beta_{proporção \times proporção} = 0,004$; $\beta_{tempo \times tempo} = 0,000$) à $\alpha = 0,05$.

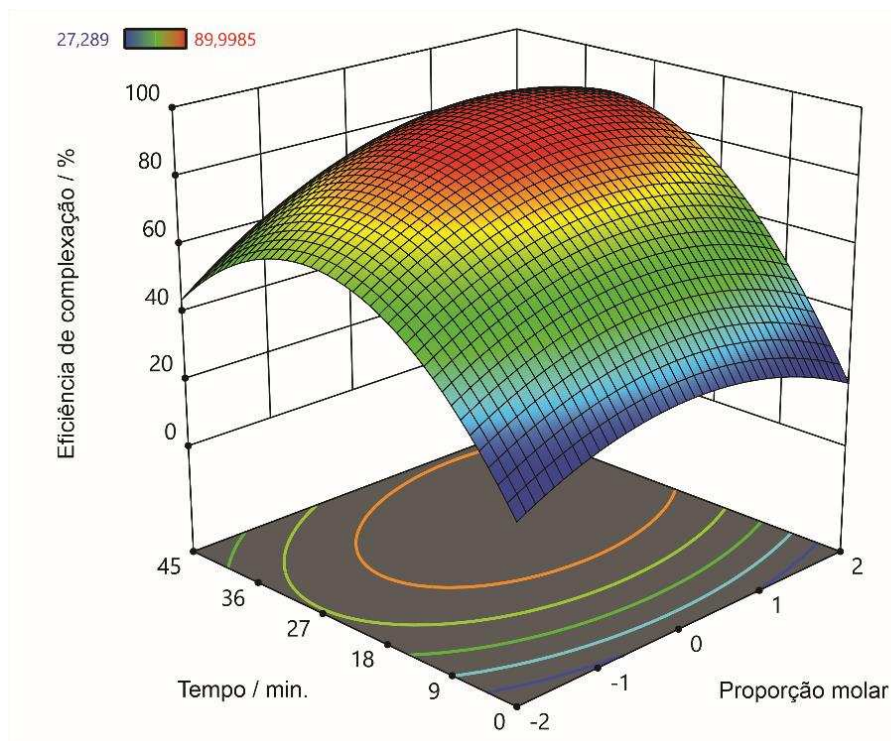


Figura 4. Superfície de resposta da otimização da eficiência de complexação com a equação do modelo de regressão e coeficientes à $\alpha = 0,05$.

Os maiores valores de eficiência apresentam coloração vermelha e os menores azul. As condições para obter a melhor EC na preparação do CI a partir do OE da CAT foram previstas pelo *software* Minitab. A otimização obtida foi de utilizar a razão molar OE:HP β CD de 1:1,14 e macerar por 30 min. Os CIs foram produzidos nessas condições e caracterizados com as técnicas analíticas descritas a seguir.

3.2. Eficiência de complexação

Para verificar a eficiência de complexação, foi obtida a curva analítica do OE da CAT a partir de um espectrofotômetro UV-Vis (Fig. 5). Os grupos de átomos que absorvem na região do UV-Vis em espectroscopia são chamados

de cromóforos. Considerando que o OE é formado por uma mistura complexa de compostos, a absorbância dos compostos presentes no OE da CAT foi quantificada por essa técnica analítica. O comprimento de onda de máxima de absorção ocorre em 193 nm e este foi adotado para identificar e quantificar o OE extraído do CI. A curva analítica é mostrada como *insert* da Fig. 5 e a equação da regressão linear obtida foi $y = 53,024x + 0,03732$, com $R^2_{ajustado} = 0,9976$ e $F_{ajuste} = 0,591$ ($p < 0,05$). A EC do CI otimizado foi de $(94,9 \pm 1,7)\%$. A alta eficiência está relacionada a proporção de OE da CAT e HP β CD otimizada, além do tempo ideal de maceração, pois considerando a alta volatilidade e instabilidade do OE, macerar por muito tempo pode contribuir para a degradação dos compostos.

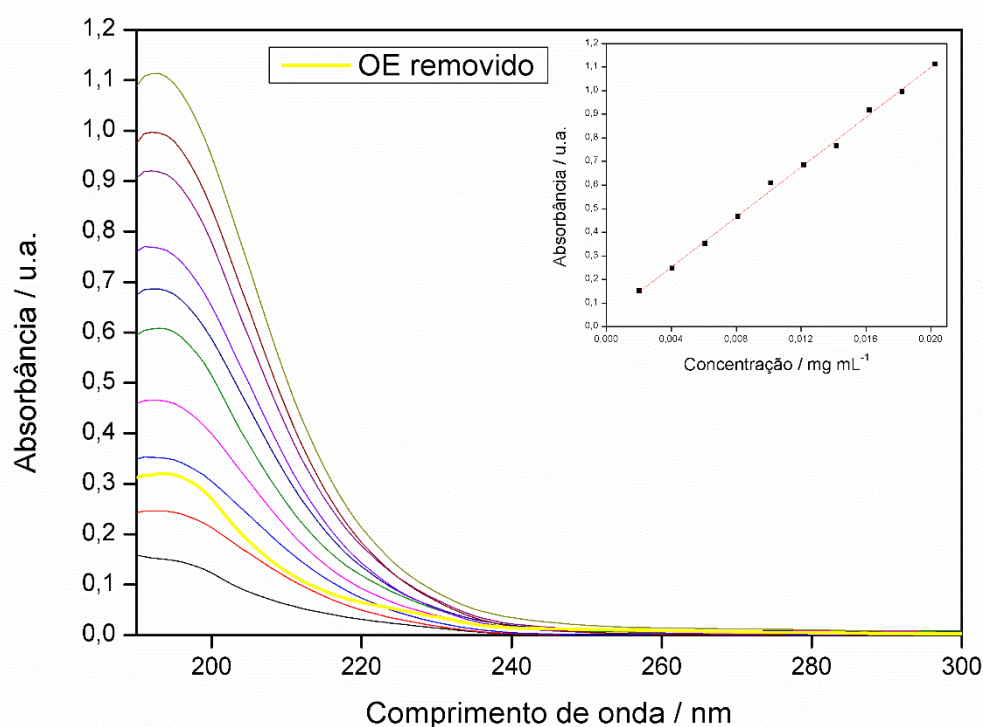


Figura 5. Espectro de absorção no UV-Vis de soluções padrão do óleo essencial (OE) da *Psidium cattleyanum* em acetonitrila ($2,03$ a $20,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) e do OE removido do complexo de inclusão. Como *insert* está a curva analítica do OE em acetonitrila ($\lambda_{\text{máx}} = 193 \text{ nm}$).

O OE extraído do CI otimizado também foi submetido à análise cromatográfica para caracterização dos compostos complexados (Fig. 6). Ao comparar a Fig. 6 com a Fig. 2, observa-se que os compostos majoritários do OE estão presentes no CI. Do ponto de vista qualitativo, a similaridade dos

cromatogramas do OE e do OE extraído do CI evidenciam a capacidade da HP β CD em aprisionar compostos hidrofóbicos nas cavidades.

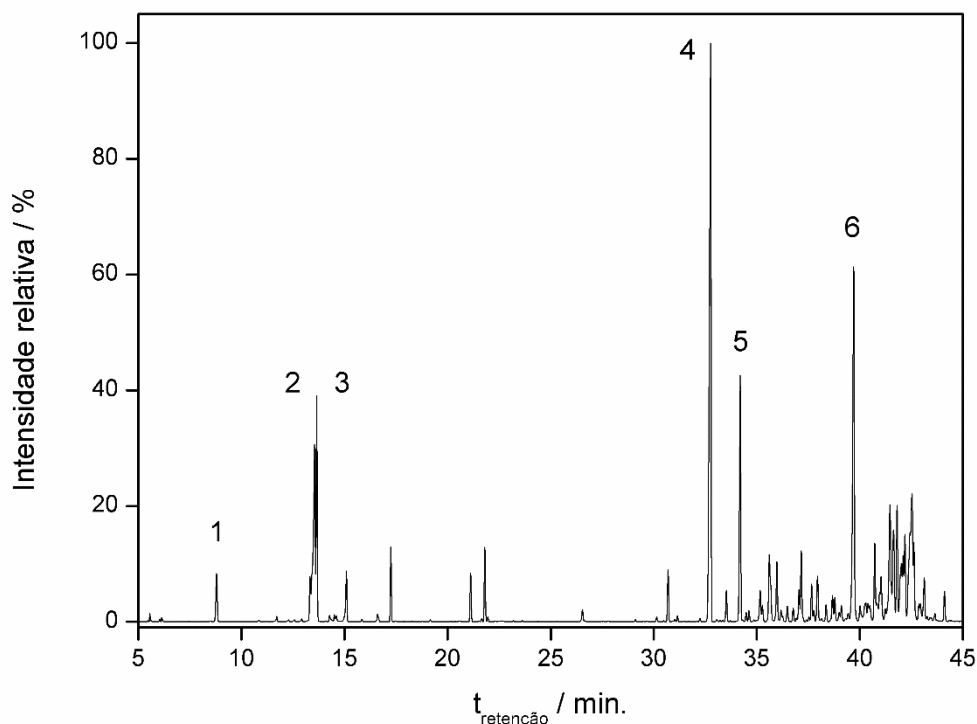


Figura 6. Cromatograma do óleo essencial da espécie *Psidium cattleianum* extraído do complexo de inclusão com a HP β CD. 1) α -pineno; 2) limoneno; 3) 1,8-cineol; 4) β -cariofileno; 5) α -humuleno; 6) óxido de cariofileno.

Marreto *et al.* (2008) fizeram a extração dos compostos complexados em HP β CD e também observaram semelhanças entre os cromatogramas do OE (*Lippia gracilis*) e do OE extraído do CI. No trabalho citado anteriormente foi dado destaque a eficiência do oligossacarídeo HP β CD em complexar os compostos terpênicos.

3.3. Caracterização dos complexos de inclusão

3.3.1. Estabilidade térmica

As curvas termogravimétricas para o OE, HP β CD e CI são apresentadas na Fig. 7. A curva do OE apresenta perda de massa em um evento contínuo com a volatilização e degradação ocorrendo a partir de 30 °C, tendo o máximo de degradação em 142 °C. Em 170 °C, o OE é totalmente degradado (Fig. 8b).

Pode-se ver na Tabela 3 as perdas de massa da HP β CD (Fig. 8a) e do CI (Fig. 8c) que foram divididas em dois eventos: O primeiro pode ser atribuído à perda de água que está na superfície e nas cavidades do material (Δm_1) e o segundo com grande perda de massa, representando a decomposição completa do material (Δm_2).

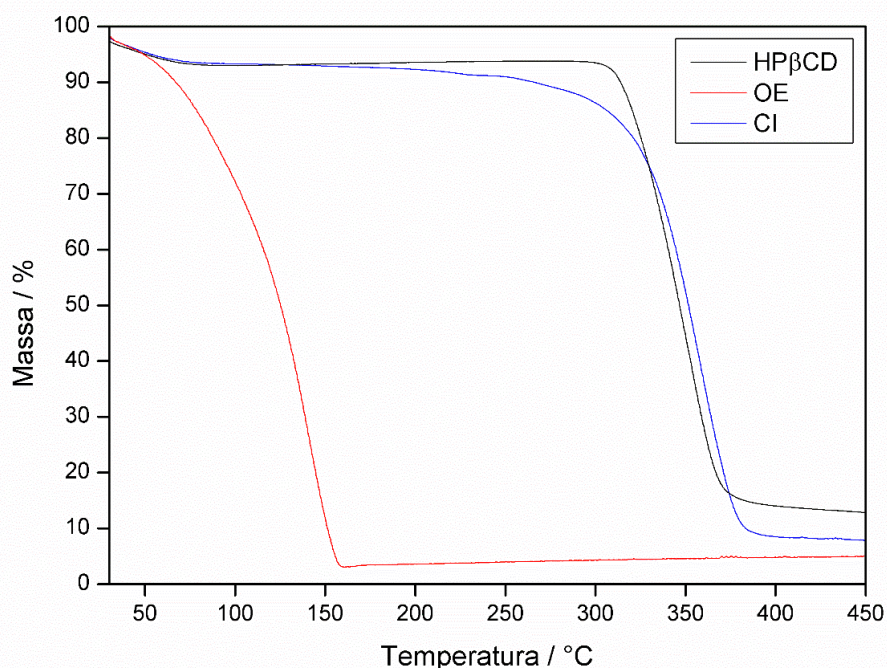


Figura 7. Curvas termogravimétricas da HP β CD, do óleo essencial da espécie *Psidium cattleianum* (OE) e do complexo de inclusão (CI).

O CI não apresentou perda de massa entre 110 e 170 °C, o que sugere que compostos do OE não foram complexados na parte externa. O máximo de degradação da HP β CD e do CI foi 349 e 357 °C, respectivamente, apresentando grande estabilidade térmica do oligossacarídeo e proteção do OE no CI. A perda de massa da água (Δm_1) é um pouco maior para HP β CD em comparação ao CI, o que sugere que houve a substituição das moléculas de água dentro da cavidade HP β CD por um material hidrofóbico, como o OE.

Outra avaliação da estabilidade térmica do OE complexado foi verificada através do aquecimento do CI à 180 °C e quantificação por espectroscopia no UV-Vis (Fig. 9). Essa temperatura foi selecionada a partir do resultado da TGA, para garantir a completa volatilização do OE.

Após o aquecimento do CI à 180 °C, o OE foi totalmente protegido pela HP β CD, pois a curva do OE removido se sobrepôs a curva representada em

vermelho na Figura 10. Segundo HILL; GOMES; TAYLOR (2013) a HP β CD apresenta um pico endotérmico em torno de 300 °C referente a fusão e decomposição térmica da ciclodextrina. Assim, o aquecimento utilizado não ultrapassa à temperatura de degradação da HP β CD, que consegue proteger o OE. Por outro lado, o OE aquecido à 180 °C foi volatilizado restando apenas um resíduo no fundo da placa de porcelana.

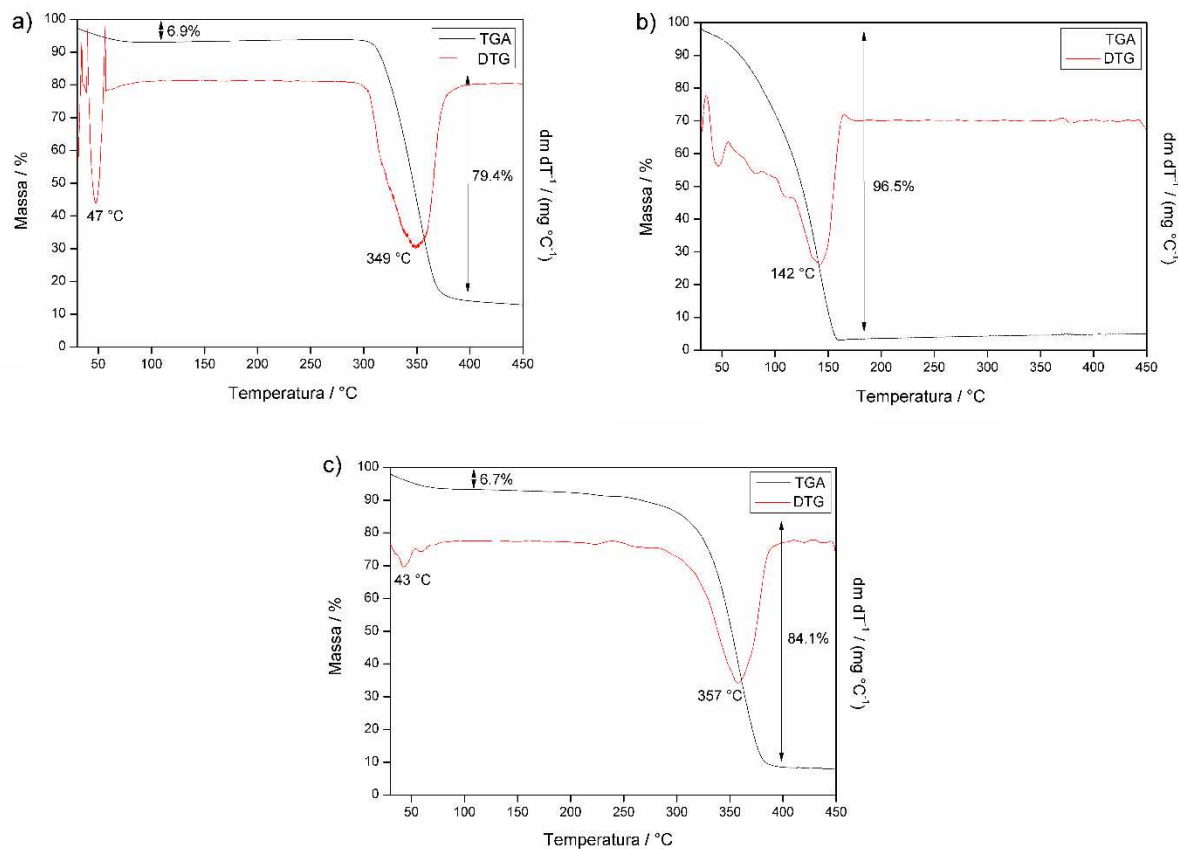


Figura 8. Curva termogravimétrica com derivada: a) HP β CD; b) óleo essencial da espécie *Psidium cattleianum*; c) complexo de inclusão.

Tabela 3. Perda de massa da HP β CD e do complexo de inclusão otimizado (CI).

Amostra	Δm_1 (%) ^a	Δm_2 (%) ^b
	0-110 °C	180-400 °C
HP β CD	6,9	79,4
CI	6,7	84,1

Variação de massa: ^aperda de água e ^bdegradação da HP β CD ou do complexo de inclusão.

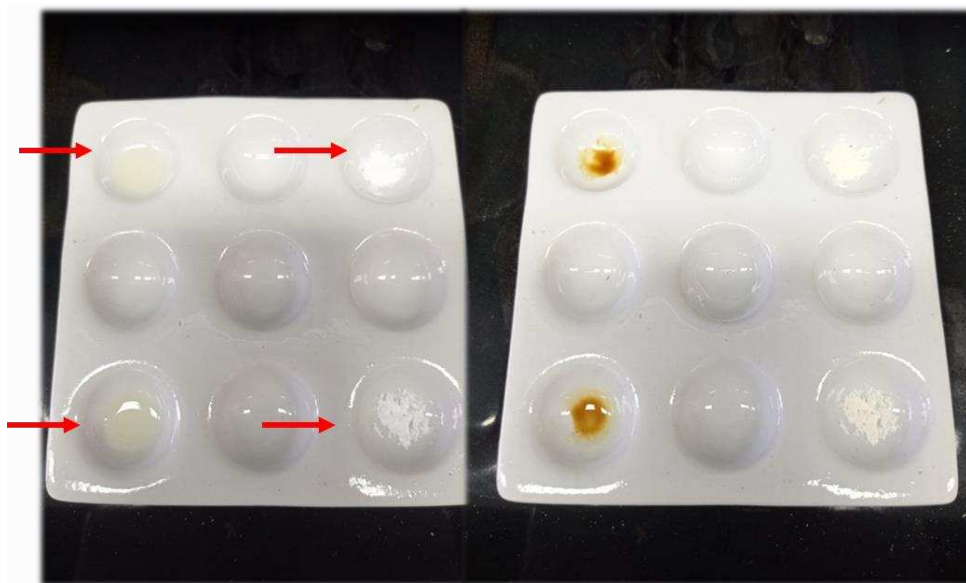


Figura 9. Placa de porcelana antes e depois de ser aquecida à 180 °C por 10 min. contendo o óleo essencial da espécie *P. cattleyanum* e o complexo de inclusão.

Fonte: O autor.

Os resultados obtidos demonstram que para superar a limitação da volatilização e degradação do OE a baixas temperaturas, o OE deve ser complexado em HP β CD, ampliando assim seu uso potencial.

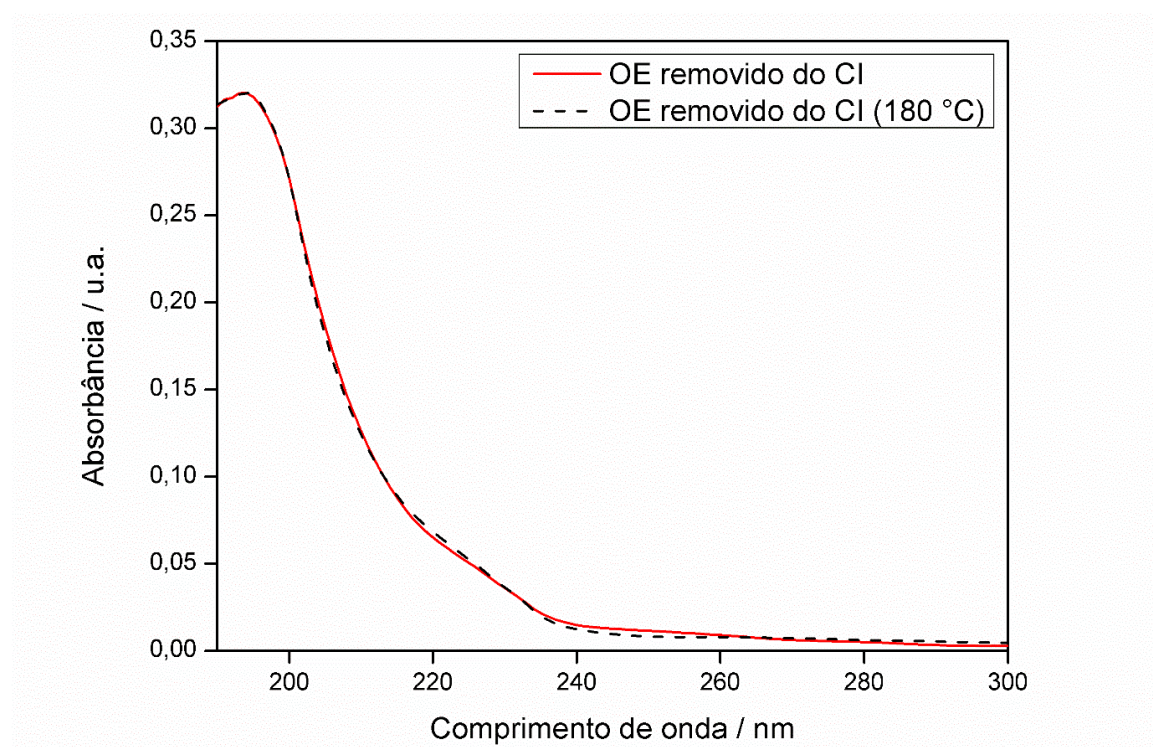


Figura 10. Espectro de absorção no UV-Vis do OE removido do complexo de inclusão (CI) e do CI aquecido a 180 °C.

3.3.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de FTIR da HP β CD, do OE, do CI, do OE e do CI, ambos aquecidos a 180 °C são mostrados na Fig. 11.

Essa técnica contribui para a verificação da formação do CI através da visualização de bandas pertencentes ao OE e a HP β CD que se apresentam simultaneamente no CI, indicando a interação entre hóspede e hospedeiro.

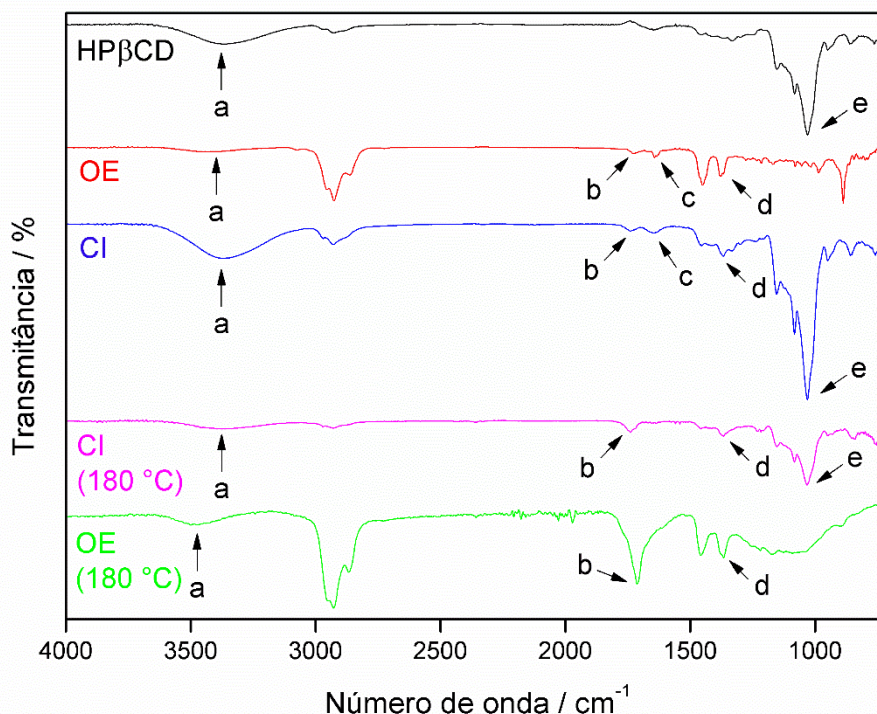


Figura 11. Espectros de FTIR para a HP β CD, óleo essencial da espécie *Psidium cattleyanum* (OE), do complexo de inclusão (CI) e do CI e OE, ambos após aquecimento a 180 °C.

Em todos os espectros, observa-se a presença de uma banda larga representada por **a**, que possui número de onda de aproximadamente 3400 cm^{-1} e pode ser atribuída ao estiramento da ligação O-H (BARBOSA, 2007). A diminuição da banda **a** no CI submetido ao aquecimento (180 °C) se refere a eliminação da água presente na amostra.

A banda em 2925 cm^{-1} , presente em todos os espectros, se refere ao estiramento assimétrico de CH_2 . As bandas em 2860 e 2950 cm^{-1} , observadas principalmente no OE, pertencem ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH_3 , respectivamente (BARBOSA, 2007). As bandas em 2860, 2925 e

2950 cm^{-1} do OE submetido ao aquecimento (180 °C) tiveram maior intensidade quando comparado ao OE (Fig. 11). Isso pode indicar que existem maiores quantidades de vibrações das ligações químicas no OE aquecido do que no OE. Assim, devido a degradação do OE quando é aquecido outros compostos podem ter sido formados.

A banda **b**, em 1740 cm^{-1} , apesar de ser uma banda fraca, possivelmente se refere ao estiramento da carbonila C=O. Sua baixa intensidade pode ser devido a sua presença ser minoritária no OE, pois este não foi identificado por análise cromatográfica (BARBOSA, 2007). Para o espectro do OE aquecido, a banda **b** possui número de onda em 1712 cm^{-1} e também se refere a banda de carbonila. Porém, esta banda pode ser atribuída a carbonila de outro composto orgânico e evidencia que houve degradação de compostos presentes no OE quando é aquecido.

A banda **c** em 1640 cm^{-1} aparece devido à deformação angular da H_2O presente tanto no OE quanto no CI em pequena quantidade (BARBOSA, 2007). A banda **c** no CI submetido ao aquecimento foi suprimida, pois a água foi evaporada durante o processo.

A banda **d**, com número de onda de 1378 cm^{-1} representa a frequência vibracional da deformação angular simétrica de CH_3 e está presente, principalmente, no OE e nos CIs (BARBOSA, 2007).

A banda **e** em 1030 cm^{-1} representa o estiramento da ligação C-O de éter cíclico e está presente no espectro da $\text{HP}\beta\text{CD}$ e dos CIs. O espectro do OE não apresenta a banda **e** sugerindo que 1,8-cineol e óxido de cariofileno podem ter sido degradados ou volatilizados do CI, no entanto, esses compostos foram observados no cromatograma do OE removido do CI (Fig. 6). Assim, a técnica de FTIR não foi suficiente para mostrar bandas características desses compostos ou eles foram complexados em menores quantidades na $\text{HP}\beta\text{CD}$ e não puderam ser evidenciados pelo FTIR. O espectro do OE aquecido apresenta uma banda larga entre 900 e 1300 cm^{-1} , representando a formação de novos compostos.

As bandas **b**, **d** e **e** confirmaram que houve interação entre o OE e a $\text{HP}\beta\text{CD}$. As bandas destacadas na $\text{HP}\beta\text{CD}$ também foram observadas nos espectros de outros autores (MAGALHÃES *et al.*, 2020; PINHEIRO *et al.*, 2017b; RAKMAI *et al.*, 2018). Apesar da menor intensidade das bandas presentes no CI

aquecido a 180 °C em comparação ao CI, o OE extraído foi quantificado por espectroscopia do UV-Vis e o resultado foi mostrado anteriormente.

3.3.3. Análise de tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta por DLS

O tamanho hidrodinâmico médio e a distribuição de tamanho (PDI - índice de polidispersidade) do CI e da HP β CD foram apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Diâmetro hidrodinâmico da partícula, potencial Zeta e índice de polidispersão da HP β CD e do complexo de inclusão.

Amostra	Diâmetro médio da partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)	Índice de polidispersão (PDI)
HP β CD	431,9 ^a \pm 18,8	-25,1 ^b \pm 0,9	0,38 ^a \pm 0,06
CI	440,1 ^a \pm 13,9	-40,9 ^a \pm 2,2	0,23 ^b \pm 0,01

Letras iguais entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$.

O diâmetro hidrodinâmico do CI e da HP β CD foram iguais entre si e acima de 400 nm. Em solução aquosa esses materiais apresentaram tendência de agregação, como observado por outro autor (MENDES *et al.*, 2022). Geralmente, os aglomerados não ocorrem de maneira uniforme, podendo gerar variabilidade no tamanho dos CIs, o que justifica os valores de PDI obtidos (HILL; GOMES; TAYLOR, 2013; KOTRONIA *et al.*, 2017; MIRANDA *et al.*, 2019). Sabe-se que um sistema com $PDI \leq 0,1$ é considerado altamente monodisperso, valores entre 0,1 e 0,4 são moderadamente polidispersos e $> 0,4$ são altamente polidispersos (BHATTACHARJEE, 2016). Dessa forma, o CI e a HP β CD podem ser classificados como moderadamente e altamente polidispersos, respectivamente. A maior uniformidade dos tamanhos do CI é favorável, pois ele pode conter quantidades semelhantes do agente bioativo, como o OE, o que leva a uma liberação mais uniforme (KOTRONIA *et al.*, 2017).

O potencial Zeta é um indicador da estabilidade dos CIs em suspensão. Partículas com valores mais elevados em módulo ($>|30|$ mV) representam uma repulsão eletrostática mais forte e, portanto, melhor estabilidade das partículas (MIRANDA *et al.*, 2019). Sendo assim, o CI pode ser classificado como maior estabilidade em suspensão aquosa em comparação com a HP β CD.

3.3.4. Difractometria de raios X

Os resultados das análises de XRD corroboram para a confirmação da formação do CI e foram apresentados na Fig. 12. Quando ocorre a complexação, certos picos podem se deslocar e/ou aumentar a nitidez de outros já existentes, uma vez que a maioria das moléculas líquidas, como os OEs, não apresentam padrões de difração (WADHWA *et al.*, 2017).

O difratograma da HP β CD e do CI apresenta as principais bandas com 2θ em 10° e 19° . As bandas largas são características de compostos amorfos, semelhante ao que foi encontrado por outros trabalhos (GAO *et al.*, 2019b; MAGALHÃES *et al.*, 2020). No entanto, o CI exibiu um pequeno estreitamento da banda em torno de 19° em comparação com a HP β CD, o que pode ser devido à formação do CI. Dessa forma, para que haja a complexação do OE deve haver uma organização do CI justificando a alteração no difratograma (MAGALHÃES *et al.*, 2020).

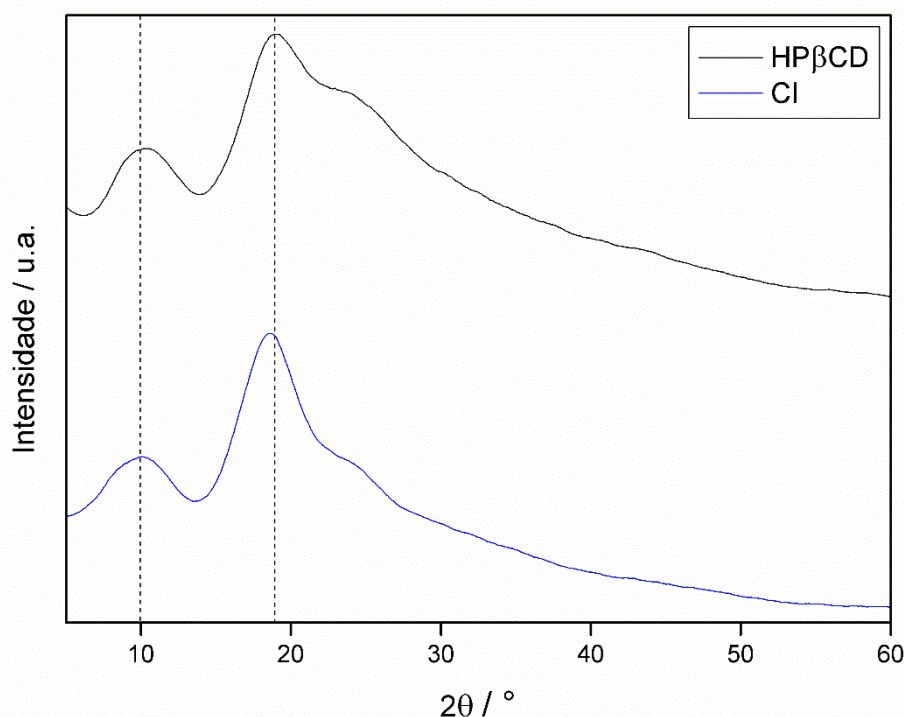


Figura 12. Difratograma da HP β CD e do complexo de inclusão da espécie *Psidium cattleianum* (CI).

3.4. Liberação controlada

O estudo do perfil de liberação do OE da CAT a partir do CI foi realizado para estimar o tempo de liberação do OE em solução aquosa de DMSO 1% e em acetonitrila. O meio aquoso simula as condições empregadas no experimento larvicida com *A. aegypti*, pois previamente o CI é solubilizado em água e posteriormente as larvas são adicionadas. Este experimento foi realizado em uma mesa agitadora (Fig. 13).



Figura 13. Mesa agitadora em que foi realizado o experimento de liberação *in vitro* do óleo essencial de *P. cattleyanum* do complexo de inclusão nos meios acetonitrila e solução aquosa de DMSO 1%.

Fonte: O autor.

O CI foi colocado em uma membrana de diálise que permitiu a migração do OE para o meio externo através do processo de osmose até atingir o equilíbrio. Para quantificar o OE liberado do CI foi utilizada a curva analítica do OE em acetonitrila (Fig. 5) e do OE em solução aquosa de DMSO 1% (Fig. 14).

A curva analítica do OE em solução aquosa de DMSO 1% é mostrada como *insert* da Figura 14. O comprimento de onda de máxima de absorção ocorre em 232 nm e este foi adotado para identificar e quantificar o OE extraído do CI. A equação da regressão linear obtida foi $y = 0,5011x + 0,0856$, com $R^2_{ajustado} = 0,9759$ e $F_{ajuste} = 0,392$ ($p < 0,05$).

Como pode ser observado na Fig. 15, a liberação do OE da CAT em acetonitrila é caracterizada por duas fases: a primeira sendo uma liberação inicial

relativamente rápida, entre 0 e 6 h, que é chamada de “*burst effect*”, em que cerca de 30% do OE foi liberado; a segunda fase (após 6 h) de liberação sustentada é mais lenta e constante, sendo liberado mais aproximadamente 15%. Após 51 h, a liberação acumulada de 45% foi alcançada. A liberação inicial mais rápida normalmente é atribuída ao OE adsorvido na superfície do CI (BABAUGLU *et al.*, 2017), o que não foi observado pela TGA.

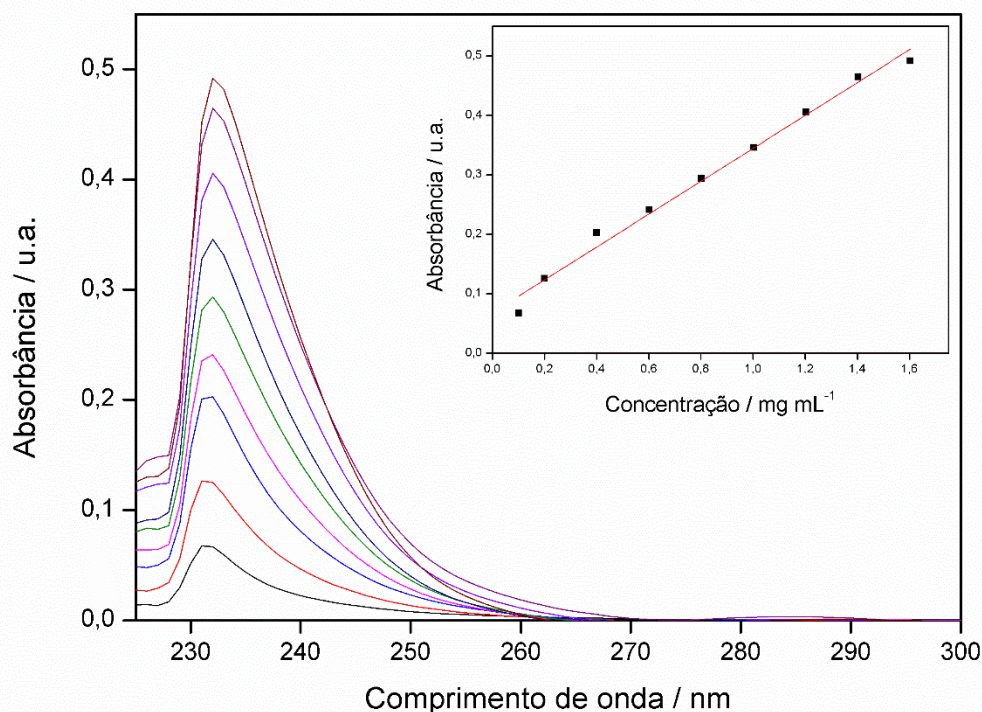


Figura 14. Espectro de absorção no UV-Vis de soluções padrão do óleo essencial da espécie *Psidium cattleianum* em água e DMSO 1% ($1,00 \times 10^{-1}$ a $1,60 \text{ mg mL}^{-1}$). Como *insert* está a curva analítica do óleo essencial em água e DMSO 1% ($\lambda_{\text{máx}} = 232 \text{ nm}$).

Em relação a liberação do OE em acetonitrila, tais resultados podem ser devido à grande afinidade do OE pelo meio mais apolar, fazendo com que uma fração migre rapidamente para a solução devido ao gradiente de concentração. Na segunda etapa, pode estar havendo o ressecamento da membrana, causado pela acetonitrila, não permitindo o equilíbrio do OE nos meios interno e externo. Uma outra hipótese sugerida é que os poros da membrana de diálise são fechados e/ou obstruídos pela HP β CD, que é insolúvel em acetonitrila, deixando a liberação mais lenta e incompleta. A Figura 16a e 16b apresentam as membranas em meio aquoso e em acetonitrila, respectivamente, após o

experimento de liberação controlada. Percebe-se o aspecto da membrana em acetonitrila mais ressecado, o que pode ter impedido a migração do OE para o meio externo. Babaoglu *et al.* (2017) utilizaram a mesma membrana para avaliar a liberação controlada do OE de cravo no CI com a HP β CD. Os autores obtiveram uma liberação acumulada de apenas 30% em solvente orgânico.

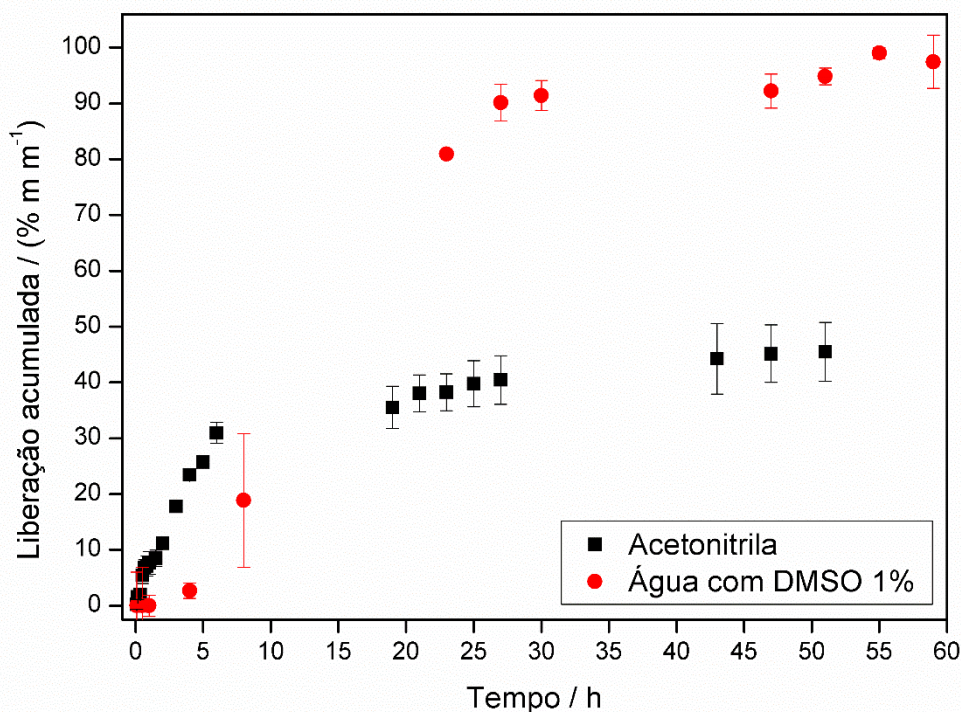


Figura 15. Perfil de liberação *in vitro* do óleo essencial de *Psidium cattleianum* do complexo de inclusão com a HP β CD nos meios acetone e solução aquosa de DMSO 1%.

O CI, em acetone, que ficou retido na membrana foi quantificado por espectrofotometria na região do UV-Vis e apresentou 45% de massa acumulada do OE. Ou seja, apenas metade da quantidade de OE presente no CI foi liberado, justificando a baixa quantidade atingida.

Por outro lado, a liberação do OE em solução aquosa de DMSO 1% apresentou um perfil diferente do CI em acetone. Após cerca de 4 h de agitação, o OE ficou bastante retido, porém, entre 4 e 27 h a liberação foi aumentando gradativamente até aproximadamente 90%. Após 27 h a taxa de liberação diminuiu e estabilizou. Após 59 h a liberação acumulada de 98% foi alcançada. Em solução aquosa de DMSO 1% ocorre o equilíbrio osmótico do OE complexado entre o interior e o exterior da membrana, permitindo a migração do

OE para a parte externa. Considerando que a água solubiliza a HP β CD, não ocorre obstrução dos poros da membrana, permitindo a liberação completa do OE. Em meio aquoso sem DMSO, a liberação do OE deve ser ainda mais lenta, pois o OE tem forte interação com a cavidade apolar do HP β CD, impedindo a liberação no meio aquoso no qual possui pouca afinidade.

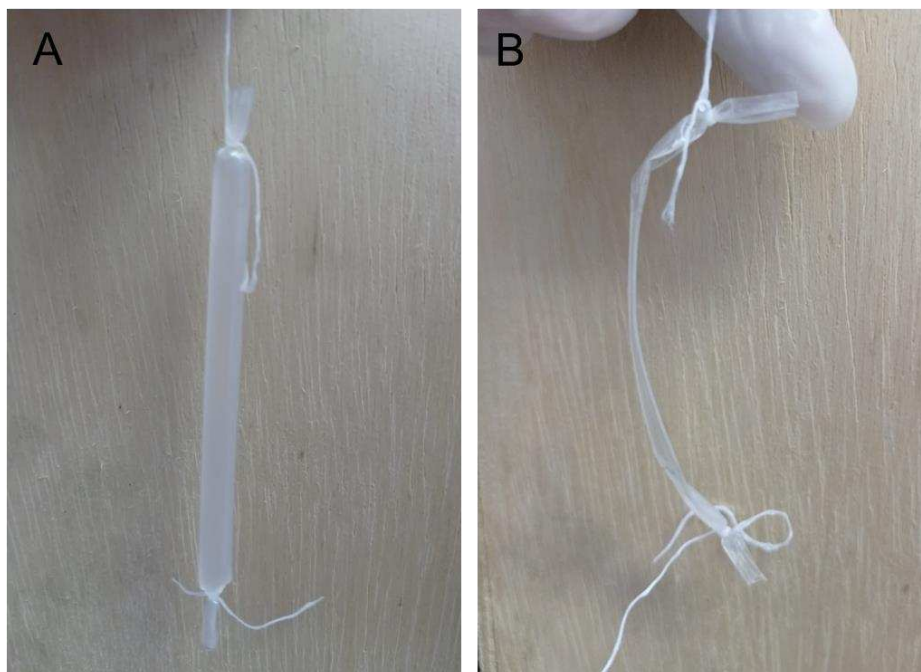


Figura 16. Membranas de diálise após o experimento com liberação controlada. A) Solução aquosa com DMSO 1%; B) Acetonitrila.

Fonte: O autor.

3.5. Atividade larvicida

As atividades larvicidas do OE da CAT em DMSO e do CI foram apresentadas na Tabela 5. Os valores de CL₅₀ e CL₉₀ do OE são menores do que do CI, assim, o OE é mais tóxico que o complexo formado. Na literatura não há trabalhos publicados com ação tóxica do CI feito com HP β CD. Um estudo que avaliou a atividade larvicida do CI do OE com β -ciclodextrina também verificou que o OE é mais tóxico do que o CI (GALVÃO *et al.*, 2015). Outro trabalho, entretanto, observou o contrário (GALVÃO *et al.*, 2019).

O perfil de liberação acumulada do OE em solução aquosa de DMSO (Fig. 15) mostra que a liberação total do OE no meio ocorre somente após 27 h. Logo, a liberação do OE no CI é lenta e, provavelmente, muito menor em água sem

DMSO (meio utilizado no experimento larvicida em *A. aegypti*). Assim, uma hipótese sugerida é que como a liberação do OE é lenta, pode não haver tempo de contato suficiente para que maior quantidade de larvas sejam mortas. Dessa forma, no experimento com o OE, as larvas ficam em contato direto com o óleo durante 24 h, o que não ocorre com o OE que está protegido na HP β CD. Além disso, outra possibilidade é que o composto mais tóxico tenha a taxa de liberação do CI mais lenta, logo, apresentará menor atividade larvicida em comparação com o OE.

Tabela 5. Toxicidade do óleo essencial da *Psidium cattleianum* e do complexo de inclusão em larvas de *Aedes aegypti*.

	CL ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	CL ₉₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^b	χ^2 ^c
OE em DMSO 1%	81,73 (80,14-83,32)	102,50 (99,82-105,73)	0,4761
CI	134,44 (130,93-137,62)	168,69 (163,80-174,98)	0,3028

^aConcentração letal média necessária para matar 50% da população com intervalo de confiança.

^bConcentração letal média necessária para matar 90% da população com intervalo de confiança.

^cQui-quadrado de Pearson com $\alpha = 0,05$.

De forma geral, pode-se observar que os compostos majoritários e minoritários do OE da CAT foram complexados na HP β CD (Fig. 6). Sendo assim, a menor toxicidade do CI em comparação ao OE não pode ser atribuída a não complexação de algum composto potencialmente tóxico.

Os compostos químicos presentes no OE são responsáveis por sua bioatividade. Alguns trabalhos avaliaram a toxicidade do β -cariofileno, principal composto do OE da CAT, em larvas de *A. aegypti*. Para o β -cariofileno a CL₅₀ foi de 88,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PERUMALSAMY; KIM; AHN, 2009) e 1202 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SILVA *et al.*, 2008). O óxido de cariofileno, segundo composto principal do OE da CAT, apresenta CL₅₀ de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SILVA *et al.*, 2008). Enquanto o limoneno, que é o terceiro composto majoritário do OE da CAT, apresentou CL₅₀ em larvas de *A. aegypti* igual a 17,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ROCHA *et al.*, 2015), 26,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (GALVÃO *et al.*, 2015), 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SANTOS *et al.*, 2011) e 37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SILVA *et al.*, 2008). Dessa forma, estes compostos isolados possuem toxicidade em larvas de *A. aegypti*, sendo o limoneno o mais tóxico.

No entanto, deve-se considerar que os compostos majoritários encontrados nos OEs nem sempre são os principais responsáveis pelas propriedades que esses demonstram. Em alguns casos, a bioatividade da mistura é mais elevada do que dos compostos isolados (ROSA *et al.*, 2016). Isto pode ser explicado pelo sinergismo entre os constituintes presentes nos OEs e a presença de compostos minoritários, que podem ser biologicamente ativos.

Apesar do CI ser menos tóxico do que o OE em DMSO, a formação do CI é capaz de melhorar a solubilidade aquosa e estabilidade térmica dos OEs. Além disso, permite sua utilização em recipientes contendo água, que são potenciais criadouros de larvas, sendo o CI mais adequado do que o OE.

4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a espécie *P. cattleyanum* possui conteúdo significativo de OE nas folhas e apresenta atividade larvicida. O processo de produção do CI, formado a partir do OE da CAT com a HP β CD, foi otimizado e apresentou alta eficiência de complexação. O estudo das variáveis tempo de maceração e proporção molar foram parâmetros imprescindíveis para a obtenção de CI com alta eficiência de complexação. O CI obtido foi caracterizado por técnicas analíticas comprovando que o OE foi complexado na cavidade da HP β CD. Devido à alta solubilidade aquosa do CI, este foi avaliado para o controle de larvas de *A. aegypti* e sua toxicidade foi comparada com o OE em DMSO. Apesar da toxicidade do CI ser inferior ao do OE, as vantagens que possui são superiores, pois são produtos termicamente estáveis e que não necessitam de solvente para serem solubilizados em água. Assim, os CIs da espécie CAT são produtos potencialmente tóxicos as larvas de *A. aegypti* e podem ser comercializados para essa finalidade.

REFERÊNCIAS

ADAM, F. *et al.* Aromatic Plants of French Polynesia. V. Chemical Composition of Essential Oils of Leaves of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleyanum* Sabine. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 1, p. 98–101, jan. 2011.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. EUA: Allured Publishing Corporation, 2007.

ALVES, T. A. *et al.* Phytotoxicity and cytogenetic action mechanism of leaf extracts of *Psidium cattleianum* Sabine in plant bioassays. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e260985, 2022.

AZEEM, M. *et al.* Chemical composition and repellent activity of native plants essential oils against dengue mosquito, *Aedes aegypti*. v. 140, n. 111609, p. 7, 2019.

BABAOGLU, H. C. *et al.* Encapsulation of clove essential oil in hydroxypropyl beta-cyclodextrin for characterization, controlled release, and antioxidant activity. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 5, p. e13202, out. 2017.

BARBOSA, L. C. DE A. **Espectroscopia no Infravermelho**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2007.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, ago. 2016.

CASTRO, M. R. *et al.* Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 242–250, fev. 2015.

CHALANNAVAR, R. K. *et al.* Chemical constituents of the essential oil from leaves of *Psidium cattleianum* var. *cattleianum*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, p. 783–789, 2013.

CIOBANU, A.; LANDY, D.; FOURMENTIN, S. Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 110–114, ago. 2013.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Editora FIOCRUZ, 1994.

COSME, L. V. *et al.* Evolution of *kdr* haplotypes in worldwide populations of *Aedes aegypti*: Independent origins of the F1534C *kdr* mutation. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. e0008219, 16 abr. 2020.

EL-SAYED, A. M. **The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals**. Disponível em: <<http://www.pherobase.com>>. Acesso em: 27 maio. 2020.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. v. 4

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

GALVÃO, J. G. *et al.* Lippia gracilis essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes: an environmentally safe formulation to control Aedes aegypti larvae: Lippia gracilis essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes. **Pest Management Science**, v. 75, n. 2, p. 452–459, fev. 2019.

GAO, S. *et al.* Physicochemical properties and fungicidal activity of inclusion complexes of fungicide chlorothalonil with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, p. 111513, nov. 2019.

HERRERA, A. *et al.* Antifungal and physicochemical properties of inclusion complexes based on β -cyclodextrin and essential oil derivatives. **Food Research International**, v. 121, p. 127–135, jul. 2019.

HILL, L. E.; GOMES, C.; TAYLOR, T. M. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 86–93, abr. 2013.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, jan. 2018.

KAMIMURA, J. A. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 701–709, jul. 2014.

KFOURY, M. *et al.* Encapsulation in cyclodextrins to widen the applications of essential oils. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p. 129–143, mar. 2019.

KOTRONIA, M. *et al.* Encapsulation of Oregano (Origanum onites L.) Essential Oil in β -Cyclodextrin (β -CD): Synthesis and Characterization of the Inclusion Complexes. **Bioengineering**, v. 4, n. 4, p. 74, 9 set. 2017.

LEAL, R. C. *et al.* A Química Quântica na compreensão de teorias de Química Orgânica. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1211–1215, 2010.

LINSTROM, P. J.; MALLARD, W. G. **NIST Chemistry WebBook**. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 27 maio. 2020.

MAGALHÃES, T. S. S. DE A. *et al.* Development and Evaluation of Antimicrobial and Modulatory Activity of Inclusion Complex of Euterpe oleracea Mart Oil and β -Cyclodextrin or HP- β -Cyclodextrin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 942, 31 jan. 2020.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 313–326, set. 2010.

MARRETO, R. N. *et al.* Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing Lippia gracilis essential oil. **Thermochemica Acta**, v. 475, n. 1–2, p. 53–58, set. 2008.

MEDINA, A. L. *et al.* Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 916–922, out. 2011.

MENDES, L. A. *et al.* Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 684–689, dez. 2017.

MENDES, L. A. *et al.* Spring alterations in the chromatographic profile of leaf essential oils of improved guava genotypes in Brazil. **Scientia Horticulturae**, v. 238, p. 295–302, ago. 2018.

MENDES, L. A. *et al.* Development of inclusion complexes of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with *Psidium guajava* L. essential oil by freeze-drying and kneading methods for application as *Aedes aegypti* L. larvicide. **Natural Product Research**, p. 1–5, 18 ago. 2022.

MENG, X.; PAN, Q.; LIU, Y. Preparation and properties of phytosterols with hydroxypropyl β -cyclodextrin inclusion complexes. **European Food Research and Technology**, v. 235, n. 6, p. 1039–1047, dez. 2012.

MIRANDA, M. *et al.* Nanostructuring lipid carriers using *Ridolfia segetum* (L.) Moris essential oil. **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, p. 109804, out. 2019.

MOSSA, A.-T. H. Green Pesticides: Essential Oils as Biopesticides in Insect-pest Management. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 354–378, 1 maio 2016.

NDII, M. Z. *et al.* Estimating the reproduction number and designing the integrated strategies against dengue. **Results in Physics**, v. 27, n. 104473, p. 10, 2021.

PANDIYAN, G. N.; MATHEW, N.; MUNUSAMY, S. Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p. 549–556, jun. 2019.

PATIL, J. S. *et al.* INCLUSION COMPLEX SYSTEM; A NOVEL TECHNIQUE TO IMPROVE THE SOLUBILITY AND BIOAVAILABILITY OF POORLY SOLUBLE DRUGS: A REVIEW. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 2, n. 2, p. 29–34, 2010.

PEREIRA, E. DOS S. *et al.* *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 258, p. 95–103, ago. 2018.

PERUMALSAMY, H.; KIM, N.-J.; AHN, Y.-J. Larvicidal Activity of Compounds Isolated From *Asarum heterotropoides* Against *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 6, p. 1420–1423, 1 nov. 2009.

PINHEIRO, J. *et al.* Inclusion Complexes of Copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) Oleoresin and Cyclodextrins: Physicochemical Characterization and Anti-

- Inflammatory Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2388, 18 nov. 2017.
- PINO, J. A. *et al.* Leaf Oils of *Psidium parvifolium* Griseb. and *Psidium cattleianum* Sabine from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 4, p. 370–371, jul. 2004.
- RAKMAI, J. *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 219–225, jan. 2018.
- ROCHA, D. K. *et al.* Larvicidal Activity against *Aedes Aegypti* of Foeniculum Vulgare Essential Oils from Portugal and Cape Verde. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 4, p. 1934578X1501000, abr. 2015.
- ROSA, C. S. *et al.* Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 19–26, mar. 2016.
- SANTOS, M. D. S. *et al.* Caracterização do suco de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) extraído mecanicamente e tratado enzimaticamente. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 29, n. 5, p. 617–621, 18 dez. 2007.
- SAS Institute**. : SAS/STAT User's Guide. Cary, NC, USA, 2008.
- SCUR, M. C. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 101–108, 12 fev. 2016.
- SEFIDKON, F.; ABBASI, K.; KHANIKI, G. B. Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 19–23, jan. 2006.
- SIFOLA, M. I.; BARBIERI, G. Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 4, p. 408–413, maio 2006.
- SILVA, W. J. *et al.* Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3251–3255, maio 2008.
- SMITH, L. B.; KASAI, S.; SCOTT, J. G. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 1–12, out. 2016.
- SOUSA, V. D. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. v. 2
- SOUZA, T. DA S. DE *et al.* Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38–44, fev. 2017.

TAO, F. *et al.* Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 247–255, nov. 2014.

TEIXEIRA, B. N. *et al.* Synthesis and Characterization of Nano-Encapsulated Black Pepper Oleoresin using Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrin for Antioxidant and Antimicrobial Applications: Black pepper oleoresin nanoparticles.... **Journal of Food Science**, v. 78, n. 12, p. N1913–N1920, dez. 2013.

VARAN, G. *et al.* Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 2, p. 457–469, out. 2017.

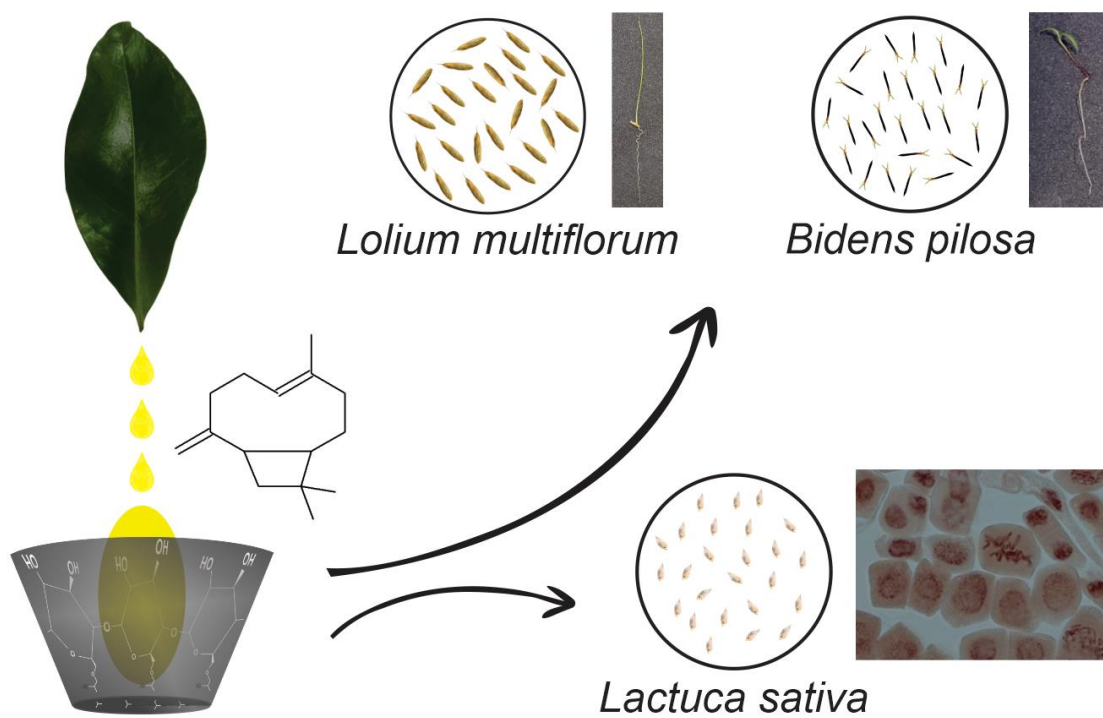
WADHWA, G. *et al.* Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 89, n. 1–2, p. 39–58, out. 2017.

WHO. **GUIDELINES FOR LABORATORY AND FIELD TESTING OF MOSQUITO LARVICIDES**. [s.l.] World Health Organization, 2005.

YANG, L. *et al.* Reduced effectiveness of repellents in a pyrethroid-resistant strain of *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) and its correlation with olfactory sensitivity. **Pest Management Science**, v. 76, n. 1, p. 118–124, jan. 2020.

CAPÍTULO 4

Atividade herbicida e citogenotóxica de complexos de inclusão do óleo essencial das folhas de *Psidium gaudichaudianum* e β -cariofileno em 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina



RESUMO

O uso de produtos naturais, como os óleos essenciais (OEs), para o controle de plantas invasoras em sistemas agrícolas, vem despertando grande interesse. O gênero *Psidium* é conhecido por conter plantas com OEs. Destaque é dado ao OE de *Psidium gaudichaudianum* (GAU) e seu composto majoritário β -cariofileno (β -CAR), que foram alvos deste trabalho. Apesar do OE GAU e do β -CAR serem promissores para utilização em plantas invasoras, eles são muito voláteis e facilmente biodegradados. Dessa forma, uma maneira de evitar ou diminuir essas características, são os métodos de proteção, como a formação de complexos de inclusão (CIs) com a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD). Assim, o objetivo deste trabalho foi obter CIs a partir do OE GAU e do β -CAR e avaliar suas atividades herbicida e citogenotóxica. Os CIs obtidos foram caracterizados pelas técnicas analíticas: UV-Vis, GC, TGA e FTIR, e estes foram utilizados como herbicidas nas plantas invasoras *Lolium multiflorum* e *Bidens pilosa*. Os CIs obtidos apresentaram eficiência de complexação de 91,5 e 83,9%, para o OE GAU e o β -CAR, respectivamente. Os CIs produzidos foram capazes de proteger o OE e o β -CAR da volatilidade e degradação, com alta estabilidade térmica, além de solubilizarem o OE e β -CAR em água sem a adição de solvente orgânico. O OE, o β -CAR e seus respectivos complexos foram utilizados quanto a atividade herbicida nas concentrações de 187,5 a 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, avaliando as variáveis germinação, crescimento radicular e crescimento da parte aérea. De forma geral, o CI GAU foi mais tóxico que o CI β -CAR. Na maioria das concentrações avaliadas, o OE e o β -CAR apresentaram toxicidade igual ou maior que os respectivos CIs. O CI GAU na concentração de 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é indicado para uso em *B. pilosa* e *L. multiflorum*, pois apresentou maior toxicidade, logo, houve efeito dose dependente. O CI β -CAR na concentração de 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ poderia ser indicado principalmente para aplicação em *L. multiflorum*. A citogenotoxicidade foi avaliada em células meristemáticas da raiz da planta modelo *Lactuca sativa*, sendo verificado uma influência dos OEs e CIs na normalidade do ciclo celular. Verificou-se a redução do índice mitótico e o aumento de anormalidades cromossômicas, evidenciando ação aneugênica

e clastogênica do OE, do β -CAR e dos CIs. Os resultados evidenciaram que os CIs podem ser utilizados em plantas invasoras, pois em termos de ação herbicida e citogenotóxica foi eficiente. Além disso, é possível indicar os produtos obtidos como potenciais a serem explorados comercialmente, pois os CIs permitem que o OE complexado apresente constituição química mais estável do que o OE puro, diante das condições de armazenamento. Ainda, este trabalho contribui para o desenvolvimento da GAU, uma espécie nativa do Brasil, com potencial para a bioeconomia.

Palavras-chave: Produtos naturais. Araçá. Atividade biológica. Bioherbicida.

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a escassez de alimentos nos últimos anos tornou necessário o desenvolvimento da agricultura sustentável, visando preservar o meio ambiente, reduzir custos e elevar a produtividade (KAUR *et al.*, 2021). No entanto, em grandes culturas como trigo, milho, entre outras, as plantas invasoras crescem de forma espontânea e indesejada, causando perda da produtividade da cultura, colocando em risco a integridade de sistemas agrícolas e causando prejuízo econômico (PAINI *et al.* 2016; EL-ALAM *et al.* 2020). Esforços contínuos são realizados para proteger as lavouras de plantas invasoras, que vão desde o controle mecânico até o químico (XIE *et al.*, 2019). Sendo este último o mais utilizado na agricultura moderna, juntamente com práticas de manejo integrado (DABA; BERECHA; TADESSE, 2021). No entanto, o uso excessivo e inadequado de herbicidas sintéticos, como o glifosato, para o controle de plantas invasoras, favorece a seleção de genótipos resistentes, além de causar danos ambientais, à saúde humana e animal (BENCHAA *et al.*, 2019; IBÁÑEZ; BLÁZQUEZ, 2018; PINHEIRO *et al.*, 2017a; ZHANG *et al.*, 2016).

Dessa forma, para superar as desvantagens dos herbicidas sintéticos, os produtos naturais obtidos a partir de plantas, são uma alternativa viável, eficiente e segura para os agricultores (MAES *et al.*, 2021). Os óleos essenciais (OEs) foliares podem possuir atividade herbicida para plantas invasoras, como a *Lolium multiflorum* (azevém) (IBÁÑEZ; BLÁZQUEZ, 2019a) e a *Bidens pilosa* (picão preto) (ALVES *et al.*, 2014). O gênero *Psidium* (Myrtaceae) contém espécies que produzem OEs, em geral ricos em sesquiterpenos, os quais podem ser inibidores da germinação de sementes e interferirem no desenvolvimento de diferentes espécies vegetais (SILVA *et al.*, 2021). Recentemente, o OE das folhas de *Psidium gaudichaudianum* Proença & Faria (GAU), rico em β -cariofileno, foi relatado por suas propriedades fitotóxicas sobre o crescimento radicular e aéreo de *Lactuca sativa* L. (alface), apresentando resultados estatisticamente semelhantes ao herbicida pós-emergente glifosato (VASCONCELOS *et al.*, 2019). No entanto, não há na literatura trabalhos com espécies de *Psidium* avaliados em plantas invasoras.

A espécie GAU é uma angiosperma conhecida popularmente como araçá. Apesar do gênero *Psidium* possuir ampla diversidade genética de forma interespecífica, GAU pode ser considerada uma espécie nativa pouco conhecida (SILVA *et al.*, 2021). Investigar espécies pouco estudadas é imprescindível para o seu uso sustentável. As plantas invasoras *L. multiflorum* e *B. pilosa* são anuais e possuem diferentes preferências de habitat. *B. pilosa* (Asteraceae) é originária da América do Sul e comum em todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo, que possuem clima quente e úmido (ARTHUR; NAIDOO; COOPOOSAMY, 2012). *L. multiflorum* (Poaceae) é uma gramínea de origem europeia e comum em regiões mais frias (FIRESTONE; JASIENIUK, 2012).

Embora os OEs tenham potencial para uso no controle de plantas invasoras, eles são muito voláteis e facilmente degradados quando expostos a luz, calor e oxigênio (MOSSA, 2016). Assim, a utilização de métodos de proteção de OEs quanto ao aumento da estabilidade térmica e solubilidade em água, permitem ampliar as suas aplicações. Um desses métodos utiliza a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP β CD), que é um oligossacarídeo derivado do amido, para produzir complexos de inclusão (CIs) com os OEs. Os CIs formados pela HP β CD possuem a superfície polar e cavidade apolar, assim a HP β CD aprisiona moléculas hidrofóbicas, como os compostos presentes nos OEs e são solúveis em meio aquoso (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018).

Com a finalidade de ampliar o conhecimento dos OEs, suas potenciais aplicações e criar um produto bioherbicida, foi utilizado o OE da espécie *P. gaudichaudianum* e do composto majoritário β -cariofileno para este estudo. A partir deles foram obtidos os CIs, caracterizados por diferentes técnicas analíticas e avaliados quanto a germinação e crescimento radicular e aéreo de sementes de *L. multiflorum* e *B. pilosa*. Ainda, foi verificada a ação citogenotóxica dos produtos obtidos no ciclo celular de células meristemáticas radiculares de *L. sativa*. A *L. sativa* foi utilizada por ser considerada uma planta modelo, pois possui um baixo número de cromossomos ($2n = 18$) e estes são relativamente longos (2,8 a 5,5 μm), o que facilita a visualização microscópica das alterações citogenéticas, além de alta sensibilidade (SANTIAGO *et al.*, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2017).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Padrões e reagentes

Os reagentes utilizados foram β -cariofileno (96,2%, Quinarí, lote CAR76HG, Ponta Grossa, PR, Brasil), 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina (HP β CD, Oakwood Chemical, Estill, SC, EUA), etanol (95%, Didática, São Paulo, SP, Brasil), acetonitrila (99,9%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), acetona (99,5%, Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil), tween 80 (Êxodo Científica, Hortolândia, SP, Brasil), glifosato (Roundup, São José dos Campos, SP, Brasil), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ácido clorídrico (37%, Neon, Suzano, SP, Brasil), metanossulfonato de metila (MMS) (99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), aceto-orceína (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil) e ácido acético (99,7%, Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para a preparação das soluções foi utilizada água tipo 1, obtida pelo sistema PURELAB (PURELAB Ultra MK2).

2.2. Coleta e extração de óleo essencial das folhas de *P. gaudichaudianum*

As plantas de *Psidium gaudichaudianum* estão localizadas no Centro de Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES). Amostras foliares de plantas foram coletadas em julho de 2021 às 8 horas da manhã em Alegre, Espírito Santo, Brasil, localizada na latitude sul (20° 45'), longitude oeste (41° 31') e altitude de 254 metros.

Uma amostra de *P. gaudichaudianum* foi coletada, seca e depositada no herbário RB do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB00774107).

As amostras foliares foram coletadas ao redor da copa das árvores. O material foi armazenado em sacos de papel e as folhas foram secas à sombra e à temperatura ambiente (~25 °C) por cerca de uma semana. Em seguida, as folhas foram armazenadas em freezer a -9 °C até a extração do OE.

O OE foi obtido por hidrodestilação via aparelho Clevenger, durante quatro horas de extração, conforme metodologia recomendada pela

Farmacopeia Brasileira para óleos voláteis (SOUSA, 2019). Nas extrações, realizadas várias vezes, foram utilizados cerca de 100 g de folhas secas em aproximadamente 1500 mL de água tipo 1 em um balão de fundo redondo de 2000 mL. O OE foi removido com micropipeta e armazenado em freezer a -20 °C, protegido da luz até o uso.

2.3. Determinação da densidade absoluta e rendimento de extração de óleo essencial

A densidade absoluta do OE e do β -cariofileno foi determinada usando um picnômetro (RBR vidros, São Paulo, Brasil) de 5 mL. As massas do picnômetro vazio e seco, contendo água e com o OE, foram pesadas. O cálculo de densidade foi realizado usando a Equação 1.

$$d = \frac{m_2 - m_1}{m_3 - m_1} \times (d_{\text{água}} - d_{\text{ar}}) + d_{\text{ar}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: d = densidade absoluta do OE (g cm^{-3}); m_1 = massa do picnômetro seco e vazio (g); m_2 = massa do picnômetro com o OE (g); m_3 = massa do picnômetro com água tipo 1 (g); $d_{\text{água}}$ = densidade da água a 25 °C ($9,97 \times 10^{-1} \text{ g cm}^{-3}$); d_{ar} = densidade do ar ($1,18 \times 10^{-1} \text{ g cm}^{-3}$).

O rendimento da extração do OE foi determinado, em triplicata, pela razão entre a massa do OE extraído e a massa da planta seca, conforme a Equação 2.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa do óleo essencial (g)}}{\text{massa da planta seca (g)}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 2})$$

2.4. Perfil cromatográfico do óleo essencial

A identificação e a semiquantificação dos constituintes do OE das folhas e do β -cariofileno foram realizadas utilizando a cromatografia a gás com detector de ionização de chama (GC-FID QP2010SE, Shimadzu, Japão) e cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS QP2010SE, Shimadzu, Japão) de acordo com a metodologia de Mendes *et al.* (2017). Essas análises foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Agronomia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Para essas caracterizações, as seguintes condições foram

adotadas: o gás arraste utilizado foi o He para os dois detectores com fluxo e velocidade linear de 2,80 mL min⁻¹ e 50,80 cm seg⁻¹ (GC-FID) e 1,98 mL min⁻¹ e 50,90 cm seg⁻¹ (GC-MS), respectivamente; a temperatura do injetor foi de 220 °C na razão split de 1:30; coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm); fase estacionária Rtx[®]-5MS (0,25 µm de espessura do filme); a temperatura do forno teve a seguinte programação: temperatura inicial de 40 °C, a qual permaneceu por 3 minutos e em seguida a temperatura foi aumentada gradativamente a 3 °C min⁻¹ até atingir 180 °C, em que permaneceu por 10 minutos, tendo um tempo total de análise de 59,67 min; as temperaturas que foram utilizadas nos detectores FID e MS são de 240 e 200 °C, respectivamente (SOUZA *et al.*, 2017). A amostra utilizada foi retirada do vial em um volume de 1 µL de uma solução de 3% de OE em acetonitrila 99,9%.

As análises por GC-MS foram realizadas em um equipamento utilizando ionização por impacto eletrônico com energia de 70 eV; velocidade de varredura de 1000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos seg⁻¹ e fragmentos detectados de 29 a 400 (*m/z*). As análises por GC-FID foram realizadas por uma chama formada por H₂ e ar atmosférico com temperatura de 300 °C. Foram utilizados fluxos de 40 mL min⁻¹ e 400 mL min⁻¹ para H₂ e ar, respectivamente.

A identificação dos componentes do OE e do β-cariofileno foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos com os disponíveis no banco de dados da espectroteca (Wiley 7, NIST 05 e NIST 05s) e pelo índice de retenção (IR). Para o cálculo do IR, foi utilizada uma mistura de alcanos saturados C₇-C₄₀ (Supelco, Estados Unidos) submetida sob as mesmas condições cromatográficas do OE e do β-cariofileno, e foi obtido o tempo de retenção ajustado de cada composto através do GC-FID. Em seguida, os valores calculados para cada composto foram comparados com os da literatura (ADAMS, 2007; EL-SAYED, 2019; LINSTROM; MALLARD, 2018).

O percentual relativo de cada composto presente no OE GAU e no β-cariofileno foi determinado pelo cálculo da razão entre a área do pico integrado e a área total de todos os constituintes da amostra, desde que a

área relativa fosse superior a 2%. Esses dados foram obtidos pelas análises realizadas em GC-FID.

2.5. Preparação dos complexos de inclusão

Os CIs foram obtidos pelo método de maceração seguindo a metodologia de Mendes *et al.* (2023). Os CIs contendo o OE foram preparados da seguinte maneira: utilizou-se a proporção molar do OE e HP β CD de 1:1 e o tempo de maceração total de 35 min. Cerca de 3,9 g de HP β CD (1460 g mol⁻¹) e 0,5 g do OE (187,47 g mol⁻¹) foram pesados em um almofariz. A massa molar média do OE foi obtida considerando a massa molar de cada composto e suas respectivas porcentagens de área relativa obtidas a partir da análise cromatográfica. Os experimentos foram realizados em triplicata. A mistura foi manualmente misturada sob pressão por 5 min utilizando almofariz e pistilo. Em seguida, adicionou-se o volume de etanol a 95% correspondente a 2 mmol mL⁻¹ de HP β CD para formar uma pasta homogênea e logo após a mistura foi macerada por 30 min. De forma similar, o CI contendo o β -cariofileno foi preparado em triplicata, variando apenas as massas pesadas de HP β CD e de β -cariofileno (204,36 g mol⁻¹), que foram 3,6 e 0,5 g, respectivamente. Os CIs produzidos foram mantidos a 5 °C em dessecador sob vácuo por 72 horas. Posteriormente, os CIs foram armazenados em frascos âmbar à -20 °C.

2.6. Caracterização dos complexos de inclusão

2.6.1. Curva analítica

Para determinar a eficiência da complexação (EC), uma curva analítica do OE e do β -cariofileno foi obtida usando um espectrofotômetro NanoDrop UV-Vis (Thermo Scientific, Nanodrop One, Waltham, Massachusetts, EUA). O equipamento utilizado possui resolução de 0,5 nm e foram utilizadas cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. As análises foram realizadas em modo de varredura na faixa de 190 a 850 nm. Essas análises foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Agronomia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Para esta análise, dez soluções padrão foram preparadas em triplicata com concentrações crescentes de OE em acetonitrila (1,9 a 19,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A curva analítica do β -cariofileno foi preparada com concentrações crescentes em acetonitrila (1,0 a 20,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os valores de absorvância em 195 e 197 nm, para o OE GAU e β -cariofileno, respectivamente, foram obtidos para a construção da curva, cujos pontos foram submetidos à regressão linear pelo Método dos Mínimos Quadrados.

Para quantificar a concentração de OE e o β -cariofileno removido dos CIs, 25 mg dos materiais foram dissolvidos em 50 mL de acetonitrila 99,9%, e o sistema foi mantido no escuro a 900 rpm em um agitador magnético (Thermo Scientific, Cimerac, China) por 48 horas. Este procedimento foi realizado em triplicata e adaptado de Hill *et al.* (2013). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em centrífuga (206-BL, Fanem, São Paulo, Brasil) a 1900 rpm por 20 min a 25 °C para decantar a HP β CD, deixando apenas o OE ou o β -cariofileno solúveis em acetonitrila. As soluções contendo o OE e β -cariofileno em solvente foram submetidas à análise UV-Vis, monitorando 195 e 197 nm, respectivamente. As concentrações do OE e do β -cariofileno foram obtidas pela curva analítica, possibilitando a determinação das massas de OE ou β -cariofileno extraídas. As eficiências de complexação foram determinadas usando a Equação 3:

$$\text{EC (\%)} = \frac{m_{\text{ext}} \text{ (mg)}}{m_{\text{adic}} \text{ (mg)}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde a m_{ext} é a massa do OE ou β -cariofileno extraída do CI (mg) e m_{adic} é a massa do OE ou β -cariofileno adicionada no início do processo de complexação (mg).

2.6.2. Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica foi medida por análise termogravimétrica (TGA) com o auxílio de um analisador térmico DTG (60H, Shimadzu, Japão). Cerca de 4 mg de HP β CD, OE, β -cariofileno e CIs foram pesados em uma microbalança analítica (Mettler Toledo, XP26, São Paulo, Brasil). Em seguida, as amostras foram colocadas individualmente em um cadinho de alumina e aquecidas na faixa de temperatura de 30 a 450 °C a uma taxa de

aquecimento de 10 °C min⁻¹. Foi utilizada atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL min⁻¹. Essa análise foi realizada no Laboratório de Embalagens (LABEM) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

2.6.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

O HP β CD, o OE, o β -cariofileno e os CIs foram submetidos à análise de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Foi utilizado um espectrofotômetro de refletância total atenuada (ATR) com cristal de germânio (Nicolet 6700, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) na região de 4000 a 700 cm⁻¹, com 32 varreduras e resolução espectral de 4 cm⁻¹. Essa análise foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.7. Avaliação da atividade herbicida

As emulsões do OE e do β -cariofileno foram preparadas utilizando acetona (2% v v⁻¹) e tween 80 (0,05% v v⁻¹) em meio aquoso, com as seguintes concentrações: 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 μ g mL⁻¹. As soluções dos CIs foram preparadas nas mesmas concentrações, no entanto, somente com água. Os controles negativos foram: acetona (2% v v⁻¹) com tween 80 (0,05% v v⁻¹) e HP β CD em água. Os controles positivos foram: glifosato (1 mL L⁻¹) e 2,4-D (3 mmol L⁻¹).

Para a avaliação da taxa de germinação (G), crescimento radicular (CR) e crescimento aéreo (CA), foram adicionados 3 mL da solução de cada tratamento (incluindo os controles) em placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo sementes de *Bidens pilosa* e *Lolium multiflorum* em papel de filtro. Os tratamentos foram realizados com 25 sementes e cinco repetições. As placas foram vedadas com papel filme plástico e mantidas em câmara de germinação (BOD) a (24 \pm 2) °C com fotoperíodo de 16 h no claro e 8 h no escuro. O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado.

A porcentagem de germinação (%G), o CR e CA de *B. pilosa* e *L. multiflorum* foram avaliados sete dias após a exposição inicial das sementes aos tratamentos. O crescimento aéreo e radicular foi medido com um

paquímetro digital (Stainless Hardened, Índia). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

2.8. Análise de citotoxicidade

A avaliação citogenética foi realizada na planta modelo *L. sativa* para visualizar alterações mitóticas em seu ciclo celular, como anormalidades cromossômicas e envolvendo a presença de micronúcleos (SANTIAGO *et al.*, 2017). Esta espécie possui sementes com germinação rápida e uniforme, além de ser sensível a ação de agentes tóxicos (TIGRE *et al.*, 2012).

Para realização dos experimentos, 2 mL da solução de cada tratamento (OE GAU, CI GAU, β -CAR e CI β -CAR) nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionados a placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo 25 sementes de *L. sativa* em papel de filtro. Os controles negativos foram: acetona (2% v v⁻¹) com tween 80 (0,05% v v⁻¹) e HP β CD em água. O metanossulfonato de metila (MMS) (4 mmol L⁻¹) foi usado como controle positivo, pois é um agente alquilante de DNA em testes citogenotóxicos (SINGH *et al.*, 2020). Após 48 h de exposição dos tratamentos com as sementes, 10 raízes de cada repetição foram coletadas e fixadas em solução de etanol:ácido acético (3:1 v v⁻¹) e armazenadas em freezer a -18 °C.

Para a avaliação microscópica, foram preparadas lâminas com células meristemáticas radiculares. As raízes, previamente fixadas, foram lavadas com água destilada e hidrolisadas em HCl 5 mol L⁻¹ por 18 min à temperatura ambiente. As lâminas foram preparadas pela técnica de compressão e coradas com aceto-orceína (2% m v⁻¹). Em seguida, foram cobertas com lamínula, seladas e armazenadas em freezer a -18 °C para conservação do material e posterior análise. Foram avaliadas mil células por lâmina, totalizando 5000 células por tratamento.

A citotoxicidade foi determinada pela razão entre o total de células em divisão e o total de células avaliadas, medida pelo índice mitótico (IM). A genotoxicidade foi determinada usando a soma das frequências de células com anormalidades cromossômicas (AC) (cromossomos não orientados, cromossomos aderentes, c-metáfases, pontes e quebras cromossômicas) e

nucleares (AN) (comunicação nuclear, broto nuclear, células multinucleadas e núcleo condensado) obtida pela razão entre o número total de células com alterações e o número total de células avaliadas. Já a mutagenicidade foi determinada pela frequência de células com micronúcleos obtida pela razão entre o número total de células com micronúcleos e o número total de células avaliadas (SANTOS; SOMMAGGIO; MARIN-MORALES, 2022). A porcentagem de cada alteração cromossômica dentro do total de células em divisão também foi avaliada. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

2.9. Análise estatística

A regressão linear foi realizada por meio do Programa Minitab, versão 17. Os experimentos de fitotoxicidade (%G, CR e CA) foram realizados como um fatorial triplo. O primeiro fator foram as espécies de plantas invasoras (*B. pilosa* e *L. multiflorum*). O segundo fator incluiu quatro tratamentos (OE GAU, CI GAU, β -CAR e CI β -CAR). O terceiro fator foram as cinco concentrações dos materiais citados anteriormente (3000, 1500, 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para os ensaios fitotóxicos e citotóxicos (IM, AN e AC), os dados foram submetidos à ANOVA (análise de variância) com delineamento inteiramente casualizado. A comparação estatística dos dados entre os fatores foi realizada usando o teste de Tukey e a comparação com controles usando o teste de Dunnett a 5% de significância, utilizando o software R Studio versão 4.1.0 ("R Core Team", 2021).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O OE da *P. gaudichaudianum* apresentou rendimento da extração de $(0,58 \pm 0,02)\%$ (m m^{-1}). A densidade do OE GAU e do β -cariofileno foi de 0,9157 e 0,9005 g cm^{-3} , respectivamente. É importante a obtenção do rendimento de extração do OE para observar se há viabilidade econômica na sua exploração em larga escala. Na literatura não está relatado o rendimento da extração de OEs das folhas de *P. gaudichaudianum*, por esse motivo, pode-se realizar a comparação do valor obtido com outras plantas.

Os OEs de *Psidium* mais estudados e registrados no mundo, são: *P. guajava*, *P. guineense* e *P. cattleyanum*; e estas apresentaram o OE das folhas com rendimentos de 0,3% (MENDES *et al.*, 2022), 0,1-0,9% (FIGUEIREDO *et al.*, 2018) e 0,8% (SAVOLDI *et al.*, 2020), respectivamente (SILVA *et al.*, 2021). De forma geral, os OEs com utilização comercial podem apresentar rendimento de extração entre 0,30 e 3,86% (m m^{-1}), o que ocorre para o OE GAU (FADEL *et al.*, 2020). Ao comparar o rendimento do OE GAU com as outras espécies do gênero, observa-se que ela pode ser considerada uma planta contendo quantidade de OE de interesse comercial.

A composição química do OE GAU, as estruturas químicas e o cromatograma foram apresentados na Tabela 1, Fig. 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Identificação dos compostos presentes no óleo essencial da espécie *Psidium gaudichaudianum*.

n	Composto ^a	t _{retenção} ^b	A _{relativa} (%) ^c	Massa molar (g mol ⁻¹)	Classificação terpênica ^d
1	α -pineno	8,549	9,2	136,24	MH
2	limoneno	12,833	9,8	136,24	MH
3	1,8-cineol	12,833	4,3	154,25	MO
4	γ -terpineno	14,149	2,9	136,24	MH
5	β -cariofileno	30,646	53,3	204,36	SH
6	α -humuleno	32,003	12,0	204,36	SH
7	óxido de cariofileno	37,519	5,0	220,36	SO
Total identificado			96,5		

^aCompostos majoritários listados na ordem de eluição utilizando coluna Rtx[®]-5MS. ^bTempo de retenção. ^cCompostos com área relativa > 2% foram identificados. ^dClassificação terpênica: monoterpeno hidrocarboneto (MH), monoterpeno oxigenado (MO), sesquiterpeno hidrocarboneto (SH) e sesquiterpeno oxigenado (SO).

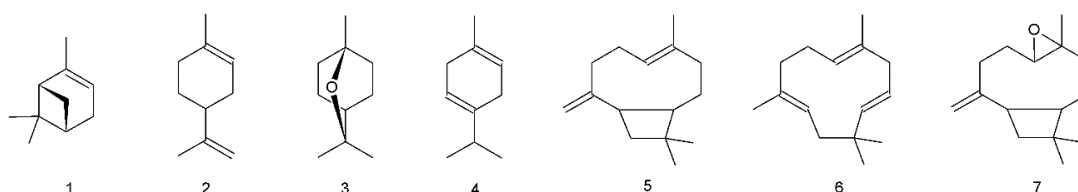


Figura 1. Estruturas químicas dos compostos identificados no óleo essencial da espécie *Psidium gaudichaudianum*. 1) α -pineno; 2) limoneno; 3) 1,8-cineol; 4) γ -terpineno; 5) β -cariofileno; 6) α -humuleno; 7) óxido de cariofileno.

Apesar do cromatograma conter cerca de 100 compostos, apenas sete deles foram identificados ($A_{\text{relativa}} > 2\%$), correspondendo a 96,5% do total da composição do OE. Estes compostos foram agrupados em classes terpênicas, sendo mono ou sesquiterpenos, podendo ser hidrocarbonetos ou oxigenados (Tabela 1). Dentre estes 70,3% foram classificados como sesquiterpenos e 26,2% monoterpenos, sendo predominantemente hidrogenados. Os compostos majoritários ($A_{\text{relativa}} > 10\%$) presentes no OE GAU foram: β -cariofileno (53,3%) e α -humuleno (12,0%). Para o OE da espécie GAU, Vasconcelos *et al.* (2019) verificaram que o OE continha β -cariofileno (17,0%) e α -humuleno (5,5%), além de limoneno (16,2%) e outros compostos minoritários. Este último trabalho utilizou a mesma planta do presente estudo, apesar das semelhanças qualitativas nas composições, quantitativamente houve diferenças, que poderiam ser justificadas por condições ambientais, como fatores climáticos e diferentes épocas de coletas das folhas.

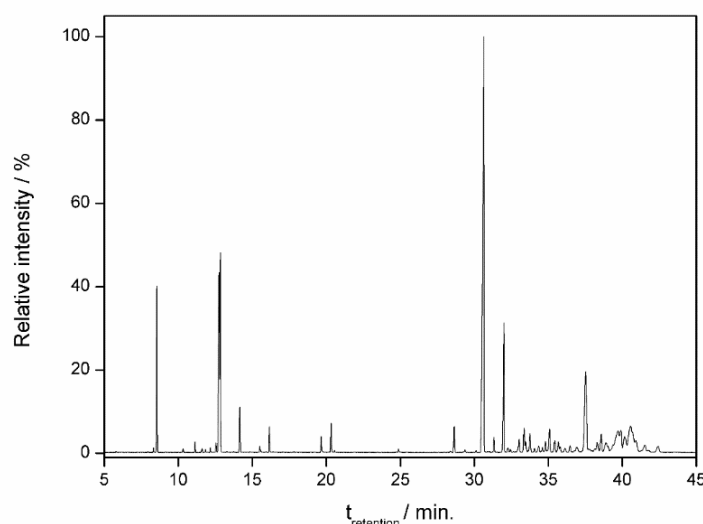


Figura 2. Cromatograma do óleo essencial da espécie *Psidium gaudichaudianum*.

O perfil químico do OE foliar de GAU apresentou compostos semelhantes aos relatados em OEs de outras espécies do gênero em outras regiões do mundo (SILVA *et al.*, 2021). Apesar da variação da composição dos OEs em espécies de *Psidium*, de forma geral, observa-se que o β -cariofileno é um composto importante para o gênero. Portanto, a aplicação

do β -cariofileno de forma isolada ao ser comparada com o OE GAU permite indicar sua potencialidade ou se esta ocorre de forma sinérgica com os outros compostos. O cromatograma do OE β -cariofileno foi apresentado na Fig. 3.

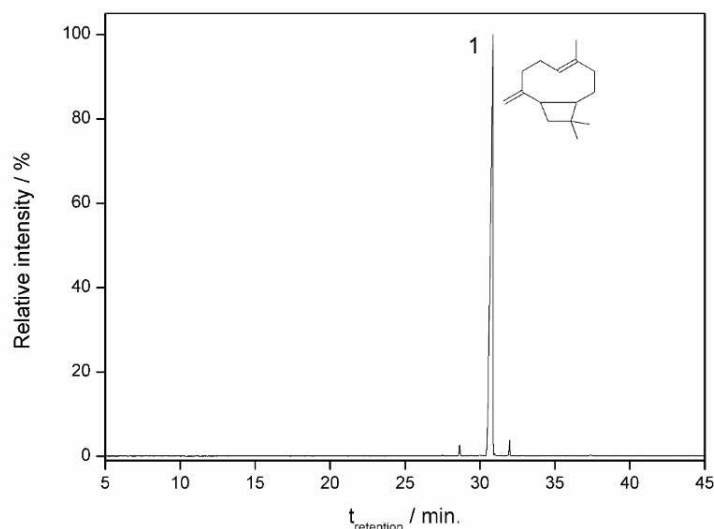


Figura 3. Cromatograma do β -cariofileno (1) com a estrutura química.

3.1. Preparo dos complexos de inclusão e caracterizações

O método de preparo dos complexos de inclusão foi realizado utilizando a maceração (MENDES *et al.*, 2022). Esse método pode ser considerado simples, de alta eficiência e escalonável (CID-SAMAMED *et al.*, 2022). O hóspede (OE ou β -cariofileno) é misturado com o hospedeiro (HP β CD) e após a adição de etanol, forma-se uma pasta, que é macerada, permitindo que o hóspede seja incorporado às cavidades do hospedeiro. Para confirmar a formação dos complexos de inclusão e determinar a eficiência do processo, sua caracterização com técnicas analíticas é fundamental e estas se complementam. Isso é possível devido as variações nas propriedades físicas da molécula hóspede devido à formação do complexo de inclusão. As técnicas analíticas selecionadas foram: Espectroscopia na região do UV-Vis, GC, TGA e FTIR.

A quantidade de OE incluída na ciclodextrina (eficiência de complexação) foi determinada espectrofotometricamente. Para isso, foi obtida a curva analítica do OE GAU a partir de um espectrofotômetro UV-Vis

(Fig. 4). O comprimento de onda de máxima de absorção ocorre em 195 nm e este foi adotado para identificar e quantificar o OE extraído do CI. A curva analítica é mostrada como *insert* da Fig. 4 e a equação da regressão linear obtida foi $y = 51,453x + 0,0537$, com $R^2_{ajustado} = 0,9913$ e $F_{ajuste} = 0,871$ ($p < 0,05$). A eficiência de complexação foi de $(91,5 \pm 0,6)\%$.

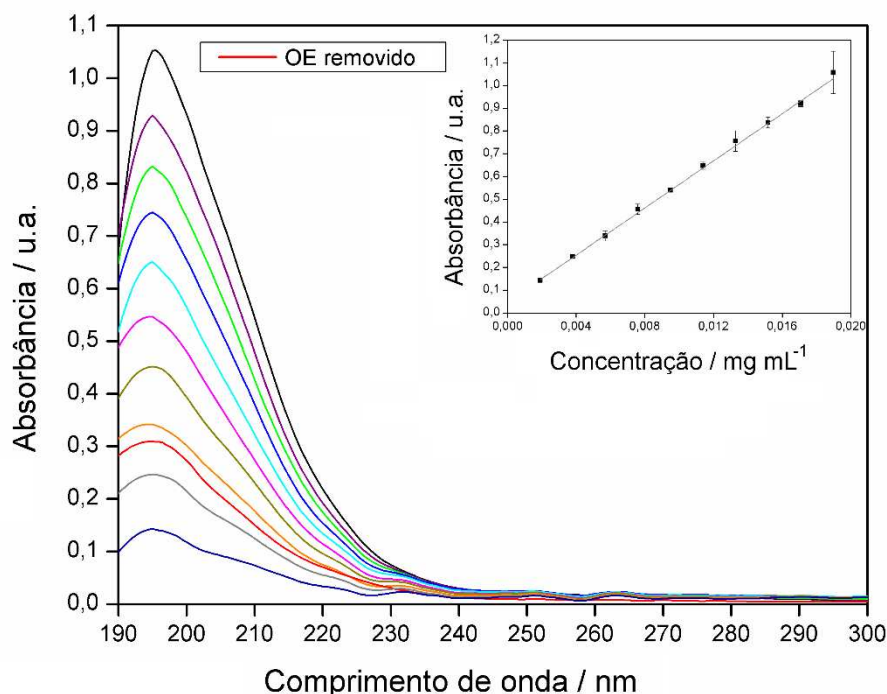


Figura 4. Espectro de absorção no UV-Vis de soluções padrão do óleo essencial (OE) da *Psidium gaudichaudianum* em acetonitrila ($1,9$ a $19,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e do OE removido do complexo de inclusão. Como *insert* está a curva analítica do OE em acetonitrila ($\lambda_{\text{máx}} = 195 \text{ nm}$).

A verificação da eficiência de complexação do β -cariofileno foi realizada selecionando os valores de absorbância no comprimento de onda de 197 nm (Fig. 5). Este foi adotado para identificar e quantificar o β -cariofileno extraído do CI. A curva analítica é mostrada como *insert* da Fig. 5 e a equação da regressão linear obtida foi $y = 62,987x + 0,02119$, com $R^2_{ajustado} = 0,9991$ e $F_{ajuste} = 0,000$ ($p < 0,05$). A eficiência de complexação foi de $(83,9 \pm 1,6)\%$.

O CI GAU e o CI β -CAR alcançaram eficiência de complexação superior a 80%. Trabalhos que utilizaram a maceração para formar complexo de inclusão do analito de interesse com a HP β CD, obtiveram eficiência de

78% (KAMIMURA *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2013) e 97% (BABAOGU *et al.*, 2017) no processo de produção. Para o complexo de inclusão de linalool com HP β CD, utilizando como método de preparo a agitação em solução aquosa, a eficiência do processo foi de 32% (POONPHATANAPRICHA *et al.*, 2021). Logo, o processo de maceração para a formação de complexos de inclusão, contendo compostos mais apolares, é promissor.

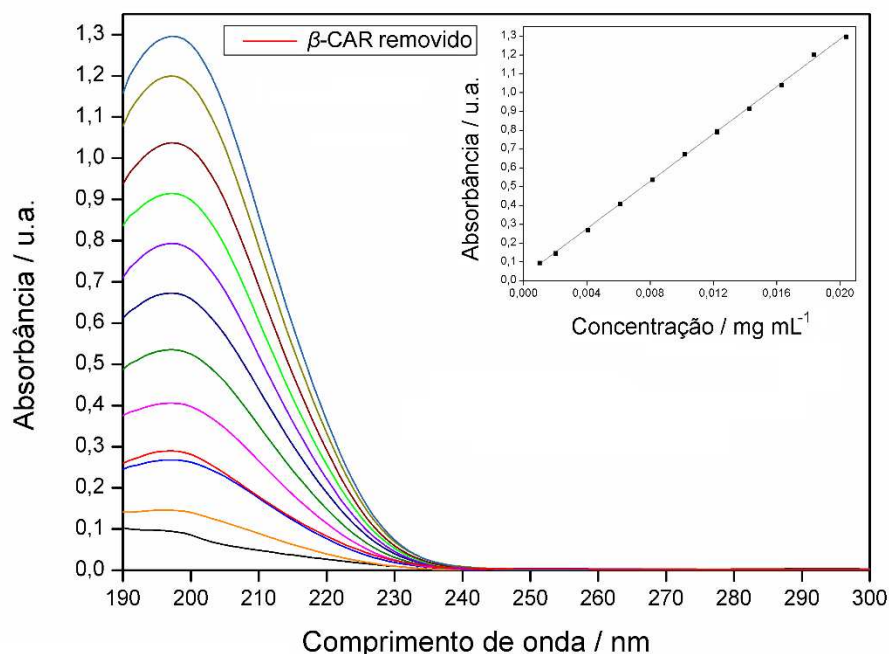


Figura 5. Espectro de absorção no UV-Vis de soluções padrão do β -cariofileno (β -CAR) em acetonitrila (1,0 a 20,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e do β -CAR removido do complexo de inclusão. Como *insert* está a curva analítica do β -CAR em acetonitrila ($\lambda_{\text{máx}} = 197 \text{ nm}$).

O OE GAU e o β -cariofileno extraídos dos correspondentes CIs foram caracterizados por cromatografia sob as mesmas condições das amostras não complexadas (Fig. 6 e 7). Ao comparar os cromatogramas, observa-se que os compostos majoritários do OE estão presentes no CI (Fig. 6) e o β -cariofileno foi encontrado no CI (Fig. 7). Assim, a similaridade dos cromatogramas do OE não complexado e do OE extraído do CI demonstraram qualitativamente a capacidade da HP β CD em aprisionar compostos hidrofóbicos. Do ponto de vista qualitativo, outros autores

encontraram semelhanças ao comparar os cromatogramas de OEs não complexados com OEs extraídos de CIs (MARRETO *et al.*, 2008).

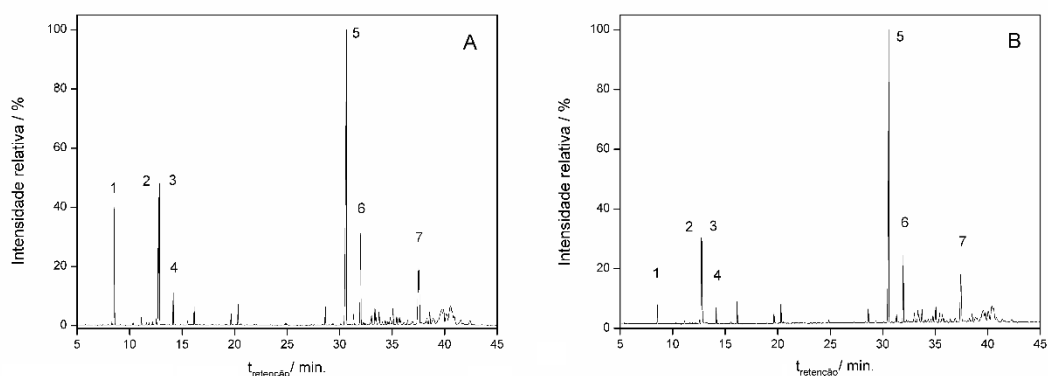


Figura 6. Cromatograma do óleo essencial. A: *P. gaudichaudianum*; B: *P. gaudichaudianum* extraído do complexo de inclusão. 1) α -pineno; 2) limoneno; 3) 1,8-cineol; 4) γ -terpineno; 5) β -cariofileno; 6) α -humuleno; 7) óxido de cariofileno.

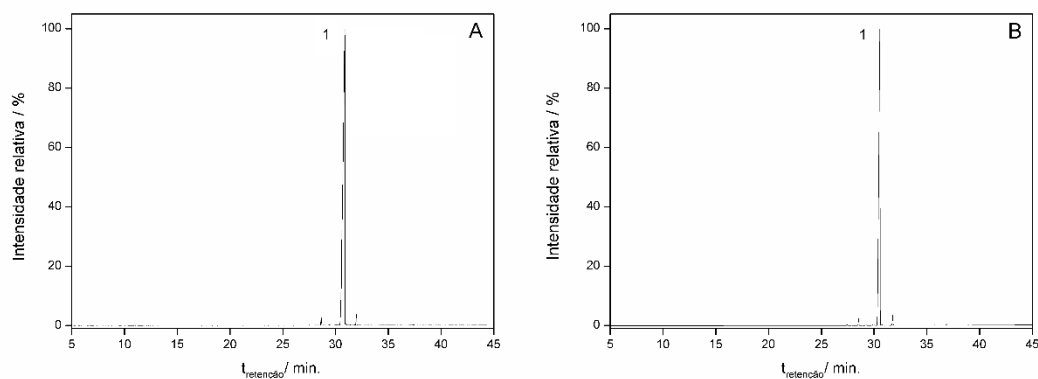


Figura 7. Cromatograma do A: β -cariofileno; B: β -cariofileno extraído do complexo de inclusão. 1) β -cariofileno.

Em relação a análise termogravimétrica, as curvas termogravimétricas foram apresentadas na Fig. 8 e a Tabela 2 contém as perdas de massa calculadas para intervalos específicos de cada amostra (Fig. 9). A TGA permite verificar a estabilidade térmica das amostras por suas variações de massa, em função da temperatura, e seu uso é imprescindível para a confirmação da formação de complexos de inclusão.

A perdas de massa das amostras foram divididas em três regiões: Δm_1 refere-se a perda das moléculas de água por evaporação ou

volatilização do OE GAU e β -CAR (30-110 °C); Δm_2 é a degradação da amostra ou volatilização do OE e β -CAR ou perda das moléculas de água que ficaram retidas na cavidade da HP β CD (110-200 °C); Δm_3 a degradação da amostra (200-400 °C) (Tabela 2).

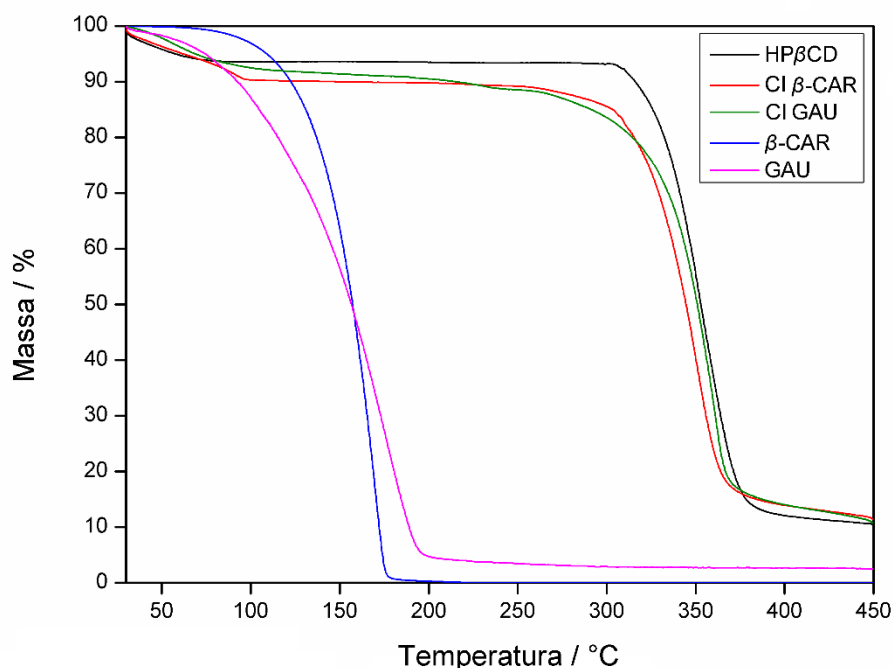


Figura 8. Curvas termogravimétricas da HP β CD, do β -cariofileno (β -CAR), da *Psidium gaudichaudianum* (GAU) e dos respectivos complexos de inclusão (CIs).

Tabela 2. Perda de massa da HP β CD, da *Psidium gaudichaudianum* (GAU), do β -cariofileno (β -CAR) e dos respectivos complexos de inclusão (CIs).

Amostra	Δm_1 (%) ^a	Δm_2 (%) ^b	Δm_3 (%) ^c
	30-110 °C	110-200 °C	200-400 °C
HP β CD	6,4	0,1	81,4
GAU	17,4	77,9	-
β -CAR	5,3	94,4	-
CI GAU	7,9	1,6	76,5
CI β -CAR	9,8	0,4	75,9

Variação de massa: ^aperda de água ou volatilização, ^bdegradação, volatilização ou perda de água que ficou retida na cavidade da HP β CD e ^cdegradação da amostra.

Em relação a HP β CD, inicialmente ocorre a perda de massa de 6,4% em temperaturas abaixo de 110 °C. Isso está relacionado à liberação da água adsorvida em sua estrutura, e até 300 °C a variação de massa é de apenas 0,1%, quando então sua decomposição foi iniciada. A terceira perda de massa (Δm_3) da HP β CD foi a mais evidente e ocorreu com o máximo de degradação em 351 °C. Assim, esse oligossacarídeo tem alta estabilidade térmica quando comparado ao OE ou β -CAR.

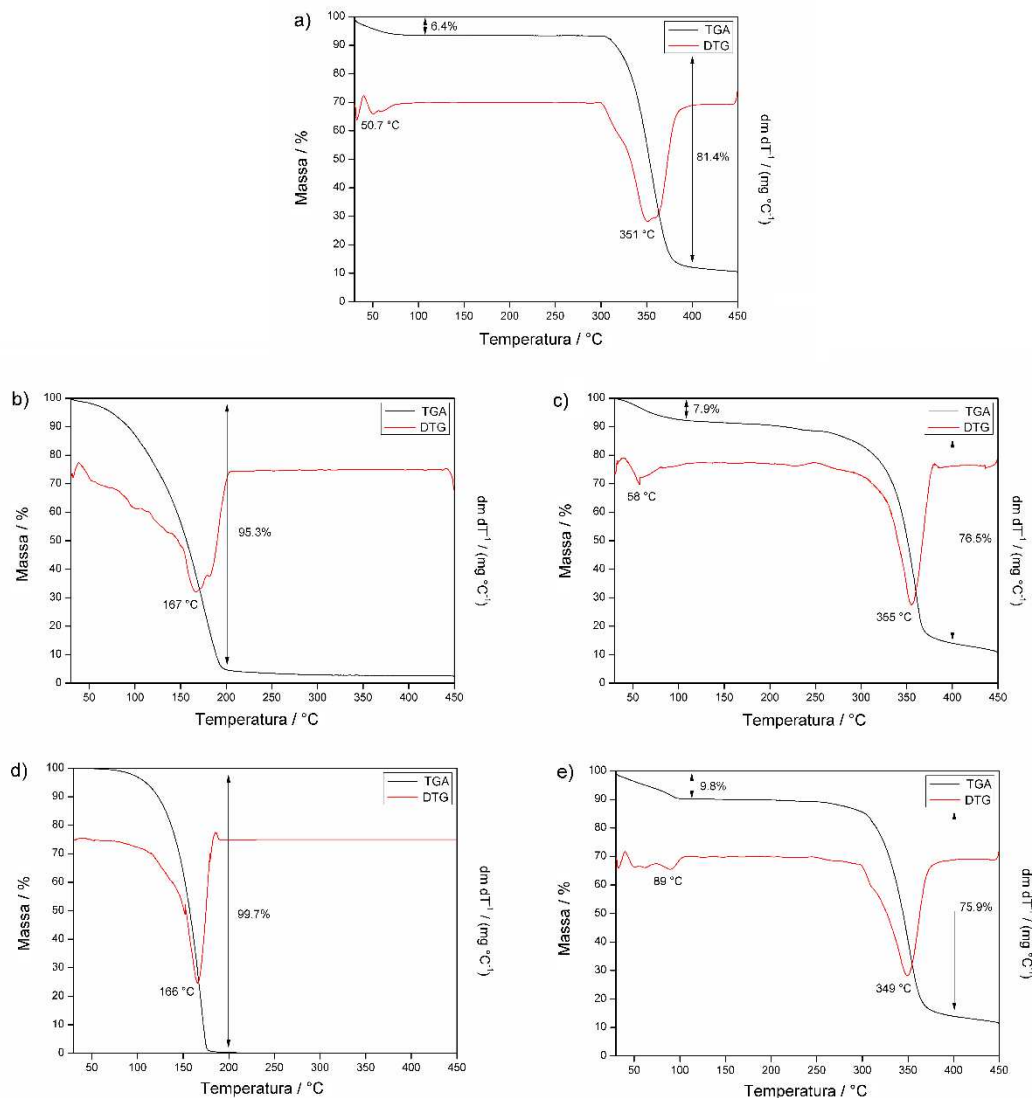


Figura 9. Curva termogravimétrica com derivada: a) HP β CD; b) óleo essencial da espécie *Psidium gaudichaudianum*; c) complexo de inclusão da *P. gaudichaudianum*; d) β -cariofileno; d) complexo de inclusão do β -cariofileno.

O OE GAU apresentou a perda de massa em um único evento, com o máximo de degradação ou volatilização em 167 °C, sendo que na Δm_2 a perda de massa foi de 77,9%. O β -CAR teve perda de massa gradual com o máximo teor de degradação ou volatilização em 166 °C, com Δm_2 de 94,5%. Assim, o OE e o β -CAR apresentam comportamentos semelhantes e são totalmente degradados até 200 °C. No entanto, os CIs da GAU e β -CAR apresentam a perda de massa mais evidente somente na Δm_3 , sendo 76,5 e 75,9%, respectivamente. Logo, os CIs com HP β CD permitem a proteção térmica do OE e do β -CAR, pois o máximo de degradação ocorre somente em cerca de 350 °C.

Na região de Δm_2 , ocorreu uma pequena perda de massa nos CIs, confirmando uma característica diferente da HP β CD, que praticamente não perdeu massa nesse intervalo de temperatura. Portanto, essa perda de massa dos CIs pode estar associada à volatilização de uma pequena fração do OE e β -CAR que está adsorvida na superfície da HP β CD. Assim, estes podem ter sido complexados na parte externa da HP β CD, o que também foi observado por Piletti *et al.* (2019). Porém, Δm_2 do OE e β -CAR são muito superiores aos valores dos CIs, logo, as amostras complexadas na cavidade da ciclodextrina proporcionam o aumento da estabilidade térmica. Devido à capacidade da ciclodextrina de reter os compostos dos OEs para evitar sua volatilização, os complexos de inclusão podem complexar de forma eficiente e estável as moléculas hóspedes (SU *et al.*, 2019). Assim, essa vantagem corrobora com a hipótese que o OE e o β -CAR foram protegidos da degradação térmica e isso foi observado por outros autores (BABAUGLU *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2019a; KOTRONIA *et al.*, 2017; MARRETO *et al.*, 2008).

Apesar das curvas dos CIs serem semelhantes a HP β CD, entre 200 e 300 °C houve perda de massa dos CIs, o que não ocorreu para a curva da HP β CD (Fig. 8). Logo, isso representa a perda de massa das amostras complexadas, sendo uma evidência de que a complexação ocorreu, pois o CI tem propriedades térmicas diferentes da HP β CD. Outro trabalho verificou que o OE de alho quando complexado em β -ciclodextrina, apresentou alteração nas propriedades térmicas nessa região do termograma e atribuiu esse fenômeno a complexação (PILETTI *et al.*, 2019; PRABU *et al.*, 2015).

Dessa forma, esses resultados indicam que as propriedades térmicas foram alteradas após a formação do complexo de inclusão e essas mudanças são um forte indicativo da complexação do OE e do β -CAR.

Dessa forma, os experimentos com TGA corroboraram com os resultados da eficiência de complexação do OE GAU e do β -CAR com HP β CD, que não foi ideal (100%).

A análise por espectroscopia FTIR é uma ferramenta amplamente utilizada para fornecer informações qualitativas na identificação de interações entre as moléculas complexadas e a HP β CD. Assim, é importante observar bandas presentes no OE GAU e no β -CAR que estejam nos CIs, bem como as bandas de HP β CD, indicando a complexação. Os espectros obtidos são exibidos na Fig. 10.

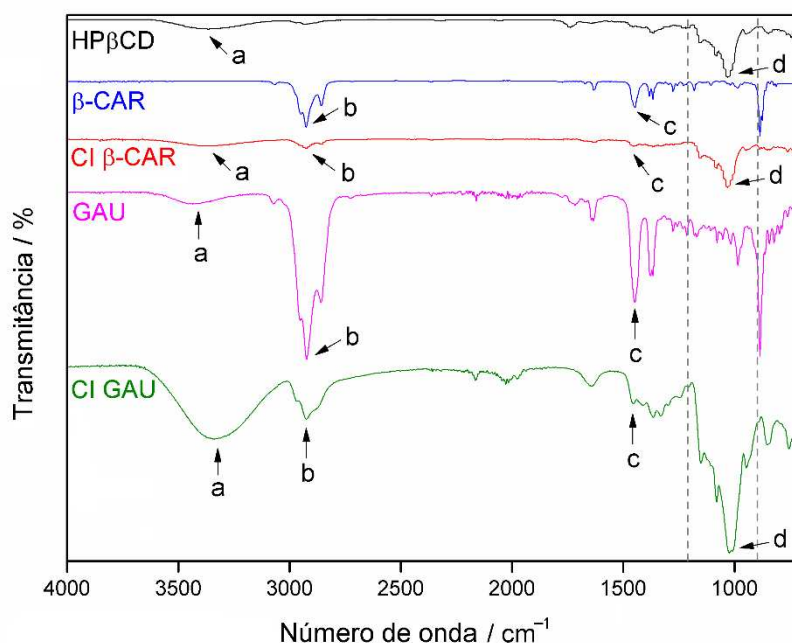


Figura 10. Espectros de FTIR para a HP β CD, β -cariofileno (β -CAR), complexo de inclusão do β -CAR (CI β -CAR), óleo essencial da espécie *Psidium gaudichaudianum* (GAU) e CI GAU.

No espectro da HP β CD foi destacada a banda **a** em torno de 3400 cm^{-1} , que se refere a vibração do estiramento da ligação O-H, e a banda **d** em 1030 cm^{-1} , que representa o estiramento da ligação C-O de éter cíclico (BARBOSA, 2007). A banda **a** está presente em todos os espectros com exceção do β -CAR, como era esperado, por este conter apenas ligações

carbono-carbono e carbono-hidrogênio. De forma semelhante, a banda **d** está presente apenas no espectro da HP β CD e dos CIs. O espectro da GAU não apresenta a banda **d** de forma evidente, sugere-se assim que os compostos presentes no OE com a ligação C-O de éter cíclico podem ter sido degradados ou volatilizados do CI. No entanto, todos os compostos majoritários foram observados no cromatograma do OE removido do CI (Fig. 6b).

A banda **b** em 2925 cm^{-1} , presente em todos os espectros, se refere ao estiramento assimétrico da ligação C-H nos grupos CH_2 . Essa banda não é tão evidente no espectro da HP β CD, pois ele está presente na estrutura da molécula apenas na substituição do grupamento 2-hidroxipropil (Fig. 11). As bandas em 2860 e 2950 cm^{-1} , observadas principalmente nos espectros da GAU e do β -CAR, pertencem ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H nos grupos CH_3 (BARBOSA, 2007). A banda **c** em 1450 cm^{-1} também representa a frequência vibracional da deformação angular assimétrica nos grupos CH_3 e está presente, principalmente, no OE GAU, no β -CAR e nos CIs (BARBOSA, 2007). As bandas **b** e **c** apresentam-se com maior intensidade no espectro da GAU, pois esse OE é o que mais apresenta compostos com ligação CH_3 .

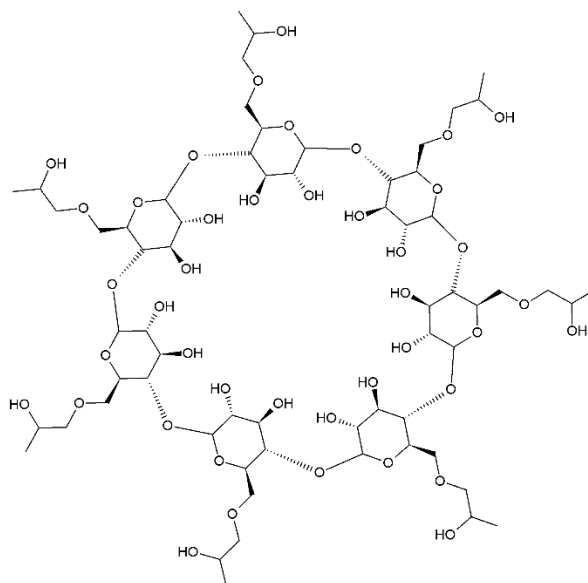


Figura 11. Estrutura da 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.

As bandas no espectro da GAU com número de onda em torno de 900 a 1200 cm^{-1} foram suprimidas no CI (entre as linhas verticais tracejadas). O

desaparecimento dessas bandas no espectro do CI pode estar relacionado a complexação dos compostos com vibrações nessa região, que foram sobrepostas por bandas presentes na HP β CD (GAO *et al.*, 2019b; RAKMAI *et al.*, 2018). Isso ocorre porque essas bandas ficaram evidentes nos CIs, mesmo com tamanho reduzido, corroborando com a hipótese da presença de OE ou β -CAR com HP β CD.

As bandas **a**, **b**, **c** e **d** confirmaram que houve interação entre os hóspedes que são o OE e o β -CAR com o hospedeiro que é a HP β CD. Outros trabalhos também relacionaram as mudanças das bandas nos espectros como um indicativo de complexação (Pinheiro *et al.*, 2017; Pires *et al.*, 2019).

3.2. Atividade herbicida

O potencial herbicida do OE da *P. gaudichaudianum*, do β -cariofileno e dos respectivos CIs foram testados em diferentes concentrações em relação à germinação de sementes (G), crescimento radicular (CR) e crescimento aéreo (CA) em *B. pilosa* e *L. multiflorum*. O glifosato (CP1) e o 2,4-D (CP2) foram usados como controles positivos. A mistura dos solventes acetona (2%) e tween 80 (0,05%) em meio aquoso foi utilizada como controle negativo (CN) para o OE ou β -CAR, e para os CIs, utilizou-se a HP β CD em meio aquoso.

Inicialmente, para verificar a significância e comparar as toxicidades do OE, β -CAR e seus respectivos CIs, foi realizada a análise de variância com todos os resultados avaliados, que indicou que os tratamentos tiveram efeito significativo na germinação, crescimento radicular e aéreo em *B. pilosa* e *L. multiflorum*, com valor de $p < 0,001$ (Tabela 3). Além disso, interações bidirecionais e tridirecionais também mostraram significância, exceto para a interação entre espécies e concentração nas variáveis crescimento radicular e aéreo. Logo, podemos comparar o efeito dos tratamentos nas plantas invasoras e entre elas nas mesmas concentrações sobre a germinação, crescimento radicular e aéreo (Tabela 4).

Comparando a resposta de cada planta invasora aos tratamentos avaliados, os resultados mostram que a *L. multiflorum* foi uma planta mais sensível do que a *B. pilosa* (Tabela 4). Isso ocorreu, pois a *L. multiflorum*

teve menor porcentagem de germinação e crescimento radicular em relação a *B. pilosa* na maioria dos tratamentos e concentrações. Com relação ao crescimento da parte aérea, os tratamentos tiveram efeitos semelhantes sobre as plantas invasoras na maioria das concentrações.

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para o efeito do óleo essencial da *P. gaudichaudianum*, β -cariofileno e os respectivos complexos de inclusão na germinação e crescimento radicular e aéreo de *Bidens pilosa* e *Lolium multiflorum*.

Fonte de variação	df	F _{calculado}		
		Germinação (%)	Crescimento radicular (mm)	Crescimento aéreo (mm)
Espécie de planta invasora (A)	1	345,2801***	160,437***	4,9259*
Tratamento (B)	3	63,6608***	158,2757***	219,206***
Concentração (C)	4	26,706***	8,5239***	26,9576***
A X B	3	27,9444***	58,5316***	5,4023**
A X C	4	3,6755**	1,5868	2,1215
B X C	12	13,4208***	10,8153***	24,6083***
A X B X C	12	7,519***	4,804***	7,7438***
Coeficiente de variação		20,53%	23,69%	23,37%

df Graus de liberdade, número de replicatas (n): 5. *Significância à 5% de probabilidade (p<0,05), **Significância à 1% de probabilidade (p<0,01), ***Significância à 0,1% de probabilidade (p<0,001).

Além disso, de forma geral, percebe-se que o OE GAU é mais tóxico do que todos os outros tratamentos (Tabela 4). Assim, o efeito sinérgico do OE é evidenciado, pois a mistura dos compostos é importante para sua aplicação biológica. Outros trabalhos evidenciaram que os OEs constituídos majoritariamente por compostos sesquiterpênicos podem contribuir para a atividade fitotóxica (ANDRIANA *et al.*, 2019; VASCONCELOS *et al.*, 2019).

Tabela 4. Resultados da comparação entre as médias dos efeitos dos tratamentos com óleo essencial da *P. gaudichaudianum*, β -cariofileno e os respectivos complexos de inclusão e suas concentrações na germinação e crescimento radicular e aéreo em *B. pilosa* e *L. multiflorum*.

Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Tratamentos	Germinação (G) (%)		Crescimento radicular (CR) (mm)		Crescimento aéreo (CA) (mm)	
		<i>B. pilosa</i>	<i>L. multiflorum</i>	<i>B. pilosa</i>	<i>L. multiflorum</i>	<i>B. pilosa</i>	<i>L. multiflorum</i>
3000	OE GAU	3,2 \pm 3,3 Bc	23,2 \pm 15,8 Ab	2,3 \pm 2,6 Bc	9,3 \pm 5,7 Ab	0,0 \pm 0,0 Ad	5,1 \pm 3,0 Ac
	CI GAU	52,8 \pm 18,8 Ab	19,2 \pm 4,4 Bb	15,3 \pm 2,4 Ab	13,2 \pm 5,8 Aab	14,3 \pm 0,7 Ac	13,0 \pm 7,0 Ab
	β -CAR	86,4 \pm 10,4 Aa	44,8 \pm 15,6 Ba	20,3 \pm 3,8 Ab	19,8 \pm 6,2 Aa	22,3 \pm 5,1 Ab	21,9 \pm 6,8 Aa
	CI β -CAR	82,4 \pm 6,1 Aa	28,8 \pm 11,8 Bab	40,3 \pm 1,8 Aa	13,2 \pm 3,9 Bab	31,1 \pm 5,3 Aa	13,6 \pm 4,1 Bb
1500	OE GAU	4,0 \pm 6,9 Bb	30,4 \pm 14,3 Ab	1,8 \pm 2,5 Bc	8,1 \pm 1,6 Ab	0,0 \pm 0,0 Ac	5,3 \pm 1,7 Ac
	CI GAU	79,2 \pm 7,7 Aa	35,2 \pm 7,7 Bab	19,2 \pm 1,1 Ab	17,1 \pm 6,3 Aa	16,2 \pm 4,3 Bb	22,1 \pm 4,5 Aab
	β -CAR	92,0 \pm 5,7 Aa	49,6 \pm 8,8 Ba	24,1 \pm 3,6 Ab	16,6 \pm 5,4 Ba	26,4 \pm 5,7 Aa	16,6 \pm 7,3 Bb
	CI β -CAR	80,0 \pm 9,4 Aa	44,8 \pm 15,6 Bab	41,6 \pm 4,2 Aa	15,9 \pm 3,0 Ba	28,3 \pm 7,9 Aa	27,4 \pm 4,0 Aa
750	OE GAU	44,0 \pm 25,3 Ab	29,6 \pm 4,6 Ab	6,1 \pm 3,8 Ac	9,8 \pm 3,0 Ab	4,4 \pm 4,1 Ac	5,5 \pm 1,1 Ac
	CI GAU	79,2 \pm 12,5 Aa	52 \pm 11,0 Ba	24,4 \pm 2,4 Ab	18,5 \pm 5,9 Ba	19,2 \pm 1,2 Ab	12,6 \pm 3,3 Bb
	β -CAR	92,8 \pm 8,2 Aa	48,8 \pm 12,1 Ba	27,9 \pm 3,4 Ab	20,7 \pm 3,3 Ba	29,4 \pm 4,4 Aa	24,8 \pm 3,2 Aa
	CI β -CAR	88,0 \pm 4,9 Aa	53,6 \pm 14,6 Ba	35,4 \pm 3,3 Aa	17,5 \pm 5,9 Ba	31,4 \pm 4,6 Aa	27,7 \pm 3,3 Aa
375	OE GAU	76,0 \pm 7,5 Aa	45,6 \pm 6,7 Ba	12,2 \pm 3,8 Ac	12,4 \pm 6,2 Ab	8,4 \pm 2,9 Ab	9,9 \pm 2,3 Ab
	CI GAU	81,6 \pm 12,2 Aa	50,4 \pm 14,6 Ba	27,0 \pm 0,7 Ab	17,7 \pm 6,2 Bab	26,5 \pm 3,3 Aa	16,4 \pm 7,0 Bb
	β -CAR	83,2 \pm 19,1 Aa	0,0 \pm 0,0 Bb	13,0 \pm 3,2 Ac	0,0 \pm 0,0 Bc	0,0 \pm 0,0 Ab	0,0 \pm 0,0 Ac
	CI β -CAR	87,2 \pm 8,7 Aa	62,4 \pm 9,2 Ba	35,4 \pm 3,3 Aa	24,1 \pm 5,5 Ba	29,4 \pm 6,4 Ba	35,5 \pm 3,4 Aa
187,5	OE GAU	77,6 \pm 8,8 Aa	42,4 \pm 18,5 Ba	16,4 \pm 3,8 Ac	14,9 \pm 6,6 Abc	14,9 \pm 3,4 Ab	14,2 \pm 4,6 Ab
	CI GAU	84,0 \pm 11,7 Aa	52,8 \pm 11,1 Ba	27,0 \pm 2,0 Ab	8,6 \pm 1,8 Bc	25,9 \pm 5,0 Aa	16,9 \pm 4,5 Bb
	β -CAR	84,8 \pm 10,4 Aa	53,6 \pm 6,7 Ba	26,6 \pm 5,9 Ab	18,9 \pm 5,8 Bab	27,7 \pm 3,6 Aa	29,7 \pm 6,4 Aa
	CI β -CAR	80,0 \pm 13,3 Aa	60,0 \pm 7,5 Ba	37,1 \pm 4,9 Aa	22,3 \pm 9,7 Ba	26,1 \pm 2,8 Ba	36,6 \pm 1,5 Aa

As médias seguidas por letras diferentes, maiúsculas nas colunas (plantas) e minúsculas nas linhas (tratamentos), diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Média \pm desvio padrão ($n = 5$).

Pode-se ainda estabelecer uma resposta dose-dependente para essas plantas, uma vez que a G, o CR e o CA diminuíram com o aumento das concentrações. Contudo, a concentração de $375 \mu\text{g mL}^{-1}$ do β -CAR é uma exceção, pois promoveu a inibição total da G, do CA e do CR em *L. multiflorum* e do CA em *B. pilosa* (Tabela 4).

A germinação das sementes, os crescimentos radicular e aéreo das plantas invasoras foram relacionados com todos os tratamentos e comparados aos controles (Figura 12, 13 e 14).

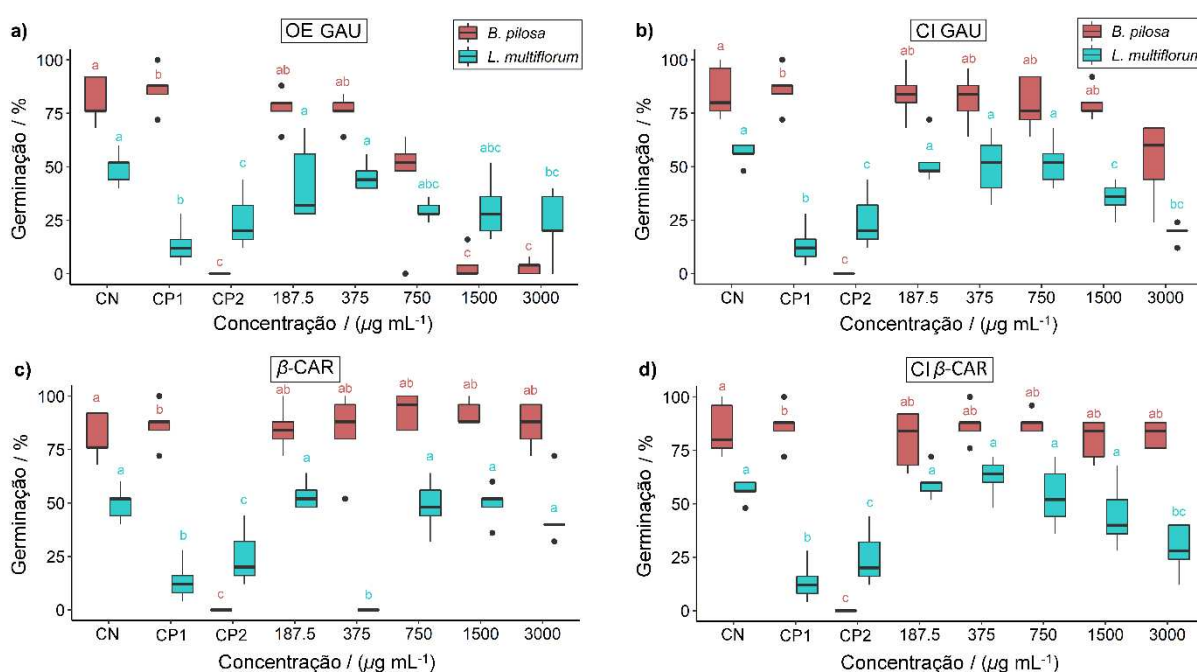


Figura 12. Atividade herbicida do (a) óleo essencial de *P. gaudichaudianum*, (b) complexo de inclusão da *P. gaudichaudianum*, (c) β -CAR e (d) complexo de inclusão do β -CAR; sobre a germinação de *Bidens pilosa* e *Lolium multiflorum*. CN = controle negativo; CP1 = controle positivo 1 (glifosato); CP2 = controle positivo 2 (2,4-D). Os boxplots seguidos das mesmas letras dos controles (CN, CP1 e CP2) não diferem entre si pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

A taxa de germinação das sementes das plantas invasoras utilizando os tratamentos foi comparada aos controles (Figura 12). Em relação ao OE GAU, observou-se que a germinação em sementes de *B. pilosa*, nas maiores concentrações ($\geq 1500 \mu\text{g mL}^{-1}$), foi similar ao 2,4-D (CP2), em que não houve germinação (Fig. 15). O glifosato (CP1), por ser geralmente um herbicida pós emergente, não afeta a germinação de *B. pilosa*. Para o CI GAU, somente a concentração de $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ causou uma redução da taxa de germinação de *B. pilosa*, semelhante ao que foi

observado em $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ do OE GAU (Fig. 16). Para *B. pilosa*, o β -CAR e o CI β -CAR não influenciaram na variável germinação, pois se assemelharam ao controle negativo e ao glifosato (Fig. 17 e 18). No que diz respeito as sementes da planta *L. multiflorum*, considerando a utilização do OE GAU e do CI GAU, destaca-se a germinação em $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos, que se assemelharam aos controles positivos (Fig. 19 e 20). Na concentração de $375 \mu\text{g mL}^{-1}$ o β -CAR, inibiu 100% a germinação de sementes de *L. multiflorum* (Fig. 21).

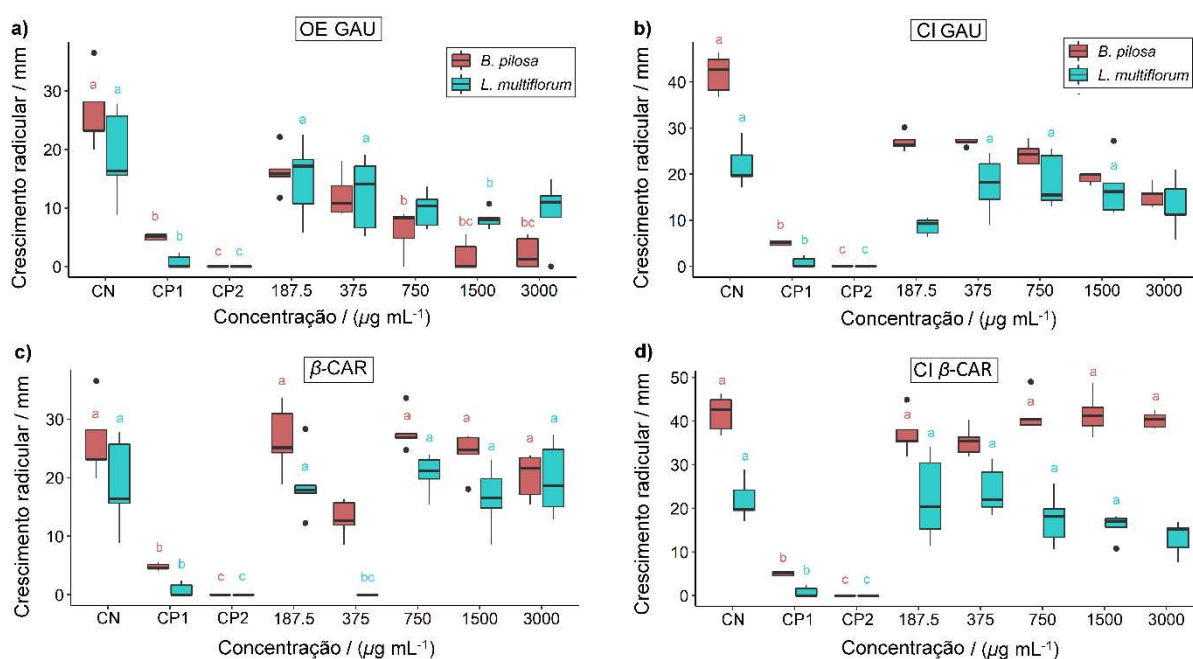


Figura 13. Atividade herbicida do (a) óleo essencial de *P. gaudichaudianum*, (b) complexo de inclusão da *P. gaudichaudianum*, (c) β -CAR e (d) complexo de inclusão do β -CAR; sobre o crescimento radicular de *Bidens pilosa* e *Lolium multiflorum*. CN = controle negativo; CP1 = controle positivo 1 (glifosato); CP2 = controle positivo 2 (2,4-D). Os boxplots seguidos das mesmas letras dos controles (CN, CP1 e CP2) não diferem entre si pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Em relação ao crescimento radicular, tanto o OE GAU quanto o CI GAU, em *B. pilosa*, tiveram crescimentos inferiores ao controle negativo. No entanto, o OE GAU apresentou inibição do alongamento das raízes igual ao glifosato em concentrações $\geq 750 \mu\text{g mL}^{-1}$. Considerando o β -CAR e o CI β -CAR, apenas a concentração de $375 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibiu o alongamento das raízes de *B. pilosa*, não se assemelhando a nenhum dos controles. Para a *L. multiflorum*, destaque é dado ao OE GAU na concentração de $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$, pois o CR se assemelhou ao glifosato. Para o CI GAU, houve diminuição do CR em $187,5$ e $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo essas as concentrações mais

tóxicas. Na concentração de $375 \mu\text{g mL}^{-1}$ o β -CAR, inibiu 100% o CR da *L. multiflorum*. Para o CI β -CAR, $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi a concentração que mais inibiu o CR de *L. multiflorum* (Fig. 22).

Para a variável crescimento aéreo em *B. pilosa*, no OE GAU, destacam-se as concentrações $\geq 750 \mu\text{g mL}^{-1}$, em que não houve desenvolvimento da parte aérea da planta, pois se assemelharam ao 2,4-D. O CI também apresentou os maiores valores de inibição de CA com concentrações $\geq 750 \mu\text{g mL}^{-1}$, se assemelhando ao glifosato. O CA de *B. pilosa* e *L. multiflorum* foi totalmente inibido utilizando $375 \mu\text{g mL}^{-1}$ de β -CAR. A concentração de $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ do CI β -CAR foi a que mais interferiu no CA de *L. multiflorum*. Todas as concentrações do OE GAU e do CI GAU afetaram o CA de *L. multiflorum*.

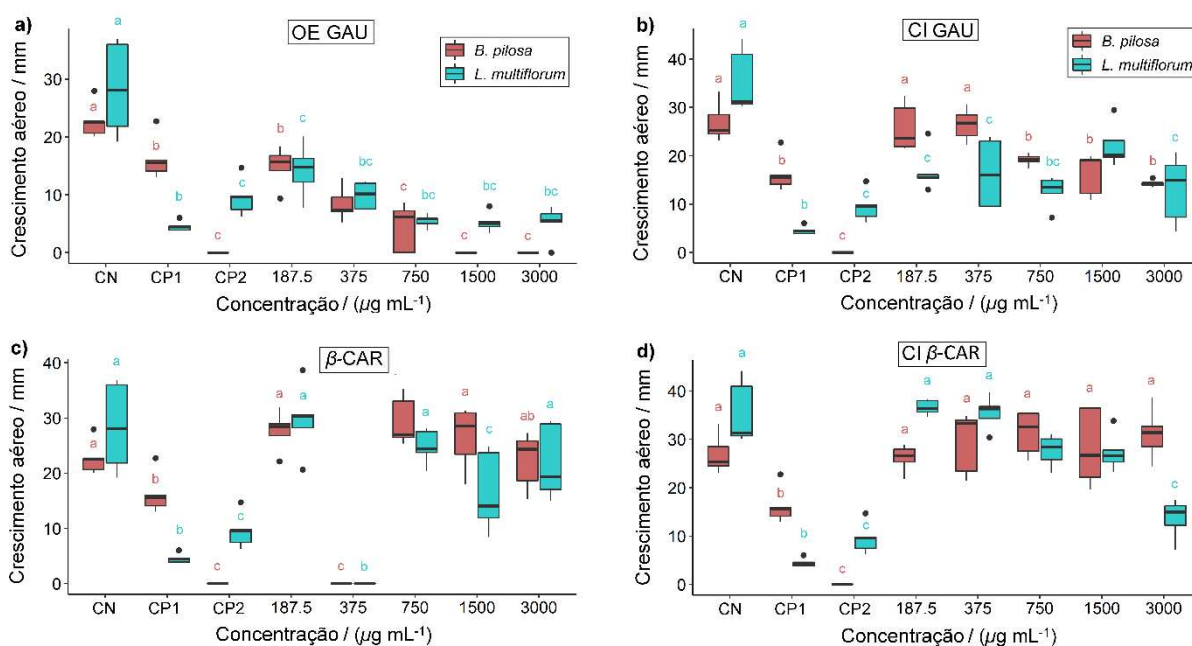


Figura 14. Atividade herbicida do (a) óleo essencial de *P. gaudichaudianum*, (b) complexo de inclusão da *P. gaudichaudianum*, (c) β -CAR e (d) complexo de inclusão do β -CAR; sobre o crescimento aéreo de *Bidens pilosa* e *Lolium multiflorum*. CN = controle negativo; CP1 = controle positivo 1 (glifosato); CP2 = controle positivo 2 (2,4-D). Os boxplots seguidos das mesmas letras dos controles (CN, CP1 e CP2) não diferem entre si pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

De forma geral, a maioria dos tratamentos utilizados apresentaram atividade herbicida, seja por inibir a germinação de sementes ou por afetar o crescimento das raízes e da parte aérea. O OE GAU é um produto natural promissor, pois apresenta potencial herbicida semelhante ao glifosato, que é um produto comercial,

especialmente na concentração de $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ao avaliar o CR e CA. Ainda, observa-se que os CIs apresentaram atividade herbicida igual ou menor do que o OE ou o β -CAR. Apesar disso, a utilização de complexos de inclusão ao invés do OE permite ampliar suas aplicações no setor agrícola visto que os CIs melhoram suas propriedades, como já discutido anteriormente. Diante disso, pode-se recomendar a utilização do CI GAU na concentração de $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em *B. pilosa* e *L. multiflorum*, pois apresentou efeito negativo moderado na G, no CA e no CR. Em relação ao CI β -CAR, a concentração mais indicada para ser utilizada em *L. multiflorum* é de $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$, pois apresenta maior toxicidade.



Figura 15. Efeito do óleo essencial de *Psidium gaudichaudianum* em *Bidens pilosa*. 1) $187,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; 2) $375 \mu\text{g mL}^{-1}$; 3) $750 \mu\text{g mL}^{-1}$; 4) $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$; 5) $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Figura 16. Efeito do complexo de inclusão do óleo essencial de *Psidium gaudichaudianum* em *Bidens pilosa*. 1) $187,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; 2) $375 \mu\text{g mL}^{-1}$; 3) $750 \mu\text{g mL}^{-1}$; 4) $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$; 5) $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Figura 17. Efeito do β -cariofileno em *Bidens pilosa*. 1) CN = controle negativo (acetona e tween 80 em meio aquoso); 2) CP1 = controle positivo 1 (glifosato); 3) CP2 = controle positivo 2 (2,4-D); 4) 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5) 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 6) 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 7) 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 8) 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Figura 18. Efeito do complexo de inclusão do β -cariofileno em *Bidens pilosa*. 1) CN = controle negativo (HP β CD em meio aquoso); 2) CP1 = controle positivo 1 (glifosato); 3) CP2 = controle positivo 2 (2,4-D); 4) 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5) 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 6) 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 7) 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 8) 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Figura 19. Efeito do óleo essencial de *Psidium gaudichaudianum* em *Lolium multiflorum*. 1) 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 2) 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 3) 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 4) 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5) 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Figura 20. Efeito do complexo de inclusão do óleo essencial de *Psidium gaudichaudianum* em *Lolium multiflorum*. 1) 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 2) 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 3) 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 4) 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5) 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Figura 21. Efeito do β -cariofileno em *Lolium multiflorum*. 1) CN = controle negativo (acetona e tween 80 em meio aquoso); 2) CP1 = controle positivo 1 (glifosato); 3) CP2 = controle positivo 2 (2,4-D); 4) 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5) 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 6) 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 7) 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 8) 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Figura 22. Efeito do complexo de inclusão do β -cariofileno em *Lolium multiflorum*. 1) CN = controle negativo (HP β CD em meio aquoso); 2) CP1 = controle positivo 1 (glifosato); 3) CP2 = controle positivo 2 (2,4-D); 4) 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5) 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 6) 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 7) 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 8) 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Outro ponto que deve ser ressaltado é que a comparação entre os tratamentos, apresentada na Tabela 4, não leva em consideração os controles negativos utilizados. Para solubilizar o OE GAU e o β -CAR em meio aquoso foi utilizado o tween 80, que é um surfactante considerado de baixa toxicidade ao ambiente: solo, plantas e ser humano (CHENG *et al.*, 2017). Além disso, o tween 80 é um surfactante não-iônico, economicamente viável, um dos melhores e mais utilizados para solubilizar o OE em água (CAMPOLO *et al.*, 2020; PENG; YIN; LI, 2012). No entanto, observa-se que o controle negativo do OE GAU e do β -CAR, contendo acetona e tween 80 em água, na maioria das vezes, tem maior toxicidade no CR e no CA do que o controle negativo dos CIs, que é a HP β CD. Isso significa que parte da toxicidade do OE GAU e do β -CAR se deve ao solvente e não somente ao OE.

A avaliação das propriedades herbicidas em plantas invasoras utilizando o OE GAU e o β -CAR não foram relatadas anteriormente na literatura. Porém, esse OE já foi testado em plantas modelo (alface e sorgo) (VASCONCELOS *et al.*, 2019). Nesse trabalho, o OE GAU afetou o crescimento da raiz de alface nas concentrações $\geq 750 \mu\text{g mL}^{-1}$, se assemelhando ao glifosato, o que foi correspondente ao observado nas plantas invasoras (VASCONCELOS *et al.*, 2019). Outro trabalho que utilizou complexos de inclusão de nove OEs em HP β CD verificou que não houve melhora na toxicidade de alface (*L. sativa*) e azevém (*L. perenne*), quando comparado aos OEs não complexados (EL-ALAM *et al.*, 2020).

A nanoemulsão contendo OE de erva-doce (*Foeniculum vulgare*) é uma forma de protegê-lo e foi utilizada para verificar a atividade herbicida em plantas invasoras de trigo (*Triticum aestivum*) (KAUR *et al.*, 2021). Apesar da nanoemulsão não ter sua eficácia comparada com o OE, a nanoemulsão apresentou capacidade de inibir a G, o CR e o CA (KAUR *et al.*, 2021).

Idealmente o OE ou CI OE devem ser tóxicos em plantas invasoras sem afetar as plantações agrícolas, isso porque o herbicida seria aplicado no ambiente em que essas plantas estariam juntas. Neste contexto, M. Ibáñez and Blázquez (2019), utilizaram OEs formados majoritariamente por compostos sesquiterpênicos e verificaram atividade herbicida promissora em *L. multiflorum* e outras plantas invasoras (IBÁÑEZ; BLÁZQUEZ, 2019b). Este trabalho utilizou as mesmas concentrações dos OEs em plantas não alvo (tomate, pepino e arroz) e não foram observados efeitos fitotóxicos significativos (IBÁÑEZ; BLÁZQUEZ, 2019b).

3.3. Atividade citogenotóxica

A análise da citogenotoxicidade foi realizada para verificar o efeito tóxico do óleo essencial de *P. gaudichaudianum*, do β -cariofileno e dos CIs sobre o ciclo celular da planta modelo *L. sativa*, determinando assim, o modo de ação envolvido na inibição da germinação e crescimento radicular. As Tabelas 5 e 6 apresentam os resultados das alterações induzidas sobre o índice mitótico e o potencial genotóxico e mutagênico observados.

Tabela 5. Índice mitótico, genotoxicidade e mutagenicidade observado em células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* expostas ao óleo essencial de *Psidium gaudichaudianum* (OE GAU) e ao β -cariofileno (β -CAR).

Tratamento	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Índice mitótico (%)	Genotoxicidade (%)	Mutagenicidade (%)
CN	-	8,16 \pm 1,08 a	2,14 \pm 0,32 a	0,00 \pm 0,00 a
CP	-	8,57 \pm 0,62 b	2,88 \pm 0,25 b	0,00 \pm 0,00 b
OE GAU	187,5	8,70 \pm 0,78 ab	2,46 \pm 0,71 ab	0,00 \pm 0,00 ab
	375	8,96 \pm 1,09 ab	2,24 \pm 0,39 ab	0,02 \pm 0,04 ab
	750	9,22 \pm 1,29 ab	2,36 \pm 0,50 ab	0,00 \pm 0,00 ab
	1500	8,92 \pm 0,57 ab	2,38 \pm 0,29 ab	0,04 \pm 0,05 ab
	3000	7,88 \pm 1,13 ab	2,30 \pm 0,51 ab	0,02 \pm 0,04 ab
β -CAR	187,5	8,64 \pm 0,84 ab	2,16 \pm 0,55 ab	0,00 \pm 0,00 ab
	375	4,82 \pm 1,30	2,16 \pm 0,46 ab	0,04 \pm 0,05 ab
	750	7,2 \pm 0,37 ab	2,22 \pm 0,58 ab	0,00 \pm 0,00 ab
	1500	7,22 \pm 1,18 ab	1,96 \pm 0,42 a	0,00 \pm 0,00 ab
	3000	7,54 \pm 1,24 ab	1,98 \pm 0,36 a	0,00 \pm 0,00 ab

As médias com letras diferentes entre linhas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). CN = controle negativo (acetona e tween 80 em meio aquoso); CP = controle positivo (metanossulfonato de metila).

A citotoxicidade foi estimada através da análise do índice mitótico. O índice mitótico está relacionado às células em divisão e sua diminuição é causada pela interrupção de uma ou mais fases mitóticas ou pela desaceleração da taxa de divisão celular do meristema apical da raiz (YUET PING *et al.*, 2012). A diminuição da divisão

celular tem como consequência a redução do alongamento da raiz (HARASHIMA; SCHNITTGER, 2010). As anormalidades cromossômicas e nucleares (efeito genotóxico) também levam a alterações no índice mitótico visto que interferem na viabilidade celular (GONÇALVES *et al.*, 2020). Dessa forma, compostos citotóxicos também podem demonstrar genotoxicidade (BIANCHI; MANTOVANI; MARIN-MORALES, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2020).

Tabela 6. Índice mitótico, genotóxico e mutagênico observado em células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* expostas ao complexo de inclusão do essencial de *Psidium gaudichaudianum* (CI GAU) e do β -cariofileno (CI β -CAR).

Tratamento	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Índice mitótico (%)	Genotoxicidade (%)	Mutagenicidade (%)
CN	-	9,36 \pm 0,62 a	1,96 \pm 0,38 a	0,00 \pm 0,00 a
CP	-	8,57 \pm 0,62 b	2,88 \pm 0,25 b	0,00 \pm 0,00 b
CI GAU	187,5	8,78 \pm 0,61 ab	2,02 \pm 0,30 a	0,00 \pm 0,00 ab
	375	9,10 \pm 0,16 ab	1,88 \pm 0,38 a	0,04 \pm 0,05 ab
	750	7,90 \pm 0,80 b	1,48 \pm 0,51 a	0,00 \pm 0,00 ab
	1500	7,86 \pm 0,82 b	1,72 \pm 0,04 a	0,00 \pm 0,00 ab
	3000	7,52 \pm 0,49 b	1,52 \pm 0,47 a	0,04 \pm 0,05 ab
CI β -CAR	187,5	7,80 \pm 0,69 b	1,48 \pm 0,38 a	0,00 \pm 0,00 ab
	375	8,54 \pm 0,49 ab	1,82 \pm 0,29 a	0,02 \pm 0,04 ab
	750	8,80 \pm 1,19 ab	1,82 \pm 0,21 a	0,00 \pm 0,00 ab
	1500	8,58 \pm 0,44 ab	2,54 \pm 0,57 ab	0,00 \pm 0,00 ab
	3000	8,28 \pm 1,12 ab	2,76 \pm 0,36 b	0,00 \pm 0,00 ab

As médias com letras diferentes entre linhas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). CN = controle negativo (2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina em meio aquoso); CP = controle positivo (metanossulfonato de metila).

Os efeitos genotóxicos podem ser causados pelos mecanismos de ação aneugênico e clastogênico. Os agentes aneugênicos induzem a erros na ligação dos cromossomos ao fuso mitótico, provocando anormalidades cromossômicas como c-metáfase, perdas e aderências cromossômicas (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2017). Os agentes clastogênicos interagem diretamente com o DNA

provocando quebras cromossômicas e pontes (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2017).

A mutagenicidade foi avaliada pela presença de células com micronúcleos. Esta anormalidade nuclear é um marcador de toxicidade. Os micronúcleos podem ter origem de quebras cromossômicas causadas por agentes clastogênicos, ou através de perdas cromossômicas causadas por agentes aneugênicos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007, 2009; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Em relação ao índice mitótico, o OE GAU e o β -CAR se assemelharam aos controles, exceto na concentração de $375 \mu\text{g mL}^{-1}$ do β -CAR (Tabela 5). Para essa concentração, observou-se a inibição total da G, do CR e do CA de *L. multiflorum* (Tabela 4). Assim, o efeito citotóxico do β -CAR justifica essas alterações herbicidas a nível macroscópico. Se o índice mitótico foi baixo, significa que menor quantidade de células está se dividindo sendo mais difícil encontrar anormalidades cromossômicas (genotoxicidade).

A porcentagem de cada alteração cromossômica dentro do total de células em divisão foi avaliada (Fig. 23). As imagens das anormalidades cromossômicas e nucleares observadas no microscópio em células meristemáticas de *Lactuca sativa* expostas ao OE, β -CAR e seus respectivos CIs foram apresentadas na Figura 24. Apesar dos controles não apresentarem muita diferença no índice mitótico (Tabela 5 e 6), o controle positivo exibiu maior genotoxicidade, com maior quantidade de alterações cromossômicas, principalmente de c-metáfase (Fig. 23).

Em $375 \mu\text{g mL}^{-1}$ a genotoxicidade do β -CAR apesar de não ter sido muito afetada, se assemelhando aos controles (Tabela 5), foi a concentração que apresentou a maior frequência de anormalidades cromossômicas (Fig. 23b), especialmente c-metáfase e ponte (Fig. 24A,E,F), em relação as demais concentrações. Logo, os mecanismos de ação do β -CAR são por efeito clastogênico e aneugênico. Nas concentrações de 1500 e $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ do β -CAR, a genotoxicidade foi menos afetada do que as demais. Em relação a mutagenicidade, apesar do OE GAU, β -CAR e CIs se assemelharem aos controles, em que não houve presença de núcleo condensado ou micronúcleo (Fig. 24H), eles estão presentes nos tratamentos, como em $375 \mu\text{g mL}^{-1}$ do β -CAR, sendo um indicativo de efeito mutagênico (Tabela 5 e 6).

O OE GAU apresenta c-metáfase e cromossomos aderentes (Fig. 24E-G) como as principais anormalidades cromossômicas (Fig. 23a). Logo, o principal mecanismo

de ação do OE foi causado por agentes aneugênicos. Na concentração de $375 \mu\text{g mL}^{-1}$ do OE GAU houve quebras cromossômicas (Fig. 23a). Além disso, ele apresentou a presença de núcleo condensado ou micronúcleo em 375, 1500 e $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 5).

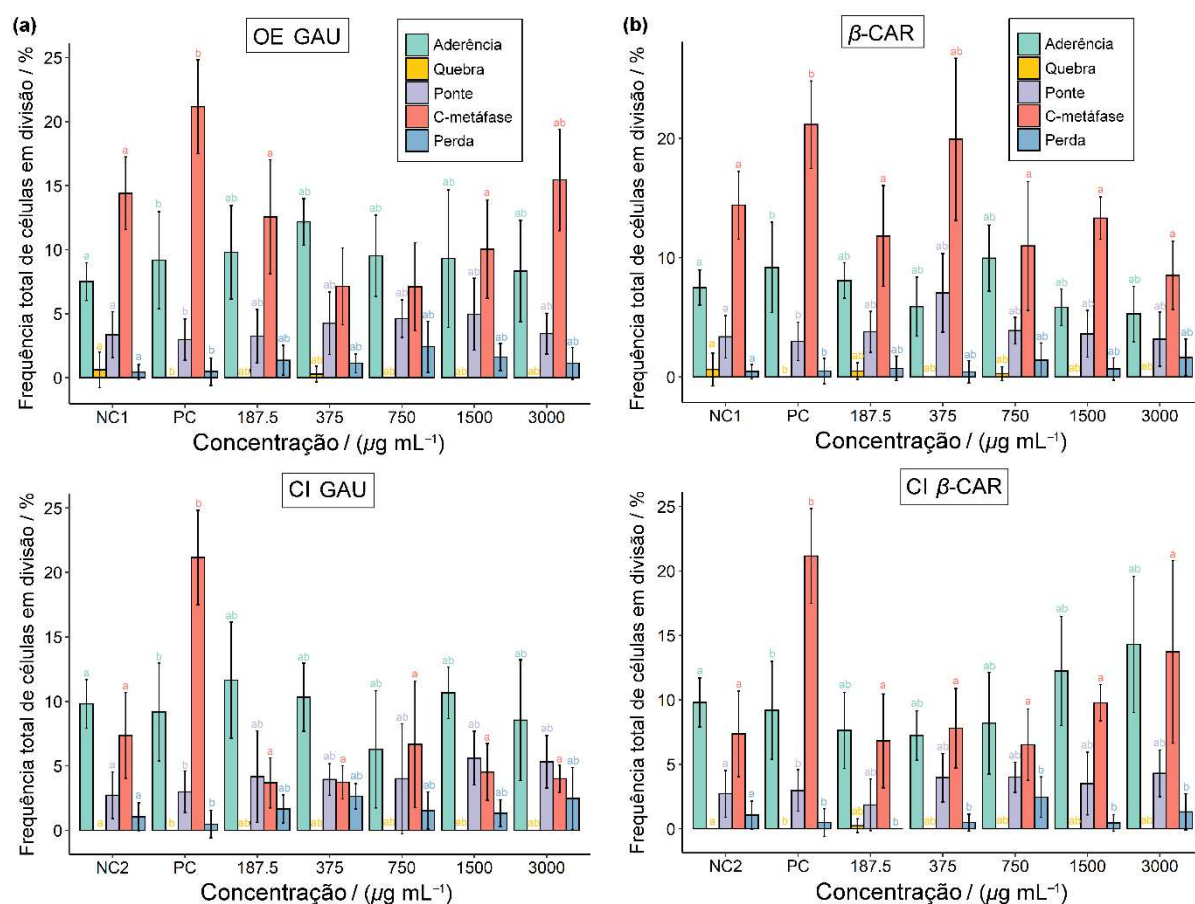


Figura 23. Porcentagem de anormalidades cromossômicas observadas em células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* expostas ao: a) óleo essencial de *Psidium gaudichaudianum* (OE GAU) e ao seu complexo de inclusão (CI GAU); b) β -cariofileno (β -CAR) e ao seu complexo de inclusão (CI β -CAR). CN1 = controle negativo 1 (acetona e tween 80 em meio aquoso); CN2 = controle negativo 2 (HP β CD em meio aquoso); CP = controle positivo (metanossulfonato de metila). As médias com letras diferentes entre barras com as mesmas cores diferem estatisticamente entre si pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

O CI GAU apresentou citotoxicidade maior nas concentrações igual ou acima de $750 \mu\text{g mL}^{-1}$, pois apresentaram os menores índices mitóticos (Tabela 6). Se o ciclo celular foi afetado, a multiplicação celular anormal pode contribuir para a diminuição da germinação e do crescimento radicular e aéreo. Isso foi observado na atividade

herbicida, uma vez que as maiores concentrações do CI GAU foram as que mais afetaram a G, o CR e o CA. Apesar do CI GAU não afetar a genotoxicidade, foram verificadas c-metáfase, cromossomos aderentes e ponte como as principais anormalidades cromossômicas (Fig. 23a). Por isso, os mecanismos de ação do CI GAU foram por efeito clastogênico e aneugênico. Em 375 e 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, houve indício de mutagenicidade visto que foram encontrados micronúcleos utilizando o CI GAU (Tabela 6).

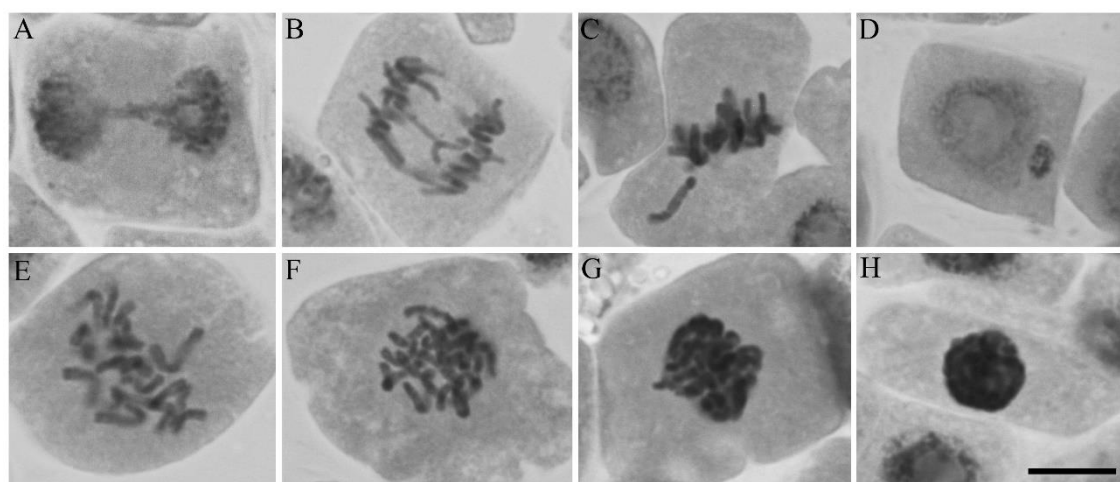


Figura 24. Anormalidades cromossômicas e nucleares observadas em células meristemáticas de *Lactuca sativa* expostas ao OE, β -CAR e seus CIs. A) ponte em telófase; B) anáfase com ponte e cromossomo perdido; C) metáfase com cromossomo perdido; D) intérfase com micronúcleo; E) e F) c-metáfase; G) aderência cromossômica; H) núcleo condensado. Barra = 10 μm .

O CI β -CAR apresentou índice mitótico e genotoxicidade semelhante ao controle positivo em 187,5 e 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. As principais anormalidades cromossômicas observadas foram c-metáfase e cromossomos aderentes, evidenciando o efeito aneugênico (Fig. 23b). Em 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o CI β -CAR apresentou indício de mutagenicidade.

De forma geral, as anormalidades cromossômicas menos observadas entre os tratamentos foram quebra e perda (Fig. 23). As anormalidades mais observadas foram c-metáfase e cromossomos aderentes. A c-metáfase está associada ao mau funcionamento do fuso ou sua inativação, paralisando o ciclo mitótico em metáfase (FREITAS *et al.*, 2016; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Portanto, a presença de c-metáfase indica que o fuso provavelmente está sendo danificado por proteases contidas no OE GAU ou β -CAR (PALMIERI *et al.*, 2021). Os cromossomos aderentes

levam à perda das características normais de condensação, à formação de aglomerados e está relacionada a efeito citotóxico (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2011).

Em OEs de *Psidium* também foram observados anormalidades cromossômicas principalmente do tipo c-metáfase e cromossomos aderentes em *L. sativa* (VASCONCELOS *et al.*, 2021). Assim, os resultados obtidos nesse trabalho foram semelhantes aos de Vasconcelos *et al.* (2019), que utilizaram o OE GAU e observaram que compostos com efeitos citotóxicos induziam anormalidades cromossômicas em *L. sativa*, logo, apresentaram efeito genotóxico. De acordo com Nishida *et al.* (2005), de forma geral os OEs, além do 1,8-cineol e α -pineno, que estão presentes no OE GAU, têm a capacidade de inibir a síntese de DNA, o que impede que a célula entre em mitose, tendo assim efeito aneugênico.

Foi possível verificar que o OE GAU, o β -CAR e os respectivos CIs interferem no ciclo celular de raízes de *L. sativa* e induzem a anormalidades cromossômicas. Os resultados permitiram estabelecer uma correlação entre os parâmetros microscópicos e macroscópicos, justificando a fitotoxicidade comprovada.

4. CONCLUSÃO

O uso de produtos naturais, como o óleo essencial de *Psidium gaudichaudinum*, o padrão majoritário β -cariofileno e os complexos de inclusão têm um efeito promissor no manejo de plantas invasoras. Uma vez que os OEs são considerados produtos ecologicamente seguros e facilmente degradados na natureza, podem ser uma alternativa para reduzir a quantidade de herbicidas comumente utilizados. Os complexos de inclusão produzidos foram capazes de proteger o OE e o β -CAR da volatilidade e degradação térmica, com alta eficiência de complexação. Foi estudada a comparação entre os efeitos médios dos tratamentos com óleo essencial de *P. gaudichaudinum*, β -cariofileno e respectivos complexos de inclusão e suas concentrações na germinação, crescimento radicular e aéreo em *B. pilosa* e *L. multiflorum*. O CI do OE GAU na maior concentração testada apresentou efeito significativo contra as espécies de plantas invasoras *B. pilosa* e *L. multiflorum*. No entanto, o CI do β -CAR na maior concentração foi eficaz apenas em *L. multiflorum*. Os CIs mantiveram ou diminuíram a atividade biológica em plantas invasoras quando comparado ao OE GAU e β -CAR não complexados, mas positivamente o CI permite a aplicação do OE no campo, pois protege o OE da volatilização enquanto aumenta

sua solubilidade em água. Estudos futuros com foco na toxicidade desses complexos de inclusão em culturas como trigo e milho são necessários. Contudo, os avanços alcançados neste trabalho fornecem um produto bioherbicida comercialmente viável para o controle de plantas invasoras.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. EUA: Allured Publishing Corporation, 2007.

ALVES, M. C. S. *et al.* Allelopathic effect of essential oils of medicinal plants in *Bidens pilosa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3 suppl 1, p. 731–736, 2014.

ANDRADE, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 706–710, nov. 2008.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. *et al.* Spent Pot Liner (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 882–888, maio 2011.

ANDRIANA, Y. *et al.* Biological Activities and Chemical Constituents of Essential Oils from *Piper cubeba* Bojer and *Piper nigrum* L. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1876, 15 maio 2019.

ARTHUR, G. D.; NAIDOO, K. K.; COOPOOSAMY, R. M. *Bidens pilosa* L.: Agricultural and pharmaceutical importance. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 17, 9 maio 2012.

BABAOGLU, H. C. *et al.* Encapsulation of clove essential oil in hydroxypropyl beta-cyclodextrin for characterization, controlled release, and antioxidant activity. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 5, p. e13202, out. 2017.

BARBOSA, L. C. DE A. **Espectroscopia no Infravermelho**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2007.

BENCHAA, S. *et al.* Chemical composition and herbicidal activity of essential oils from two Labiatae species from Algeria. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 4, p. 335–346, 4 jul. 2019.

BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, p. 102–111, out. 2015.

CAMPOLO, O. *et al.* Essential oil-based nano-emulsions: Effect of different surfactants, sonication and plant species on physicochemical characteristics. **Industrial Crops and Products**, v. 157, p. 112935, dez. 2020.

CHENG, M. *et al.* Advantages and challenges of Tween 80 surfactant-enhanced technologies for the remediation of soils contaminated with hydrophobic organic compounds. **Chemical Engineering Journal**, v. 314, p. 98–113, abr. 2017.

CID-SAMAMED, A. *et al.* Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132467, ago. 2022.

DABA, A.; BERECHA, G.; TADESSE, M. Herbicidal effects of essential oils from selected plant species against common coffee (*Coffea arabica* L.) weed species. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 43, n. 12, p. 162, dez. 2021.

EL-ALAM, I. *et al.* Antifungal and Phytotoxic Activities of Essential Oils: In Vitro Assays and Their Potential Use in Crop Protection. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 825, 11 jun. 2020.

EL-SAYED, A. M. **The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals**. Disponível em: <<http://www.pherobase.com>>. Acesso em: 27 maio. 2020.

FADEL, H. H. M. *et al.* Correlation between chemical composition and radical scavenging activity of 10 commercial essential oils: Impact of microencapsulation on functional properties of essential oils. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 6815–6827, ago. 2020.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252–259, jul. 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, set. 2009.

FIGUEIREDO, P. L. B. *et al.* Chemical variability in the essential oil of leaves of Araçá (*Psidium guineense* Sw.), with occurrence in the Amazon. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 52, dez. 2018.

FIRESTONE, J. L.; JASIENIUK, M. Seed production is reduced by small population size in natural populations of the invasive grass *Lolium multiflorum*. **Biological Invasions**, v. 14, n. 12, p. 2519–2529, dez. 2012.

FREITAS, A. S. *et al.* Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 426–434, fev. 2016.

GAO, S. *et al.* Preparation and characterization of cyanazine–hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. **RSC Advances**, v. 9, n. 45, p. 26109–26115, 2019a.

GAO, S. *et al.* Physicochemical properties and fungicidal activity of inclusion complexes of fungicide chlorothalonil with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, p. 111513, nov. 2019b.

GONÇALVES, M. DE M. C. *et al.* Phytotoxicity and cytogenotoxicity of composted tannery sludge. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 27, p. 34495–34502, set. 2020.

HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 66–74, fev. 2010.

HILL, L. E.; GOMES, C.; TAYLOR, T. M. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 86–93, abr. 2013.

IBÁÑEZ; BLÁZQUEZ. Phytotoxic Effects of Commercial Eucalyptus citriodora, Lavandula angustifolia, and Pinus sylvestris Essential Oils on Weeds, Crops, and Invasive Species. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2847, 5 ago. 2019a.

IBÁÑEZ, M.; BLÁZQUEZ, M. Phytotoxicity of Essential Oils on Selected Weeds: Potential Hazard on Food Crops. **Plants**, v. 7, n. 4, p. 79, 22 set. 2018.

IBÁÑEZ, M.; BLÁZQUEZ, M. Ginger and Turmeric Essential Oils for Weed Control and Food Crop Protection. **Plants**, v. 8, n. 3, p. 59, 10 mar. 2019b.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, jan. 2018.

KAMIMURA, J. A. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 701–709, jul. 2014.

KAUR, P. *et al.* Nanoemulsion of Foeniculum vulgare essential oil: A propitious striver against weeds of Triticum aestivum. **Industrial Crops and Products**, v. 168, p. 113601, set. 2021.

KOTRONIA, M. *et al.* Encapsulation of Oregano (Origanum onites L.) Essential Oil in β -Cyclodextrin (β -CD): Synthesis and Characterization of the Inclusion Complexes. **Bioengineering**, v. 4, n. 4, p. 74, 9 set. 2017.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, jul. 2009.

LINSTROM, P. J.; MALLARD, W. G. **NIST Chemistry WebBook**. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 27 maio. 2020.

MAES, C. *et al.* Essential Oil-Based Bioherbicides: Human Health Risks Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9396, 30 ago. 2021.

MARRETO, R. N. *et al.* Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing Lippia gracilis essential oil. **Thermochimica Acta**, v. 475, n. 1–2, p. 53–58, set. 2008.

MENDES, L. A. *et al.* Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 684–689, dez. 2017.

MENDES, L. A. *et al.* Development of inclusion complexes of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with *Psidium guajava* L. essential oil by freeze-drying and kneading methods for application as *Aedes aegypti* L. larvicide. **Natural Product Research**, p. 1–5, 18 ago. 2022.

MENDES, L. A. *et al.* Optimization of inclusion complex's preparation of *Psidium cattleianum* S. essential oil and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin by central composite design for application as larvicide in *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 194, p. 116333, abr. 2023.

MOSSA, A.-T. H. Green Pesticides: Essential Oils as Biopesticides in Insect-pest Management. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 354–378, 1 maio 2016.

NISHIDA, N. *et al.* Allelopathic Effects of Volatile Monoterpenoids Produced by *Salvia leucophylla*: Inhibition of Cell Proliferation and DNA Synthesis in the Root Apical Meristem of *Brassica campestris* Seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 5, p. 1187–1203, maio 2005.

PAINI, D. R. *et al.* Global threat to agriculture from invasive species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 27, p. 7575–7579, 5 jul. 2016.

PALMIERI, M. J. *et al.* *Polybia occidentalis* and *Polybia fastidiosa* venom: a cytogenotoxic approach of effects on human and vegetal cells. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 566–574, 2 nov. 2021.

PENG, Y.; YIN, L.; LI, Y. Combined effects of lemon essential oil and surfactants on physical and structural properties of chitosan films. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 1, p. 44–50, 2012.

PILETTI, R. *et al.* Microencapsulation of garlic oil by β -cyclodextrin as a thermal protection method for antibacterial action. **Materials Science and Engineering: C**, v. 94, p. 139–149, jan. 2019.

PINHEIRO, C. G. *et al.* Essential Oil of the Brazilian Native Species *Hesperozygis ringens*: A Potential Alternative to Control Weeds. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 3, p. 701–711, 4 maio 2017a.

PINHEIRO, J. *et al.* Inclusion Complexes of Copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) Oleoresin and Cyclodextrins: Physicochemical Characterization and Anti-Inflammatory Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2388, 18 nov. 2017b.

PIRES, F. Q. *et al.* Thermal analysis used to guide the production of thymol and *Lippia organoides* essential oil inclusion complexes with cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 137, n. 2, p. 543–553, jul. 2019.

POONPHATANAPRICHA, T. *et al.* The Preservation and Enantiomeric Selection of Linalool by Nanoencapsulation Using Cyclodextrins. **Scientia Pharmaceutica**, v. 89, n. 3, p. 42, 3 set. 2021.

PRABU, S. *et al.* Preparation, characterization and molecular modeling studies of the inclusion complex of Caffeine with Beta-cyclodextrin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1099, p. 616–624, nov. 2015.

R Core Team. : R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2021. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>

RAKMAI, J. *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 219–225, jan. 2018.

SANTIAGO, J. DE A. *et al.* Cytogenotoxic effect of essential oil from *Backhousia citriodora* L. (Myrtaceae) on meristematic cells of *Lactuca sativa* L. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 515–520, set. 2017.

SANTOS, T.; SOMMAGGIO, L. R. D.; MARIN-MORALES, M. A. Phyto-genotoxicity assessment of different associations between sludges from Water and Sewage Treatment Plants, before and after the bioremediation process. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 26, p. 40029–40040, jun. 2022.

SAVOLDI, T. L. *et al.* Antimicrobial activity of essential oil from *Psidium cattleianum* Afzel. ex Sabine leaves. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 19, n. 6, p. 614–627, 30 nov. 2020.

SILVA, R. C. E *et al.* Monoterpenes and Sesquiterpenes of Essential Oils from *Psidium* Species and Their Biological Properties. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 965, 12 fev. 2021.

SILVEIRA, G. L. *et al.* Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359–367, jul. 2017.

SINGH, N. *et al.* Chemical characterization, phytotoxic, and cytotoxic activities of essential oil of *Mentha longifolia*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 12, p. 13512–13523, abr. 2020.

SOUSA, V. D. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. v. 2

SOUZA, T. DA S. DE *et al.* Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38–44, fev. 2017.

SU, Z. *et al.* Inclusion Complex of *Exocarpium Citri Grandis* Essential Oil with β -Cyclodextrin: Characterization, Stability, and Antioxidant Activity. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 6, p. 1592–1599, jun. 2019.

TEIXEIRA, B. N. *et al.* Synthesis and Characterization of Nano-Encapsulated Black Pepper Oleoresin using Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrin for Antioxidant and

Antimicrobial Applications: Black pepper oleoresin nanoparticles.... **Journal of Food Science**, v. 78, n. 12, p. N1913–N1920, dez. 2013.

TIGRE, R. C. *et al.* Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 125–132, out. 2012.

VASCONCELOS, L. C. *et al.* Phytochemical analysis and effect of the essential oil of *Psidium* L. species on the initial development and mitotic activity of plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 25, p. 26216–26228, set. 2019.

VASCONCELOS, L. C. *et al.* Chemical composition, phytotoxicity and cytogenotoxicity of essential oil from leaves of *Psidium guajava* L. cultivars. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e6110917710, 21 jul. 2021.

XIE, B. *et al.* Effects of mechanical and chemical control on invasive *Spartina alterniflora* in the Yellow River Delta, China. **PeerJ**, v. 7, p. e7655, 3 set. 2019.

YUET PING, K. *et al.* Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7782–7791, 26 jun. 2012.

ZHANG, C. *et al.* Health effect of agricultural pesticide use in China: implications for the development of GM crops. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34918, dez. 2016.

3. CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho foi desenvolvida uma tecnologia para produzir CIs a partir de produtos naturais obtidos de fontes renováveis. Os insumos utilizados na produção de CIs são amigáveis ao ambiente, sendo o OE extraído das folhas da goiabeira e araçá, provenientes de culturas amplamente cultivadas no Brasil, podendo ser obtidas a partir de processo de podas das plantações. A HP β CD, que é um derivado do amido, também apresenta baixa toxicidade ao meio ambiente e ao ser humano. A composição química dos OEs e os rendimentos de extração foram determinados, sendo imprescindíveis para demonstrar a viabilidade de exploração das plantas estudadas, visando seu potencial de aplicação em grande escala. O planejamento experimental multivariado demonstrou ser uma ferramenta muito importante para otimizar o processo de produção dos CIs. Dessa forma, a partir do desenvolvimento desse método é possível complexar vários OEs com a HP β CD, obtendo alta eficiência na produção.

Considerando que os OEs de *P. guajava* e *P. cattleyanum* apresentaram atividade larvicida promissora em *A. aegypti*, acredita-se que o gênero *Psidium* seja uma referência em possuir OEs com essa aplicação. Outra aplicação com o OE de *P. gaudichaudianum* e o β -cariofileno foi na produção de bioherbicidas para aplicação em plantas invasoras que surgem em lavouras de forma indesejável. Os produtos aplicados apresentaram eficácia na atividade herbicida e citogenotóxica.

Devido à presença marcante de óleos essenciais foliares nas plantas do gênero *Psidium* e suas múltiplas aplicações, outras espécies devem ser estudadas. No entanto, somente os OEs protegidos podem ser aplicados em possíveis criadouros de larvas ou em campos agrícolas, que estão expostos a variações climáticas. Assim, os CIs, obtidos nesse trabalho, são um avanço científico que permitem o desenvolvimento de plantas do gênero *Psidium*, a obtenção de um produto ambientalmente amigável com potencial exploração e comercialização.

4. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALOLGA, R. N. *et al.* GC-MS-based metabolomics, antibacterial and anti-inflammatory investigations to characterize the quality of essential oil obtained from dried *Xylopiya aethiopica* fruits from Ghana and Nigeria. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, p. jphp.13150, 5 ago. 2019.

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Biologia das células**. 3. ed. São Paulo: Moderna plus, 2009.

AMIRI, E. *et al.* Combined antioxidant and sensory effects of corn starch films with nanoemulsion of Zataria multiflora essential oil fortified with cinnamaldehyde on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 153, p. 66–74, jul. 2019.

ARAKI, K.; TOMA, H. E. Química de sistemas supramoleculares constituídos por porfirinas e complexos metálicos. **Química Nova**, v. 25, n. 6a, p. 962–975, nov. 2002.

ASBAHANI, A. E. *et al.* Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, abr. 2015a.

ASBAHANI, A. E. *et al.* Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, abr. 2015b.

ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Advances in Spray-Drying Encapsulation of Food Bioactive Ingredients: From Microcapsules to Nanocapsules. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 103–131, 25 mar. 2019.

ASSIS, L. M. DE *et al.* Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99–109, 24 abr. 2012.

ATTARD, P.; ANTELMINI, D.; LARSON, I. Comparison of the Zeta Potential with the Diffuse Layer Potential from Charge Titration. **Langmuir**, v. 16, n. 4, p. 1542–1552, fev. 2000.

AZEVEDO, S. G. *et al.* Bioactivity of Licaria puchury-major Essential Oil Against *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Records of Natural Products**, v. 12, n. 3, p. 229–238, 15 jan. 2018.

BANDEIRA, J. M. *et al.* Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 157–164, 2011.

BARBALHO, S. M. *et al.* *Psidium Guajava* (Guava): A Plant of Multipurpose Medicinal Applications. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 01, n. 04, p. 1–6, 2012.

BARBOSA, L. C. DE A. **Espectroscopia no Infravermelho**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2007.

BARROS, V. C.; FEITOSA, C. M. **Produtos naturais no combate ao mosquito *Aedes aegypti***. 1. ed. [s.l.] Átomo, 2019.

BATISTA, P. F. *et al.* Quality of different tropical fruit cultivars produced in the Lower Basin of the São Francisco Valley. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 1, p. 176–184, mar. 2015.

BISWAS, K. K. *et al.* Essential oil production: relationship with abundance of glandular trichomes in aerial surface of plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 1, p. 13–19, jan. 2009.

BORGES, C. C. *et al.* *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): traditional use in a community of southern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 34–40, 2013.

BRASIL. **Dengue Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASILEIRO, J. S. L. Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas. p. 71, 2011.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 645–666, jul. 2007.

CALVO, P. *et al.* Effects of microcapsule constitution on the quality of microencapsulated walnut oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 10, p. 1273–1280, out. 2011.

CASTRO, M. R. *et al.* Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 242–250, fev. 2015.

CHARLES, D. J.; SIMON, J. E. Comparison of Extraction Methods for the Rapid Determination of Essential Oil Content and Composition of Basil. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, n. 3, p. 458–462, maio 1990.

CHAROENLAP, N. *et al.* Optimization of cyclodextrin production from sago starch. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 1, p. 49–54, mar. 2004.

CHAUDHARY, V. B.; PATEL, J. K. CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEX TO ENHANCE SOLUBILITY OF POORLY WATER SOLUBLE DRUGS: A REVIEW. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 1. v. 4, p. 68–76, 2013.

CHEN, Q. *et al.* Orange Fragrance with Sustained-Release Properties Prepared by Nanoethosomal Encapsulation of Natural Orange Essential Oil. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 19, n. 11, p. 7464–7470, 1 nov. 2019.

CHRISTAKI, E. *et al.* Innovative uses of aromatic plants as natural supplements in nutrition. Em: **Feed Additives**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 19–34.

CIOBANU, A.; LANDY, D.; FOURMENTIN, S. Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 110–114, ago. 2013.

CLETON, N. *et al.* Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191–203, nov. 2012.

CODAY, B. D. *et al.* Indirect determination of zeta potential at high ionic strength: Specific application to semipermeable polymeric membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 478, p. 58–64, mar. 2015.

CONNORS, K. A. Population Characteristics of Cyclodextrin Complex Stabilities in Aqueous Solution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, n. 7, p. 843–848, jul. 1995.

CORRADINI, E. *et al.* Estudo Comparativo de Amidos Termoplásticos Derivados do Milho com Diferentes Teores de Amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 268–273, 2005.

CORRÊA-FILHO, L.; MOLDÃO-MARTINS, M.; ALVES, V. Advances in the Application of Microcapsules as Carriers of Functional Compounds for Food Products. **Applied Sciences**, v. 9, n. 3, p. 571, 9 fev. 2019.

COSME, L. V. *et al.* Evolution of kdr haplotypes in worldwide populations of *Aedes aegypti*: Independent origins of the F1534C kdr mutation. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. e0008219, 16 abr. 2020.

DAS, S. *et al.* Encapsulation in chitosan-based nanomatrix as an efficient green technology to boost the antimicrobial, antioxidant and in situ efficacy of *Coriandrum sativum* essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 294–305, jul. 2019.

DAVIET, L.; SCHALK, M. Biotechnology in plant essential oil production: progress and perspective in metabolic engineering of the terpene pathway. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 3, p. 123–127, maio 2010.

DE LIMA, J. R.; ALVES, L. D. S.; DE SANTANA, D. P. Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, p. 397–402, 2012.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. DA. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945–954, 9 jan. 2009.

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, fev. 2014.

DIAS, M. P.; NOZARI, R. M.; SANTARÉM, E. R. Herbicide activity of natural compounds from *Baccharis* spp. Herbicidal activity of natural compounds from *Baccharis* spp. on the germination and seedlings growth of *Lactuca sativa* and *Bidens pilosa*. **Allelopathy Journal**, v. 42, n. 1, p. 21–36, set. 2017.

EKAMBARAM, P.; SATHALI, A. A. H.; PRIYANKA, K. SOLID LIPID NANOPARTICLES: A REVIEW. p. 23, 2012.

EL-ALAM, I. *et al.* Antifungal and Phytotoxic Activities of Essential Oils: In Vitro Assays and Their Potential Use in Crop Protection. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 825, 11 jun. 2020.

FALOWO, A. B. *et al.* Phytochemical Constituents and Antioxidant Activity of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) Essential Oil on Ground Beef from Boran and Nguni Cattle. **International Journal of Food Science**, v. 2019, p. 1–8, 1 jan. 2019.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; DE PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Review: Microencapsulation of food ingredients. **Braz. J. Food Technol.**, v. 11, n. 2, p. 11, 2008.

FERREIRA-DE-LIMA, V. H.; LIMA-CAMARA, T. N. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 77, dez. 2018.

FIRESTONE, J. L.; JASIENIUK, M. Seed production is reduced by small population size in natural populations of the invasive grass *Lolium multiflorum*. **Biological Invasions**, v. 14, n. 12, p. 2519–2529, dez. 2012.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. v. 4

FLORI, J. E. Principais Variedades de Goiaba. **Revista Campo e Negócios HF**, v. 8, n. 129, p. 72–73, fev. 2016.

FRANZON, R. C. *et al.* Araças do Gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. **Embrapa Cerrados**, v. 266, p. 48, 2009.

GALLI, G. M. *et al.* Low Dose of Nanocapsules Containing Eucalyptus Oil Has Beneficial Repellent Effect Against Horn Fly (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, 20 set. 2018.

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

GALVÃO, J. G. *et al.* *Lippia gracilis* essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes: an environmentally safe formulation to control *Aedes aegypti* larvae: *Lippia gracilis* essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes. **Pest Management Science**, v. 75, n. 2, p. 452–459, fev. 2019.

GAO, S. *et al.* Physicochemical properties and fungicidal activity of inclusion complexes of fungicide chlorothalonil with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, p. 111513, nov. 2019.

GIANNENAS, I. *et al.* The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts. Em: **Feed Additives**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 1–18.

GODOY NETTO, A. V. DE; FREM, R. C. G.; MAURO, A. E. A química supramolecular de complexos pirazólicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1208–1217, 2008.

GOMES, L. M. M. *et al.* Inclusion complexes of red bell pepper pigments with β -cyclodextrin: Preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt. **Food Chemistry**, v. 148, p. 428–436, abr. 2014.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509–530, dez. 2006.

GUPTA, S.; VARIYAR, P. S. Nanoencapsulation of essential oils for sustained release: application as therapeutics and antimicrobials. Em: **Encapsulations**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 641–672.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 117739280700200, jan. 2007.

HARADA, A.; TAKASHIMA, Y.; YAMAGUCHI, H. Cyclodextrin-based supramolecular polymers. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 4, p. 875, 2009.

HARADA, H.; MISAWA, N. Novel approaches and achievements in biosynthesis of functional isoprenoids in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 1021–1031, out. 2009.

HERRERA, A. *et al.* Antifungal and physicochemical properties of inclusion complexes based on β -cyclodextrin and essential oil derivatives. **Food Research International**, v. 121, p. 127–135, jul. 2019.

HONG, K.; PARK, S. Melamine resin microcapsules containing fragrant oil: synthesis and characterization. **Materials Chemistry and Physics**, v. 58, n. 2, p. 128–131, mar. 1999.

JAFELICCI JUNIOR, M.; VARANDA, L. C. O mundo dos colóides. **Química Nova na Escola**, v. 9, p. 9–13, 1999.

JAMIL, B. *et al.* Encapsulation of Cardamom Essential Oil in Chitosan Nanocomposites: In-vitro Efficacy on Antibiotic-Resistant Bacterial Pathogens and Cytotoxicity Studies. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 4 out. 2016.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, jan. 2018.

JOSEPH, B. REVIEW ON NUTRITIONAL, MEDICINAL AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF GUAVA (*PSIDIUM GUAJAVA* LINN.). v. 2, n. 1, p. 17, 2011.

JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 417–427, out. 2014.

KABIR, K. E. *et al.* Growth-disrupting, larvicidal and neurobehavioral toxicity effects of seed extract of *Seseli diffusum* against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 90, p. 52–60, abr. 2013.

KABIR, M. A. *et al.* Dengue Detection: Advances in Diagnostic Tools from Conventional Technology to Point of Care. **Biosensors**, v. 11, n. 7, p. 206, 23 jun. 2021.

KALLELI, F. *et al.* Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and methanol extract from Tunisian and French fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 8, ago. 2019.

KFOURY, M. *et al.* Encapsulation in cyclodextrins to widen the applications of essential oils. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p. 129–143, mar. 2019.

KNAAK, N.; FIUZA, L. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120–132, 10 set. 2010.

KÜLHEIM, C. *et al.* The Eucalyptus terpene synthase gene family. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 450, dez. 2015.

LANGE, B. M. *et al.* Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 24, p. 13172–13177, 21 nov. 2000.

LIMA, E. P. *et al.* Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 5, dez. 2011.

LIMA, R. K. *et al.* Caracterização química do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. spe, p. 1777–1781, 2009.

MAGALHÃES, T. S. S. DE A. *et al.* Development and Evaluation of Antimicrobial and Modulatory Activity of Inclusion Complex of Euterpe oleracea Mart Oil and β -Cyclodextrin or HP- β -Cyclodextrin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 942, 31 jan. 2020.

MANGANARIS, G. A. *et al.* Antioxidant Phytochemicals in Fresh Produce: Exploitation of Genotype Variation and Advancements in Analytical Protocols. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, p. 95, 6 fev. 2018.

MARMITT, D. J. *et al.* Plantas Medicinais da RENISUS Com Potencial Anti-inflamatório: Revisão Sistemática Em Três Bases de Dados Científicas. **Revista Fitos**, v. 9, n. 2, 2015.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 313–326, set. 2010.

MARRETO, R. N. *et al.* Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochimica Acta**, v. 475, n. 1–2, p. 53–58, set. 2008.

MEDINA, A. L. *et al.* Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 916–922, out. 2011.

MENDES, L. A. *et al.* Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 684–689, dez. 2017a.

MENDES, L. A. *et al.* Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 684–689, dez. 2017b.

MENDES, L. A. *et al.* Spring alterations in the chromatographic profile of leaf essential oils of improved guava genotypes in Brazil. **Scientia Horticulturae**, v. 238, p. 295–302, ago. 2018.

MENDES, L. A. *et al.* Development of inclusion complexes of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with *Psidium guajava* L. essential oil by freeze-drying and kneading methods for application as *Aedes aegypti* L. larvicide. **Natural Product Research**, p. 1–5, 18 ago. 2022.

MENDES, L. A. *et al.* Optimization of inclusion complex's preparation of *Psidium cattleianum* S. essential oil and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin by central composite design for application as larvicide in *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 194, p. 116333, abr. 2023.

MESSINA, J. P. *et al.* The current and future global distribution and population at risk of dengue. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1508–1515, set. 2019.

MORAIS, L. A. S. DE. INFLUÊNCIA DOS FATORES ABIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 4050–4063, 2009.

MOSSA, A.-T. H. Green Pesticides: Essential Oils as Biopesticides in Insect-pest Management. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 354–378, 1 maio 2016.

MOTHANA, R. A. *et al.* Analysis of Chemical Composition and Assessment of Cytotoxic, Antimicrobial, and Antioxidant Activities of the Essential Oil of *Meriandra dianthera* Growing in Saudi Arabia. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2647, 22 jul. 2019.

NDII, M. Z. *et al.* Estimating the reproduction number and designing the integrated strategies against dengue. **Results in Physics**, v. 27, n. 104473, p. 10, 2021.

OGOSHI, T.; HARADA, A. Chemical Sensors Based on Cyclodextrin Derivatives. **Sensors**, v. 8, n. 8, p. 4961–4982, 25 ago. 2008.

OKOH, S. O.; OKOH, O. O.; OKOH, A. I. Inhibitory effects of *Azadirachta indica* secondary metabolites formulated cosmetics on some infectious pathogens and oxidative stress radicals. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 123, dez. 2019.

OLIVEIRA-FILHO, R. D. DE *et al.* Biological Activities and Pharmacological Applications of Cyclodextrins Complexed with Essential Oils and Their Volatile

Components: A Systematic Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 33, p. 3951–3963, 12 nov. 2018.

OLUGU, S. V. *et al.* Effect of *Drypetes gossweileri* essential oil and irradiation treatments on inhibition and sensitivity of bacterial spores. **Food Science and Technology International**, p. 108201321986565, 12 ago. 2019.

OZDEMIR, N. *et al.* Preparation of black pepper oleoresin inclusion complexes based on beta-cyclodextrin for antioxidant and antimicrobial delivery applications using kneading and freeze drying methods: A comparative study. **LWT**, v. 91, p. 439–445, maio 2018.

P. FERREIRA, T. *et al.* Prolonged mosquitocidal activity of *Siparuna guianensis* essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. e0007624, 9 ago. 2019.

PADOVAN, A. *et al.* The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 3, p. 695–716, set. 2014.

PAINI, D. R. *et al.* Global threat to agriculture from invasive species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 27, p. 7575–7579, 5 jul. 2016.

PANDIYAN, G. N.; MATHEW, N.; MUNUSAMY, S. Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p. 549–556, jun. 2019.

PARVAN, L. G. *et al.* Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, n. 0, set. 2020.

PATEL, S. Exotic tropical plant *Psidium cattleianum*: a review on prospects and threats. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 11, n. 3, p. 243–248, set. 2012.

PATIL, J. S. *et al.* INCLUSION COMPLEX SYSTEM; A NOVEL TECHNIQUE TO IMPROVE THE SOLUBILITY AND BIOAVAILABILITY OF POORLY SOLUBLE DRUGS: A REVIEW. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 2, n. 2, p. 29–34, 2010.

PIRES, F. Q. *et al.* Lipid nanoparticles as carriers of cyclodextrin inclusion complexes: A promising approach for cutaneous delivery of a volatile essential oil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, p. 110382, out. 2019.

PRAKASH, B. *et al.* Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, p. 1–11, jul. 2018.

RAKMAI, J. *et al.* Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. **Biology, Engineering and Medicine**, v. 2, n. 1, 2016.

RODRÍGUEZ, J. *et al.* Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p. 41–59, maio 2016.

ROHMER, M. *et al.* Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 11, p. 2564–2566, jan. 1996.

ROMAN, E. S. *et al.* Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p. 301–306, jun. 2004.

SAGALOWICZ, L.; LESER, M. E. Delivery systems for liquid food products. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 1–2, p. 61–72, abr. 2010.

SÁNCHEZ ROJAS, F.; BOSCH OJEDA, C. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004–2008. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 1, p. 22–44, mar. 2009.

SANGWAN, N. S. *et al.* Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3–21, 2001.

SANTIAGO, J. DE A. *et al.* Cytogenotoxic effect of essential oil from *Backhousia citriodora* L. (Myrtaceae) on meristematic cells of *Lactuca sativa* L. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 515–520, set. 2017.

SANTOS, M. D. S. *et al.* Caracterização do suco de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) extraído mecanicamente e tratado enzimaticamente. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 29, n. 5, p. 617–621, 18 dez. 2007.

SANTOS, T.; SOMMAGGIO, L. R. D.; MARIN-MORALES, M. A. Phyto-genotoxicity assessment of different associations between sludges from Water and Sewage Treatment Plants, before and after the bioremediation process. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 26, p. 40029–40040, jun. 2022.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, out. 2003.

SCHMID, G. Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. **Tibtech**, v. 7, n. 9, p. 244–248, 1989.

SCUR, M. C. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 101–108, 12 fev. 2016.

ŠEREGELJ, V. *et al.* Application of encapsulated natural bioactive compounds from red pepper waste in yogurt. **Journal of Microencapsulation**, p. 1–31, 13 set. 2019.

SHAH, B. R. *et al.* Preparation and optimization of Pickering emulsion stabilized by chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for curcumin encapsulation. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 369–377, jan. 2016.

SHETTA, A.; KEGERE, J.; MAMDOUH, W. Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, in-vitro release, antioxidant and antibacterial activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 731–742, abr. 2019.

SILVA, C. DE S. *et al.* Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil in ground beef. **International Journal of Food Microbiology**, v. 293, p. 79–86, mar. 2019.

SILVA, R. C. E *et al.* Monoterpenes and Sesquiterpenes of Essential Oils from *Psidium* Species and Their Biological Properties. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 965, 12 fev. 2021.

SILVEIRA, G. L. *et al.* Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359–367, jul. 2017.

SINGH, R. *et al.* Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes – A Review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 171–183, 2010.

SIVABALAKRISHNAN, K. *et al.* Resistance to the larvicide temephos and altered egg and larval surfaces characterize salinity-tolerant *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 8160, 19 maio 2023. SMITH, L. B.; KASAI, S.; SCOTT, J. G. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 1–12, out. 2016.

SOUZA, L. S.; VELINI, E. D.; MAIOMONI-RODELLA, R. C. S. Efeito alelopático de plantas daninhas e concentrações de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 343–354, dez. 2003.

STAN, M. S. *et al.* Essential Oil Microcapsules Immobilized on Textiles and Certain Induced Effects. **Materials**, v. 12, n. 12, p. 2029, 25 jun. 2019.

SU, Z. *et al.* Inclusion Complex of *Exocarpium Citri Grandis* Essential Oil with β -Cyclodextrin: Characterization, Stability, and Antioxidant Activity. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 6, p. 1592–1599, jun. 2019.

SUGANYA, V.; ANURADHA, V. Microencapsulation and Nanoencapsulation: A Review. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 3, 25 mar. 2017.

TAO, F. *et al.* Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 247–255, nov. 2014.

TEIXEIRA, B. N. *et al.* Synthesis and Characterization of Nano-Encapsulated Black Pepper Oleoresin using Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrin for Antioxidant and Antimicrobial Applications: Black pepper oleoresin nanoparticles.... **Journal of Food Science**, v. 78, n. 12, p. N1913–N1920, dez. 2013.

TIAN, M. *et al.* Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of the essential oil from the rhizomes of *Zingiber striolatum* Diels. **Natural Product Research**, p. 1–5, 25 mar. 2019.

TIMERMAN, A.; NUNES, E.; LUZ, K. **Dengue no Brasil: doença urbana**. 1. ed. São Paulo: Limay, 2012.

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. B. Genomic Organization of Plant Terpene Synthases and Molecular Evolutionary Implications. **Genetics Society of America**, v. 158, p. 811–832, 2001.

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. B. Genomic Organization of Plant Terpene Synthases and Molecular Evolutionary Implications. p. 22, [s.d.].

VAHEDIKIA, N. *et al.* Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, p. 25–32, maio 2019.

VAN DER VEEN, B. A. *et al.* Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 336–360, 2000.

VARAN, G. *et al.* Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 2, p. 457–469, out. 2017.

VASCONCELOS, L. C. *et al.* Chemical composition, phytotoxicity and cytogenotoxicity of essential oil from leaves of *Psidium guajava* L. cultivars. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e6110917710, 21 jul. 2021.

VENTURINI, C. DE G. *et al.* Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.

VIEIRA, R. F. *et al.* **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.

VILLALONGA, R.; CAO, R.; FRAGOSO, A. Supramolecular Chemistry of Cyclodextrins in Enzyme Technology. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 7, p. 3088–3116, jul. 2007.

VITTI, K. A.; LIMA, L. M. DE; MARTINES FILHO, J. G. Agricultural and economic characterization of guava production in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 42, n. 1, p. e-447, 2020.

WADHWA, G. *et al.* Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 89, n. 1–2, p. 39–58, out. 2017.

WALTER, M.; SILVA, L. P. DA; EMANUELLI, T. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 974–980, ago. 2005.

WANG, Y. *et al.* Insecticidal and repellent efficacy against stored-product insects of oxygenated monoterpenes and 2-dodecanone of the essential oil from *Zanthoxylum planispinum* var. *dintanensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 24, p. 24988–24997, ago. 2019.

WANG, Y.; JIANG, Z.-T.; LI, R. Complexation and molecular microcapsules of Litsea cubeba essential oil with β -cyclodextrin and its derivatives. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 6, p. 865–873, abr. 2009.

WHELEHAN, M.; MARISON, I. W. Microencapsulation using vibrating technology. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 8, p. 669–688, dez. 2011.

WHO. **Global Vector Control Response 2017–2030**. Geneva: World Health Organization, 2017.

World Checklist of Selected Plant Families: Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <<http://apps.kew.org/wcsp/>>. Acesso em: 21 ago. 2023.

WU, Z. *et al.* Multifunctional chitosan-based coating with liposomes containing laurel essential oils and nanosilver for pork preservation. **Food Chemistry**, v. 295, p. 16–25, out. 2019.

YAN, X. *et al.* Synthesis and Characterization of Melamine-Formaldehyde Microcapsules Containing Pyraclostrobin by In situ Polymerization. **Polymer Science, Series B**, v. 60, n. 6, p. 798–805, nov. 2018.

YANG, L. *et al.* Reduced effectiveness of repellents in a pyrethroid-resistant strain of *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) and its correlation with olfactory sensitivity. **Pest Management Science**, v. 76, n. 1, p. 118–124, jan. 2020.

YAZGAN, H.; OZOGUL, Y.; KULEY, E. Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 306, p. 108266, out. 2019.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469–1479, dez. 2007.


5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dada a relevância científica do presente estudo, foi possível a obtenção de um depósito do pedido de patente de invenção intitulado "Processo de elaboração do complexo de inclusão pelo método de maceração, complexo de inclusão, composições e usos", protocolado no INPI em 29/08/2022, sob o número definitivo de proteção BR 10 2022 017284-6 (Apêndice 1). Obtivemos a publicação de três artigos em revistas conceituadas como a *Natural Product Research* (fator de impacto 2,49), a *Industrial Crops and Products* (fator de impacto 6,45) e a *Molecules* (fator de impacto 4,93), referentes ao conteúdo dos capítulos 1, 2 e 3 da tese, respectivamente (Apêndices 2-4). A revisão bibliográfica da tese se transformou em um capítulo de livro intitulado "Complexos de inclusão de óleos essenciais de *Psidium* para aplicação larvicida, herbicida e citogenotóxica" e publicado no livro "Tecnologia e Inovação em Ciências Agrárias e Biológicas Avanços para a sociedade atual" da Editora Seven (Apêndice 5). Os capítulos da tese e assuntos que envolviam aplicação de óleos essenciais de *Psidium* e outros métodos de proteção foram apresentados no Simpósio de Integração Acadêmica da UFV (Apêndice 6-7), VI Encontro De Ciências Biológicas do IFES (Apêndice 8-9) e em congresso internacional (Encontro Latino-Americano de Pós-graduação/INIC) (Apêndice 10-11), recebendo o prêmio de melhor trabalho da área (Apêndice 12). Neste ano, alguns trabalhos foram enviados ao INIC (Apêndice 13-16). O projeto com o tema "Desperdício zero: Extração de óleos essenciais de plantas para um mundo sustentável" foi desenvolvido e orientado com os alunos do ensino técnico e superior na 13ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia do IFES (Apêndice 17). Por final, almeja-se a publicação de mais um artigo, que está sendo redigido, com a otimização no preparo de nanoemulsão de óleo essencial e aplicação fungicida.

6. APÊNDICE

Apêndice 1



29/08/2022 870220077809
15:37

29409161950606332

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 017284 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25944455000196

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Campus UFV, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, sala 04.

Cidade: Vicosa

Estado: MG

CEP: 36570-900

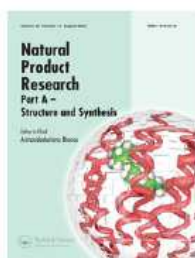
País: Brasil

Telefone: (31) 3612 2334

Fax:

Email: propriedadeintelectual@ufv.br

Apêndice 2



Natural Product Research
Formerly Natural Product Letters



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpj20>

Development of inclusion complexes of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with *Psidium guajava* L. essential oil by freeze-drying and kneading methods for application as *Aedes aegypti* L. larvicide

Luiza Alves Mendes, Rafael Resende Assis Silva, Nilda de Fátima Ferreira Soares, Gustavo Ferreira Martins, Róbson Ricardo Teixeira, Marcia Flores da Silva Ferreira & Renata Pereira Lopes Moreira

To cite this article: Luiza Alves Mendes, Rafael Resende Assis Silva, Nilda de Fátima Ferreira Soares, Gustavo Ferreira Martins, Róbson Ricardo Teixeira, Marcia Flores da Silva Ferreira & Renata Pereira Lopes Moreira (2022): Development of inclusion complexes of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with *Psidium guajava* L. essential oil by freeze-drying and kneading methods for application as *Aedes aegypti* L. larvicide, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2022.2112579](https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2112579)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2112579>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 18 Aug 2022.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Apêndice 3

Industrial Crops & Products 194 (2023) 116333



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Optimization of inclusion complex's preparation of *Psidium cattleianum* S. essential oil and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin by central composite design for application as larvicide in *Aedes aegypti* L

Luiza Alves Mendes^a, Rafael Resende Assis Silva^b, Eugênio Eduardo de Oliveira^c, Maria Júlia Maciel Corrêa^c, Clara Suprani Marques^b, Marcia Flores da Silva Ferreira^d, Róbson Ricardo Teixeira^a, Renata Pereira Lopes Moreira^{a,*}

^a Department of Chemistry, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, ZIP: 36.570-000 Viçosa, MG, Brazil

^b Department of Food Technology, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, ZIP: 36.570-000 Viçosa, MG, Brazil

^c Department of Entomology, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, ZIP: 36.570-000 Viçosa, MG, Brazil

^d Department of Agronomy, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alto Universitário, s/n, Guararema, ZIP: 29.500-000 Alegre, ES, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Inclusion complex
Araçá
Essential oil
Dengue

ABSTRACT

The present investigation described the preparation of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) inclusion complex (IC) of the essential oil (EO) of *Psidium cattleianum* (CAT) and the *Aedes aegypti* larvicidal evaluation of the EO and IC. The EO was extracted from the leaves of CAT with a 0.79% (m mL^{-1}) yield. It is mainly composed of sesquiterpenes, with β -caryophyllene being the major component (34.2%). To achieve optimized conditions for the preparation of the IC, through the physical method of kneading, the parameters molar ratio of EO/HP β CD and the kneading time were evaluated. The best molar ratio of EO:HP β CD was 1:1.14 and the kneading time corresponded to 30 min. The amount of essential oil loaded under optimized conditions was $(94.9 \pm 1.7)\%$. The prepared IC was characterized by spectroscopy in the UV-Vis region, FTIR, TGA, DLS, and XRD to prove the interaction of the EO with the HP β CD. The release of EO from the IC was evaluated in aqueous media using 1% DMSO (v v^{-1}) and acetonitrile. The EO slowly released into the aqueous medium, which was used to simulate the aquatic environment in which *A. aegypti* larvae develop. The larvicidal activity of CAT EO in DMSO was 81.73 and 102.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for LC₅₀ and LC₉₀, respectively. The IC's toxicity was 134.44 and 168.69 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for LC₅₀ and LC₉₀, respectively. Although the larvicidal activity of EO is higher as compared to the IC, the latter presents great thermal stability and high water solubility. Taking together, the described in this study points to the fact that IC prepared from CAT EO may represent a good alternative for *A. aegypti* larvae control.

1. Introduction

Dengue, Chikungunya, and Zika are arboviruses transmitted by the mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), which is the most successful invasive species in the world (Cosme et al., 2020). As it impacts the health of many people, representing a social and economic burden, attempts to eradicate this vector have been carried out over the years (Ndii et al., 2021). The control of *A. aegypti* at the larval stage is an important approach to reducing infections transmitted by this vector. To achieve it, synthetic chemicals, such as pyrethroids, have been used as the main strategy to control the spread of larvae and mosquitoes (Yang et al., 2020).

However, despite the effectiveness of chemical agents in combating *A. aegypti*, studies have shown that the continuous use has generated resistant insects, requiring the utilization of alternative methods, such as the employment of essential oils (EOs) with larvicidal effect (Azeem et al., 2019; Mendes et al., 2017; Smith et al., 2016).

The *Psidium cattleianum* S. (CAT) species belongs to the Myrtaceae family and is popularly known as araçazeiro, producing fruits called strawberry guava or araçá (Castro et al., 2015). This species is native to Brazil and has commercial importance, which is attributed to its fruits used in the food industry (Pereira et al., 2018; Santos et al., 2007).

In addition, CAT displays antioxidant, antifungal, and antimicrobial activities (Castro et al., 2015; Medina et al., 2011; Scur et al., 2016).

* Corresponding author.

E-mail address: renata.plopes@ufv.br (R.P.L. Moreira).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116333>

Received 12 October 2022; Received in revised form 16 January 2023; Accepted 25 January 2023

Available online 25 January 2023

0926-6690/© 2023 Published by Elsevier B.V.

Article

Herbicide and Cytogenotoxic Activity of Inclusion Complexes of *Psidium gaudichaudianum* Leaf Essential Oil and β -Caryophyllene on 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

Luiza Alves Mendes ^{1,*}, Loren Cristina Vasconcelos ², Milene Miranda Praça Fontes ², Geisiele Silva Martins ², Aline dos Santos Bergamin ³, Matheus Alves Silva ³, Rafael Resende Assis Silva ⁴, Taíla Veloso de Oliveira ⁵, Victor Gomes Lauriano Souza ^{6,7,*}, Marcia Flores da Silva Ferreira ³, Róbson Ricardo Teixeira ¹ and Renata Pereira Lopes ^{1,*}

- ¹ Department of Chemistry, Federal University of Viçosa (UFV), Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa 36570-000, MG, Brazil; robson.teixeira@ufv.br
² Department of Biology, Federal University of Espírito Santo (UFES), Alto Universitário, s/n, Guararema, Alegre 29500-000, ES, Brazil; loren-vasconcelos@hotmail.com (L.C.V.); milenemiranda@yahoo.com.br (M.M.P.F.); martinsgeisiele@gmail.com (G.S.M.)
³ Department of Agronomy, Federal University of Espírito Santo (UFES), Alto Universitário, s/n, Guararema, Alegre 29500-000, ES, Brazil; alinebergamin258@hotmail.com (A.d.S.B.); alvesmatheus21@gmail.com (M.A.S.); mlfloresf@gmail.com (M.F.d.S.F.)
⁴ Department of Food Materials Science and Engineering, Federal University of São Carlos (UFSCar), Rod. Washington Luiz, s/n, São Carlos 13565-905, SP, Brazil; rafael.resendeas@gmail.com
⁵ Department of Food Technology, Federal University of Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brazil; taíla.oliveira@ufv.br
⁶ International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL), Av. Mestre José Veiga s/n, 4715-330 Braga, Portugal
⁷ M&T-RICs, CubicB, Department of Chemistry, NOVA School of Science and Technology (FCT NOVA), University Nova de Lisboa, Campus de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal
* Correspondence: luiza.alves@ufv.br (L.A.M.); victor.souza@inl.int (V.G.L.S.); renata.plopes@ufv.br (R.P.L.)



Citation: Mendes, L.A.; Vasconcelos, L.C.; Fontes, M.M.P.; Martins, G.S.; Bergamin, A.d.S.; Silva, M.A.; Silva, R.R.A.; Oliveira, T.V.d.; Souza, V.G.L.; Ferreira, M.F.d.S.; et al. Herbicide and Cytogenotoxic Activity of Inclusion Complexes of *Psidium gaudichaudianum* Leaf Essential Oil and β -Caryophyllene on 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Molecules* **2023**, *28*, 5909. <https://doi.org/10.3390/molecules28155909>

Academic Editors: Patrícia Formoso and Rita Muzzalupo

Received: 21 July 2023

Revised: 2 August 2023

Accepted: 3 August 2023

Published: 6 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The present investigation aimed to develop inclusion complexes (ICs) from *Psidium gaudichaudianum* (GAU) essential oil (EO) and its major compound β -caryophyllene (β -CAR), and to evaluate their herbicidal (against *Lolium multiflorum* and *Bidens pilosa*) and cytogenotoxic (on *Lactuca sativa*) activities. The ICs were obtained using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) and they were prepared to avoid or reduce the volatility and degradation of GAU EO and β -CAR. The ICs obtained showed a complexation efficiency of 91.5 and 83.9% for GAU EO and β -CAR, respectively. The IC of GAU EO at a concentration of 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ displayed a significant effect against weed species *B. pilosa* and *L. multiflorum*. However, the β -CAR IC at a concentration of 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was effective only on *L. multiflorum*. In addition, the cytogenotoxic activity evaluation revealed that there was a reduction in the mitotic index and an increase in chromosomal abnormalities. The produced ICs were able to protect the EO and β -CAR from volatility and degradation, with a high thermal stability, and they also enabled the solubilization of the EO and β -CAR in water without the addition of an organic solvent. Therefore, it is possible to indicate the obtained products as potential candidates for commercial exploration since the ICs allow the complexed EO to exhibit a more stable chemical constitution than pure EO under storage conditions.

Keywords: natural product; araçá; inclusion complex; biological activity; bioherbicide

1. Introduction

The concern with food shortages in recent years resulted in a growing movement towards sustainable agriculture in order to preserve the environment, reduce costs, and increase productivity [1]. However, in large crops such as wheat and corn, invasive plants grow spontaneously and undesirably, causing a loss of crop productivity, jeopardizing the integrity of agricultural systems, and causing economic damage [2,3]. Continuous



Complexos de inclusão de óleos essenciais de *Psidium* para aplicação larvicida, herbicida e citogenotóxica



<https://doi.org/10.56238/tecnocienagrariabiosoci-003>

Luiza Alves Mendes

Mestre
Universidade Federal de Viçosa

Loren Cristina Vasconcelos

Mestre
Universidade Federal do Espírito Santo

Milene Miranda Praça-Fontes

Doutora
Universidade Federal do Espírito Santo

Marcia Flores da Silva Ferreira

Doutora
Universidade Federal do Espírito Santo

Róbson Ricardo Teixeira

Doutor
Universidade Federal de Viçosa

Renata Pereira Lopes Moreira

Doutora
Universidade Federal de Viçosa

RESUMO

As plantas do gênero *Psidium* (Myrtaceae) apresentam, dentre seus usos relevantes, atividades biológicas relacionadas aos seus compostos ativos, com destaque ao óleo essencial (OE) presente na

folha. Os OEs extraídos das folhas de *Psidium* guajava, *Psidium cattleianum* e *Psidium gaudichaudianum* possuem aplicações em larvas de *Aedes aegypti*, herbicida e citogenotóxica. Para ampliar as aplicações do OE, que é insolúvel em água e facilmente degradado por fatores externos, métodos de proteção podem ser utilizados para formar cápsulas ou complexos de inclusão (CIs). Um oligossacarídeo que pode ser utilizado para complexar o OE é a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP β CD), que é derivada do amido. Para produzir os CIs, os métodos físicos como maceração (KN) e liofilização (FD) podem ser empregados. A fim de comprovar se os CIs foram preparados corretamente, técnicas analíticas podem ser utilizadas, como a espectroscopia na região do UV-Vis, FTIR, TGA, DLS e XRD. Os OEs e CIs de *Psidium* produzidos podem ser aplicados em larvas de *Aedes aegypti*, em plantas invasoras como *Lolium multiflorum* e *Bidens pilosa* e em células meristemáticas da raiz de *Lactuca sativa*, sendo verificado a influência na normalidade do ciclo celular. Considerando a importância dos óleos essenciais, dos complexos de inclusão e de suas potenciais aplicações, este capítulo aborda os assuntos mais relevantes numa revisão da literatura sobre esse assunto.

Palavras-chave: Goiabeira, Araçá, Produto natural, Encapsulamento, Complexo de inclusão, Dengue, Plantas daninhas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 GOIABEIRA

As goiabeiras (*Psidium guajava* Linnaeus) pertencem à família Myrtaceae, que compreende cerca de 120 gêneros e 7000 espécies, que se distribuem predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo ("WCSP", 2020). As goiabeiras são classificadas como árvores de tamanho médio, perenes e frutíferas (Fig. 1). Suas folhas apresentam até cerca de 20 cm de comprimento, com pecíolo curto e nervuras na parte inferior. Possuem flores hermafroditas e geralmente brancas

Apêndice 6



SIA | SIMPÓSIO DE INTEGRAÇÃO ACADÊMICA

UFV
Universidade Federal de Viçosa

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho "Preparação de complexos de inclusão do óleo essencial de *Psidium guajava* L. em *Aedes aegypti* L.", de autoria de Gabriel da Silva Souza, RENATA PEREIRA LOPES MOREIRA (Orientador), Luiza Alves Mendes, Gabriela Camila Pinto, foi apresentado em sessão vídeo no Simpósio de Integração Acadêmica, realizado no período de 8 a 10 de novembro de 2022, no Campus Viçosa da Universidade Federal de Viçosa.

Viçosa, 18 de novembro de 2022.

João Carlos Pereira da Silva
João Carlos Pereira da Silva
Pró-Reitor de Ensino

Raul Narciso C. Guedes
Raul Narciso C. Guedes
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós Graduação

José Ambrósio Ferreira Neto
José Ambrósio Ferreira Neto
Pró-Reitor de Extensão e Cultura

Apêndice 7



SIA | SIMPÓSIO DE INTEGRAÇÃO ACADÊMICA

UFV
Universidade Federal de Viçosa

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho "Fração hexânica de *Eugenia astringens* Cambess: modo de ação e nanoencapsulamento com ciclodextrinas", de autoria de Jeany Paschoalino Mendes, ANDREA DE OLIVEIRA BARROS RIBON (Orientador), Joao Pedro Vianna Braga, Lizandra Das Neves Quaresma, JOAO PAULO VIANA LEITE, Luiza Alves Mendes, foi apresentado em sessão painel no Simpósio de Integração Acadêmica, realizado no período de 8 a 10 de novembro de 2022, no Campus Viçosa da Universidade Federal de Viçosa.

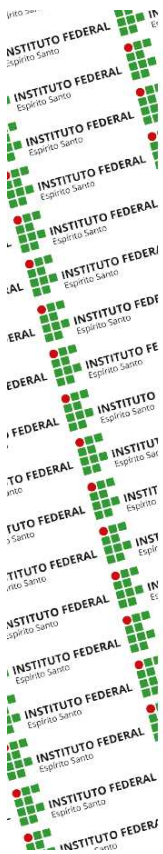
Viçosa, 18 de novembro de 2022.

João Carlos Pereira da Silva
João Carlos Pereira da Silva
Pró-Reitor de Ensino

Raul Narciso C. Guedes
Raul Narciso C. Guedes
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós Graduação

José Ambrósio Ferreira Neto
José Ambrósio Ferreira Neto
Pró-Reitor de Extensão e Cultura

Apêndice 8

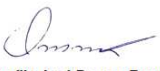


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
 CAMPUS DE ALEGRE
 Rodovia ES-482 (Cachoeiro-Alegre), Km 47 – Distrito de Rive – Caixa Postal 47 – 29500-000 – Alegre – ES
 28 3552-8131

CERTIFICADO

Certificamos que **Luiza Alves Mendes**, CPF 127.527.017-48, participou da Atividade 'APRESENTAÇÃO EM PÔSTER DO TRABALHO ATIVIDADE LARVICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE PSIDIUM, RICOS EM SESQUITERPENOS, EM SPODOPTERA FRUGIPERDA', incluída no Evento de Extensão intitulado 'VI ENCONTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS', realizado por esta Instituição, na função de COMUNICADOR(A) ORAL, no dia 01 de Dezembro de 2022, com carga horária de 2 hora(s).

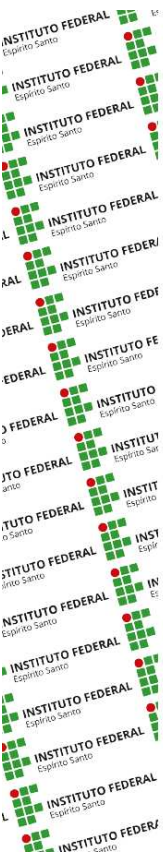
Alegre - ES, 15 de Junho de 2023


Otacilio José Passos Rangel
 Coordenador de Extensão
 Portaria nº 509 - DOU 06.03.2022


Romulo Matos de Moraes
 Diretor-Geral
 Portaria nº 1.993 - DOU 23.11.2021

Número de Registro: 273776
 Código de Verificação: GIGWBWC4Z
 Para verificar a autenticidade deste documento acesse: <http://src.ifes.edu.br/certificado>

Apêndice 9

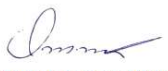


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
 CAMPUS DE ALEGRE
 Rodovia ES-482 (Cachoeiro-Alegre), Km 47 – Distrito de Rive – Caixa Postal 47 – 29500-000 – Alegre – ES
 28 3552-8131

CERTIFICADO

Certificamos que **Thais Dutra de Carvalho**, CPF 165.833.327-60, participou da Atividade 'APRESENTAÇÃO EM PÔSTER DO TRABALHO AVALIAÇÃO INSETICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PSIDIUM SPP. SOBRE SPODOPTERA FRUGIPERDA', incluída no Evento de Extensão intitulado 'VI ENCONTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS', realizado por esta Instituição, na função de COMUNICADOR(A) ORAL, no dia 01 de Dezembro de 2022, com carga horária de 2 hora(s).

Alegre - ES, 15 de Junho de 2023


Otacilio José Passos Rangel
 Coordenador de Extensão
 Portaria nº 509 - DOU 06.03.2022


Romulo Matos de Moraes
 Diretor-Geral
 Portaria nº 1.993 - DOU 23.11.2021

Número de Registro: 273778
 Código de Verificação: W7GY5U4RGZ
 Para verificar a autenticidade deste documento acesse: <http://src.ifes.edu.br/certificado>

Apêndice 10



XXVI/Inic
Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

XXII/EPG
Encontro Latino Americano
de Pós-Graduação

XVI/InicJr
Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior

XII/Inid
Encontro Nacional
de Iniciação à Docência

II/Enexun
Encontro Nacional de
Extensão Universitária



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "NANOEMULSÃO COM ÓLEOS ESSENCIAIS: UMA REVISÃO DE LITERATURA" de autoria de Luiza Alves Mendes, Loren Cristina Vasconcelos, Rafael Resende Assis Silva, Milene Miranda Praça Fontes, Marcia Flores da Silva Ferreira e Renata Pereira Lopes Moreira, foi apresentado no XXII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação (XXII EPG), realizado na Universidade do Vale do Paraíba, nos dias 19, 20 e 21 de outubro de 2022.



São José dos Campos, 21 de outubro de 2022.

Prof. Dr. Leandro José Raniero
Pró-reitor de Pós-graduação e Pesquisa

Realização: **Univap**
Universidade do Vale do Paraíba

FV FUNDAÇÃO
VALEPARAIBANA
DE ENSINO

Apoio: **CNPq**
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPESP

CAPES

Univap

Apêndice 11



XXVI/Inic
Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

XXII/EPG
Encontro Latino Americano
de Pós-Graduação

XVI/InicJr
Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior

XII/Inid
Encontro Nacional
de Iniciação à Docência

II/Enexun
Encontro Nacional de
Extensão Universitária



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "ATIVIDADE FITOTÓXICA DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE HPβCD CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE Psidium gaudichaudianum" de autoria de Loren Cristina Vasconcelos, Luiza Alves Mendes, Francisco Liviê Arrais Mendes Oliveira, Ingrid de Souza Ribeiro, Marcia Flores da Silva Ferreira, Renata Pereira Lopes Moreira e Milene Miranda Praça Fontes, foi apresentado no XXII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação (XXII EPG), realizado na Universidade do Vale do Paraíba, nos dias 19, 20 e 21 de outubro de 2022.



São José dos Campos, 21 de outubro de 2022.

Prof. Dr. Leandro José Raniero
Pró-reitor de Pós-graduação e Pesquisa

Realização: **Univap**
Universidade do Vale do Paraíba

FV FUNDAÇÃO
VALEPARAIBANA
DE ENSINO

Apoio: **CNPq**
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPESP

CAPES

Univap

Apêndice 12



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "ATIVIDADE FITOTÓXICA DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE HPβCD CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium gaudichaudianum*" de autoria de Loren Cristina Vasconcelos, Luiza Alves Mendes, Franciso Liviête Arrais Mendes Oliveira, Ingrid de Souza Ribeiro, Marcia Flores da Silva Ferreira, Renata Pereira Lopes Moreira e Milene Miranda Praça Fontes desenvolvido na instituição Universidade Federal de Viçosa - UFV foi considerado o melhor trabalho da área Engenharia Agrônômica no XXII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação (XXII EPG), realizado na Universidade do Vale do Paraíba, nos dias 19, 20 e 21 de outubro de 2022.



São José dos Campos, 21 de outubro de 2022.


Prof. Dr. Leandro José Raniero
Pró-reitor de Pós-graduação e Pesquisa

Realização:   FUNDAÇÃO VALEPARAIBANA DE ENSINO

Apoio:    

Apêndice 13



INIC 2023

**A era digital e suas implicações sociais:
Desafios e contribuições**

ATIVIDADE LARVICIDA DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium cattleyanum* S. EM *Aedes aegypti* L.

Luiza Alves Mendes¹, Rafael Resende Assis Silva², Loren Cristina Vasconcelos³, Róbson Ricardo Teixeira¹, Marcia Flores da Silva Ferreira³, Renata Pereira Lopes Moreira¹.

¹Universidade Federal de Viçosa (UFV). Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, 36.570-000 Viçosa – MG, Brasil, luiza.alves@ufv.br (L.A.M.), robsonr.teixeira@ufv.br (R.R.T.), renata.plopes@ufv.br (R.P.L.).

²Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Rod. Washington Luiz, s/n, 13565-905 São Carlos – SP, Brasil, rafael.resendeas@gmail.com (R.R.A.S.).

³Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Alto Universitário, s/n, Guararerna, 29.500-000 Alegre – ES, Brasil, loren-vasconcelos@hotmail.com (L.C.V.), mlfressf@gmail.com (M.F.S.F.).

Resumo

Este trabalho utilizou o complexo de inclusão (CI) do óleo essencial (OE) de *Psidium cattleyanum* (CAT) em 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina (HPβCD), previamente preparado e caracterizado, na avaliação da atividade larvicida em *Aedes aegypti*. Assim, tanto o OE quanto o CI foram aplicados e suas toxicidades foram comparadas para essa finalidade. O OE foi extraído das folhas de CAT com rendimento de 0,79% (m m⁻¹) e é constituído majoritariamente por sesquiterpenos, sendo o β-cariofileno o principal componente (34,2%). A atividade larvicida do OE da CAT em DMSO foi de 81,73 e 102,50 μg mL⁻¹ para CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente. Para o CI, a toxicidade foi de 134,44 e 168,69 μg mL⁻¹ para CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente. Embora a atividade larvicida do OE seja maior em relação ao CI, este último apresenta grande estabilidade térmica e alta solubilidade em água. Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo apontam para o fato de que o CI preparado a partir do OE da CAT pode representar uma

Apêndice 14



OTIMIZAÇÃO NO PREPARO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium cattleyanum* S. EM HP β CD

Luiza Alves Mendes¹, Rafael Resende Assis Silva², Loren Cristina Vasconcelos³, Róbson Ricardo Teixeira¹, Marcia Flores da Silva Ferreira³, Renata Pereira Lopes Moreira¹.

¹Universidade Federal de Viçosa (UFV). Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, 36.570-000 Viçosa – MG, Brasil, luiza.alves@ufv.br (L.A.M.), robsonr.teixeira@ufv.br (R.R.T.), renata.plopes@ufv.br (R.P.L.).

²Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Rod. Washington Luiz, s/n, 13565-905 São Carlos – SP, Brasil, rafael.resendeas@gmail.com (R.R.A.S.).

³Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Alto Universitário, s/n, Guararema, 29.500-000 Alegre – ES, Brasil, loren-vasconcelos@hotmail.com (L.C.V.), mlfloressf@gmail.com (M.F.S.F.).

Resumo

Descreve-se na presente investigação a preparação de complexos de inclusão (CI) do óleo essencial (OE) de *Psidium cattleyanum* (CAT) em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP β CD). O OE foi extraído das folhas de CAT com rendimento de 0,79% (m m⁻¹) e é constituído majoritariamente por sesquiterpenos, sendo o β -cariofileno o principal componente (34,2%). Para obter condições otimizadas para a preparação do CI, através do método físico de maceração, foram variados os parâmetros razão molar OE/HP β CD e o tempo de maceração. A melhor razão molar de OE:HP β CD foi de 1:1,14 e o tempo de maceração correspondeu a 30 min. A eficiência de complexação utilizando as condições otimizadas foi de (94,9 \pm 1,7)%. O CI preparado foi caracterizado por espectroscopia na região UV-Vis, FTIR, TGA e DLS para comprovar a interação do OE com a HP β CD.

Apêndice 15



ATIVIDADE DO COMPLEXO DE INCLUSÃO COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium gaudichaudianum* NO CICLO CELULAR DE ALFACE

Francisco Liviê Arrais Mendes Oliveira¹, Loren Cristina Vasconcelos¹, Luiza Alves Mendes², Renata Pereira Lopes Moreira², Marcia Flores da Silva Ferreira¹, Milene Miranda Praça Fontes¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, s/n, Guararema, Departamento de Biologia - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, livietearrais18@gmail.com, loren-vasconcelos@hotmail.com, mlfloressf@gmail.com, milenemiranda@yahoo.com.br.

²Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, Departamento de Química - 36570-900 - Viçosa-MG, Brasil, luiza.alves@ufv.br, renata.plopes@ufv.br.

Resumo

O óleo essencial (OE) de *Psidium gaudichaudianum* (Myrtaceae) é uma alternativa sustentável ao uso de herbicidas sintéticos. A formação de complexos de inclusão (CI) a partir do encapsulamento do OE no composto 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP β CD) tem se mostrado útil para preservar a integridade química e aumentar a solubilidade dos OEs em meio aquoso. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do OE de *P. gaudichaudianum* e do CI de HP β CD contendo OE, no ciclo celular de células de *Lactuca sativa*. Para a análise, foram preparadas lâminas citológicas das raízes de *L. sativa* tratadas com diferentes concentrações do OE, CI, dos controles positivo e negativo, e avaliado o índice mitótico e as alterações cromossômicas e nucleares. O CI apresentou reduções no índice mitótico das células de *L. sativa* nas concentrações de 375, 750, 1500 μ g mL⁻¹. OE puro não apresentou esse efeito. Tanto OE puro quanto os CIs não apresentaram efeito genotóxico. Esses resultados indicam que o CI com o OE de *P. gaudichaudianum* apresentou atividade citotóxica nas células *L. sativa*, e o complexo de inclusão em HP β CD preservou suas bioatividades.

Apêndice 16



NANOEMULSÕES DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper dilatatum* PARA CONTROLE SUSTENTÁVEL DE ERVAS DANINHAS

Loren Cristina Vasconcelos¹, Luiza Alves Mendes², Rafael Resende de Assis Silva³, Taíla Veloso de Oliveira⁴, Renata Pereira Lopes², Tatiana Tavares Carrijo¹, Milene Miranda Praça Fontes¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, s/n, Guararema, Departamento de Biologia - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, loren-vasconcelos@hotmail.com, milenemiranda@yahoo.com.br, tcarrijo@gmail.com.

²Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, Departamento de Química - 36570-900 - Viçosa-MG, Brasil, luiza.alves@ufv.br, renata.plopes@ufv.br.

³Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, 13565-905 - São Carlos - SP, Brasil, Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais, rafaelras@estudante.ufscar.br.

⁴Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, Departamento de Tecnologia de Alimentos - 36570-900 - Viçosa-MG, taíla.oliveira@ufv.br.

Resumo

A crescente preocupação com os impactos ambientais e a resistência aos herbicidas sintéticos impulsiona a busca por alternativas sustentáveis de controle de ervas daninhas. O óleo essencial (OE) de *Piper dilatatum* se destaca como uma promissora opção para herbicidas naturais. No entanto, sua aplicação enfrenta limitações devido à baixa solubilidade aquosa e rápida degradação. Para superar esses desafios, as nanoemulsões (NEs) têm se destacado como eficazes métodos de proteção para OEs. Neste estudo, formulamos NE do OE de *P. dilatatum* através de homogeneização ultrassônica e avaliamos sua atividade herbicida contra *Bidens pilosa* L. A NE apresentou gotículas em tamanho nano (8,7 nm) e maior estabilidade térmica em comparação com o OE não encapsulado. A NE causou uma

Apêndice 17



DESPERDÍCIO ZERO: EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS PARA UM MUNDO SUSTENTÁVEL

MENDES, L. A.¹, JÚLIO, A. A.¹, VIANNA, L. S.¹, SOUZA, T. S.¹, MENINI, L.¹, SOUZA, M. DE O.¹, MOREIRA, R. P. L.²

¹Instituto Federal do Espírito Santo - Campus de Alegre, Rua Principal, s/n, Distrito de Rive, CEP: 29520-000, Alegre, ES, Brasil, luiza.mendes@ifes.edu.br, armandaj@gmail.com, larissasouzav@hotmail.com, tsouza@ifes.edu.br, lmenini@ifes.edu.br, m.quimic@gmail.com.

²Universidade Federal de Viçosa - Campus de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP: 36.570-000, Viçosa, MG, Brasil, renatapmoreira@gmail.com.

Resumo – Os óleos essenciais são derivados do metabolismo secundário de espécies vegetais aromáticas, e seus componentes químicos possuem propriedades interessantes. O objetivo desse projeto foi extrair óleos essenciais de várias plantas pelo método de hidroddestilação, e realizar uma revisão bibliográfica, usando diferentes bases de dados, sobre as propriedades que vários óleos essenciais, obtidos de diferentes plantas, exibem. Além disso, os óleos essenciais, por serem derivados vegetais, são produtos sustentáveis e que tem importantes aplicações em diversas áreas.

Palavras-chave: Óleos essenciais, propriedades biológicas, sustentabilidade.

Introdução

A demanda por produtos que sejam ecologicamente e ambientalmente aceitos é crescente. Nesse contexto, os óleos essenciais (OEs) vêm se destacando por sua versatilidade. Os OEs são constituídos por uma mistura de substâncias odoríferas voláteis, que derivam do metabolismo secundário de plantas aromáticas (BUNSE et al., 2022). Algumas famílias de plantas apresentam mais relevância quando se trata da produção de OEs, sendo relatadas na literatura as famílias Araceae, Asteraceae, Apiaceae, Apocynaceae, Cucurbitaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Liliaceae.