



Universidade Federal do Maranhão (UFMA) - Centro de Ciências
Exatas e Tecnologia - (CCET), Programa de Pós-Graduação em Química
(PPGQuim)

ESTELA MESQUITA MARQUES

**Desenvolvimento de Nanogéis Contendo Curcumina e Óleo Essencial da
Espécie *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae) como Terapia Combinada
para o controle de *Aedes aegypti* e Leishmaniose**

São Luís – MA

2025

ESTELA MESQUITA MARQUES

**Desenvolvimento de Nanogéis Contendo Curcumina e Óleo
Essencial da Espécie *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae) como Terapia
Combinada para o controle de *Aedes aegypti* e Leishmaniose**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em Química pelo
Programa de Pós-Graduação em Química -
(PPGQuim) da Universidade Federal do Maranhão.

Orientador: Prof. Dr. Renato Sonchini Gonçalves

São Luís – MA

2025

ESTELA MESQUITA MARQUES

**Desenvolvimento de Nanogéis Contendo Curcumina e Óleo
Essencial da Espécie *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae) como Terapia
Combinada para o controle de *Aedes aegypti* e Leishmaniose**

Aprovada em : 19/02/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Sonchini Gonçalves (Orientador-UFMA)

Profa. Dra. Ana Clecia Santos de Alcantara (UFMA)

Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa (PPGQ/UFAM)

São Luís - MA

2025

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a). Diretoria
Integrada de Bibliotecas/UFMA

Mesquita Marques, Estela.

Desenvolvimento de Nanogéis Contendo Curcumina e Óleo Essencial da Espécie *Pectis brevipedunculata* Asteraceae como Terapia Combinada para controle de *Aedes aegypti* e Leishmaniose / Estela Mesquita Marques. - 2025.

158 p.

Orientador(a): Renato Sonchini Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - Ma, 2025.

1. Nanogéis. 2. Óleo Essencial. 3. *Pectis Brevipedunculata*. 4. *Aedes Aegypti*. 5. Leishmaniose. I. Sonchini Gonçalves, Renato. II. Título.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais:

Nome: Estela Mesquita Marques

Naturalidade: São Luís/MA

Nacionalidade: Brasileira

Formação Acadêmica:

Graduação (2017-2021)

Licenciatura em Química – Universidade Estadual do Maranhão - Campus

Cidade Universitária Paulo IV

Pós-Graduação:

Especialização (2023)

Especialização em Ciências da Natureza, suas Tecnologias e o mundo do trabalho. (Carga Horária: 360h). Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.

Mestrado em andamento (2023-2025)

Mestrado em Química, realizado no Departamento de Química da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), tendo como orientador o Profº Dr. Renato Sonchini Gonçalves.

Título do Projeto: “Desenvolvimento de Nanogéis Contendo Curcumina e Óleo Essencial da Espécie *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae) como Terapia Combinada para controle de *Aedes aegypti* e Leishmaniose”.

TRABALHOS CIENTÍFICOS (2023-2024)

Resumos em congressos

Rocha, R. L.; **Marques E. M.**; Campos, L. M. O.; Da Costa, Camila Silva; Xavier, Júlia Karla Albuquerque Melo; Gonçalves, Renato Sonchini. Desenvolvimento de um nanogel nGF2002Ds contendo óleo essencial da espécie *Duguetia stelechantha* (Diels) R.E.Fr. como alternativa larvicida no combate ao *Aedes aegypti*. 2024. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Marques, E. M.; Campos, L. M. O.; Da Costa, Camila Silva; Xavier, Júlia Karla Albuquerque Melo; Costa, Emmanoel Vilaça; Souza, Melissa Pires; Correa, T.

G. S.; Mendonça, Caritas De Jesus Silva; Brandão, Clenilma Marques; Gonçalves, Renato Sonchini. Desenvolvimento de uma formulação larvicida nGF2002Pb contendo óleo essencial de *Pectis brevipedunculata* Sch.Bip.: uma alternativa eco-friendly no controle do *Aedes aegypti*. 2024. (Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil).

Marques, Estela Mesquita; Rocha, Raiene Lisboa; Andrade, L. G. S.; Da Costa, Camila Silva; Costa, Emmanoel Vilaça; Carvalho, Rafael Cardoso; Ribeiro, Rachel Melo; Gonçalves, Renato Sonchini. Desenvolvimento de um nanogel ecofriendly à base de óleo essencial de *Pectis brevipendunculata* (Asteraceae) para uso tópico com propriedades leishmanicidas e anti-inflamatórias. 2024. (II Simpósio Nacional em Ciências da Saúde e I Simpósio de Animais de Laboratório e Ciências da Saúde).

Andrade, Lucas George Santos; Sousa, Brendha Araújo; **Marques Estela Mesquita;** Xavier, Júlia Karla Albuquerque Melo; Ribeiro, Rachel Melo; Carvalho, Rafael Cardoso; Gonçalves, Renato Sonchini; Monteiro, O. S. Desenvolvimento De Formulações Líquidas Nanoestruturadas Com Copolímero Pluronic F127 Contendo Óleo Essencial De Pogostemon Cablin Para Aplicações Anti Inflamatória Em Modelo De Edema De Pata Em Camundongos. 2024. (II Simpósio Nacional em Ciências da Saúde e I Simpósio de Animais de Laboratório e Ciências da Saúde).

Rocha, R. L.; **Marques, Estela Mesquita;** Da Costa, Camila Silva; Almeida, J. M.; Brandão, Clenilma Marques; Gonçalves, Renato Sonchini. Desenvolvimento de um nanogel ecofriendly com óleo essencial da espécie *Duguetia stelechantha* como alternativa sustentável no controle larvicida do *Aedes aegypti*,. 2024. (Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil).

Marques E. M.; Rocha, R. L.; Campos, L. M. O.; Xavier, Júlia Karla Albuquerque Melo; Costa, Emmanoel Vilaça; Mendonça, Caritas De Jesus Silva; Gonçalves, Renato Sonchini. Desenvolvimento de Nanogéis Contendo Óleo Essencial da *Pectis brevipedunculata* com Potencial Leishmanicida. 2024. (EPQuim - Encontro de Pós graduação em Química UFMA IFMA).

Artigos derivados dessa dissertação

MARQUES, Estela Mesquita; ROCHA, Raiene Lisboa; BRANDÃO, CLENILMA Marques; XAVIER, Júlia Karla Albuquerque Melo; CAMARA, Marcos Bispo Pinheiro; MENDONÇA, Caritas De Jesus Silva; DE LIMA, Roberto Batista; SOUZA, Melissa Pires; COSTA, Emmanoel Vilaça; GONÇALVES, Renato Sonchini. Development of an Eco-Friendly Nanogel Incorporating *Pectis brevipedunculata* Essential Oil as a Larvicidal Agent Against *Aedes aegypti*. PHARMACEUTICS 1 , v. 16, p. 1337, 2024.

MARQUES, Estela Mesquita; ANDRADE, Lucas George Santos; ALENCAR, Luciana Magalhães Rabelo ; RATES, Erick Rafael Dias; RIBEIRO, Rachel Melo; CARVALHO, Rafael Cardoso; NUNES, Glécilla Colombelli de Souza ; LERA-NONOSE, Daniele Stéfanie Sara Lopes; GONÇALVES, Maria Júlia Schiavon ; LONARDONI, Maria Valdrinez Campana ; SOUZA, Melissa Pires ; COSTA, Emmanoel Vilaça ; GONÇALVES, Renato Sonchini. Nanotechnological Formulation Incorporating *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae) Essential Oil: An Ecofriendly Approach for Leishmanicidal and Anti-Inflammatory Therapy. Polymers , v. 17, p. 379, 2025.

CAMPOS, Lara Maria Oliveira; **Marques, Estela Mesquita** ; LERA-NONOSE, Daniele Stéfanie Sara Lopes; GONÇALVES, Maria Julia Schiavon; LONARDONI, Maria Valdrinez Campana; NUNES, Glécilla Colombelli De Souza; BRAGA, Gustavo ; GONÇALVES, Renato Sonchini . Enhanced Nanogel Formulation Combining the Natural Photosensitizer (Asteraceae) Photodynamic Curcumin and *Pectis brevipedunculata* Essential Therapy Oil in for Synergistic Leishmaniasis PHARMACEUTICS 2. , v. 17, p. 286, 2025.

Premiações

Melhor apresentação oral na categoria Química Orgânica com o trabalho: Desenvolvimento de Nanogéis Contendo Óleo Essencial da *Pectis brevipedunculata* com Potencial Leishmanicida. 2024. EPQuim - Encontro de Pós graduação em Química UFMA-IFMA.

*Aos meus amados filhos Ayan Levy
Marques Cantanhede e Nicolas
Otsuka da Silva Marques.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua infinita bondade, amor, graça, força, e proteção sem os quais nada seria realizado, ao seu refúgio constante em quem tenho buscado abrigo nos momentos difíceis.

Aos meus filhos Ayan Levy Marques Cantanhede e Nicolas Otsuka da Silva Marques, eles são a minha base e tudo que faço é por eles e para eles!

Ao meu orientador, Dr. Renato Sonchini Gonçalves pela paciência, carinho, confiança e disposição. Por ser uma pessoa maravilhosa, um exemplo de profissional. Tê-lo como orientador é uma grande honra e traz inspiração!

A minhas amigas do grupo de pesquisa Raiene Lisboa Rocha, Lara Maria Oliveira Campos, Thaíssa Gabrielle Silva Correa e Camila Silva da Costa pelas palavras, companhia e por terem me ajudado durante todo o curso. Aos meus colegas de laboratório Antônio Fernanda Lopes da Silva, Amanda de Jesus Alves Miranda, Auxiliadora Barata Lopes, Julia Karla de Albuquerque Melo Xavier, Aldilene da Silva Lima, Carla Janaína Rebouças Marques do Rosário, Lucas George Santos Andrade, por todo apoio e companhia.

A Profa. Ma. Clenilma Marques Brandão por ter gentilmente me recebido em seu laboratório para realizar os testes larvicidas e pelos ensinamentos.

A Profa. Dra. Cáritas Mendonça Brandão e seu grupo de pesquisa do Núcleo de Combustíveis e Catálise Ambiental (NCCA) da UFMA, pelas análises de CG-EM.

Ao Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa e seu grupo de pesquisa “Grupo de Estudo de Química de Biomoléculas do Laboratório de Produtos Naturais e Síntese Orgânica (LAPNASO) (GEQBiom)” da UFAM Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pelas análises de RMN e CG-EM realizadas na Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (CA/CAM/UFAM)

Às Profas. Dra. Maria Valdrinez Campana Lonardoni, Dra. Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera e o Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá da UEM, pelas análises *in vitro* frente a células promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Aos Profs. Dra. Rachel Melo Ribeiro e Dr. Rafael Cardoso Carvalho do biotério da UFMA, por terem me recebido com muito carinho em seu laboratório para realização dos testes *in vivo* em modelos de inflamação em patas de camundongos.

Em especial, a minha família, minha Mãe Francisca Sousa Mesquita e meu pai Edson Sousa Marques, pois se sou o que sou hoje é porque foram eles que sempre foram meu porto seguro. As minhas irmãs Stefane Mesquita Marques e Steliane Mesquita Marques que sempre estiveram comigo e me ajudaram com meus filhos. Ao meu companheiro Max Átilla Otsuka Sousa da Silva por me apoiar e cuidar dos nossos filhos durante minha ausência.

Gostaria de manifestar meus sinceros agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, cujo apoio tem sido essencial para o desenvolvimento de minha pesquisa e formação acadêmica.

RESUMO

Doenças tropicais negligenciadas como a leishmaniose tegumentar (LT), dengue, vírus Zika e Chikungunya, transmitidas por mosquitos, representam desafios significativos para a saúde pública em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. A LT, uma infecção parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, afeta a pele e as mucosas, causando lesões graves e debilitantes. Paralelamente, a rápida propagação e adaptação de vírus como a Dengue, Zika e Chikungunya ressalta a necessidade de desenvolvimento de produtos e métodos que permitam o controle, tratamento e, em alguns casos, a erradicação dessas doenças. Dessa forma, considerando a crescente resistência aos tratamentos convencionais e o alto custo dos medicamentos disponíveis atualmente para o tratamento dessas doenças, e considerando também a possibilidade de efeitos colaterais adversos, produtos à base de compostos naturais emergem como uma alternativa promissora aos métodos tradicionais de controle e tratamento. O óleo essencial da *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. (OEPb), popularmente conhecida como “capim-limão”, tem se destacado como uma alternativa natural com potencial larvicida, especialmente no controle de vetores como o *Aedes aegypti*, devido à sua composição química, rica em monoterpenos oxigenados como o geranial e o neral, com significativa atividade biológica, oferecendo uma abordagem sustentável e de baixo impacto ambiental em relação aos métodos tradicionais de controle vetorial. Neste trabalho, um nanogel eco-friendly à base dos polímeros plurônico F127 e carbopol 974P do OEPb (nGP) foi desenvolvido utilizando uma metodologia de baixo custo e livre de solventes orgânicos. O nGP apresentou boa estabilidade física e química, mediante os testes de estabilidade acelerada. Técnicas de caracterização (UV-Vis, FTIR, DLS, MEV e AFM) confirmaram a incorporação do OEPb na matriz do nGP, revelando o tamanho de partículas na escala nanométrica. Ensaio *in vitro* contra larvas de *A. aegypti* foram realizados e revelaram que na dose de 500 µg/mL do nGP, as taxas de mortalidade foram de 96,0% ± 7,0 após 24 h e 100,0% ± 0,0 após 48 h. O grupo de controle positivo tratado com temefós (100,0 µg/mL) alcançou 100% de mortalidade em

ambos os momentos, validando as condições experimentais e fornecendo uma referência para avaliar a eficácia do produto proposto. A atividade leishmanicida *in vitro* foi avaliada em promastigotas de *Leishmania amazonensis*, e os efeitos anti-inflamatórios *in vivo* foram avaliados usando um modelo de edema de pata de camundongos. *In vitro*, nGF4 (nanogel carregado com OEPb) demonstrou atividade leishmanicida significativa, com taxas de mortalidade de promastigotas excedendo 80% em 24 h e 90% em 48 h. *In vivo*, nGF2, nGF3 e nGF4 exibiram efeitos anti-inflamatórios, com nGF3 e nGF4 reduzindo edema em 62,7% em 2 h pós-tratamento. O nanogel vazio (nGF0) mostrou atividade anti-inflamatória mínima. Neste estudo, também foi desenvolvido um segundo nanogel (nGPC) com a incorporação de dois princípios ativos: OEPb e curcumina, a partir da otimização da formulação nGP. O nGPC apresentou boa estabilidade física e química, mediante os testes de estabilidade acelerada. Técnicas de caracterização (FTIR, DLS, MEV, AFM e Reologia) confirmaram a incorporação do OEPb na matriz do nGPC, revelando tamanho de partículas na escala nanométrica. Ensaio *in vitro* contra *Leishmania (Leishmania) amazonensis* também foram realizados para o nGPC, e para os princípios ativos puros: OEPb e curcumina. Os resultados demonstraram que o nGPC aumentou significativamente a atividade antipromastigota em comparação com Curcumina livre e OEPb. Na concentração mais alta testada (50,0 µg/mL OEPb e 17,5 µg/mL Curcumina), nGPC induziu mais de 88% de mortalidade em promastigotas *LLa* ao longo de 24, 48 e 72 h, indicando eficácia sustentada. Mesmo em concentrações mais baixas, nGPC manteve atividade dependente da dose, sugerindo um efeito sinérgico entre Curcumina e OEPb. Esses resultados evidenciam o potencial de nGP e nGPC como um nanocarregador inovador para o tratamento alternativo contra leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: Nanogéis, Óleo essencial, *Pectis brevipedunculata*, *Aedes aegypti*, Leishmaniose.

ABSTRACT

Transient diseases such as cutaneous leishmaniasis (TL), dengue, Zika virus and Chikungunya, transmitted by mosquitoes, represent significant challenges to public health worldwide, especially in tropical and subtropical regions. TL, a parasitic infection caused by protozoa of the genus *Leishmania*, affects the skin and mucous membranes, causing severe and debilitating lesions. At the same time, the rapid spread and adaptation of viruses such as dengue, Zika and Chikungunya highlight the need to develop products and methods that allow the control, treatment and, in some cases, eradication of these diseases. Thus, considering the growing resistance to conventional treatments and the high cost of drugs currently available for the treatment of these diseases, and also considering the possibility of adverse side effects, products based on natural compounds emerge as a promising alternative to traditional methods of control and treatment. The essential oil of *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. (OEPb), popularly known as lemongrass, has stood out as a natural alternative with larvicidal potential, especially in the control of vectors such as *Aedes aegypti*, due to its chemical composition, rich in oxygenated monoterpenes such as geranial and neral, with significant biological activity, offering a sustainable approach with low environmental impact compared to traditional vector control methods. In this work, an ecological nanogel based on pluronic polymers F127 and carbopol 974P of OEPb (nGP) was developed using a low-cost methodology free of organic solvents. The nGP showed good physical and chemical stability through accelerated stability tests. Characterization techniques (UV-Vis, FTIR, DLS, SEM and AFM) confirmed the incorporation of OEPb in the nGP matrix, revealing particle size in the nanometric scale. *In vitro* assays against *A. aegypti* larvae were performed and revealed that, at a dose of 500 µg/mL of nGP, mortality rates were 96.0% ± 7.0 after 24 h and 100.0% ± 0.0 after 48 h. The positive control group treated with temephos (100.0 µg/mL) achieved 100% mortality at both time points, validating the experimental conditions and providing a reference to evaluate the efficacy of the proposed product. The *in vitro* leishmanicidal activity was evaluated in *Leishmania*

amazonensis promastigotes, and the *in vivo* anti-inflammatory effects were assessed using a mouse paw edema model. *In vitro*, nGF4 (EOPb-loaded nanogel) demonstrated significant leishmanicidal activity, with promastigote mortality rates exceeding 80% at 24 h and 90% at 48 h. *In vivo*, nGF2, nGF3, and nGF4 exhibited anti-inflammatory effects, with nGF3 and nGF4 reducing edema by 62.7% at 2 h post-treatment. The empty nanogel (nGF0) showed minimal anti-inflammatory activity. In this study, a second nanogel (nGPC) was also developed with the incorporation of two active ingredients: OEPb and curcumin, from the optimization of the nGP formulation. nGPC showed good physical and chemical stability through accelerated stability tests. Characterization techniques (FTIR, DLS, SEM, AFM, and Rheology) confirmed the incorporation of OEPb into the nGPC matrix, revealing particle size in the nanometric scale. *In vitro* assays against *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* were also performed for nGPC, and for the pure active ingredients: OEPb and curcumin. The results demonstrated that nGPC significantly increased the antipromastigote activity compared to free curcumin and OEPb. At the highest concentration tested (17.5 µg/mL OEPb and 50.0 µg/mL Curcumin, nGPC induced more than 88% mortality in *LLa* promastigotes over 24, 48 and 72 h, showing sustained efficacy. Even at lower concentrations, nGPC has dose-dependent activity, providing a synergistic effect between Curcumin and OEPb. These results highlight the potential of nGP and nGPC as an innovative nanocarrier for alternative treatment against leishmaniasis itself.

Keywords: Nanogels, Essential oil, *Pectis brevipedunculata*, *Aedes aegypti*, Leishmaniasis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

974p - Carbopol 974P

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APE - Alil pentaeritritol

AS - Alginato de sódio

CMC - Concentração micelar crítica

DH - Diâmetros hidrodinâmicos médios

DLS - Espalhamento Dinâmico de Luz

DOX – Doxorubicina

DTNs - Doenças tropicais negligenciadas

EMA - Agência Europeia de Medicamentos

EP - Emulsão de Pickering

F127 - Pluronic F127

FTIR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

HLB - Equilíbrio hidrofílico-lipofílico

IFA - Ingredientes farmacêuticos ativos

LT – Leishmaniose Tegumentar

LV - Leishmaniose Visceral

nG - Nanogel composto por F127,974p e água

nGP - Nanogel composto por F127, 974p e água carregado com *OEPb*

nGPC - Nanogel composto por F127, 974p e água carregado com *OEPb* e *Curcumina*

OEPb - Óleo essencial de *Pectis brevipedunculata*

OE(s) - Óleo Essencial ou Óleos Essenciais

OMS - Organização Mundial de Saúde

ONU - Organização das Nações Unidas

P. brevipedunculata – *Pectis brevipedunculata*

PEO - Poli (óxido de etileno)

Ph. Eur - Farmacopeia Europeia

PPO - Poli (óxido de propileno)

RTA - Refletância Total Atenuada

SP1049C - Mistura de plurônico L61 e F127 carregados com doxorubicina

USP - Farmacopéia dos Estados Unidos

UV-Vis - Espectroscopia de Absorção Ultravioleta Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: À esquerda- Flebotomíneo picando um hospedeiro mamífero: Quando um mosquito infectado realiza o repasto sanguíneo a um hospedeiro, os parasitas do gênero *Leishmania* que estão presentes na sua saliva são injetados na corrente sanguínea. À direita- Ferida cutânea desenvolvida em um hospedeiro e as representações das formas amastigota, arredondada (inferior) e promastigota, flagelada (superior)..... 24

Figura 2: Representação química das estruturas dos medicamentos Anfotericina B, Glucantime e Pentamidina, utilizados para tratar a Leishmaniose..... 27

Figura 3: Ciclo de vida do mosquito *A. aegypti*: O primeiro estágio corresponde à fase ovular, seguida pelo segundo estágio, onde ocorre o desenvolvimento larval. Essa fase larval é subdividida em quatro instares (L1-L4), ao longo dos quais a larva passa por sucessivas mudas antes de atingir o terceiro estágio, que corresponde à fase de pupa. A pupa, por sua vez, evolui para o quarto e último estágio, no qual ocorre a emergência do mosquito adulto.....29

Figura 4: Fotografias da espécie *Pectis brevipedunculata* e representações das estruturas químicas de seus principais constituintes, pertencentes à classe dos monoterpenos..... 31

Figura 5: Fotos da esquerda para direita: *Curcuma longa*, rizoma e extrato de curcuma. Abaixo, a representação química estrutural da molécula de curcumina..... 32

Figura 6: Fotografia do nanogel nGPb, acompanhada de uma representação esquemática da estrutura química, bem como das técnicas empregadas na primeira parte deste trabalho para caracterizar a composição química do OEPb e sua incorporação na matriz do gel. Também inclui a representação da avaliação *in vitro* de seu potencial larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*.... 36

Figura 7: Coeficiente de incidência de casos prováveis por 100 mil habitantes, no ano de 2024. Dados retirados do portal do Ministério da Saúde (<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses>)... 39

Figura 8: Registros de ocorrência da espécie *P. brevipedunculata* nos estados brasileiros, com destaque para o estado do Maranhão (MA), onde a coleta da espécie foi realizada na capital, São Luís, no campus da Universidade Federal do Maranhão, nas coordenadas geográficas (2°33'20.5"S, 44°18'32.7"W)..... 43

Figura 9: Representação química estrutural do copolímero F127 e seu processo de auto organização em micelas acima ou próximas dos valores de CMC e/ou TMC. A figura destaca a região central, ou “core micelar”, onde fármacos hidrofóbicos podem se acomodar e ser transportados ao alvo terapêutico..... 48

Figura 10 - Representação química estrutural do polímero 974p.....50

Figura 11: Sequência experimental para o procedimento de extração por hidrodestilação do OE a partir da espécie *P. brevipedunculata* envolveu as etapas sequenciais de secagem ao ar do material vegetal, trituração e hidrodestilação sob condições controladas. O rendimento do OEPb foi de 0,81%, e o óleo coletado foi armazenado adequadamente para análise subsequente..... 56

Figura 12: Ilustração esquemática da sequência experimental para preparação do nGP. Os procedimentos de química verde são apresentados nas etapas experimentais..... 58

Figura 13: Cromatograma obtido por CG-EM do OEPb evidenciando os picos dos componentes majoritários: (A)geranial, (B)citral, (C) α -pineno e (D)limoneno..... 62

Figura 14: Monoterpenos encontrados nos óleos de *Pectis* e sua relação biossintética, envolvendo interconversão por reações de isomerização, ciclização, hidroxilação e aromatização. (1) Nerol, (2) neral, (3) geranial, (4) geraniol, (5) cuminaldeído, (6) perilaldeído, (7) limoneno, (8) p-cimeno, (9) timol, (10) α -pineno, (11) carvona e (12) β -pineno (Massing et al., 2021; Camara et al., 2023)..... 64

Figura 15: Região ampliada dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C (abaixo) adquiridos para o OEPb em CDCl_3 66

Figura 16: Fotos das formulações de nanogel preparadas com diferentes composições % (m/m) de F127, 974p, H_2O e OEPb de acordo com a Tabela 4. (A) GF1-GF4 apresentam formulações estáveis; (B) GF5 a GF8 exibem separação de fases; (C) GF9 e GF10 mostram separação de fases, e GF11 exibe estabilidade na forma de uma nanoemulsão. (D) O comportamento termorresponsivo foi demonstrado para a formulação GF4..... 69

Figura 17: Espectros de FT-IR dos materiais puros (A) Óleo Essencial da *P. brevipedunculata* (OEPb), (B) Plurônico F127 (F127), (C) Carbopol 974p (974p) entre 4000-2500 cm^{-1} e (D) 974p entre 2500 a 690 cm^{-1} 75

Figura 18 - Espectros de FTIR dos nanogéis (A) nG e (B) nGP..... 76

Figura 19: Distribuição do tamanho de partículas em condições de (A) alta diluição, mostrando um Dh de 30,18 nm e PDI de 0,54, e (B) (D) potencial ϑ de -1,6 mV. Em condições de baixa diluição (C) o valor de Dh é alterado para 429,3 nm, e PDI de 0,27 e (D) sem alteração significativa no valor do potencial ϑ 78

Figura 20: Concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ para larvas de *A. aegypti*. Após 24 h de tratamento com o nanogel nGP, a CL₅₀ foi de 199,5 ± 5,6 µg/mL e a CL₉₀ foi de 392,0 ± 16,6 µg/mL, com um R2 de 0,9992. Após 48 h de tratamento, a CL₅₀ diminuiu para 184,5 ± 8,2 µg/mL e a CL90 para 253,4 ± 7,6 µg/mL, com um R2 de 0,9989..... 82

Figura 21: Curvas de Força AFM. (A) Mapa topográfico da amostra, exibindo contrastes distintos para regiões mais altas (áreas mais claras) e regiões mais baixas (áreas mais escuras). O ponto 1 (Pt 1) corresponde à região específica onde a curva de força foi adquirida. (B) Curva de força representativa obtida do Ponto 1 na imagem A, ilustrando os ciclos de aproximação (azul) e retração (vermelho). Os índices ao longo da curva destacam os estágios distintos da interação sonda-amostra, conforme detalhado nas inserções gráficas: (1) a sonda está distante da superfície da amostra, (2) a sonda estabelece contato com a superfície da amostra, (3) o regime linear da curva durante a indentação, (4) a resistência máxima observada durante a separação sonda-amostra, (5) a sonda se retrai da amostra e (6) o ciclo de aproximação-retração conclusivo..86

Figura 22: Esquema da sequência experimental para avaliação *in vivo* do potencial anti-inflamatório de nanogéis..... 87

Figura 23: Micrografias MEV de nG com ampliação de 1000x (A), 2000x (B) e (C) e 5000x (D) após o processo de liofilização..... 89

Figura 24: Micrografias MEV de nGP em uma ampliação de 500x (A), 1000x (B), 2000x (C) e 5000x (D) após o processo de liofilização. As micrografias MEV mostram regiões planas bem definidas com a ausência de poros..... 90

Figura 25: Micrografias MEV de nGP em uma ampliação de 1000x (A), 2000x (B) e (C) e 5000x (D) após o processo de liofilização. As micrografias MEV mostram planos espessos organizados em camadas..... 90

Figura 26: Mapas topográficos AFM do nanogel nG. (A) Setas amarelas indicam estruturas esféricas formadas por micelas F127, com altura média de 108,74 ± 19,41 nm (n = 19), e setas verdes indicam regiões planas com altura média de 5,92 ± 3,00 nm (n = 15). (B) e (D) Micrografias 3D expandidas mostrando as estruturas esféricas em detalhes. (C) Estruturas micelares cúbicas formadas por processos agregacionais de micelas F127..... 92

Figura 27: Mapas de módulo de Young (A) e (B) e mapas de força de adesão

(C) e (D) foram adquiridos para os diferentes domínios observados no nG..... 94

Figura 28: Mapas AFM topográficos do nanogel nGP. (A) Setas vermelhas indicam estruturas planas formadas pela presença de EOPb na superfície da matriz nG, com altura média de $7,39 \pm 0,79$ nm ($n = 17$). (B) Setas verdes indicam a incorporação de EOPb nas estruturas micelares F127 e nos poros do material nG, com valores médios de altura de $1,37 \pm 0,21$ nm ($n = 20$) e tamanho de $40,58 \pm 7,98$ nm ($n = 20$). (C) e (D) Micrografias 3D mostrando as estruturas planas do nGP..... 95

Figura 29: Mapas do módulo de Young (A) e (B) e forças de adesão (C) e (D) adquiridos para o nanogel nGP..... 96

Figura 30: (A) atividade leishmanicida *in vitro* da formulação de nanogel (nGF4) demonstrando concentração e eficácia dependente do tempo contra LLa ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dunn). (B) Imagens representativas de culturas de *Leishmania* tratadas com a formulação de nanogel (nGF4): (a) Cultura não tratada após 24 horas. (b) Cultura tratada com o nanogel (nGF0) por 24 horas. (c–h) Culturas tratadas com OEPb em concentrações de 2,2, 1,1, 0,55, 0,28, 0,14 e 0,07 mg/mL, respectivamente, por 24 h. (i) Cultura não tratada após 48 h. (j) Cultura tratada com nGF0 por 48 h. (k–p) Culturas tratadas com OEPb em concentrações de 2,2, 1,1, 0,55, 0,28, 0,14 e 0,07 mg/mL, respectivamente, por 48 h..... 98

Figura 31: A) Ação anti-inflamatória tópica de nanogéis em um modelo experimental de edema de pata em camundongos ($p < 0,05$, ANOVA, teste de Tukey). B) Fotografias das patas dos Camundongos durante a realização do experimento para o nanogel nGF3 (possui 0,5% de OEPb)..... 100

Figura 32: Esquema da preparação do nGPC com adição de curcumina à solução sob condições controladas de temperatura, garantindo a sua dispersão uniforme na matriz polimérica..... 103

Figura 33: Fotos das formulações de nanogel preparadas com diferentes composições % (m/m) de F127, 974p, H₂O, OEPb e Curcumina de acordo com a Tabela 7..... 108

Figura 34: Formulação nGPC, evidenciando o comportamento termorresponsivo: (A) formulação à temperatura de 15°C com transição sol-gel e (B) formulação gel à temperatura de 27°C..... 109

Figura 35: Espectros de FTIR do nanogel nGPC entre 4000-2500 cm⁻¹ e (D) 974p entre 2500 a 690 cm⁻¹..... 110

Figura 36. Gráficos de Dif (μm²/s) em função de T (K): (A) nG e (B) nGPC... 114

Figura 37. Gráfico de $\Delta G_d^\#$ em função da temperatura para nG e nGPC..... 117

Figura 38: Micrografias MEV de nanogéis após o processo de liofilização: (A) e (B) nG em ampliações de 1000× e 5000×, respectivamente; (C), (D), (E) e (F) nGPC em ampliações de 200×, 500×, 1000× e 2000×, respectivamente..... 119

Figura 39: Comportamento reológico da amostra nGPC em temperaturas variáveis: (A) comportamento do fluido newtoniano a 5°C com uma curva de tensão de cisalhamento linear versus taxa de cisalhamento; (B) comportamento de afinamento por cisalhamento a 25°C, demonstrando diminuição da viscosidade com aumento da taxa de cisalhamento; (C) padrão tixotrópico pronunciado a 32°C, com redução da viscosidade e recuperação estrutural incompleta após cisalhamento. As curvas demonstram a resposta dinâmica do nanogel às forças de cisalhamento, destacando sua adequação para aplicações tópicas; (D) imagem real do nanogel nGPC durante a transição sol-gel, mostrando sol a 5°C e gel a 25°C. As curvas demonstram a resposta dinâmica do nanogel às forças de cisalhamento, destacando sua adequação para aplicações tópicas..... 121

Figura 40: Mortalidade *in vitro* de células promastigotas LLa em resposta a diferentes concentrações da formulação de nanogel nGPC em três pontos de tempo (24, 48 e 72 h). As concentrações C1-C4 representam a combinação de (curcumina/OEPb) da seguinte forma: C1 = 50:17,5, C2 = 25:8,75, C3 = 12,5:4,38, e C4=6,65:2,19 (µg/mL). Os dados indicam um aumento dependente da dose na mortalidade celular, com as maiores concentrações induzindo mais de 88% de mortalidade em todos os pontos de tempo..... 124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise de CG-EM de OEPb: Índice de retenção(IR), Fórmula molecular(FM) e porcentagem relativa (%).....	58
Tabela 2- Dados de RMN para ^1H e ^{13}C (500,13 e 125,76 MHz, respectivamente; CDCl_3) dos compostos majoritários neral e geranial presentes no OEPb e comparação com dados da literatura. (δ) deslocamento químico..	61
Tabela 3 - Dados de RMN para ^1H e ^{13}C (500,13 e 125,76 MHz, respectivamente; CDCl_3) dos compostos majoritários α -pineno e limoneno presentes no OEPb e comparação com dados da literatura. (δ) deslocamento químico.....	62
Tabela 4 - Diferentes composições % (m/m) dos componentes dos nanogéis vazios (nG): plurônico F127, carbopol 974P e água.....	63
Tabela 5 - Diferentes composições % (p/p) de OEPb e água foram incorporadas à formulação nG para atingir GF1 a GF11.....	65
Tabela 6: Eficácia do efeito larvicida do nGP contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> em 24 e 48 h pós-tratamento representada em % de mortalidade $\pm$ Desvio Padrão (DP) para um n = 10.....	74
Tabela 7: Diferentes composições (% m/m) de Curcumina e água foram incorporadas à base da formulação nGP para atingir nGPC1 a nGPC5 e nGFPCIC50.....	100
Tabela 8: Medidas de DLS em função da temperatura para os nanogéis nG e nGP. As medidas foram realizadas em quintuplicata, e os resultados estão expressos como média $\pm$ SD.....	102
Tabela 9. Parâmetros termodinâmicos do processo difusional para nG e nGPC..	109

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas.....	26
1.2 A Leishmaniose: Causa e Tratamento.....	26
1.3 Arboviroses Urbanas e o Ciclo de Vida do <i>Aedes aegypti</i>	30
1.4 Flora Maranhense como Fonte de Medicamentos Naturais.....	33
1.5 Curcumina um produto natural eficiente no tratamento de DTNs.....	34
1.6 Polímeros em Bloco como Sistemas Drug-delivery.....	36
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	40
2.1 Doenças tropicais negligenciadas (DTNs).....	40
2.2 As DTNs no Brasil.....	41
2.3 A necessidade de novos medicamentos para DTNs.....	42
2.4 Plantas medicinais como tratamento alternativo de DTNs.....	43
2.5 Família Asteraceae e o Gênero <i>Pectis</i>	44
2.6 Óleo Essencial da Espécie <i>P. brevipedunculata</i>	47
2.7 <i>Curcuma longa</i> L.....	48
2.8 Nanoformulações Copoliméricas.....	50
2.9 Polímero Carbopol 974p: Versatilidade e Aplicações Farmacêuticas....	52
3 OBJETIVOS.....	54
3.1 Objetivo Geral.....	54
3.2 Objetivos Específicos.....	54
4 Desenvolvimento do Nanogel nGP e Avaliação do seu Potencial Cito-tóxico contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>.....	56
4.1 Materiais e Métodos.....	57
4.1.1 Materiais.....	57
4.1.2 Coleta e identificação do material vegetal.....	57
4.1.3 Hidrodestilação do OEPb.....	57
4.1.4 Determinação do Rendimento da Extração OEPb.....	58
4.1.5 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas CG-EM).....	59
4.1.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	59
4.1.7 Desenvolvimento das formulações Nanogéis.....	60
4.1.8 Ensaios de Estabilidade dos Nanogéis.....	61
4.1.9 Análise de Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).....	62
4.1.10 Análises Espectroscopia de Absorção Ultravioleta Visível (UV-Vis).....	62
4.1.11 Análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	62
4.2.12 Teste <i>in vitro</i> Frente a Larvas de <i>A. aegypti</i>	62
4.2.13 Análise Estatística.....	63

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4.2.1 Determinação do Rendimento do OEPb.....	63
4.2.2 Caracterização do OEPb por CG-EM.....	64
4.2.3 Caracterização do OEPb por RMN.....	68
4.2.4 Desenvolvimento dos nanogéis vazios (nG).....	70
4.2.5 Desenvolvimento de nanogéis carregados com OEPb.....	72
4.2.6 Ensaio de Estabilidade Acelerada das Formulações nGF1–nGF4.....	73
4.3 Caracterizações do Nanogel nGP.....	75
4.3.1 Caracterização por CG-EM e UV-Vis.....	75
4.3.2 Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	76
4.3.3 Caracterização por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	79
4.3.4 Ensaios <i>in vitro</i> do nGP Contra Larvas de <i>A. aegypti</i>	81
5 Formulação nanotecnológica incorporando óleo essencial de <i>Pectis brevipedunculata</i> (Asteraceae): uma abordagem ecologicamente correta para terapia leishmanicida e anti-inflamatória.....	86
5.1 Materiais e Métodos.....	87
5.1.1 Materiais.....	87
5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	87
5.1.3 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	87
5.1.4 Ensaio <i>in vitro</i> contra promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (LLa).....	89
5.1.5 Avaliação <i>in vivo</i> da Atividade Anti-Inflamatória dos Nanogéis.....	89
5.1.6 Análise Estatística.....	91
5.2 Resultados e Discussão.....	91
5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	91
5.2.2 Análise de Microscopia de Força Atômica (AFM).....	94
5.2.3 Atividade Leishmanicida <i>in vitro</i> do Nanogel.....	99
5.2.4 Avaliação <i>in vivo</i> do Potencial Anti-inflamatório dos Nanogéis.....	101
6 Formulação aprimorada de um nanogel combinando curcumina e óleo essencial de <i>Pectis brevipedunculata</i> (Asteraceae) para terapia sinérgica contra leishmaniose.....	104
6.1.1 Materiais e Métodos.....	104
6.1.2 Desenvolvimento da Formulação nGPC.....	105
6.1.3 Ensaio de Estabilidade das Formulações Nanoestruturadas.....	106
6.1.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	106
6.1.5 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	106
6.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	108
6.1.7 Análise Reológica.....	108
6.1.8 Ensaio <i>in vitro</i> Contra Promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (LLa).....	109

6.1.9 Análise Estatística.....	109
6.2 Resultados e Discussão.....	110
6.2.1 Preparo da formulação nGPC.....	110
6.2.2 Ensaio de Estabilidade da Formulação nGPC.....	111
6.2.3 Análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	112
6.2.4 Análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	113
6.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	120
6.2.6 Análise de Reologia.....	122
6.2.7 Atividade Leishmanicida <i>in vitro</i> do Nanogel.....	124
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	128
8 REFERÊNCIAS.....	130
10 APÊNDICE.....	143

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um grupo de doenças infecciosas que afetam predominantemente populações pobres em regiões tropicais e subtropicais, causadas por vírus, bactérias, parasitas e vermes. Dentre as DTNs mais destacadas estão a dengue, chikungunya, zika vírus e a leishmaniose, todas com impactos devastadores em populações vulneráveis (Ministério da Saúde, 2024). Somente no ano de 2024, o Brasil registrou mais de 2 milhões de casos de dengue e 107.528 mil casos de chikungunya em todo o país, sendo considerado um dos maiores números já registrados desde o início do monitoramento nos anos 2000 (Brasil, 2024).

Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil em 2023, foram registrados aproximadamente 13 mil casos de leishmaniose tegumentar (LT) e 2 mil casos de leishmaniose visceral (LV), localizados, especialmente, nas regiões do Norte e Nordeste (Brasil, 2024). Até o momento, não há vacina para uso humano contra essa infecção parasitária e o tratamento disponível apresenta efeitos colaterais significativos, contribuindo para a alta taxa de abandono do tratamento e o surgimento de cepas resistentes. O elevado índice dessas DTNs representa um grande desafio para a saúde pública devido à sobrecarga nos sistemas de saúde, especialmente nas regiões mais afetadas. A alta incidência dessas doenças implica em custos significativos para o tratamento, além do impacto direto na qualidade de vida das populações afetadas.

1.2 A Leishmaniose: Causa e Tratamento

A leishmaniose é uma doença infecciosa endêmica, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae. A transmissão ocorre através da picada de fêmeas de mosquitos flebotomíneos, popularmente conhecidos como mosquito-palha, birigui ou tatuquira (Fig. 1). Durante o

repasto sanguíneo, o mosquito inocula no hospedeiro a forma promastigota do parasita (estágio infeccioso), que, uma vez dentro das células fagocíticas do hospedeiro, transforma-se em amastigota (estágio tecidual), multiplicando-se e infectando outras células (Talismi, Zahedifard e Rafati, 2018). A leishmaniose pode se manifestar de duas formas principais: visceral (LV) e tegumentar (LT). Na forma tegumentar, as lesões são caracterizadas por úlceras avermelhadas de bordas elevadas que, se não tratadas, podem evoluir para deformações graves e infecções secundárias causadas por bactérias oportunistas, como *Staphylococcus aureus* (Vera *et al.*, 2001).



Figura 1: À esquerda- Flebotomíneo picando um hospedeiro mamífero: Quando um mosquito infectado realiza o repasto sanguíneo a um hospedeiro, os parasitas do gênero *Leishmania* que estão presentes na sua saliva são injetados na corrente sanguínea. À direita- Ferida cutânea desenvolvida em um hospedeiro e as representações das formas amastigota, arredondada (inferior) e promastigota, flagelada (superior).

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil, a forma tegumentar é a mais comum da leishmaniose (Brasil, 2022). Também conhecida como úlcera de Bauru, nariz de tapir, botão do Oriente e ferida brava, a LT é caracterizada pela formação de úlceras avermelhadas, únicas ou múltiplas, com bordas elevadas nas mucosas e na pele. A evolução da doença pode resultar em ulcerações destrutivas nas cavidades nasal, faringe e laringe, levando a deformações graves, configurando a forma mucocutânea (Fig. 1). Entre 2001 e 2021, nas Américas, foram registrados 1.105.545 casos de leishmaniose cutânea (LC) e 69.665 novos casos de LV, com uma média anual de 2.488 casos e uma taxa de letalidade de cerca de 8%, considerada a mais alta em comparação com outros continentes (OPAS, 2022).

O tratamento da leishmaniose possui um custo elevado, tornando-se inacessível para grande parte da população de baixa renda. Os medicamentos utilizados para tratar essa doença possuem preços elevados, além dos custos adicionais com exames, consultas médicas e internações em casos graves. Em muitos países endêmicos, como no Brasil, onde a doença afeta principalmente populações vulneráveis, o acesso ao tratamento depende de programas públicos de saúde. No entanto, a oferta nem sempre é suficiente, e a falta de investimentos em alternativas terapêuticas acessíveis agrava a situação. Sem assistência governamental, o alto custo do tratamento deixa muitos pacientes sem opções, perpetuando o ciclo de pobreza e doença.

Além disso, o surgimento de resistência aos medicamentos convencionais torna urgente o desenvolvimento de terapias alternativas mais eficazes e acessíveis para tratar as feridas causadas pela LT, especialmente para as populações mais afetadas. Atualmente, o tratamento é realizado com antimoniatos de *N*-metil-glucamina (Glucantime®), anfotericina B e pentamidina (Fig. 2). No Brasil, o glucantime é utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose. Esse composto é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da *N*-metil-glucamina. Devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na terapia e consequente aumento das formas resistentes de parasitas (Balaña-Fouce et al., 1998). O glucantime é rapidamente absorvido e excretado nas primeiras 48h pelos rins após administração endovenosa ou intramuscular, o que faz com que seja necessária a administração de doses elevadas do fármaco para obter a eficácia do tratamento (Rath et al., 2003). Assim, consequentemente causando efeitos colaterais como toxicidades cardíaca, hepática, pancreática, renal e do sistema músculo-esquelético (Neves et al., 2011). O mecanismo de ação e a eficácia terapêutica do glucantime ainda não é bem conhecido, estudos sugerem que o antimônio pentavalente (glucantime) possa ser uma pró-droga, que é convertido metabolicamente a antimônio trivalente após sua administração (Roberts; McMurray e Rainey, 1998), e que assim possa interferir no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando à uma depleção dos níveis de ATP intracelular (Balaña-Fouce et al., 1998).

A anfotericina B é um antibiótico antifúngico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, sendo indicada como segunda opção para o tratamento da LT (Neves *et al.*, 2011). Ele interage com o ergosterol da membrana celular, formando poros que alteram a permeabilidade celular e o balanço iônico, causando a morte da célula parasitária (Rath *et al.*, 2003). Entretanto, pode ligar-se também ao colesterol presente na membrana plasmática das células do hospedeiro, causando boa parte dos efeitos tóxicos (Filippin e Souza, 2006). Os efeitos colaterais mais frequentes são: febre, cefaléias, náuseas, vômitos, hiporexia, tremores, calafrios, flebite, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia e alteração da função renal (BRASIL, 2011).

Quanto à pentamidina, ela é um derivado sintético da amidina, considerada uma droga de segunda escolha para tratar a leishmaniose. Existem poucos trabalhos na literatura disponíveis e o mecanismo de ação dessa droga ainda não foi totalmente elucidado. Estudos sobre o mecanismo de ação sugerem que a pentamidina atua ligando-se ao DNA e inibindo sua síntese, o que leva à disfunção celular, especialmente nas células do hospedeiro (Lima *et al.*, 2007). Em outro estudo publicado por Neves *et al.* (2011), eles sugerem que o mecanismo de ação da pentamidina ocorreria por inibição de diferentes processos celulares, ainda não totalmente elucidados. Em análises ultraestruturais da infecção por *Leishmania amazonensis* na presença de pentamidina (*in vitro*) revelaram danos significativos à mitocôndria, incluindo ruptura extensa, fragmentação da membrana e das cristas mitocondriais, além disso, observou-se a inibição da diferenciação de amastigotas em promastigotas, evidenciando o impacto da pentamidina na morfologia e no ciclo de vida do parasito (Croft *et al.*, 1982). Ademais, ela também pode causar efeitos adversos, como distúrbios cardíacos e renais.

Com dosagens estabelecidas pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde 2007). A Resolução nº 1/2020 da Anvisa dispõe sobre o preço máximo dos medicamentos a ser praticado em farmácias e drogarias (preço final ao consumidor), além de outras providências. Nos termos da resolução, e, considerando a atualização de Novembro de 2022 da Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos- (CMED), o preço máximo médio praticado para o Glucantime® é de R\$ 599,14 (50 ampolas; dose diária de 1-3 ampolas por dia)

e para anfotericina B de R\$ 1.121,52 (50mg-25 ampolas, dosagem recomendada de 15 mg/kg/dia). Da análise, fica claro que um indivíduo portador de leishmaniose representa uma despesa diária ao SUS que varia de R\$ 12,00 (Glucantime®) a R\$ 6.726,00 (Anfotericina B). Contudo, também fica às expensas do sistema público de saúde custo de intervenção médica/hospitalar para administração dos medicamentos devido aos efeitos adversos severos.

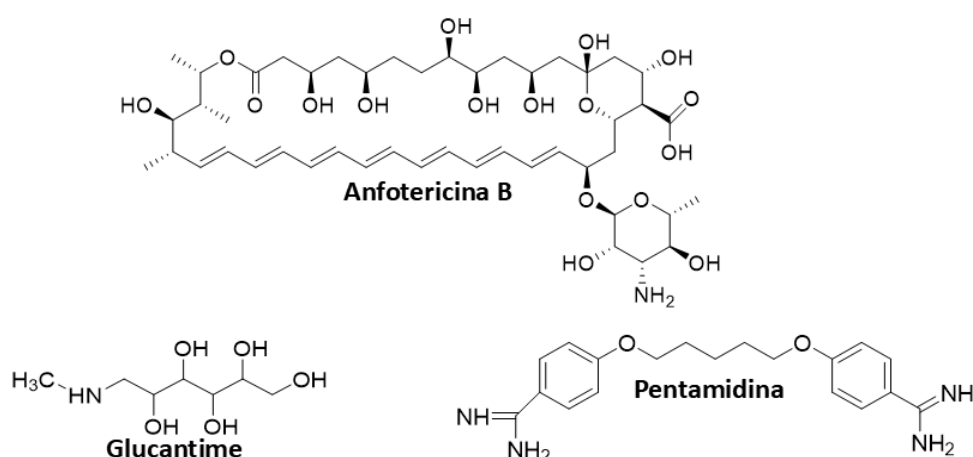


Figura 2: Representação química das estruturas dos medicamentos Anfotericina B, Glucantime e Pentamidina, utilizados para tratar a Leishmaniose.

Somado a esta problemática terapêutica, até o momento, não existe vacina de uso humano para esta parasitose e o tratamento apresenta severos efeitos colaterais, fato que colabora para alta taxa de abandono precoce do tratamento e consequente desenvolvimento de cepas resistentes. Estes dados demonstram a falha na prevenção e tratamento da leishmaniose e de outras doenças negligenciadas, justificando, assim, a importância e a necessidade de buscar estratégias mais eficazes e acessíveis à população, como por exemplo, medicamentos fitoterápicos com potencial leishmanicida bem como, o desenvolvimento de materiais avançados tecnológicos de alta eficácia.

1.3 Arboviroses Urbanas e o Ciclo de Vida do *Aedes aegypti*

As arboviroses urbanas, como dengue, zika, chikungunya e febre amarela, representam um significativo desafio à saúde pública, sendo

responsáveis por surtos devastadores em áreas densamente povoadas. Transmitidas principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti* (*A. aegypti*), essas doenças não apenas afetam a saúde humana, mas também sobrecarregam os sistemas de saúde em regiões urbanas e rurais (Rodrigues, 2024). Originalmente nativo da África, o *A. aegypti* adaptou-se com eficiência a ambientes urbanos, encontrando condições favoráveis para sua proliferação em quase todos os continentes, especialmente em áreas tropicais e subtropicais.

O comportamento sinantrópico e antropofílico do *A. aegypti* que o leva a viver próximo aos seres humanos e a preferir alimentar-se de seu sangue, torna-o um vetor eficaz na transmissão de arboviroses. Este mosquito, caracterizado por sua coloração preta com listras brancas e asas translúcidas, apresenta atividade diurna é capaz de picar de forma quase imperceptível, especialmente em ambientes fechados e com pouca luz (Ferreira *et al.*, 2022). A fêmea, ao se alimentar, é responsável pela transmissão de patógenos que causam essas doenças.

A complexidade da dinâmica de transmissão dessas arboviroses, aliada ao risco de coinfeções, torna imprescindível a adoção de abordagens integradas que combinem o controle de vetores com intervenções farmacológicas, visando mitigar o impacto desses vírus na saúde global (Jones *et al.*, 2021). Embora os inseticidas químicos tradicionais sejam amplamente utilizados, a crescente resistência do *A. aegypti* a esses produtos destaca a urgência na busca por alternativas mais sustentáveis e eficazes para o controle de vetores (Wang, 2023). O impacto das arboviroses vai além das infecções agudas, resultando em surtos recorrentes em regiões com alta concentração de mosquitos. Em 2024, o Brasil registrou números alarmantes, com milhões de casos de dengue, chikungunya e zika, reforçando a necessidade de ações integradas e contínuas de controle e prevenção para minimizar surtos epidêmicos.

O ciclo de vida do *A. aegypti* é fundamental para compreender sua eficiência como vetor e consiste em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (Fig. 3). Este ciclo é fortemente influenciado por fatores ambientais, como a disponibilidade de água e a temperatura (Gomes *et al.*, 2024). Em condições ideais, a duração do ciclo completo é de aproximadamente 7 a 10 dias, o que

facilita a rápida reprodução em áreas urbanas. Os ovos são depositados pelas fêmeas nas “paredes” de recipientes, logo acima da superfície da água. Inicialmente brancos, esses ovos tornam-se negros e brilhantes após um curto período. Após cerca de dois a três dias de desenvolvimento, eles se tornam resistentes à dessecação e podem permanecer viáveis em condições secas por até um ano (Natal, 2002). Quando entram em contato com a água, os ovos são estimulados a eclodir em um intervalo de 2 a 3 dias, dependendo da temperatura (25-46 °C), iniciando a geração de imaturos (Farnesi *et al.*, 2009).

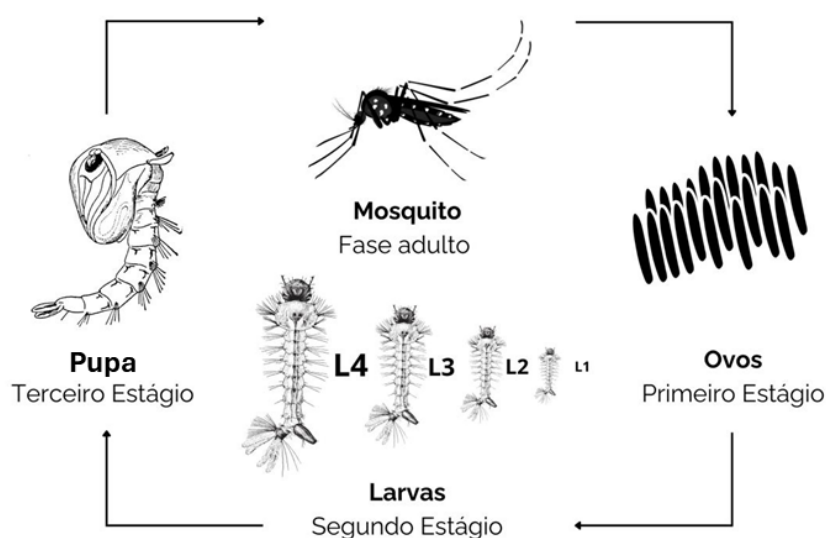


Figura 3: Ciclo de vida do mosquito *A. aegypti*: O primeiro estágio corresponde à fase ovular, seguida pelo segundo estágio, onde ocorre o desenvolvimento larval. Essa fase larval é subdividida em quatro instares (L1-L4), ao longo dos quais a larva passa por sucessivas mudas antes de atingir o terceiro estágio, que corresponde à fase de pupa. A pupa, por sua vez, evolui para o quarto e último estágio, no qual ocorre a emergência do mosquito adulto.

Após a eclosão, as larvas vivem exclusivamente na água, passando por quatro estágios de desenvolvimento (L1, L2, L3 e L4), alimentando-se de matéria orgânica no ambiente aquático. A transição entre os estágios ocorre através de um processo denominado “muda”, onde o exoesqueleto é desprendido. As larvas são móveis e realizam um nado característico em movimento de “sacudida”, subindo à superfície para respirar através de um sifão. Essa fase larval é crucial para o crescimento do mosquito, durando em média 4 a 5 dias, e está diretamente relacionada à temperatura e à disponibilidade de alimento (Junior *et al.*, 2024). Após atingirem o quarto estágio, as larvas se transformam em pupas, onde ocorre a metamorfose

completa. As pupas permanecem aquáticas e imóveis, exceto para subirem à superfície para respirar. Essa fase é relativamente curta, durando de 2 a 3 dias, até que o mosquito adulto emerja na superfície da água. Em poucos minutos, suas asas se expandem e endurecem, preparando-o para o voo. Portanto, o controle de criadouros e a adoção de medidas preventivas são cruciais para reduzir a disseminação dessas doenças e proteger a saúde pública.

1.4 Flora Maranhense como Fonte de Medicamentos Naturais

Neste sentido, a flora Medicinal Maranhense apresenta-se como uma fonte renovável, apropriada à produção de essências aromáticas, extratos, compostos isolados e como alternativa econômica para o desenvolvimento sustentável da região, com reais perspectivas de geração de riqueza, agregando valor e competitividade na utilização dos recursos naturais e da biodiversidade brasileira. O uso econômico da flora aromática e medicinal autóctone vem sendo feito sistematicamente em outros países, em face de menor exigência à agricultura primária, porém, poucos apresentam a multiplicidade de plantas e ecossistemas que a Amazônia Brasileira possui. Os óleos essenciais têm se destacado como uma alternativa promissora tanto para o tratamento de doenças quanto para o controle de vetores (Bitencourt et al., 2022; Mousavi, 2023). *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch. Bip., pertencente à família Asteraceae, é uma planta herbácea comumente encontrada em regiões tropicais e subtropicais das Américas, particularmente em países como Brasil, Argentina e Uruguai. Conhecida pelas potenciais propriedades medicinais de suas espécies, tem sido tradicionalmente utilizada em diversas culturas por seus benefícios terapêuticos, incluindo efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos. Esta espécie é caracterizada por sua folhagem aromática e flores amarelas distintivas, sendo um importante objeto de estudo na etnofarmacologia e na pesquisa de produtos naturais, especialmente no contexto do desenvolvimento de medicamentos naturais e na compreensão de seu papel ecológico (Fig. 4). O gênero *Pectis*, conhecido por seu alto teor de monoterpenos, possui um potencial significativo como fonte de larvicidas naturais. Monoterpenos como neral, geranial, α -pineno e limoneno presentes no OEPb, exibem forte atividade antimicrobiana e larvicida (Araújo et al., 2024). Esses compostos perturbam processos fisiológicos essenciais de

microorganismos e larvas, resultando em altas taxas de mortalidade. Aproveitar o gênero *Pectis*, rico em monoterpenos, como larvicida natural, apresenta uma alternativa ecológica aos produtos químicos sintéticos, aprimorando as estratégias de manejo integrado no tratamento de DTNs e arboviroses de forma mais segura e sustentável em comparação com os medicamentos inseticidas sintéticos usuais (Zohra *et al.*, 2022).

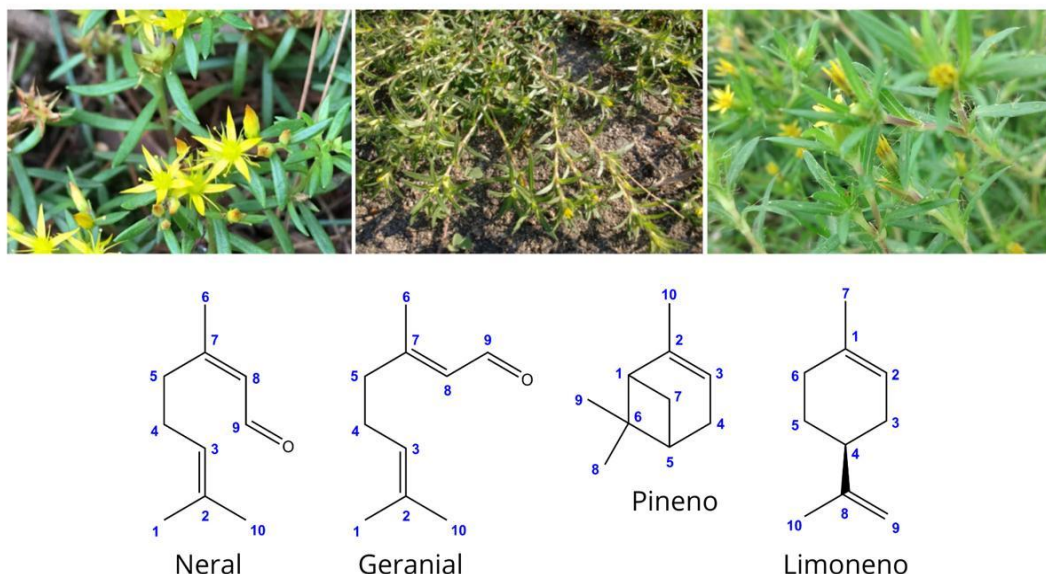


Figura 4: Fotografias da espécie *Pectis brevipedunculata* e representações das estruturas químicas de seus principais constituintes, pertencentes à classe dos monoterpenos.

1.5 Curcumina um produto natural eficiente no tratamento de DTNs

Ainda considerando o potencial terapêutico das plantas medicinais, o açafrão-da-terra é uma especiaria utilizada como um dos principais temperos da tradição culinária da Índia, e a mais de 4000 anos por diversas medicinas orientais. A cúrcuma é uma planta rizomatosa herbácea perene (*Curcuma longa*) da família do gengibre (Priyadarsini, 2014). As propriedades medicinais do cúrcuma, da qual é extraída a curcumina, são conhecidas há milhares de anos. A curcumina é um polifenol natural presente majoritariamente no rizoma da *Curcuma longa* (açafrão-da-terra) e em outras espécies (*Curcuma* spp.). Tradicionalmente, a *Curcuma longa* tem sido utilizada em países asiáticos como erva medicinal em virtude de suas propriedades antioxidante (Gupta; Patchva; Aggarwal, 2013), anti-inflamatória (Ramirez *et al.*, 2013)

antimutagênica (Bay *et al.*, 2019) antimicrobiana (Lestari; Indrayanto, 2014) e anticancerígena (Mahady, 2002). A curcumina é um composto polifenólico de fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_6$, e peso molecular de 368,38 g/mol. Apresenta em sua estrutura química dois anéis arilo contendo dois grupos fenólicos e um grupo orto-metoxi os quais são simetricamente ligadas em conjugação eletrônica com a porção β -dicetona, o que confere à sua estrutura química uma extensa conjugação de elétrons π , fundamentais para o desempenho de suas propriedades fotofísicas e fototerapêuticas (Fig. 5).

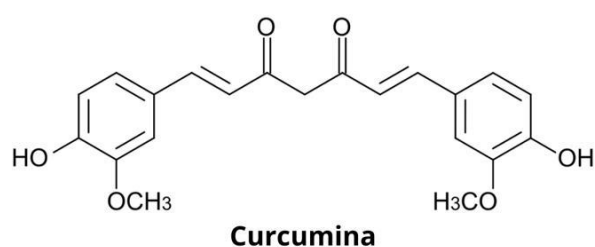


Figura 5: Fotos da esquerda para direita: *Curcuma longa*, rizoma e extrato de curcuma. Abaixo, a representação química estrutural da molécula de curcumina.

Quando irradiada com uma luz de comprimento de onda específico (entre 300 a 500 nm) a curcumina é fotoativada, fornecendo uma resposta fototerapêutica de alta eficácia na inativação fotodinâmica de microrganismos (IFMO) (Duarte *et al.*, 2020). Neste sentido, a curcumina têm sido amplamente empregada em associação com a Terapia Fotodinâmica (TFD), uma modalidade clínica minimamente invasiva para o tratamento e/ou diagnóstico de uma variedade de doenças. A TFD tem sido utilizada, em muitos caso, como terapia de primeira escolha, principalmente por não induzir nenhum tipo de resistência patogênica, em face do seu mecanismo de ação, o qual depende exclusivamente e extensivamente da taxa de formação de espécies reativas de

oxigênio (EROs), em especial, da geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) *in situ*, ou seja, diretamente no alvo terapêutico (Dobson; Queiroz; Golding 2018). Ressalta-se ainda que, embora um número considerável de trabalhos envolvendo o potencial citotóxico da curcumina tenha sido publicado na última década, sua associação com a TFD ainda merece atenção, fato este que abre um vasto campo de investigação envolvendo esta modalidade clínica no tratamento de DTNs.

1.6 Polímeros em Bloco como Sistemas Drug-delivery

A aplicação de polímeros biocompatíveis na ciência farmacêutica e na área médica tem avançado significativamente, refletindo progressos marcantes tanto em formulações farmacêuticas convencionais quanto nas mais recentes abordagens de nanomedicina. Esses polímeros desempenham um papel essencial como excipientes, melhorando as propriedades dos fármacos e ampliando suas aplicações terapêuticas em diversas áreas da saúde (Figueiras *et al.*, 2022). Entre eles, os polímeros em bloco anfifílicos, destacam-se como uma escolha preferencial para o desenvolvimento de formulações, devido às suas propriedades estruturais e funcionais. Quando a concentração de um copolímero anfifílico com segmentos de cadeias hidrofóbicas, por exemplo, poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido D,L-láctico) (PDLLA), poli(aminoácido), policaprolactona (PCL), (poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)) e porções hidrofílicas (por exemplo, PEG) excede um valor específico, conhecido como concentração crítica de agregação (CAC) para polímeros macromoleculares, as micelas são formadas por interações hidrofóbicas primárias entre as cadeias hidrofóbicas (Ghezzi *et al.*, 2021).

Essas micelas poliméricas apresentam várias vantagens significativas: (1) são sistemas termodinamicamente estáveis, (2) permitem a solubilização de fármacos insolúveis por meio de seu encapsulamento em núcleos hidrofóbicos, (3) geralmente têm um tamanho de partícula entre 10 nm e 100 nm, o que facilita a passagem pelas regiões vasculares comprometidas e permeáveis de tumores, resultando em maior permeação e tempo de retenção (efeito EPR), (4) possuem um efeito de longa circulação devido à PEGilação dos copolímeros, evitando a captação pelo sistema endotelial reticular (RES), e (5) apresentam boa degradação polimérica e biocompatibilidade (Hwang; Ramsey;

Kabanov, 2020). A organização molecular em blocos distintos permite um controle rigoroso da solubilidade, compatibilidade e auto-organização em sistemas complexos, como micelas e vesículas. Essas características são fundamentais para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, cosméticos e outras formulações, onde o ajuste das propriedades físico-químicas do polímero é crucial para otimizar a estabilidade, a biodisponibilidade e o perfil de liberação dos ativos. Além disso, os polímeros em bloco oferecem atributos valiosos, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, o que os torna altamente adequados para uso em aplicações médicas e farmacêuticas avançadas (Lorson, 2018).

Diante dessas características, os copolímeros em bloco ocupam uma posição estratégica racional para uma ampla gama de aplicações avançadas em formulações nanoestruturadas. Sua habilidade para modular parâmetros como solubilidade, estabilidade e perfil de liberação de ativos possibilita a otimização de sistemas de liberação controlada Drug-delivery e o desenvolvimento de formulações mais eficazes e direcionadas, tanto no domínio farmacêutico quanto no médico (WHO, 2005). As nanoformulações oferecem estabilidade aprimorada, entrega direcionada e liberação controlada de agentes ativos, aumentando assim a eficácia e minimizando o impacto ambiental (Santos *et al.*, 2023).

Visando ampliar as pesquisas existentes sobre o uso de nanoformulações contendo produtos naturais como uma alternativa eficiente para combater os vetores de arbovírus, apresentamos, pela primeira vez, o desenvolvimento de uma formulação na forma de nanogel nomeado de nGP, de comportamento termossensível, utilizando um método de baixa energia e livre de solventes. Este nanogel contém predominantemente o copolímero F127, um material já aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para usos farmacológicos, juntamente com uma menor quantidade do polímero 974p e uma alta concentração de OEPb. Nesta primeira etapa do trabalho, mostraremos o desenvolvimento e caracterização do nGP (Fig. 6). Testes de estabilidade acelerada e teste de prateleira foram realizados para avaliar a estabilidade física e química do material. A caracterização por meio de técnicas de FTIR e DLS confirmou a incorporação bem-sucedida do OEPb na matriz do nanogel. Os ensaios *in vitro* realizados em larvas de *Aedes aegypti*

demonstraram uma taxa de mortalidade marcadamente alta após 48 h de exposição, destacando a eficácia do tratamento.

Este estudo apresenta o nanogel nGP como uma alternativa inovadora, eficiente e sustentável, destacando sua significativa atividade larvícida contra *A. aegypti*, leishmanicida contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* e seu potencial anti-inflamatório. A incorporação do OEPb em nanogéis termossensíveis permite otimizar a biodisponibilidade e a estabilidade dos compostos ativos, favorecendo sua aplicação em larga escala para o controle sustentável de vetores em áreas endêmicas.

Além disso, foram conduzidos ensaios *in vitro* para avaliar a ação leishmanicida do nGP sobre promastigotas de *L. amazonensis* e seu efeito anti-inflamatório em um modelo experimental de inflamação *in vivo* em patas de camundongos. Como parte deste trabalho, também foi desenvolvido e caracterizado um segundo nanogel, intitulado de nGPC, contendo uma formulação otimizada com OEPb e curcumina. Essa abordagem visa explorar os efeitos citotóxicos *in vitro* dessa terapia combinada frente a promastigotas de *L. amazonensis*, ampliando as perspectivas para o tratamento das DTNs.

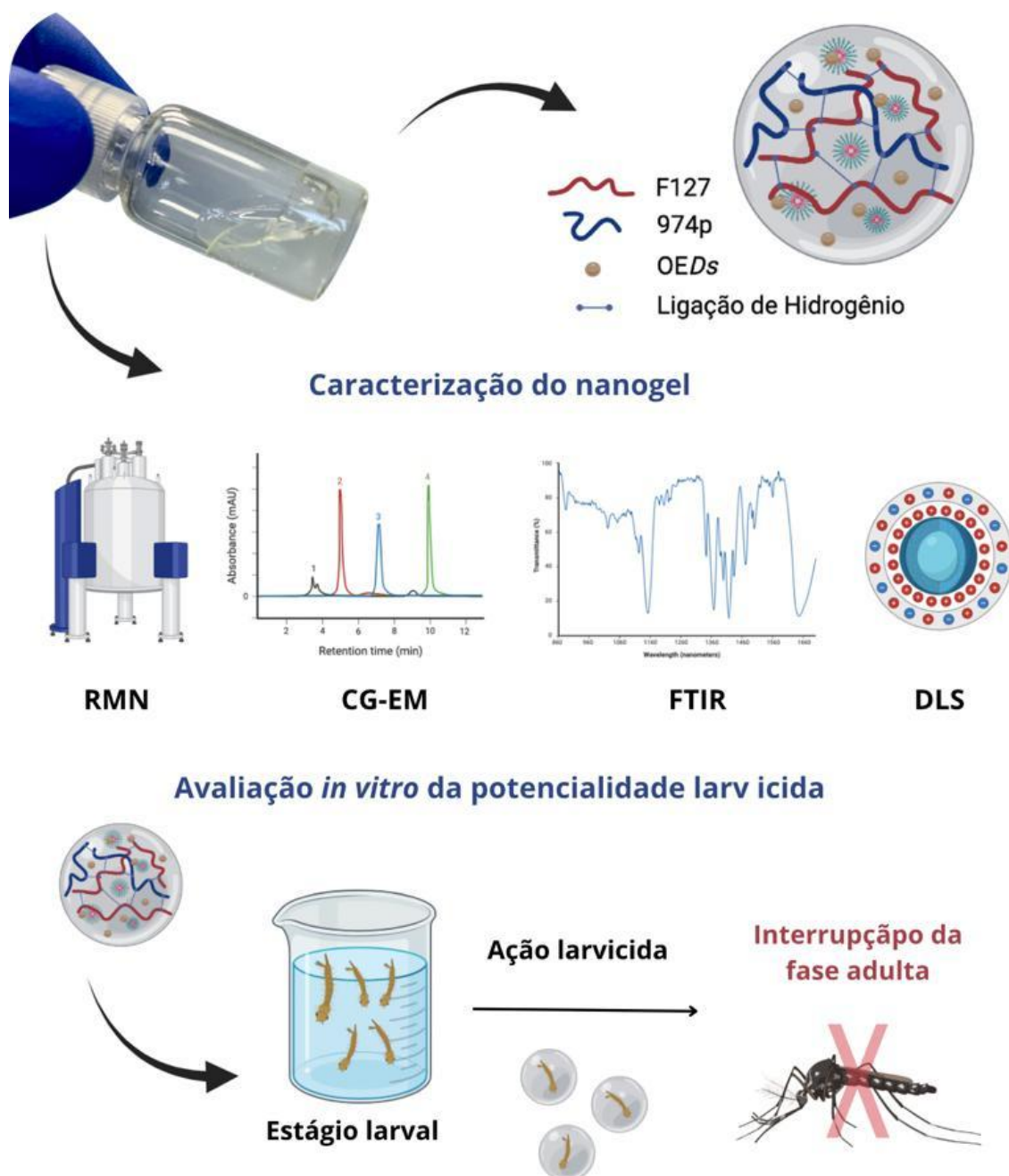


Figura 6: Fotografia do nanogel nGPb, acompanhada de uma representação esquemática da estrutura química, bem como das técnicas empregadas na primeira parte deste trabalho para caracterizar a composição química do OEPb e sua incorporação na matriz do gel. Também inclui a representação da avaliação *in vitro* de seu potencial larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doenças tropicais negligenciadas (DTNs)

DTNs englobam um grupo de enfermidades infecciosas causadas por uma diversidade de agentes etiológicos como vírus, bactérias, parasitas e vermes. Com incidência em 149 países e responsáveis por cerca de 200 mil mortes por ano, essas doenças representam um grave problema para a saúde pública global (Brasil, 2024d). Embora elas não sejam amplamente divulgadas, as DTNs impactam a vida de milhares de pessoas ao redor do mundo, causando sofrimento significativo, incapacidades permanentes e, em muitos casos, a óbito (Junior *et al.*, 2021).

Essas doenças afetam principalmente populações de baixa renda em áreas rurais, sendo reflexo das desigualdades sociais e da vulnerabilidade. Além disso, sua maior prevalência ocorre em regiões tropicais e subtropicais. O termo “negligenciada” foi cunhado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), referindo-se à falta de atenção dada a essas doenças pelas grandes indústrias farmacêuticas que demonstram pouco interesse em investir no desenvolvimento de tratamentos e vacinas devido à limitada lucratividade que essas enfermidades oferecem (Schuler, 2021).

Entre as principais mazelas que compõe esse grupo, estão a dengue, chikungunya, hanseníase, leishmaniose visceral, leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, esquistossomose, filariose linfática, tracoma e raiva humana (Brasil, 2024d). A maioria dessas enfermidades é transmitida por vetores como mosquitos, moscas, caramujos, contato com água contaminada e em alguns casos, ocorre a transmissão de pessoa para pessoa. Fatores como a pobreza, a falta de saneamento básico e ausência de infraestrutura adequada desempenham um papel crucial para a disseminação dessas doenças (Jesus, 2012).

Além dos danos à saúde, as DTNs impõem um impacto econômico significativo nas comunidades e países onde são endêmicas. Os custos elevados para o tratamento e o manejo dessas doenças sobrecarregam os sistemas de saúde, que já dispõem de recursos limitados. Esses problemas

perpetuam as desigualdades econômicas, afetando desproporcionalmente as comunidades mais pobres, que têm menor acesso a serviços de saúde, educação e oportunidades econômicas, contribuindo para o ciclo contínuo de pobreza e exclusão social (Conceição *et al.*, 2022).

2.2 As DTNs no Brasil

De acordo com o Boletim Epidemiológico do impacto das DTNs no Brasil, entre os anos de 2010 e 2023, 20 milhões da população de 0 a 14 anos foram acometidas pelas DTNs. A localização geográfica do Brasil, combinada com seu clima tropical, torna o país um ambiente propício para a proliferação dessas doenças que afetam, sobretudo, populações em condições de vulnerabilidade socioeconômica (OPAS, 2022).

Muitos dos vetores responsáveis pela transmissão das DTNs, como o mosquito *A. aegypti*, se reproduzem em ambientes quentes e úmidos. A alta umidade e as temperaturas elevadas favorecem tanto a reprodução dos mosquitos, vetores de doenças como dengue, chikungunya, zika, filariose linfática e malária, quanto a rápida multiplicação de patógenos causadores de outras DTNs, como protozoários, bactérias e vírus. Essas condições climáticas facilitam a disseminação de doenças como leishmaniose, doença de Chagas e tracoma (Nuss *et al.*, 2015). Dentre as DTNs mais prevalentes no Brasil estão: a doença de Chagas, esquistossomose, filariose linfática, hanseníase, leishmaniose visceral, leishmaniose tegumentar, oncocercose, raiva humana, tracoma, dengue, chikungunya e doença de Chagas (Ministério da Saúde, 2024; ONU, 2024). A Fig. 7 apresenta uma visão geral da incidência de casos prováveis de dengue por estado no Brasil, ressaltando a urgência de medidas efetivas para conter a disseminação da doença. Esses dados reforçam a necessidade de desenvolver e implementar estratégias de controle mais eficazes, como o desenvolvimento de novos produtos de baixo custo, que possam ser incorporados ao Sistema Único de Saúde (SUS), ampliando o acesso da população às medidas preventivas e de combate ao vetor (Hotez *et al.*, 2020).

De acordo com Organização das Nações Unidas (ONU), as DTNs com mais incidência de casos no país são: hanseníase, dengue, chikungunya e doença de Chagas (ONU, 2023). Segundo o Ministério da Saúde, a

leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar também se destacam como doenças com mais casos já registrados no país (Brasil, 2022).

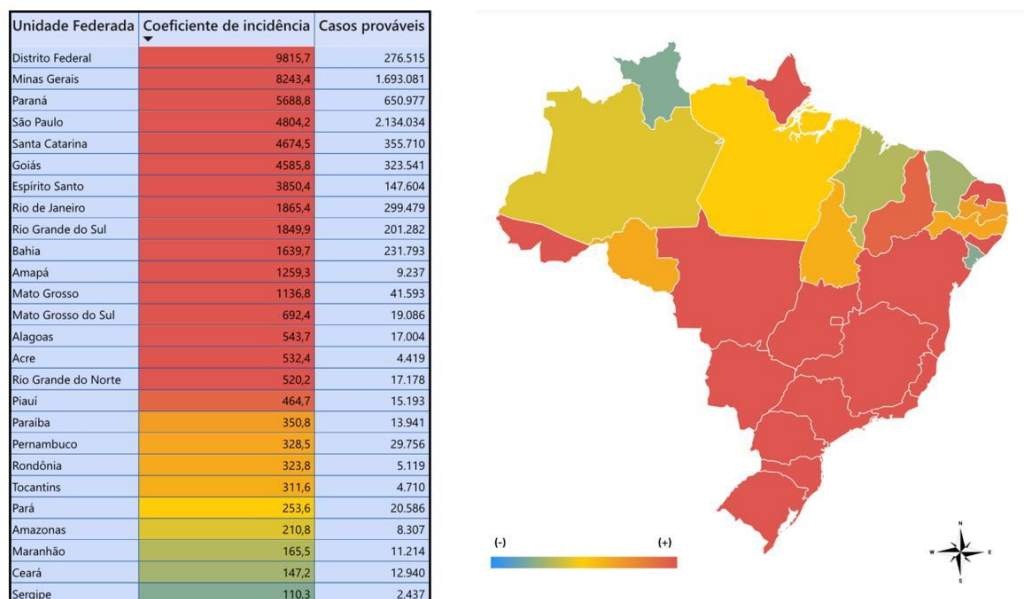


Figura 7: Coeficiente de incidência de casos prováveis por 100 mil habitantes, no ano de 2024. Dados retirados do portal do ministério da saúde (<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arbovirose>).

2.3 A necessidade de novos medicamentos para DTNs

As DTNs impactam principalmente populações em situação de pobreza e vulnerabilidade, onde o acesso a diagnósticos, tratamentos e infraestrutura de saúde é limitado. Nesse contexto, a necessidade de novos medicamentos para tratar DTNs é urgente e complexa, envolvendo desafios médicos, científicos e sociais. Embora existam tratamentos disponíveis para algumas DTNs, muitos apresentam limitações em termos de eficácia, segurança e acessibilidade.

As terapias atualmente utilizadas no tratamento das DTNs são limitadas, frequentemente inadequadas, e apresentam diversos obstáculos, como baixa eficácia, alta toxicidade e o surgimento de cepas resistentes (Dias *et al.*, 2013). Com a evolução da resistência aos medicamentos, a eficácia das terapias existentes tende a diminuir ao longo do tempo, elevando a demanda por novas opções. Além disso, muitos fármacos utilizados no tratamento dessas doenças são antiquados, tendo sido introduzidos há décadas (Pink *et al.*, 2005).

Portanto, a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes é evidente, porém, os investimentos globais em pesquisa e desenvolvimento (P&D) continuam extremamente baixos. Esse cenário é agravado pela falta de inovação e financiamento em programas de P&D voltados às DTNs, refletindo-se no número reduzido de novos medicamentos lançados nas últimas décadas (Dias *et al.*, 2013). A descoberta de moléculas candidatas a fármacos é um passo fundamental para garantir um fluxo sustentável de novos produtos inovadores. Entretanto, devido à falta de incentivos financeiros no campo das DTNs, os fatores que impulsionam a formação de parcerias diferem daqueles que regem a indústria farmacêutica tradicional, voltada para o lucro (Dias *et al.*, 2013).

Neste sentido, a química de produtos naturais emerge como uma alternativa promissora no combate às DTNs explorando a vasta diversidade de compostos presentes em plantas, microrganismos e outros organismos. Muitos desses compostos possuem estruturas químicas complexas e únicas, capazes de interagir com alvos moleculares específicos, proporcionando atividades terapêuticas inovadoras (Varela e Fernandes, 2020). Além disso, os produtos naturais servem frequentemente como modelos para a síntese de novos fármacos, sendo uma fonte essencial de inovação, especialmente em áreas onde as terapias disponíveis são limitadas, como nas DTNs. As moléculas bioativas, ou ligantes, podem ser de origem natural ou sintética, sendo identificadas por meio de triagens reais (*in vitro*), virtuais (*in silico*) ou por planejamento racional. Independentemente do método de identificação, a validação experimental de suas propriedades biológicas é fundamental para assegurar sua eficácia e segurança (Dias *et al.*, 2013).

2.4 Plantas medicinais como tratamento alternativo de DTNs

O uso de plantas medicinais como tratamento alternativo remonta à antiguidade, constituindo uma das formas mais antigas de cuidado à saúde. Civilizações como as do Egito, China e Índia desenvolveram amplos conhecimentos sobre o poder curativo das plantas que foram registrados em documentos históricos como o *Papiro Ebers* e o *Ayurveda* (Braga, 2011; Yuan *et al.*, 2016). Ao longo do tempo, esses saberes foram preservados e disseminados por diversas culturas ao redor do mundo, frequentemente

integrando-se às práticas tradicionais de cura. Nesse contexto, os bioativos extraídos de plantas medicinais desempenham um papel crucial no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de doenças (Vitorello *et al.*, 2023).

Atualmente, as plantas medicinais têm se destacado tanto no Brasil quanto no cenário global como uma alternativa acessível e promissora para o tratamento de DTNs. Os produtos naturais derivados dessas plantas vêm conquistando espaço no mercado, refletindo sua eficácia e crescente aceitação como opções terapêuticas (Lima *et al.*, 2020). O avanço científico na área de produtos naturais tem permitido a integração de conhecimentos tradicionais com métodos científicos modernos, favorecendo o isolamento e a identificação de compostos bioativos possibilitou o desenvolvimento de estudos sobre essas plantas integrando conhecimentos tradicionais com métodos científicos modernos (Viana, 2017). Esses compostos naturais ecologicamente sustentáveis, apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo ações antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticancerígenas, reforçando o potencial das plantas medicinais como alternativas eficazes no tratamento de diversas enfermidades. Além disso, a crescente adoção de bioativos no tratamento de DTNs tem sido impulsionada por fatores como o aumento dos custos dos medicamentos convencionais, os efeitos colaterais associados a esses tratamentos, e a crescente resistência dos vetores aos fármacos existentes (Leyva *et al.*, 2022). Essas circunstâncias reforçam a importância dos produtos naturais como uma opção viável e sustentável na luta contra essas doenças.

2.5 Família Asteraceae e o Gênero *Pectis*

O Cerrado Maranhense, localizado na região Nordeste do Brasil, é de grande relevância para a conservação da biodiversidade, notadamente por sua rica diversidade de espécies vegetais com potenciais medicinais e biotecnológicos. Dentre as diversas famílias de plantas presentes nesta região, destaca-se a família Asteraceae, também conhecida como Compositae. Com mais de 25.000 espécies descritas e cerca de 1600 gêneros. A Asteraceae é uma das maiores famílias botânicas do mundo. No Brasil, essa família está representada por 2070 espécies distribuídas em 275 gêneros, ocorrendo em

diversos biomas, como Amazônia, Caatinga, Pantanal e Cerrado, evidenciando sua ampla capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais (Rolnik e Olas, 2021).

Além de sua importância ecológica, as plantas da família Asteraceae possuem grande valor farmacológico, com um amplo espectro de propriedades terapêuticas comprovadas (Panda *et al.*, 2019). Um dos gêneros mais relevantes dentro dessa família é a *Pectis* L., que inclui aproximadamente 219 espécies distribuídas globalmente, sendo 70 delas nativas do Brasil (CWG, 2022). O gênero *Pectis* tem demonstrado notável potencial farmacológico e econômico, com suas espécies sendo cada vez mais exploradas por suas propriedades bioativas. Entre as espécies mais estudadas estão a *Pectis apodocephala* Baker (Albuquerque *et al.*, 2003), *Pectis elongata* Kunth (Pires *et al.*, 2024), *Pectis substriata* Rusby (Jesus *et al.*, 2020) e *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch. Bip. (Marques; Kaplan, 2013).

A espécie *P. brevipedunculata*, é uma planta herbácea nativa em áreas tropicais e subtropicais, comumente encontrada em solos arenosos e rochosos. No Brasil, está disseminada em grande parte do território, sendo facilmente encontrada nos biomas do cerrado e caatinga, bem como nas regiões Norte no Pará e Tocantins, Nordeste na Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí, Centro-Oeste no Distrito Federal e Goiás e na região do Sudeste em Minas Gerais e Rio de Janeiro (CWG, 2022) (Fig. 8). É uma planta de pequeno porte que pode variar entre 2 a 26 cm de altura, caules pubescentes com tricomas simples, entrenós de 2,5 cm; folhas opostas membranosas, lâminas lineares a oblongas, ápice agudo e numerosas glândulas sebáceas circulares; flores dimórficas com corola ligulada amarela que varia de 3,5 a 4,5 mm de comprimento e ápice de 3 dentes (CWG, 2022). *P. brevipedunculata* é popularmente conhecida como capim-limão, catinga-de-formiga, limãozinho e chá-de-moça têm ganhado destaque no desenvolvimento de fitoterápicos devido a sua potencialidade terapêutica (Jesus *et al.*, 2020). O nome capim-limão é devido às altas concentrações de citral presente nas frações voláteis do óleo essencial produzido pela *P. brevipedunculata* (Albuquerque *et al.*, 2003; Jesus *et al.*, 2020). Também é utilizada pela comunidade como planta medicinal, especialmente na forma de chá, para o tratamento de diversas enfermidades.

Infusões desta planta são usadas para tratar cólicas, problemas digestivos e também são utilizados como calmantes, ansiolíticos e anti-hipertensivos (Oliveira *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2009). Essas propriedades terapêuticas são atribuídas à presença de compostos bioativos como neral, geranial, α -pineno e limoneno (Fig. 14). O neral e o geranial são os dois isômeros do citral, amplamente reconhecidos por suas atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes. Esses compostos têm sido objeto de estudo devido à sua capacidade de inibir microrganismos patogênicos e modular respostas inflamatórias, o que os torna candidatos interessantes para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Baser, 2008; Guimarães *et al.*, 2011). O alfa-pineno, por sua vez, é um monoterpene que demonstra efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos, além de possuir propriedades broncodilatadoras (Leite *et al.*, 2007). Já o limoneno, um monoterpene monocíclico, é conhecido por sua capacidade antioxidante e potencial anticancerígeno, além de ser amplamente empregado na aromaterapia e na indústria cosmética (Araújo-Filho *et al.*, 2021; Luzia e Jorge, 2010).



Figura 8: Registros de ocorrência da espécie *P. brevipedunculata* nos estados brasileiros, com destaque para o estado do Maranhão (MA), onde a coleta da espécie foi realizada na capital, São Luís, no câmpus da Universidade Federal do Maranhão, nas coordenadas geográficas (2°33'20.5\"S, 44°18'32.7\"W).

2.6 Óleo Essencial da Espécie *P. brevipedunculata*

Os OEs são definidos como metabólitos secundários, predominantemente encontrados em plantas aromáticas, presentes em diversas partes da planta, como folhas, flores, cascas e raízes. Esses metabólitos secundários constituem uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, com suas sínteses frequentemente influenciadas por condições ambientais. Fatores abióticos, como sazonalidade, ritmo circadiano, estágio de desenvolvimento, idade da planta, temperatura, disponibilidade de água, radiação UV, nutrientes do solo, altitude, composição atmosférica e danos teciduais, afetam a composição dos OEs e suas potenciais propriedades terapêuticas. Os OEs são amplamente reconhecidos por suas propriedades biológicas e têm sido utilizados em diversas áreas, incluindo medicina, cosmética, alimentação e perfumaria (Fronza, 2021; Ivano; Freitas; Netto. 2023). Os principais constituintes dos OEs incluem terpenos, fenóis, aldeídos e ésteres, que conferem a esses óleos propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, entre outras (Sousa *et al.*, 2024; Marques e Kaplan 2013).

Esses compostos naturais têm sido amplamente estudados devido ao seu potencial terapêutico e ao crescente interesse por alternativas naturais no tratamento de doenças. De acordo com Malek *et al.*, (2021), OEs têm se destacado por sua eficácia contra fungos, bactérias e parasitas e sua aplicação em infecções de pele, inflamações e até como complementos em terapias para doenças crônicas. Essa versatilidade torna os OEs alvo de investigações científicas e de desenvolvimento de produtos fitoterápicos. Dessa forma, os OEs têm se tornado uma alternativa promissora no tratamento de doenças tropicais negligenciadas por conta do seu amplo espectro terapêutico (Maleck, 2021; Carvalho *et al.*, 2024).

A composição química do OEPb foi investigada por Oliveira *et al.* (2011), que avaliaram o efeito da temperatura de secagem sobre o teor e a composição química do óleo. Os resultados indicaram que a temperatura de secagem influencia significativamente sua composição, impactando diretamente suas propriedades farmacológicas e no teor do OEPb. Pesquisas adicionais indicam que essa espécie apresenta compostos com elevado

potencial terapêutico, sendo rica em monoterpenos, com destaque para o citral e o limoneno, ambos reconhecidos por suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (Camara *et al.*, 2023; Lopes *et al.*, 2024; Marques *et al.*, 2013). O citral, por sua vez, é uma mistura de dois isômeros estruturais: o Z-citral (ou neral) e o E-citral (ou geranial), amplamente utilizados como intensificadores de sabor, em odorizantes de perfumes e como repelentes de insetos (Antonova; Stoicheva; Antonov, 2017).

Além disso, o potencial antifúngico do OEPb foi avaliado contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causador da antracnose em mangas. Os resultados sugerem que o OE de *P. brevipedunculata* apresenta atividade antifúngica promissora, podendo ser uma alternativa natural no controle dessa fitopatologia. Segundo Araújo *et al.* (2024), o OEPb também possui propriedades inseticidas, especialmente contra *Drosophila suzukii*, uma praga agrícola de grande impacto econômico. Estudos indicam que os compostos presentes no OE afetam os receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA) dos insetos, sugerindo um mecanismo de ação específico e um potencial para uso como inseticida natural.

No que se refere às propriedades biológicas, o OEPb tem demonstrado atividades antimicrobianas e calmantes, atribuídas principalmente ao seu alto teor de citral. Essas características tornam essa planta uma candidata promissora para aplicações nas indústrias farmacêutica e de cosméticos. Ademais, estudos apontam seu potencial anti-inflamatório, demonstrando eficácia no alívio de dores agudas e crônicas (Nishijima *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2024). Esses achados reforçam a importância do OEPb como uma fonte promissora de bioativos para o desenvolvimento de novos medicamentos, especialmente no combate as DTNs, que continuam a representar um grave problema de saúde pública em escala global (Lopes *et al.*, 2024).

2.7 *Curcuma longa* L.

Curcuma longa L., comumente conhecida como açafrão-da-terra, cúrcuma ou turmeric, é uma planta herbácea perene pertencente à família Zingiberaceae. Originária do sudeste asiático, especialmente da Índia, essa espécie é amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais do mundo.

C. longa possui rizomas subterrâneos que são a parte mais importante da planta, devido ao seu uso medicinal e culinário. Os rizomas são grossos e de coloração amarelo-alaranjada, ricos em compostos bioativos. Suas folhas são grandes, com um formato lanceolado, e a planta pode atingir até 1 metro de altura. As flores são de coloração amarelada, e emergem a partir da base da planta (Fig.5).

Na medicina tradicional indiana (Ayurveda) e na medicina tradicional chinesa. *C. longa* é usada para tratar uma ampla gama de condições, incluindo distúrbios digestivos, problemas hepáticos e doenças inflamatórias. Seu uso como tempero na culinária, especialmente em pratos de curry, é igualmente difundido. A curcumina é o principal polifenol natural encontrado no rizoma de *C. longa* (Fig. 5).

A curcumina tem sido amplamente estudada e utilizada devido às suas propriedades terapêuticas. Estudos indicam que a curcumina possui significativa atividade anti-inflamatória, sendo eficaz no tratamento de condições inflamatórias crônicas. Além disso, atua como antioxidante, combatendo o estresse oxidativo ao neutralizar os radicais livres (Lestari e Indrayanto, 2014). No estudo conduzido por Mahady *et al.*, (2002), a curcumina apresentou atividade antimicrobiana, uma vez que inibiu o crescimento de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Helicobacter pylori*. No caso de *H. pylori*, um patógeno relacionado a úlceras gástricas e câncer gástrico, a curcumina mostrou capacidade de inibir seu crescimento, incluindo cepas altamente virulentas (cagA+).

Outras pesquisas também revelam que a curcumina possui atividade anticancerígena, onde um número considerável de trabalhos publicados demonstrou os efeitos da curcumina na inibição do crescimento de células tumorais (Ramirez *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2013). Além disso, outras publicações revelaram também o potencial leishmanicida e larvicida, especialmente quando associada à TFD, a curcumina é ativada eletronicamente sendo capaz de atuar com eficiência na IFMO, sem induzir resistência por parte do patógeno ao tratamento farmacológico (Pereira e Neto, 2013).

Sua ampla disponibilidade e fácil acesso contribuem para seu uso crescente em diversas aplicações terapêuticas. No entanto, a curcumina

apresenta baixa solubilidade em água, mas é altamente solúvel em solventes orgânicos como etanol, metanol, acetona e dimetilsulfóxido. Essa característica limita sua biodisponibilidade, levando ao desenvolvimento de estratégias para aumentar sua solubilidade, como o nanoencapsulamento, que é o intuito deste estudo.

2.8 Nanoformulações Copoliméricas

Os plurônicos são copolímeros triblocos do tipo A-B-A, formados por cadeias de poli (óxido de etileno) (PEO) e poli (óxido de propileno) (PPO). Devido a sua ampla disponibilidade comercial e o baixo custo, eles são amplamente utilizados como estabilizadores estéricos em formulações de fármacos nanoestruturados, contribuindo para a estabilidade e eficácia dos sistemas farmacêuticos (Khaliq *et al.*, 2023). Os diferentes tipos de plurônicos variam em suas propriedades físicoquímicas, como peso molecular e composição dos blocos PEO-PPO-PEO. Por exemplo, o plurônico F68 possui blocos de 80-30-80, enquanto o F127 e o P123 têm blocos de 100-65-100 e 20-69-20, respectivamente (Jaquilin *et al.*, 2022). A coroa hidrofílica dos F68 e F127 é significativamente mais longa que a do P123, devido aos maiores comprimentos dos blocos de PEO. Essas diferenças influenciam a concentração micelar crítica (CMC) e/ou temperatura micelar crítica (TMC) e a estabilidade das micelas, afetando sua capacidade de autoagregação e o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB). Os plurônicos F68 e F127 são os únicos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) e são amplamente usados em aplicações farmacêuticas (Fig. 9).

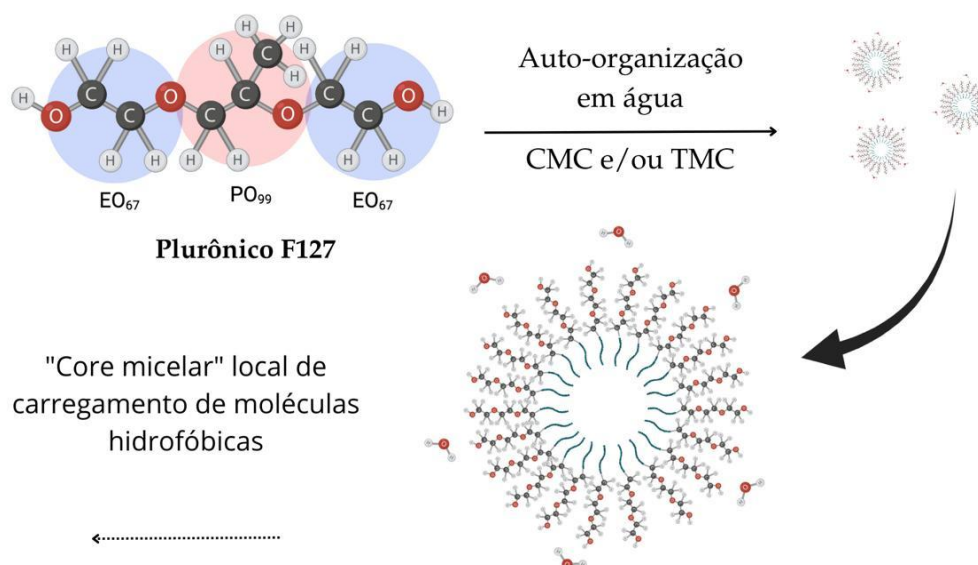


Figura 9: Representação química estrutural do copolímero F127 e seu processo de auto organização em micelas acima ou próximas dos valores de CMC e/ou TMC. A figura destaca a região central, ou “core micelar”, onde fármacos hidrofóbicos podem se acomodar e ser transportados ao alvo terapêutico.

Vale ressaltar que embora a utilização de plurônicos em formulações farmacêuticas aprovadas para estudos clínicos ainda seja limitada, podemos destacar alguns produtos promissores. Um deles é o SP1049C, um medicamento que combina os plurônicos L61 e F127, encapsulando a doxorrubicina (DOX), e empregado em estudos clínicos de adenocarcinoma de esôfago. Esta foi, notavelmente, a primeira formulação de micela baseada em plurônico usada para investigação clínica. Nos Estados Unidos, o SP1049C foi identificado como um medicamento órfão para o carcinoma gastroesofágico e relatado como participante de um estudo clínico internacional de Fase 3 (Matsumura *et al.*, 2004). De forma semelhante, foi conduzido um estudo clínico de Fase 3 do Mediclorê— um agente sol-gel termo-sensível à base dos plurônicos F68/F120 — para aplicação em cirurgias de câncer de mama, especificamente em procedimentos de dissecação axilar. O estudo está registrado na plataforma ClinicalTrials.gov sob os identificadores NCT02967146 (5 de janeiro de 2017) (Park *et al.*, 2022). Além disso, o gel de plurônico F127 (20% m/v), conhecido como LeGoo®, foi utilizado clinicamente tanto nos Estados Unidos quanto na Europa. Desenvolvido pela Pluromed Inc. (Woburn, MA, EUA), LeGoo® recebeu aprovação da FDA para oclusão endovascular

temporária de vasos sanguíneos com até 4 mm de diâmetro, localizados abaixo do pescoço.

Trata-se de um gel termossensível, que permanece líquido à temperatura ambiente, mas forma um tampão em forma de vaso sanguíneo ao ser injetado, bloqueando o fluxo sanguíneo. Essas propriedades exclusivas facilitam procedimentos cirúrgicos que envolvem a integração ou enxerto de vasos sanguíneos (Kretz *et al.*, 2012). Contudo, apesar de muitos trabalhos terem sido publicados utilizando o F127 como matriz copolimérica micelar para o transporte de fármacos com baixa solubilidade em água, visando o tratamento e o diagnóstico de diversas doenças, os estudos clínicos envolvendo o plurônico F127 ainda são limitados. Acredita-se, porém, que diversos produtos inovadores à base de F127 contendo nanocarreadores de fármacos deverão surgir no futuro.

Os nanocarreadores estão, sem dúvida, em alta demanda devido ao seu desempenho terapêutico aprimorado em comparação com os sistemas tradicionais de liberação de fármacos. Antes da aprovação para comercialização, esses nanocarreadores passam por diversas avaliações pré-clínicas e clínicas realizadas por agências reguladoras, como FDA nos Estados Unidos e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA). Produtos de nanomedicina são lançados no mercado após a otimização das necessidades terapêuticas, demanda do mercado, pesquisa e desenvolvimento, escalabilidade, fases de produção, ensaios clínicos e questões regulatórias. Durante os processos de escalonamento, é um desafio garantir que as funções desejadas das nanopartículas não sejam perdidas.

2.9 Polímero Carbopol 974p: Versatilidade e Aplicações Farmacêuticas

Os polímeros Carbopol, introduzidos comercialmente há mais de 50 anos, têm desempenhado um papel fundamental como excipientes farmacêuticos devido à sua versatilidade e alta tolerabilidade (Lubrizol, 2024a). Eles são amplamente utilizados para modificar a reologia de formulações, estabilizar suspensões, prolongar a liberação de fármacos, conferir propriedades mucoadesivas e aumentar a biodisponibilidade (Elfakhri *et al.*, 2024). No entanto, algumas versões, como os Carbopol 934 NF, 940 NF e 1342 NF, foram sintetizadas utilizando o benzeno como solvente, uma

substância tóxica e potencialmente cancerígena, o que limitou sua aplicação em produtos destinados ao uso humano (Lubrizol, 2022).

Atualmente, os carbômeros recomendados pela Farmacopeia Europeia para o desenvolvimento de medicamentos, como o 974p NF, 971p NF e 71G NF, são sintetizados em solventes mais seguros, como o acetato de etila, um solvente de classe III que apresenta menos riscos à saúde (Younes et al., 2021). O 974p NF, por exemplo, é polimerizado a partir do ácido acrílico, reticulado com alil pentaeritritol, e amplamente utilizado devido à sua alta viscosidade em baixas concentrações, ideal para formulações farmacêuticas de liberação controlada (Fig. 10).

Estudos demonstram a eficácia do 974p em diversas aplicações, incluindo comprimidos bioadesivos de cetoconazol para administração vaginal, onde mostrou boa bioadesão e liberação prolongada (Wang e Tang, 2008). Em formulações oculares, ele também demonstrou segurança e eficácia, além de sua aplicação em comprimidos de liberação controlada de claritromicina, garantindo liberação sustentada por até 12h. Essas propriedades, combinadas com sua bioadesividade, estabilidade em diferentes faixas de pH e capacidade de formar géis, tornam 974p um excipiente ideal para sistemas de Drug-Delivery avançados, contribuindo para tratamentos mais eficazes e com menor frequência de administração (Swarbrick, 2013).

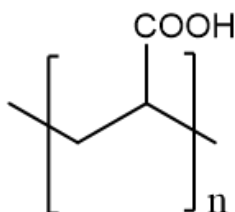


Figura 10 - Representação química estrutural do polímero 974p.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho consiste no desenvolvimento de formulações semi-sólidas, à base dos polímeros F127 e 974p, empregando uma metodologia de baixa energia, e utilizando água como solvente em todas as etapas do processo experimental, para constituir um sistema eco-friendly, nanoestruturado com comportamento termossensíveis carregado com *OEPb* e com a combinação de *OEPb*/curcumina, com o intuito de avaliar o potencial leishmanicida, larvicida e anti-inflamatório desses materiais oferecendo uma abordagem sustentável e eficaz para o tratamento de DTNs.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a extração do *OEPb* coletada na região central de São Luís, MA;
- Caracterizar o *OEPb* por meio de técnicas espectroscópicas tais como RMN de ^1H e ^{13}C , e hifenadas como CG-EM;
- Otimizar as condições experimentais para o preparo das formulações semi-sólidas na forma de nanogéis, variando as composições dos excipientes F127, 974p e água (% m/m), designadas como nG;
- Investigar o comportamento termossensível e a estabilidade preliminar das formulações nG;
- Incorporar o *OEPb* nas composições de nG que resultaram nos nanogéis de maior estabilidade física;
- Avaliar os nanogéis selecionados de acordo com testes de estabilidade acelerada e teste de prateleira de acordo com os padrões estabelecidos pela ANVISA e USP;

- Caracterizar utilizando as técnicas, UV-VIS, FTIR e DLS (determinação tamanho de partículas e potencial ζ) o nanogel contendo a maior concentração de OEPb e selecionado após os estudos de estabilidade acelerada;
- Caracterizar utilizando as técnicas morfológicas, MEV e AFM o nanogel contendo a maior concentração de OEPb;
- Avaliar *in vitro* o potencial larvicida da formulação nGP contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*;
- Avaliar *in vitro* o potencial antileishmania da formulação nGP contra cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LLa);
- Avaliar *in vivo* o potencial antiinflamatório das formulações nGF0, nGF2-nGF4 contra cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LLa);
- Incorporar o OEPb/Curcumina nas composições de nG que resultaram nos nanogéis de maior estabilidade física;
- Avaliar de acordo com testes de estabilidade acelerada e teste de prateleira de acordo com os padrões estabelecidos pela ANVISA e USP os nanogéis selecionados contendo OEPb/Curcumina;
- Caracterizar utilizando as técnicas de FTIR, DLS (determinação tamanho de partículas e potencial ζ), MEV e Reológica o nanogel contendo a maior concentração de OEPb e Curcumina selecionado após os estudos de estabilidade acelerada;
- Avaliar *in vitro* o potencial antileishmania da formulação nGPC contra cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LLa).

CAPÍTULO 4

Desenvolvimento do Nanogel nGP e Avaliação do seu Potencial Citotóxico contra larvas de *Aedes aegypti*



A busca por novas estratégias para o controle do *A. aegypti*, vetor de diversas doenças, como dengue, chikungunya e zika, é uma prioridade global, considerando os desafios impostos pela resistência crescente aos inseticidas tradicionais. Nesse contexto, o desenvolvimento de nanomateriais tem se mostrado uma abordagem promissora, uma vez que pode oferecer vantagens como maior especificidade e eficiência no combate a vetores. Dentre as alternativas, os nanogéis surgem como uma plataforma versátil, especialmente pela possibilidade de controlar a liberação de compostos ativos, aumentando a eficácia biológica e minimizando os impactos ambientais. Este capítulo apresenta o desenvolvimento do nanogel denominado nGP, formulado com o objetivo de avaliar seu potencial citotóxico frente às larvas de *A. aegypti*. A proposta envolve a identificação e quantificação dos componentes bioativos provenientes do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata* por técnicas de CG-EM e RMN de ^1H e ^{13}C associados à tecnologia de nanogéis, de forma a maximizar a eficácia do controle larval. Para isso, foram realizadas avaliações

prévias detalhadas de estabilidade física e química das formulações nanoestruturadas. Após a seleção da formulação de maior estabilidade, caracterizações via UV-Vis, FTIR e DLS foram realizadas para se obter informações em escala nanométrica da associação do OEPb com a matriz F127/974p. O potencial citotóxico do nGP foi avaliado frente a larvas de *A. aegypti*, seguindo um protocolo adaptado das diretrizes da OMS (WHO, 2005). Os resultados desta primeira etapa do trabalho foram publicados na revista *Pharmaceutical*, na sessão *Nanomedicine and Nanotechnology*, como parte do volume especial *Advanced Nanotechnology for Combination Therapy and Diagnosis*. A revista possui um fator de impacto de 4,9 e é classificada como A1 no Qualis CAPES. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16101337>

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Materiais

Plurônic F127 (poli (óxido de etileno)–poli (óxido de propileno)–poli (óxido de etileno)) copolímero tribloco (MW = 12600 g/mol; (OE99 (PO) 67 (EO) 99)), água ultrapura, sulfato de sódio anidro, clorofórmio deuterado (CDCl₃) e mistura padrão de alcanos foram com adquiridos comercialmente da empresa Merck (Rahway, NJ, EUA). Carbopol® 974p NF polímero foi gentilmente cedido pela IMCD Brasil (São Paulo, SP, Brasil). Ovos de *A. aegypti* foram abastecidos pela Biofábrica MOSCAMED (São Francisco Juazeiro, BA, Brasil) e o temefós foi fornecido por agentes de vigilância sanitária (São Luís, MA, Brasil).

4.1.2 Coleta e identificação do material vegetal

A planta herbácea *Pectis brevipedunculata* foi coletada no campus da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) em São Luís, MA, Brasil, com coordenadas 2°33'20,5"S/44°18'32,7"W. Um espécime comprovante (n° 5287) foi depositado no Herbário Rosa Mochel (SLUI) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís, MA, Brasil. A coleção da planta aderiu às leis brasileiras de proteção à biodiversidade (SisGen No. AAFB38B).

4.1.3 Hidrodestilação do OEPb

O OEPb foi extraído através do processo de hidrodestilação utilizando um aparelho do tipo Clevenger. O material vegetal (300g) foi seco ao ar ambiente por 24 horas e cortado em pequenos pedaços usando tesouras de

poda para facilitar a extração por hidrodestilação. Água destilada (500 mL) foi adicionada ao frasco, e o processo de hidrodestilação foi mantido por 2,5h após o início do refluxo. Esse tempo de 2,5 horas foi padronizado para garantir uma extração eficiente do óleo essencial de acordo com (Camara *et al.*, 2023). Após o período de extração, a mistura da fase óleo/água foi centrifugada a 3500 rpm por 10min. O sulfato de sódio anidro foi usado para eliminar quaisquer vestígios remanescentes de água.

4.1.4 Determinação do Rendimento da Extração OEPb

A porcentagem de umidade das amostras foi obtida através de um analisador de umidade IV 2500 – GEHK, por infravermelho. A umidade foi medida triplicata para calcular o desvio médio padrão. Foi pesado 2,0 g do material vegetal seco e levado ao analisador de umidade a uma temperatura de 115 °C por 30 minutos com taxa de secagem de 0,01%/min.

O cálculo do rendimento do OEPb foi expresso em porcentagem (%) e calculado a partir equação 1:

$$\text{Rendimento} = \frac{VOE \times \rho_{OE}}{ma - (ma - \% u)} \times 100$$

Onde,

V_{OE} = Volume do óleo essencial extraído; ρ_{OE} = Densidade do óleo essencial;
 $m_{amostra}$ = Massa da amostra vegetal seca; %Umidade = Umidade da amostra vegetal seca.



Figura 11: Sequência experimental para o procedimento de extração por hidrodestilação do OE a partir da espécie *P. brevipedunculata* envolveu as etapas sequenciais de secagem ao ar do material vegetal, trituração e hidrodestilação sob condições controladas. O rendimento do OEPb foi de 0,81%, e o óleo coletado foi armazenado adequadamente para análise subsequente.

4.1.5 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas CG-EM)

A análise por CG-EM da amostra de OEPb, após o processo de hidrodestilação foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás Trace Ultra acoplado a um espectrômetro de massas de quadrupolo simples ISQ (Thermo Scientific) da Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (CA/CAM/UFAM). O sistema estava equipado com um amostrador automático Tri Plus e uma coluna capilar TR-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). O gás hélio foi usado como gás de arraste, com uma taxa de fluxo de 1 mL/min. A solução de injeção foi preparada dissolvendo 10 mg de óleo em 1 mL de diclorometano, sendo injetado 1 µL dessa solução em uma razão de divisão (*split ratio*) de 1:50. O programa de temperatura da coluna foi o seguinte: temperatura inicial de 40 °C mantida por 4 minutos, seguida por um aquecimento de 4 °C/min até 240 °C, depois 10 °C/min até 280 °C, mantida por 2 minutos (Silva *et al.*, 2013). As temperaturas do injetor, interface e fonte de íons foram mantidas em 250 °C, 250 °C e 220 °C, respectivamente. Os espectros de massa foram adquiridos em uma faixa de m/z 40–440.

A identificação dos constituintes químicos do óleo essencial foi realizada comparando os espectros de massa obtidos com os disponíveis na biblioteca NIST e também comparando os índices de retenção (IR) com dados publicados (Adams, 2007). Os valores de IR foram determinados injetando uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares (C₈–C₂₀) nas mesmas condições de análise. Os cálculos foram realizados de acordo com a equação de Van den Dool e Kratz (Van Den Dool e Kratz, 1963).

4.1.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN do OEPb, tanto uni-dimensional (RMN de ¹H e ¹³C) quanto bi-dimensional (COSY, HSQC e

HMBC) foram obtidos em um aparelho BRUKER AVANCE III HD, operando a 11,75 Teslas (500,13 MHz para RMN de ^1H e 125,76 MHz para RMN de ^{13}C) da Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (CA/CAM/UFAM). A amostra foi solubilizada em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ). Como padrão de referência interno foi utilizado o tetrametilsilano (TMS), δ 0,00 (0,00 ppm). As multiplicidades dos sinais foram determinadas segundo a convenção indicadas por: s (singleto), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), t (triplete), dt (duplo triplete) e m (multiplete). As constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz) (Costa *et al.*, 2020).

4.1.7 Desenvolvimento das formulações Nanogéis

As formulações de nanogel foram preparadas seguindo o procedimento experimental descrito por Schmolka de acordo com a técnica a frio (Schmolka, 1972). Inicialmente, foram feitos testes de otimização das concentrações de plurônico F127, carbopol 974P e água para determinar qual a concentração ideal para obter uma formulação termossensível e estável. Posteriormente, para o preparo dos nanogéis contendo o princípio ativo *OEPb*, uma quantidade predeterminada do copolímero F127 foi adicionada, de forma lenta e controlada, à uma quantidade de água destilada fria, mantida em banho de gelo a uma temperatura entre 5°C e 10°C. Durante esse processo, a mistura foi submetida a agitação suave para garantir que cada partícula do copolímero fosse completamente hidratada pela solução.

Após a etapa de hidratação do copolímero F127, o componente carbopol 974p foi gradualmente incorporado à mistura, mantendo a agitação contínua à mesma temperatura (5°C-10°C) até que o carbopol 974p fosse completamente dissolvido. Em seguida, o ingrediente ativo *OEPb* foi adicionado gota a gota à solução, com a mistura sendo agitada continuamente por mais 30 minutos para garantir a incorporação uniforme dos componentes. Para assegurar a solubilidade completa de todos os ingredientes e a estabilidade da formulação, a solução foi armazenada em repouso no refrigerador a 5°C durante a noite, conforme mostrado na Fig. 12.



Figura 12: Ilustração esquemática da sequência experimental para preparação do nGP. Os procedimentos de química verde são apresentados nas etapas experimentais.

4.1.8 Ensaios de Estabilidade dos Nanogéis

Para investigar a influência da temperatura nas propriedades de estabilidade física e química das formulações de nanogel, foram realizados testes de estabilidade acelerada seguindo o Guia de Estabilidade de Cosméticos da ANVISA e a Farmacopeia dos EUA (United States Pharmacopeia - USP, 2016). Um mililitro da formulação foi centrifugado a 3000 rpm durante 30 min a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A formulação foi armazenada durante todo o estudo tanto em temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) quanto sob refrigeração controlada ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) (a temperatura foi monitorada diariamente). Portanto, as formulações foram submetidas a 7 ciclos de 24 horas a 5°C e 24 horas a 25°C . Assim, a estabilidade física foi determinada observando parâmetros como homogeneidade, separação de fases e características organolépticas (aparência, cor e odor). A estabilidade química dos nanogéis foi avaliada por análise CG-EM comparando a concentração de OE**Pb** nas formulações imediatamente após a preparação do nanogel (dia 0) e posteriormente em intervalos de 7 dias, totalizando 7 pontos de análise.

4.1.9 Análise de Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

As análises de espectroscopia na região de absorção no infravermelho com transformada de Fourier no modo de refletância foram realizadas utilizando um espectrofotômetro FTIR Tracer-100 (Shimadzu). Amostras dos materiais F127, 974p, nG, e nGP foram liofilizadas e pastilhadas com KBr, enquanto uma pequena quantidade de material OEPb puro foi analisada no modo Refletância Total Atenuada (ATR). Para a análise ATR-FTIR, o espectrômetro foi equipado com um acessório ATR horizontal e foi utilizada uma janela de cristal ZnSe (PIKE Technologies). Os espectros foram coletados na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 8 cm^{-1} e 50 varreduras. Os espectros da amostra foram obtidos primeiro espalhando a amostra uniformemente na superfície do cristal ATR, adquirindo o espectro e depois limpando a janela do cristal com hexano e acetona antes de coletar os espectros subsequentes.

4.1.10 Análises Espectroscopia de Absorção Ultravioleta Visível (UV-Vis)

Os espectros de absorção eletrônica de nanogéis a uma concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ g/mL em água foram registrados à temperatura ambiente usando um espectrofotômetro UV-Vis 1800 (Shimadzu).

4.1.11 Análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Os diâmetros hidrodinâmicos médios (D_h) e as análises de potencial ζ foram determinados por 149 dispersão dinâmica de luz (DLS) em água a 25°C e laser semiconductor de 40 mW de 658 nm 150 com um instrumento Litesizer 500 (Anton Paar GmbH) (Módulo BM 10). A medição de D_h 151 foi realizada usando uma cubeta de quartzo de 3,0 mL. O potencial ζ foi realizado usando uma cubeta de baixo volume (Univette). Todas as medições foram realizadas em triplicata (média $153 \pm \text{DP}$).

4.2.12 Teste *in vitro* Frente a Larvas de *A. aegypti*

O perfil larvicida do nanogel nGP foi avaliado contra larvas de *A. aegypti*, seguindo um protocolo adaptado das diretrizes da OMS (WHO, 2005). Os procedimentos de eclosão e criação de larvas seguiram metodologia adaptada de Amaral *et al.*, (2018) e Carvalho *et al.*, (2014). Para os ensaios, 10 larvas de

terceiro *instar* foram imersas em 20 mL da formulação nGPb e em três grupos controle, todas colocadas em copos de poliestireno com volume final de 50 mL. Foram aplicadas cinco concentrações em OEPb: 5, 50, 100, 250 e 500 µg/mL, com 10 repetições para cada concentração, totalizando 50 experimentos e tamanho amostral de 500 larvas. Adicionalmente, foram realizadas 10 repetições para o grupo controle utilizando água mineral para a fase de eclosão e crescimento larval e para o controle negativo com nG, totalizando 20 experimentos e tamanho amostral de 200 larvas. Para o controle positivo foi utilizado o larvicida comercial Temefós fersol na concentração de 100 µg/mL. Foram realizadas dez repetições, totalizando 10 experimentos e um tamanho amostral de 100 larvas. Os ensaios foram monitorados durante um período de 24 e 48 horas para determinar a porcentagem de larvas vivas e mortas, com a taxa de mortalidade calculada como % média e desvio padrão.

4.2.13 Análise Estatística

A análise estatística e a determinação das concentrações letais 50 e 90 (CL₅₀ e CL₉₀), bem como o coeficiente de determinação ajustado (R²Adj), foram realizadas utilizando o software Origin Pro (versão 8.5) com intervalo de confiança fixado em 95% (p < 0,05).

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Determinação do Rendimento do OEPb

O teor de OEPb foi determinado após a utilização da metodologia de extração por meio da hidrodestilação em aparelho de Clevenger, seguindo os parâmetros estabelecidos para hidrodestilação de óleos voláteis, e utilizando os parâmetros da Equação 1. A densidade do óleo essencial de *P. brevipedunculata* (OEPb) foi considerada conforme relatado por Camara *et al.*, (2023) sendo de 0,8995 g/mL. A umidade das folhas foi determinada em triplicata, obtendo-se os valores de 66,15%, 68,34% e 66,20%. O cálculo da média desses valores permite obter um resultado mais representativo e confiável, minimizando possíveis variações experimentais. A média da umidade foi de:

$$U = \frac{66,15\% + 68,34 + 66,20}{3} = 66,89\%$$

A massa total das folhas utilizadas no processo de hidrodestilação foi de 300 g, e o volume de óleo essencial extraído foi de 0,9 mL. Esses resultados serviram de base para o cálculo do rendimento do óleo essencial, um parâmetro crucial para a avaliação de seu potencial farmacológico e industrial.

$$OEPb (\%) = \frac{0,9\text{mL} \times 0,08995 \text{ g/mL}}{300\text{g} - (300\text{g} \times 0,6689)} = 0,81\%$$

O rendimento de extração do OEPb foi de 0,81%. Este rendimento foi menor em comparação a um estudo sazonal do espécime de *P. brevipedunculata*, coletado em São Luís (Maranhão, Brasil), no qual nos meses de março e junho foi de 1,3%, enquanto em fevereiro e setembro foi de 1,1% (Camara *et al.*, 2023). Semelhante a outro espécime de *P. brevipedunculata*, coletado em Campos dos Goytacazes (Rio de Janeiro, Brasil), apresentou um rendimento de 0,96% (Oliveira *et al.*, 2011). Esta variação nos rendimentos de EO pode ser atribuída a mudanças sazonais, condições climáticas, habitat e fatores intrínsecos à planta (Neto e Lopes, 2007).

4.2.2 Caracterização do OEPb por CG-EM

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) foi utilizada para identificar e quantificar os componentes voláteis do OEPb (Fig. 13). A análise revelou um total de treze componentes, representando 91,17% da composição do óleo (Tab.1). O componente principal foi o citral, que compreendeu 64,58% do óleo, representado por dois monoterpenos oxigenados isômeros: geranial (36,06%) e neral (28,52%). Outros constituintes significativos identificados foram o α -pineno (15,73%) e o limoneno (8,28%). Este perfil químico é consistente com estudos anteriores de espécies de *Pectis* coletadas em diferentes regiões do Brasil, onde o conteúdo de citral foi relatado variando de 81,6% a 86,5%, com α -pineno e limoneno como componentes secundários (Pereira *et al.*, 2013).

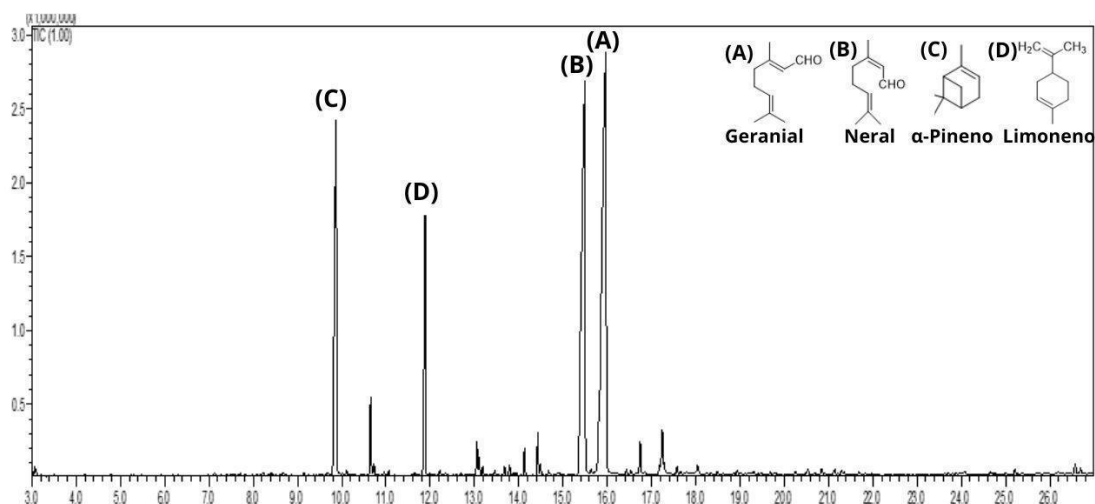
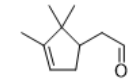
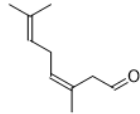
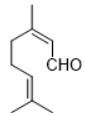
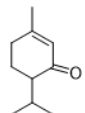
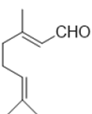
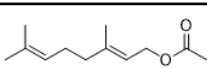
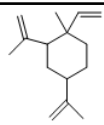


Figura 13: Cromatograma obtido por CG-EM do OEPb evidenciando os picos dos componentes majoritários: (A) geranial, (B) citral, (C) α -pineno e (D) limoneno.

Tabela 1: Análise de CG-EM de OEPb: Índice de retenção(IR), Fórmula molecular(FM) e porcentagem relativa (%).

Constituintes (%)	RI _{Cál.}	RI ^a	F.M.	%	F.E.
Hidrocarbonetos monoterpênicos					
α-Pineno	939	932	C ₁₀ H ₁₆	15,73	
Campheno	949	946	C ₁₀ H ₁₆	0,1	
β -Pineno	975	974	C ₁₀ H ₁₆	0,28	
Limoneno	1025	1024	C ₁₀ H ₁₆	8,28	
(E)- β -Ocimeno	1042	1044	C ₁₀ H ₁₆	0,11	
Monoterpenos oxigenados					
Linalol	1089	1095	C ₁₀ H ₁₈ O	0,37	

6-Camphenol	1108	1111	C ₁₀ H ₁₆ O	0,1	
<i>E</i> -Isocitral	1165	1160	C ₁₀ H ₁₆ O	1,02	
Neral	1230	1235	C₁₀H₁₆O	28,52	
Piperitone	1240	1249	C ₁₀ H ₁₆ O	0,17	
Geranial	1262	1264	C₁₀H₁₆O	36,06	
Derivados de ácidos graxos					
Acetato de Geranila	1373	1379	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0,18	
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos					
β-Elemeneno	1407	1398	C ₁₅ H ₂₄	0,25	
Total Identificado (%)			91,17%		

^a(Pereira *et al.*, 2013)

Em geral, as espécies de *Pectis* apresentam aromas agradáveis de cítricos devido à presença característica de constituintes monoterpênicos em suas composições voláteis. Os principais monoterpenos encontrados nos OEs de *Pectis* podem ser descritos de acordo com suas vias biossintéticas fig. 14: nerol/neral e geraniol/geranial dispostos em um esqueleto do tipo acíclico; α-pineno e β-pineno em um esqueleto do tipo pinano; e limoneno, paraldeído, cuminaldeído, carvona, p-cimeno e timol em um esqueleto do tipo *p*-mentano (Dewick, 2002). O aroma cítrico do OE *Pb* é principalmente devido ao alto teor de neral e geranial em sua composição volátil (Marques *et al.*, 2013).

Altas concentrações de citral (81,6-86,5%) foram relatadas no OE de espécimes coletados no sudeste (Rio de Janeiro e Espírito Santo) e nordeste (Ceará) do Brasil, seguido por α-pineno e limoneno (Marques e Kaplan, 2013; Pereira *et al.*, 2013). Apesar das diferentes zonas climáticas, o teor de citral no OE dos espécimes foi em torno de 80,0% em cada amostra (Domingues; Carlo; Pieri, 2022). No entanto, as mudanças sazonais podem influenciar a

composição química do OE de *P. brevipedunculata*. Em um estudo sazonal avaliando a composição volátil do espécime *P. brevipedunculata*, coletado em São Luís (Maranhão, Brasil), foi possível observar uma variação significativa no teor dos principais constituintes, como geranial (27,0-42,7%), neral (22,8-33,2%), α -pineno (7,2-19,8%) e limoneno (5,3-9,4%) nas estações seca e chuvosa. Neste mesmo estudo, variações expressivas desses compostos também foram observadas no período circadiano (Camara *et al.*, 2023).

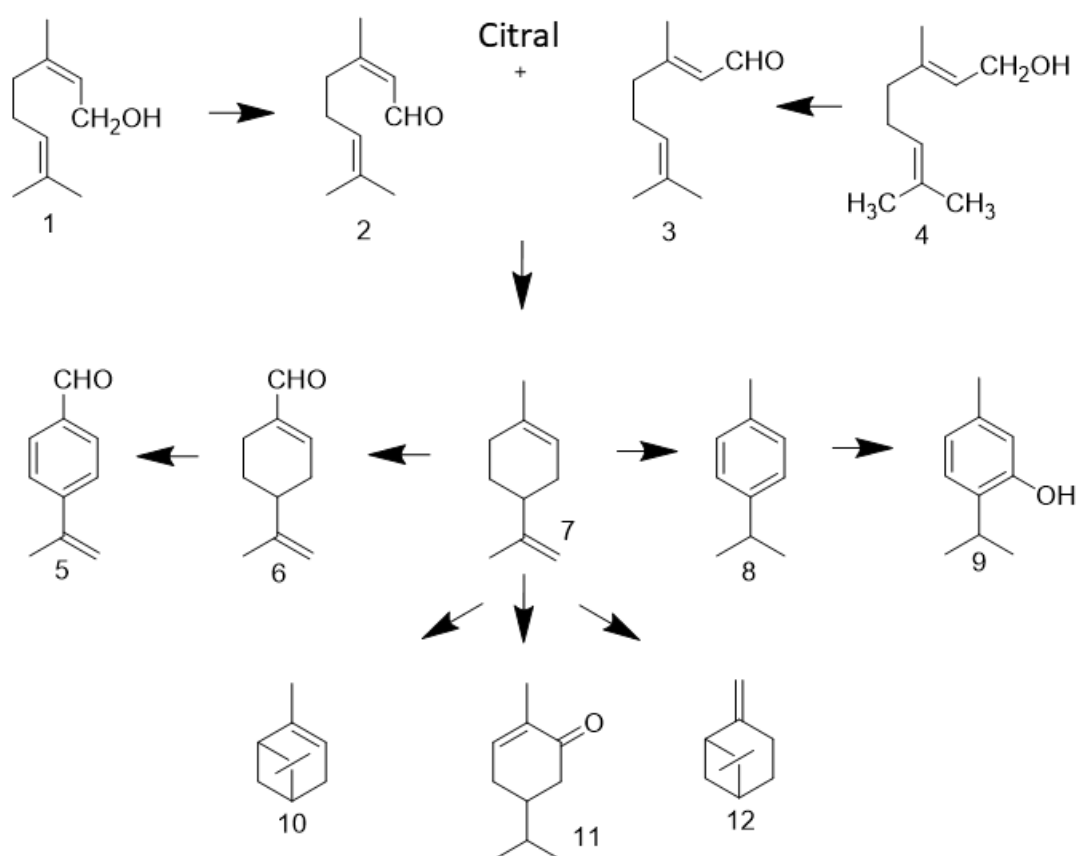


Figura 14: Monoterpenos encontrados nos óleos de *Pectis* e sua relação biossintética, envolvendo interconversão por reações de isomerização, ciclização, hidroxilação e aromatização. (1) Nerol, (2) neral, (3) geranial, (4) geraniol, (5) cuminaldeído, (6) perilaldeído, (7) limoneno, (8) p-cimeno, (9) timol, (10) α -pineno, (11) carvona e (12) β -pineno (Massing *et al.*, 2021; Camara *et al.*, 2023).

Embora haja variabilidade na composição química devido a fatores ambientais, estações e épocas de coleta, os principais componentes, neral e geranial, se mantêm entre os principais (50-80%). As concentrações de neral, geranial, α -pineno e limoneno em nosso estudo são consistentes com os resultados de um estudo recente conduzido por (Araujo *et al.*, 2024). A

composição química do OE de espécies de *Pectis* foi amplamente relatada. Outros espécimes como *Pectis elongata* do Pará e Roraima (Brasil) são considerados fontes naturais de citral (>85%) (Nascimento *et al.*, 2021; Pereira *et al.*, 2021). Semelhante ao perfil químico encontrado em nosso estudo, o OE de *Pectis oligocephala*, coletado em Sobral (Ceará, Brasil) foi rico em geranial (42,9 a 44,5%), neral (32,2 a 34,2%), seguido por α -pineno (10,7 a 11,4%) e limoneno (6,7 a 6,9%) (Albuquerque *et al.*, 2003). A composição volátil de *P. odorata*, amostrada em Córdoba (Argentina), apresenta uma mistura de citral (50%; neral, 27,2%; geranial, 23,6%) e limoneno (50,2%) (Duschatzky *et al.*, 2005). O limoneno também está presente no óleo de *P. prostata* (16,2%) de Cuba e em pequenas concentrações em *P. substriata* (6,46%) do Mato Grosso do Sul (Brasil) (Jesus *et al.*, 2020; Pino; Rosado; Fuentes, 1996).

4.2.3 Caracterização do OEPb por RMN

Para confirmar a estrutura dos principais compostos, OEPb foi submetido a análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-treze (RMN de ^1H e ^{13}C ; 500,13 e 125,76 MHz, respectivamente, em CDCl_3) (Tab. 2 e 3). O espectro de RMN de ^1H de OEPb (Apêndice) apresentou ressonâncias indicativas de uma mistura de dois isômeros, conforme mostrado pelas variações dos prótons (H-9) correspondentes aos prótons de aldeídos identificados por dois dupletos em δ 9,99 e 9,89 ppm (Fig.15). A integração desses sinais resultou em uma razão neral:geranial de 0,87:1,0. Os sinais de prótons ressonando em δ 5,18 e 5,20 correspondem aos prótons metínicos dos cicloalcenos (H-3 e H-2), confirmando a presença do α -pineno e limoneno no OEPb.

Tabela 2- Dados de RMN para ^1H e ^{13}C (500,13 e 125,76 MHz, respectivamente; CDCl_3) dos compostos majoritários neral e geranial presentes no OEPb e comparação com dados da literatura. (δ) deslocamento químico.

Posição	OEPb				Literatura (Glamočlija <i>et al.</i> , 2011)			
	Neral		Geranial		Neral		Geranial	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	9,99	191,2	9,89	190,7	9,99	191,5	9,90	190,6
2	5,88	127,4	5,88	128,6	5,88	127,1	5,88	128,7
3	-	163,8	-	163,8	-	163,9	-	163,9

Posição	OEPb				Literatura (Glamočlija et. al., 2011)			
	Neral		Geranial		Neral		Geranial	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
4	2,20	40,6	2,59	32,6	2,20	40,3	2,59	32,3
5	2,17	25,7	2,17	27,9	2,17	25,5	2,17	27,8
6	5,18	122,6	5,09	122,3	5,16	122,4	5,10	122,1
7	-	132,9	-	133,6	-	132,9	-	133,4
8	1,68	25,6	1,68	25,6	1,68	25,3	1,68	25,3
9	1,61	17,7	1,61	17,5	1,61	17,4	1,61	17,4
10	1,59	17,5	1,98	25,0	1,99	17,2	1,99	24,7

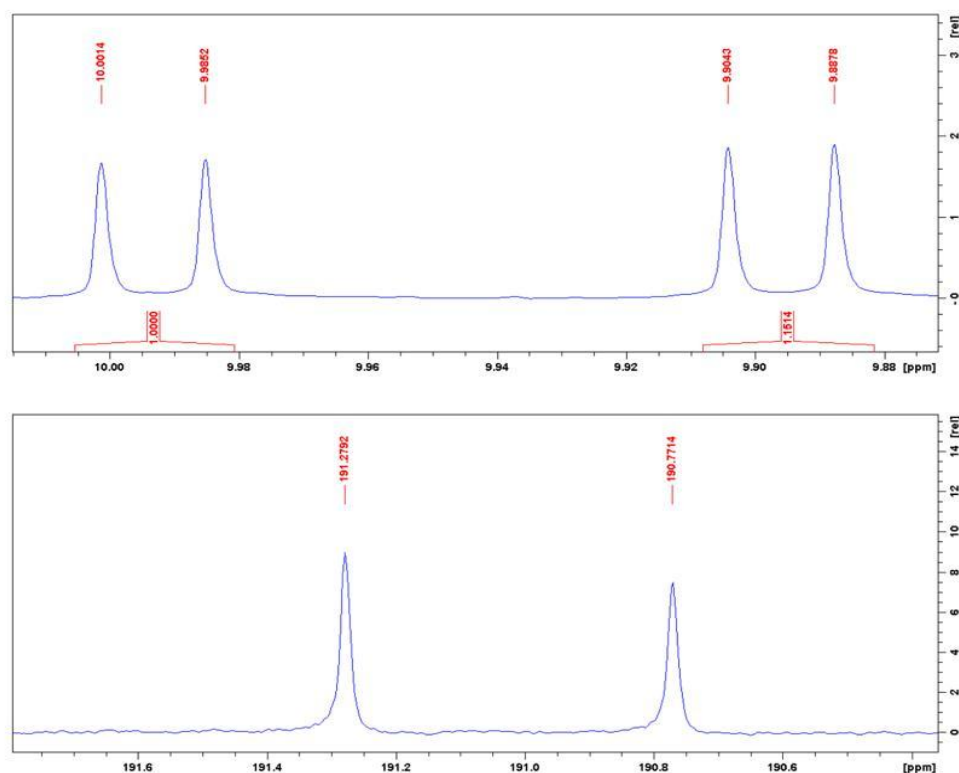


Figura 15: Região ampliada dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C (abaixo) adquiridos para o OEPb em CDCl_3 .

No espectro de RMN de ^{13}C analisado, conforme apresentado na Tab. 3 e na Fig. 15, os sinais referentes às carbonilas (C-1) foram observados em δ 191,2 e 190,7, correspondendo, respectivamente, aos isômeros neral e geranial, em conformidade com valores de deslocamentos químicos observados para aldeídos em espectros de RMN de ^{13}C , os quais variam

tipicamente entre δ 185-220 (Pavia *et al.*, 2015). Além disso, os valores observados para os carbonos C-2 e C-3 para o neral (δ 127,4 e 163,8, respectivamente), e para os carbonos C-2 e para o geranial (δ 128,6 e 163,8 respectivamente), estão dentro da faixa esperada para carbonos insaturados presentes em estruturas de anéis aromáticos, cuja faixa de deslocamento químico varia entre δ 110-175.

De acordo com a Tabela 3, os sinais em δ 144,5 (C-2) e 116,0 (C-3) correspondem aos carbonos sp^2 do α -pineno. Já os sinais observados em δ 133,6 (C-1), 120,6 (C-2), 163,8 (C-8) e 108,4 (C-9) foram atribuídos aos carbonos sp^2 do limoneno. Os dados de RMN de 1H e ^{13}C estão de acordo com as observações de (Glamoclija *et al.*, 2011; Farias *et al.*, 2019).

Tabela 3 - Dados de RMN para 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente; CDCl₃) dos compostos majoritários α -pineno e limoneno presentes no OEPb e comparação com dados da literatura. (δ) deslocamento químico.

Posição	OEPb				Literatura (Farias et al., 2019)			
	α -Pineno		Limoneno		α -Pineno		Limoneno	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	1,98	47,0	-	133,6	1,93	47,0	-	133,6
2	-	144,5	5,40	120,6	-	145,0	5,45	120,6
3	5,18	116,0	(2,35; 2,31)	30,8	5,20	116,0	(2,28; 2,08)	30,8
4	(2,23; 2,21)	31,2	1,65	41,1	(2,23; 2,21)	31,2	1,67	41,0
5	2,04	40,7	(1,61; 1,59)	30,6	2,06	40,7	(1,67; 1,49)	30,5
6	-	37,9	2,08	27,9	-	37,9	2,08	27,9
7	(1,61; 1,59)	31,4	1,73	23,4	(1,61; 1,55)	31,4	1,79	23,4
8	1,26	26,3	-	163,8	1,28	26,3	-	159,2
9	0,83	20,8	4,70	108,4	0,83	20,8	4,77	108,3
10	1,66	22,9	1,65	22,5	1,67	22,9	1,71	20,6

4.2.4 Desenvolvimento dos nanogéis vazios (nG)

Para se obter um comportamento termossensível para os nanogéis, foram consideradas algumas combinações dos excipientes variando-se de 5-20:0,1-0,3 (m/m) a proporção de F127:974p como mostra a tab. 4. Combinações de nG1-nG6 resultaram em formulações líquidas a 5 e 30 °C,

não exibindo comportamento termorresponsivo desejado. Enquanto as formulações contendo nG7-nG9 exibiram um comportamento termorresponsivo mais pronunciado em comparação com nG1-nG6, no entanto, a viscosidade não atingiu o nível desejado. Por outro lado, formulações com nG10-nG12 permaneceram líquidas a 5°C e transicionaram para semi-sólidas 30 °C com um tempo de transição de aproximadamente 10 minutos de sol para gel. Notavelmente, a combinação de nG10 produziu uma formulação de baixa viscosidade, enquanto a combinação de nG12 resultou em formulações de alta viscosidade após avaliações sensoriais. A combinação otimizada que melhor se adequou às características desejadas foi determinada como nG11, servindo como base para a incorporação do ingrediente ativo *OEPb* em várias porcentagens em massa, designada como nG, com uma rápida transição de sol para gel (Fig. 16).

Tabela 4 - Diferentes composições % (m/m) dos componentes dos nanogéis vazios (nG): plurônico F127, carbopol 974P e água.

Componentes (% m/m)			
Amostra	Água	Plurônico F127	Carbopol 974P
nG1	94,9	5	0,1
nG2	94,8	5	0,2
nG3	94,7	5	0,3
nG4	89,9	10	0,1
nG5	89,8	10	0,2
nG6	89,7	10	0,3
nG7	84,9	15	0,1
nG8	84,8	15	0,2
nG9	84,7	15	0,3
nG10	79,9	20	0,1
nG11	79,8	20	0,2
nG12	79,7	20	0,3

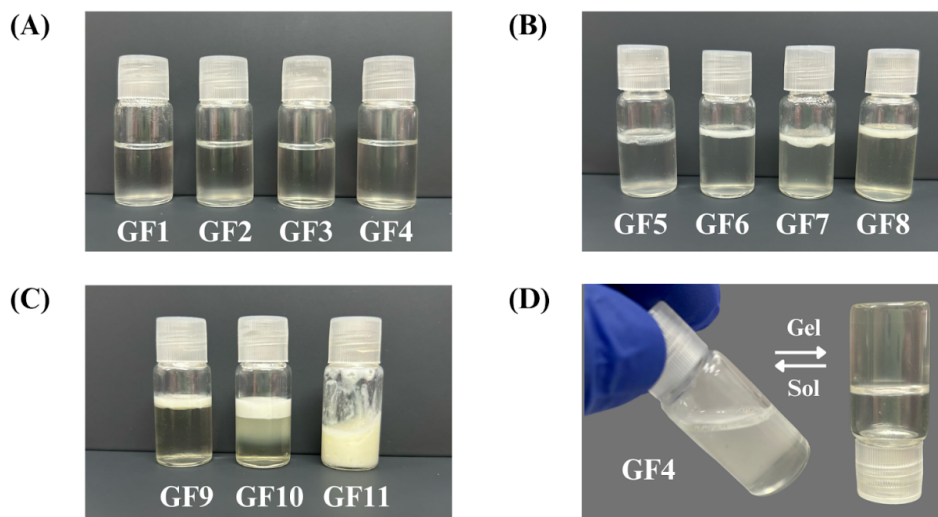


Figura 16: Fotos das formulações de nanogel preparadas com diferentes composições % (m/m) de F127, 974p, H₂O e OEPb de acordo com a Tabela 4. (A) GF1-GF4 apresentam formulações estáveis; (B) GF5 a GF8 exibem separação de fases; (C) GF9 e GF10 mostram separação de fases, e GF11 exibe estabilidade na forma de uma nanoemulsão. (D) O comportamento termorresponsivo foi demonstrado para a formulação GF4.

4.2.5 Desenvolvimento de nanogéis carregados com OEPb

A Tab. 5 mostra a combinação de nG com diferentes % (m/m) de OEPb. A avaliação preliminar da estabilidade das formulações nGF1-nGF11 forneceu informações valiosas sobre suas características físicas e sua adequação ao potencial para o desenvolvimento de nanogéis. As formulações nGF1-nGF4 apresentaram-se como soluções homogêneas e transparentes imediatamente após a preparação, mantendo sua integridade sem alterações visíveis na aparência física após 24h de armazenamento (Fig. 16A). Essas formulações são candidatas promissoras para futuras otimizações e uso potencial no desenvolvimento de nanogéis, já que sua estabilidade sob condições refrigeradas indica sua adequação para aplicações práticas. Em contraste, as formulações nGF5-nGF10 mostraram sinais de instabilidade, incluindo leve turvação logo após a preparação e separação de fases após 24h de armazenamento, caracterizada pelo aparecimento de uma camada oleosa na superfície da formulação (Figs. 16B e 16C). A espessura dessa camada oleosa aumentou de nGF5 para nGF9, indicando uma queda na estabilidade ao longo do tempo e a necessidade de ajustes nas formulações para melhorar sua estabilidade e potencial no desenvolvimento de nanogéis. A formulação nGF10

apresentou baixa estabilidade, com turvação logo após a preparação e separação trifásica após 24h de armazenamento. Essas observações sugerem que nGF10 pode exigir modificações significativas para resolver questões de estabilidade e torná-la adequada para desenvolvimento futuro. No entanto, a formulação nGF11 apresentou características de estabilidade promissoras, mantendo uma aparência de emulsão após 24h de armazenamento (Fig.16C), indicando seu potencial para investigações e desenvolvimento contínuos de formulações de emulsão. No entanto, dado que o estudo tinha como objetivo a formulação de nanogéis (O/A), as formulações nGF1-nGF4 foram priorizadas para investigações subsequentes de estabilidade acelerada. Essa decisão foi tomada para otimizar recursos e focarem formulações que demonstraram estabilidade inicial, potencialmente acelerando o processo de desenvolvimento.

Tabela 5 - Diferentes composições % (p/p) de *OEPb* e água foram incorporadas à formulação nG para atingir nGF1 a nGF11.

Código	Componentes				Estabilidade
	Água	F127	974p	<i>OEPb</i>	
nGF1	79,7	20	0,2	0,125	E ^a
nGF2	79,6	20	0,2	0,25	E ^a
nGF3	79,3	20	0,2	0,5	E ^a
nGF4	78,8	20	0,2	1	E ^a
nGF5	78,6	20	0,2	1,25	SF
nGF6	78,3	20	0,2	1,5	SF
nGF7	77,8	20	0,2	2	SF
nGF8	77,3	20	0,2	2,5	SF
nGF9	74,8	20	0,2	5	SF
nGF10	69,8	20	0,2	10	SF
nGF11	59,8	20	0,2	20	E ^b

E: Estável; SF: Separação de Fases; ^a Nanogel; ^b Nanoemulsão.

4.2.6 Ensaio de Estabilidade Acelerada das Formulações nGF1–nGF4

Os resultados dos testes de estabilidade acelerada realizados nas formulações nGF1–nGF4 forneceram informações importantes sobre os perfis de estabilidade física dessas formas semissólidas. Seguindo as diretrizes da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), nosso estudo analisou tanto a integridade química dos ingredientes farmacêuticos ativos (IFA) quanto as características físicas das formulações durante um rigoroso período de

avaliação (USP, 2005). De acordo com os padrões da USP, a estabilidade química das preparações é determinada pela manutenção da concentração do IFA dentro de uma faixa de 90-110% do valor inicial registrado no dia 0. Nossos resultados indicam que as formulações nGF1 a nGF4 permaneceram dentro dessa faixa aceitável durante todos os sete ciclos de avaliação, demonstrando uma estabilidade física sólida sob condições simuladas de armazenamento com variações de temperatura (5°C e 32°C).

Uma das características observadas nas formulações nFG1-nFG4 foi a transição sol-gel, que foi satisfatoriamente alcançada em todas as amostras. No entanto, uma observação importante é a diferença no tempo necessário para essa transição, que variou de acordo com a quantidade de *OEPb* presente na formulação. As formulações contendo menor quantidade de *OEPb* apresentaram transição sol-gel em aproximadamente 7 minutos, enquanto a formulação com 1% de *OEPb* sofreu essa transição em apenas 3 minutos. Essa diferença no tempo de geleificação pode ser explicada pela interação do *OEPb* com os polímeros utilizados na formulação F127 e o 974P. O copolímero F127 é um polímero termossensível que sofre transição sol-gel devido à autoassociação das suas cadeias hidrofóbicas em temperaturas mais elevadas (Dou; Karim; Loh, 2016). O *OEPb*, sendo uma substância apolar, pode interagir com as regiões hidrofóbicas do F127, favorecendo a formação de micelas e acelerando a transição para o estado gel. Além disso, o *OEPb* pode reduzir a quantidade de água livre disponível, promovendo uma estrutura mais compacta e facilitando a organização dos polímeros na matriz gelificada. A interação do óleo essencial com o F127 pode reduzir a energia necessária para a reorganização das micelas poliméricas, tornando o processo de transição mais rápido (Grillo; Morfin; Prévost, 2018). Além disso, o Carbopol 974P, quando disperso em meio aquoso, forma uma estrutura reticulada que pode ser afetada pela presença do óleo, contribuindo para a estabilização do gel em um tempo reduzido. Portanto, a formulação com maior concentração de óleo essencial apresentou uma transição sol-gel mais rápida devido à intensificação das interações hidrofóbicas, que promovem uma reorganização mais eficiente dos polímeros e uma formação acelerada da matriz gelificada.

Além disso, a ausência de alterações visíveis, como sedimentação de partículas ou separação de fases, e as propriedades organolépticas, como odor e cor, mantiveram-se inalteradas. Essas observações foram consistentes independentemente das condições de armazenamento, destacando a resistência das formulações às flutuações de temperatura e exposição à luz durante o teste de estabilidade acelerada, que durou 14 dias. Posteriormente, um teste de vida útil foi conduzido ao longo de 180 dias sob condições refrigeradas (5°C), reafirmando a integridade física e as propriedades organolépticas das formulações ao longo do tempo. Essa estabilidade prolongada reforça a adequação das formulações para armazenamento de longo prazo, especialmente em ambientes onde o controle de temperatura é um fator crítico.

A avaliação abrangente das formulações nGF1-nGF4 demonstra perfis robustos de estabilidade física e química, posicionando-as como candidatas promissoras para aplicações farmacêuticas. Esses resultados contribuem para o conhecimento sobre a estabilidade de formas farmacêuticas semis-sólidas e abrem caminho para seu potencial uso em diversos contextos terapêuticos. No entanto, estudos adicionais que incorporem mais parâmetros e avaliações de longo prazo são necessários para aprofundar nossa compreensão e aumentar a confiança na estabilidade e eficácia dessas formulações. Considerando o desempenho estável das formulações de nanogel nGF1-nGF4 nos ensaios de estabilidade, a formulação nGF4 (nGP) foi selecionada para estudos posteriores devido ao seu maior conteúdo de *OEPb*.

4.3 Caracterizações do Nanogel nGP

4.3.1 Caracterização por CG-EM e UV-Vis

A análise por CG de nGP foi conduzida após o ensaio de estabilidade acelerada para avaliar a estabilidade química. A comparação dos cromatogramas do *OEPb* e do nanogel nGP revelou uma alta similaridade nos perfis cromatográficos apresentando a mesma ordem de eluição: α -pineno, limoneno, geranial e neral. No entanto, o cromatograma de nGP demonstrou uma maior intensidade nos picos correspondentes a α -pineno e limoneno em relação à mistura dos isômeros geranial e neral (vide Apêndice). Interpretamos

esse resultado como indicativo de que, devido ao caráter ligeiramente mais hidrofóbico do α -pineno e limoneno, há uma tendência no aumento da solubilidade destes na matriz copolimérica do F127, o que naturalmente justifica a utilização dessa classe de polímero para a solubilização de drogas hidrofóbicas, conseqüentemente, foi possível observar um pequeno aumento das áreas sob os picos relacionados ao α -pineno e limoneno, frente à mistura de isômeros.

As análises de UV-Vis realizadas nas formulações GF1-GF4 a $5,0 \times 10^3$ g/mL em água apoiam o encapsulamento de OEPb na matriz nG (Apêndice). A banda de absorção observada em 240 nm corresponde à presença de OEPb. Observa-se que, na mesma concentração, um aumento na porcentagem de OEPb nas formulações GF1-GF4 resulta em um aumento proporcional na absorção a 240 nm, garantindo que as moléculas de OEPb permaneçam solubilizadas e bem estabilizadas dentro da matriz polimérica dos nanogéis.

4.3.2 Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Inicialmente procedemos com a caracterização dos materiais puros, óleo essencial da *P. brevipedunculata* (OEPb), plurônico (F127) e carbopol (974p). No espectro de FTIR do OEPb (Fig. 17 A), a banda de absorção de média intensidade entre $2954\text{--}2870\text{ cm}^{-1}$ está associada aos estiramentos simétrico e assimétrico das ligações C—H. As bandas finas em 1442 e 1377 cm^{-1} estão também associadas às vibrações das ligações C—H, correspondendo aos modos vibracionais de tesoura e balanço, respectivamente. A banda fina, de alta intensidade, em 1674 cm^{-1} e a banda de baixa intensidade entre $887\text{--}789\text{ cm}^{-1}$ estão relacionadas, respectivamente, ao estiramento e ao dobramento de ligações C=C de alcenos trissubstituídos, como suporte à presença dos compostos α -pineno e limoneno na composição química do OEPb. O pequeno ombro observado em 1712 cm^{-1} , característico de estiramento de carbonila de aldeídos conjugados, confirma a presença dos isômeros neral e geranial na composição do OEPb. A Figura 17B mostra o espectro de FTIR para o nanogel nGP.

O espectro de FTIR do copolímero F127 é mostrado na Fig.17B. Uma banda larga e de média intensidade com absorção em 3564 cm^{-1} está

associada à frequência de estiramento O—H de ligações de hidrogênio intermoleculares, enquanto que a banda associada com a frequência de estiramento das ligações C—O—C aparece em 1103 cm^{-1} . De fato, a associação das cadeias alongadas do copolímero F127 facilita a formação de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas das cadeias de PEO e entre estas e os grupos éter.

O espectro de FTIR do polímero 974p é mostrado nas Fig. 17 C e D. A banda larga e intensa observada entre $3475\text{--}3414\text{ cm}^{-1}$ está associada com as frequências de estiramento das ligações O—H dos grupamentos carboxílicos, tanto na forma livre, como também associados com interações intermoleculares, valor este em 3414 cm^{-1} , tipicamente atribuído a formação de dímeros de ácidos carboxílicos, com forte estabilização por ligações de hidrogênio. A banda observada em 1720 cm^{-1} , característica de estiramento C=O associado com interações intermoleculares, infere a presença de interações do tipo O—H---O=C. A carbonila funcionando como um grupo elétron-retirador, ativa eletronicamente o átomo de oxigênio, possibilitando a formação de ligações cruzadas de hidrogênio quando combinado com o F127. Estas características, intrínsecas do 974p, o torna um material robusto para o desenvolvimento de nanoplataformas Drug-delivery com propriedades bioadesivas, alta viscosidade, elevada % de eficiência de encapsulamento, e

comportamento termossensível, mesmo que empregado em pequenas % m/m).

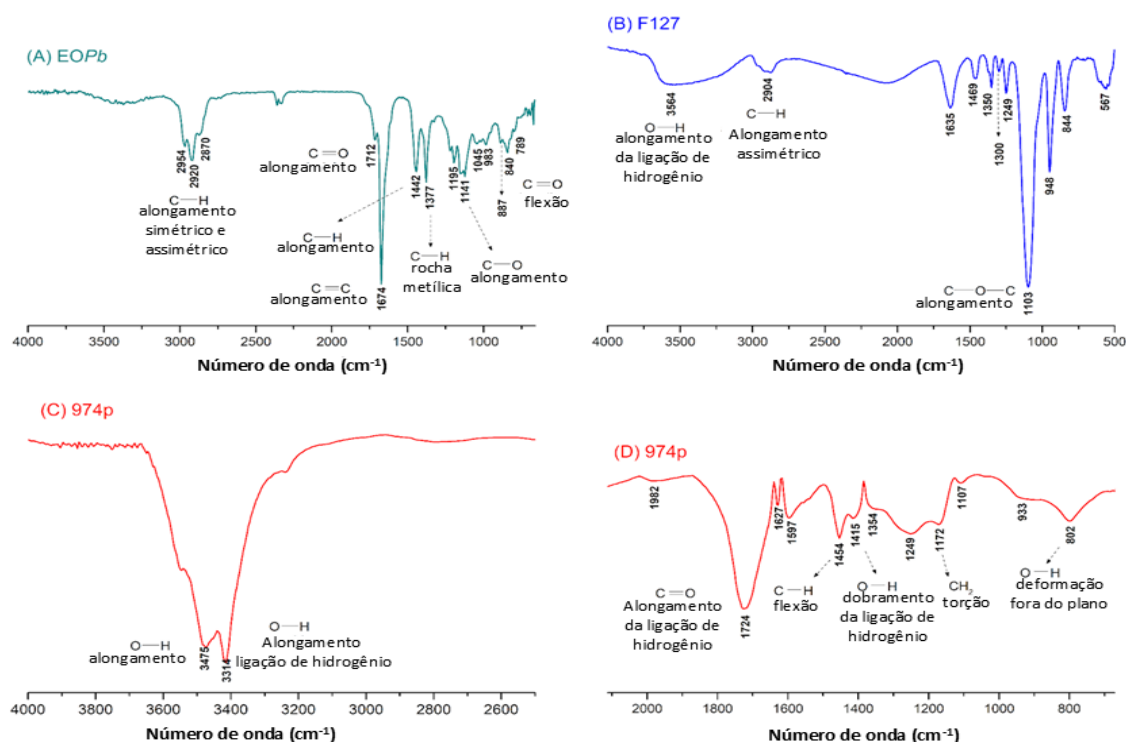


Figura 17: Espectros de FT-IR dos materiais puros (A) Óleo Essencial da *P. brevipedunculata* (OEPb), (B) Plurônico F127 (F127), (C) Carbopol 974p (974p) entre 4000-2500 cm^{-1} e (D) 974p entre 2500 a 690 cm^{-1} .

A análise de FTIR é uma ferramenta altamente eficaz frequentemente utilizada para investigar o processo de encapsulação de ingredientes farmacêuticos ativos (IFA) dentro de nanoplateformas poliméricas para aplicações de liberação de fármacos. Ao examinar mudanças ou deslocamentos nas intensidades das bandas e o alargamento das vibrações nos espectros de FTIR, pode-se obter insights sobre propriedades como miscibilidade e interações entre cadeias de macromoléculas e IFA. Assim, a adição de 1% de OEPb na matriz nG altera significativamente os valores das bandas de absorção relacionadas à mistura F127/974p (Fig. 118)

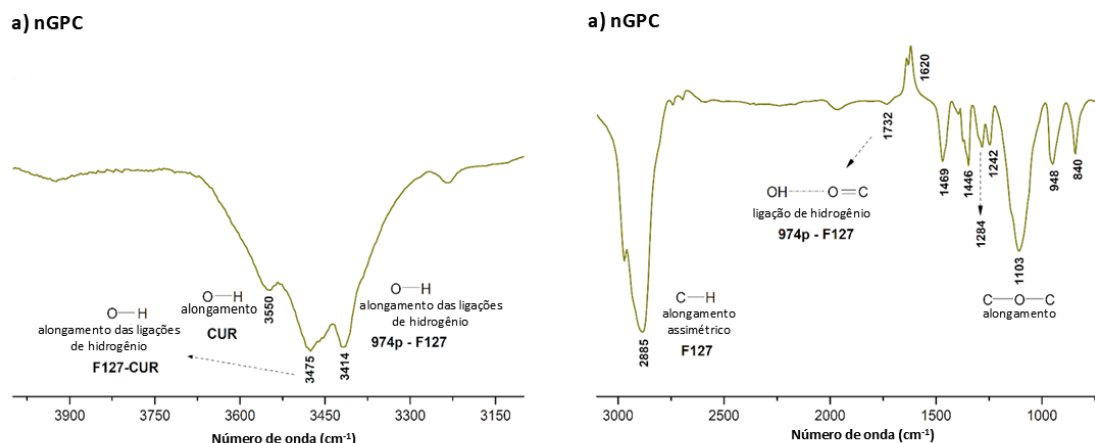


Figura 18 - Espectros de FTIR dos nanogéis (A) nG e (B) nGP.

A banda de absorção forte e fina em 3676 cm^{-1} é resultado de um acentuado deslocamento de absorção para o vermelho com $\Delta = 112\text{ cm}^{-1}$ da banda em 3564 cm^{-1} observada no espectro do nG. Essa descoberta indica que uma diminuição de energia é necessária para o estiramento das ligações de O—H, muito provavelmente as moléculas do *OEPb*, levando à interpretação de que as moléculas de *OEPb* mais hidrofóbicas estão preferencialmente acomodadas nas cadeias de PPO de F127. Parte dessa interpretação baseia-se na energia aumentada necessária para o estiramento anti-simétrico das ligações C—H, conforme indicado pelo aumento da intensidade e deslocamento para o azul ($\Delta = 19\text{ cm}^{-1}$) da banda de 2904 cm^{-1} (nG) para 2885 cm^{-1} no espectro de nGP (Fig. 18B), indicando um aumento significativo nas interações hidrofóbicas do sistema.

4.3.3 Caracterização por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O tamanho de partícula e o potencial ζ do nGP foram medidos quantitativamente usando a técnica DLS. O DLS surgiu como uma ferramenta essencial para determinar a distribuição do tamanho de nanopartículas em uma solução. Ao analisar as flutuações na intensidade da luz espalhada causadas pelo movimento browniano, o DLS fornece insights valiosos sobre o diâmetro hidrodinâmico (D_h) e a polidispersão de nanogéis, avaliando a homogeneidade e a estabilidade das formulações de nanogéis. Complementarmente ao DLS, a análise do potencial de ϑ oferece uma compreensão mais profunda do comportamento do nanogel, avaliando suas características de carga superficial.

A análise de DLS de nGP foi realizada em duas concentrações, diluição máxima e mínima em água destilada para garantir que o equipamento pudesse medir com precisão o tamanho das partículas e as propriedades do potencial de ζ em solução. Os resultados das medições de DLS revelaram diferenças notáveis. Sob diluição máxima, o D_h das partículas apresentou um valor médio de 30,44 nm e PDI de 0,54, indicando uma maior dispersão de partículas na solução (Fig. 19A). Normalmente, nanopartículas destinadas à liberação de fármacos estão na faixa de tamanho de 10 a 200 nm. Portanto, a escolha do tamanho apropriado da nanopartícula é crucial para otimizar a eficácia dos sistemas de liberação de fármacos. É bem documentado que o F127 tem uma maior propensão a se auto-organizar em soluções diluídas, formando tipicamente agregados esféricos. Essa faixa é escolhida porque nanopartículas dentro dessa faixa de tamanho exibem características favoráveis, como maior captação celular, tempo de circulação prolongado na corrente sanguínea e melhor biodistribuição.

O D_h aumentou significativamente para 429,3 nm, e PDI de 0,27 sob diluição mínima (Fig. 19C). Em concentrações mais altas, o F127 pode auto-assemblar-se em um complexo morfológico. Agregados maiores podem estar interconectados por uma arquitetura ramificada, chamada de micelas do tipo "worm-like", levando a agregados estáveis de tamanhos ainda maiores, como evidenciado em estudos anteriores (Costa *et al.*, 2024). Além disso, em concentrações mais altas, os nanogéis podem permanecer intactos por períodos prolongados em aplicações que requerem liberação controlada de ingredientes farmacêuticos ativos. Esse comportamento é atribuído à estrutura robusta formada por micelas do tipo "worm-like", que facilita a liberação sustentada e controlada das substâncias ativas.

Estudos mostram que, devido à sua arquitetura ramificada e capacidade de se organizarem formas de rede tridimensionais, os nanogéis podem manter a estabilidade do fármaco por um longo tempo, liberando o ingrediente ativo de maneira gradual e por um período prolongado. Essa característica é particularmente benéfica para tratamentos que requerem liberação prolongada, aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo a necessidade de administração frequente.

As medições do potencial de ζ não mostraram mudanças significativas nos valores nessas concentrações. Curiosamente, ambas as condições de diluição exibiram valores de potencial de ζ próximos de zero (Figs. 19 C e D). Apesar da proximidade do potencial de ζ a zero, indicando a falta de repulsão eletrostática forte entre as partículas, a estabilidade do sistema não foi notavelmente afetada.

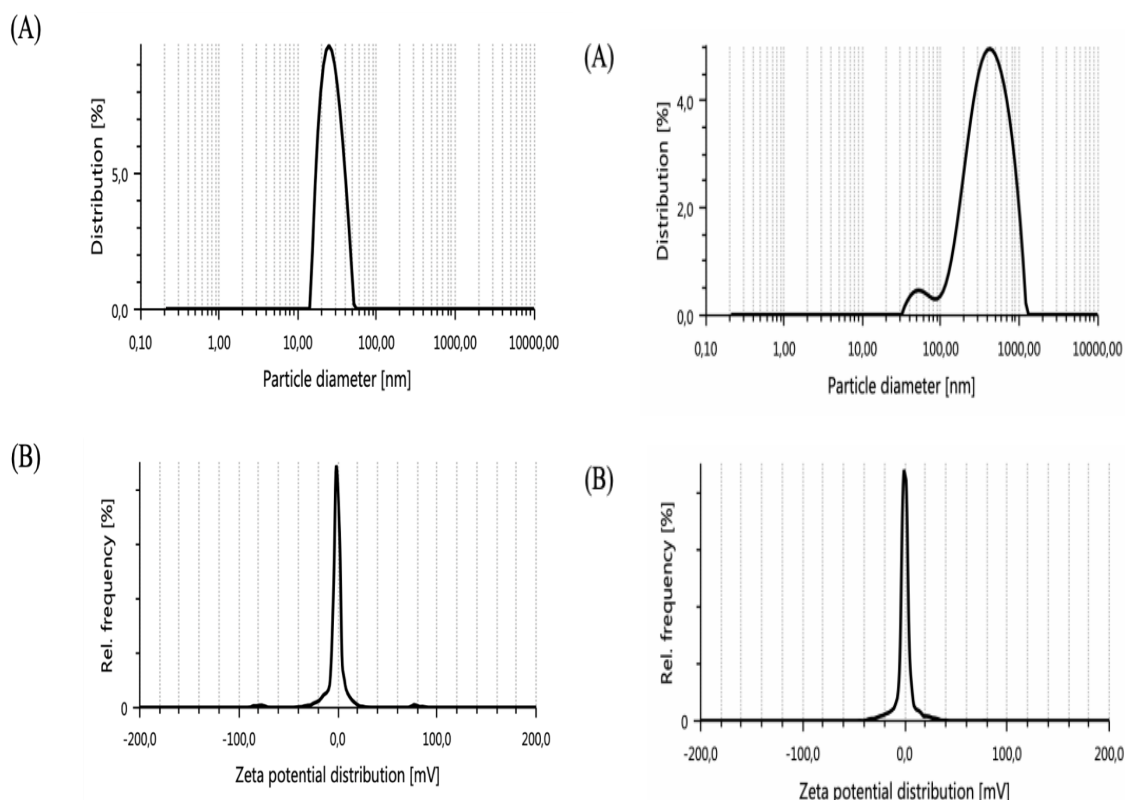


Figura 19: Distribuição do tamanho de partículas em condições de (A) alta diluição, mostrando um D_h de 30,18 nm e PDI de 0,54, e (B) (D) potencial ζ de -1,6 mV. Em condições de baixa diluição (C) o valor de D_h é alterado para 429,3 nm, e PDI de 0,27 e (D) sem alteração significativa no valor do potencial ζ .

4.3.4 Ensaios *in vitro* do nGP Contra Larvas de *A. aegypti*

Os resultados apresentados na Tabela 6 destacam a potente eficácia larvicida do nanogel nGP contra larvas de *A. aegypti* em diferentes concentrações da formulação carregada com OEPb, variando de 5 a 500 $\mu\text{g/mL}$, nos intervalos de tratamento de 24-48 h. As taxas de mortalidade, expressas em porcentagens com desvios-padrão acompanhantes, foram avaliadas para uma amostragem de 10 larvas por concentração, fornecendo suportes robustos sobre os efeitos dependentes da concentração da formulação do nGP. A atividade larvicida observada nas concentrações mais

baixas foi mínima, com taxas de mortalidade de $1,0\% \pm 3,2$ após 24 h e $1,0-2,0\% \pm 3,2-4,2$ após 48 h (Entradas 1 e 2). Essas observações sugerem que o nanogel em dosagens tão baixas é insuficiente para interromper funções biológicas críticas nas larvas, destacando a importância de otimização da concentração para controle vetorial eficaz.

A aplicação de nGP a $100 \mu\text{g/mL}$ resultou em um aumento moderado na mortalidade, alcançando $11,0\% \pm 12,9$ em 24 h e $16,0\% \pm 13,5$ em 48 h (Entrada 3). Embora um aumento temporal na eficácia tenha sido observado, a atividade larvicida geral permaneceu abaixo do ideal. Essa observação ressalta a necessidade de uma concentração limite que possa desencadear distúrbios fisiológicos significativos nas larvas, levando à mortalidade. Uma melhoria acentuada na eficácia larvicida foi alcançada em concentrações mais altas, com $250 \mu\text{g/mL}$ de nGP causando $67,0\% \pm 9,5$ de mortalidade em 24h e $89,0\% \pm 3,2$ em 48 h (Entrada 4). Em $500 \mu\text{g/mL}$, a eficácia foi ainda mais pronunciada, com taxas de mortalidade de $96,0\% \pm 7,0$ após 24 h e $100,0\% \pm 0,0$ após 48 h (Entrada 5). Esses resultados indicam que o nGP demonstra um efeito larvicida pronunciado dependente da concentração. Isso se deve, provavelmente, à maior biodisponibilidade e liberação sustentada do OEPb, que interrompe os processos fisiológicos das larvas.

Tabela 6: Eficácia do efeito larvicida do nGP contra larvas de *Aedes aegypti* em 24 e 48 h pós-tratamento representada em % de mortalidade $\pm$ Desvio Padrão (DP) para um $n = 10$.

Entrada	Tratamento $\mu\text{g/mL}$ nGP ^a	Mortalidade % $\pm$ SD	
		24h	48h
1	5	$1,0 \pm 3,2$	$1,0 \pm 3,2$
2	50	$1,0 \pm 3,2$	$2,0 \pm 4,2$
3	100	$11,0 \pm 12,9$	$16,0 \pm 13,5$
4	250	$67,0 \pm 9,5$	$89,0 \pm 3,2$
5	500	$96,0 \pm 7,0$	$100,0 \pm 0,0$
6	Água	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
7	nG ^b	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
8	Temefós ^c	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$

^a Concentração de OEPb;

^b Controle negativo testado em $1 \times 10^5 \mu\text{g/mL}$;

^c Controle positivo testado a $100 \mu\text{g/mL}$;

A ausência de mortalidade larval nos controles negativos, que incluíam água e nG sem OEPb, confirmou que a mortalidade observada nos grupos experimentais é atribuível somente aos efeitos bioativos do OEPb (Entrada 6). Isso destaca a especificidade da formulação do nanogel e seu potencial como um agente larvicida eficaz. O grupo de controle positivo tratado com temefós (Entrada 7), um larvicida amplamente reconhecido, atingiu 100% de mortalidade em ambos os pontos de tempo, validando as condições experimentais e fornecendo uma referência para avaliar a eficácia do nanogel nGP. O desempenho comparável da maior concentração de nGP com ao do temefós destaca o potencial citotóxico do nanogel como uma intervenção larvicida alternativa. Os resultados deste estudo sugerem que o nanogel nGP representa uma alternativa viável e ecologicamente correta para o controle das larvas de *A. aegypti*, especialmente em concentrações mais elevadas. A eficácia dependente da concentração observada indica que a otimização da formulação poderia aumentar sua aplicabilidade prática em programas de controle vetorial.

A Fig. 20 mostra os resultados das doses letais (CL_{50} e CL_{90}) após 24h de tratamento com nGP. Os resultados indicam que o nanogel nGP é altamente eficaz no controle das larvas de *A. aegypti*, com uma redução significativa nas concentrações letais ao longo do tempo de exposição. Após 24 h, a CL_{50} foi de 199,5 $\mu\text{g/mL}$, e a CL_{90} foi de 392,0 $\mu\text{g/mL}$, enquanto após 48 h, esses valores diminuíram para 184,5 $\mu\text{g/mL}$ e 253,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A diminuição nas concentrações letais ao longo do tempo sugere uma sensibilidade crescente das larvas ao nanogel, possivelmente devido à maior absorção ou efeito cumulativo do tratamento. Os valores de R^2 , muito próximos de 1, indicam alta precisão nos modelos de dose-resposta, reforçando a confiabilidade dos dados obtidos. Esses resultados destacam o potencial do nanogel nGP como uma ferramenta promissora no combate ao mosquito vetor de doenças. Estudos futuros devem focar nos aspectos mecânicos da mortalidade larval induzida pelo nanogel, bem como em ensaios de campo para validar sua eficácia em ambientes reais. Isso é crucial para entender melhor os processos citotóxicos do nanogel contra as larvas de *A. aegypti*, com resultados a serem publicados em pesquisas futuras. A integração dessas

abordagens nanotecnológicas tem o potencial de melhorar significativamente as estratégias de controle de mosquitos, tornando-as mais sustentáveis e direcionadas, mitigando efetivamente a disseminação de doenças arbovirais.

A eficácia larvicida do nGP corrobora os achados da literatura que destacam características como a liberação controlada de constituintes voláteis de óleos essenciais, bem como sua estabilidade estrutural. Nesse contexto, foi avaliado o desempenho larvicida de esferas de hidrogel compostas de alginato de sódio (SA) combinado com uma emulsão Pickering (PE) de óleo essencial de tomilho branco contra as larvas de *Aedes albopictus*, um vetor de arboviroses significativas em áreas rurais. Observou-se uma liberação controlada do óleo essencial, correlacionada diretamente com um aumento da atividade larvicida ao longo de 48 h (Shin *et al.*, 2021). Da mesma forma, a estabilidade do nanogel de óleo essencial de *Eucalyptus globulus* conferiu alta eficiência larvicida contra as larvas de *Anopheles stephensi* (CL_{50} 32 μ g/mL), uma espécie doméstica proeminente de mosquito vetor da malária (Alipanah *et al.*, 2022). Embora uma comparação direta dos resultados de CL_{50} publicados na literatura e os valores obtidos neste estudo para o nGP possa mostrar discrepâncias, é essencial considerar que os sistemas envolvidos são consideravelmente distintos. Primeiro, em relação aos excipientes das formulações, muitos estudos que descrevem o desenvolvimento de nanogéis utilizam surfactantes não iônicos, como os polissorbatos, para a solubilização de óleos essenciais. É importante enfatizar que essa classe de surfactantes possui CMC significativamente altas; por exemplo, o Tween-80 tem uma CMC de até 2,2 mM a 298,15 K, um valor muito superior ao do Pluronic F127, que é de 0,34 mM na mesma temperatura (Soares *et al.*, 2009). Isso pode influenciar a precipitação do conteúdo formulado quando administrado em ambientes biológicos, o que, por sua vez, poderia explicar os valores mais altos de CL_{50} relatados nesses estudos (Almeida *et al.*, 2023; Duarte *et al.*, 2020; Shin *et al.*, 2021; Alipanah *et al.*, 2022). Adicionalmente, a aplicação do nG (nanogel vazio) não mostrou nenhum efeito citotóxico nas larvas de *A. aegypti*, reforçando o perfil atóxico do F127, aprovado pela FDA como um excipiente seguro. Também é relevante considerar as diferenças no perfil químico de cada óleo essencial investigado, pois variações na composição podem refletir diretamente nos valores de CL_{50} observados, justificando as discrepâncias em

relação aos dados da literatura. Finalmente, este trabalho representa um avanço no estado da arte ao empregar, pela primeira vez, um nanogel termorresponsivo ecologicamente correto, baseado no copolímero F127 e carbopol 974p, para fins larvicidas.

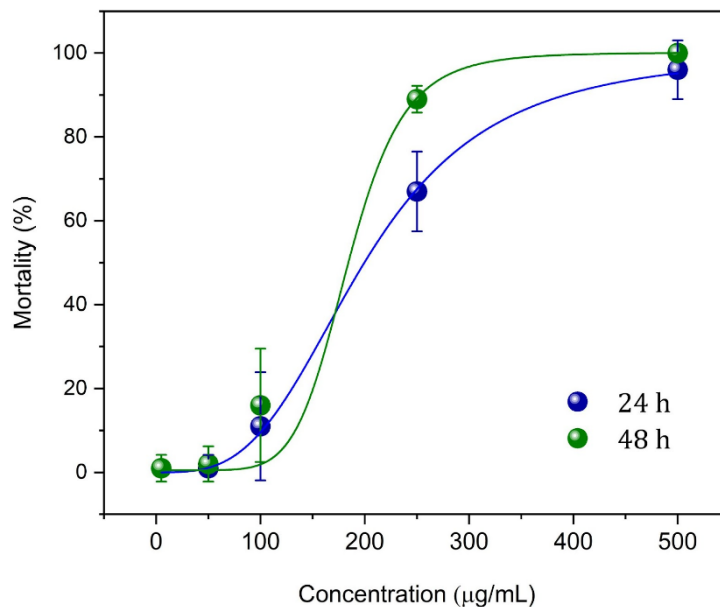
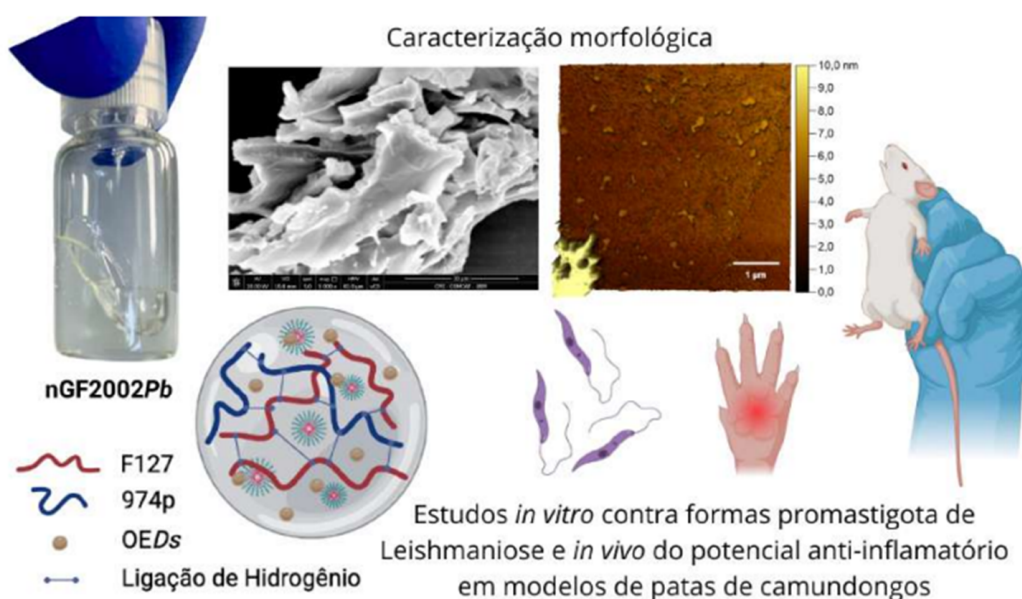


Figura 20: Concentrações letais CL_{50} e CL_{90} para larvas de *A. aegypti*. Após 24 h de tratamento com o nanogel nGP, a CL_{50} foi de $199,5 \pm 5,6$ µg/mL e a CL_{90} foi de $392,0 \pm 16,6$ µg/mL, com um R^2 de 0,9992. Após 48 h de tratamento, a CL_{50} diminuiu para $184,5 \pm 8,2$ µg/mL e a CL_{90} para $253,4 \pm 7,6$ µg/mL, com um R^2 de 0,9989.

CAPÍTULO 5

Formulação nanotecnológica incorporando óleo essencial de *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae): uma abordagem ecologicamente correta para terapia leishmanicida e anti-inflamatória.



A nanotecnologia tem se destacado como uma abordagem inovadora no desenvolvimento de terapias para doenças negligenciadas, como a leishmaniose, e em condições inflamatórias. Nesse contexto, os nanogéis surgem como veículos promissores para a liberação controlada de agentes bioativos, permitindo maior eficácia e menores efeitos adversos. O presente capítulo aborda a caracterização morfológica e a avaliação do potencial leishmanicida e anti-inflamatório do nanogel nGP. A caracterização morfológica do nGP foi realizada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM), para se obter informações morfológicas em escala nanométrica da associação do OEPb com a matriz F127/974p. O potencial leishmanicida do nGP foi avaliado por meio de estudos *in vitro* em células de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LLa). Ensaios *in vivo* foram

realizados para avaliar o efeito anti-inflamatório das formulações GF1-GF4, utilizando um modelo de inflamação em patas de camundongos.

Os resultados deste capítulo foram publicados na revista *Polymers*, na sessão da edição especial Gel Funcional e suas Aplicações Multiuso. A revista possui um fator de impacto de 4,7 e é classificada como A2 no Qualis CAPES. doi: <https://doi.org/10.3390/polym17030379>

5.1 Materiais e Métodos

5.1.1 Materiais

Gel de diclofenaco sódico, solução salina NaCl, Carragenina, XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide), PMS (*N*-metil dibenzopirazina metil sulfato), penicilina, estreptomicina, soro fetal bovino e anfotericina B, foram adquiridos comercialmente pela Merck Company (Rahway, NJ, EUA).

5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram inicialmente congeladas em nitrogênio líquido a -196 °C e então liofilizadas por 24 h usando um secador por congelamento Thermo Micro Modulyo (Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, EUA). Após a liofilização, as amostras foram revestidas com uma fina camada de metal usando um BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater (Balzers, Liechtenstein), e sua morfologia foi analisada em ampliações de 100x e 50x usando um microscópio FEI Quanta 250 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Alemanha).

5.1.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As amostras foram usadas após o processo de liofilização. Um microscópio Multimode 8 (Bruker, Santa Barbara, CA, EUA) foi usado para as análises, operando no modo PeakForce Quantitative Nanomechanics (QNM). Neste modo, a sonda oscila a 1 kHz, abaixo de sua frequência de ressonância, adquirindo curvas de força a cada ciclo de oscilação. As sondas usadas neste estudo tinham uma constante de mola nominal de 0,4 N/m e um raio de ponta de 2 nm (específico para o modelo de sonda), com uma resolução de varredura de 256 × 256 linhas e uma taxa de varredura de 0,5 Hz por mapa adquirido. Simultaneamente com a aquisição da curva de força, propriedades

nanomecânicas como o módulo de Young e adesão também foram medidas (Derjaguin *et al.*, 1975). Em um ponto no mapa topográfico adquirido para a amostra nGF3, uma curva de interação sonda-amostra real Fig. 21B) pode ser identificada, mostrando tanto a curva de aproximação (azul) quanto a curva de retração (vermelha). A separação entre essas duas curvas indica dissipação de energia durante o ciclo de aproximação-retração. Durante a fase de aproximação (Índice 1 na curva), quando a sonda está longe da superfície da amostra, forças atrativas de van der Waals atuam até que a sonda passe por um "salto para contato", fazendo contato com a superfície da amostra (Índice 2 na curva). Durante a fase de indentação, o regime linear da interação (Índice 3) é usado para calcular o módulo de Young com base no modelo Derjaguin-Muller-Toporov (DMT). Para a interação entre uma sonda cônica não deformada e uma superfície de amostra rígida, este modelo é expresso pela Eq. 1 (Hellwig *et al.*, 2017):

$$F(\delta) = \frac{4}{3} \times \left(\frac{E}{1-\nu} \right) \times \sqrt{R} \times \delta^{3/2}$$

E: é o módulo de Young; ν : é a razão de Poisson; δ : é a profundidade de indentação; R: é o raio da sonda.

Além disso, durante o ciclo de retração da curva mostrada na Fig. 20B), a separação sonda-amostra encontra resistência, manifestada como uma deflexão para baixo do cantilever devido a forças atrativas (Índice 4 na curva). A resistência máxima observada durante o desprendimento da sonda da superfície da amostra caracteriza a adesão (Rates *et al.*, 2022; Rates, *et al.*, 2024). Após superar essa resistência, a sonda se afasta da superfície da amostra, completando a aquisição de uma única curva de força (Índices 5 e 6 na curva).

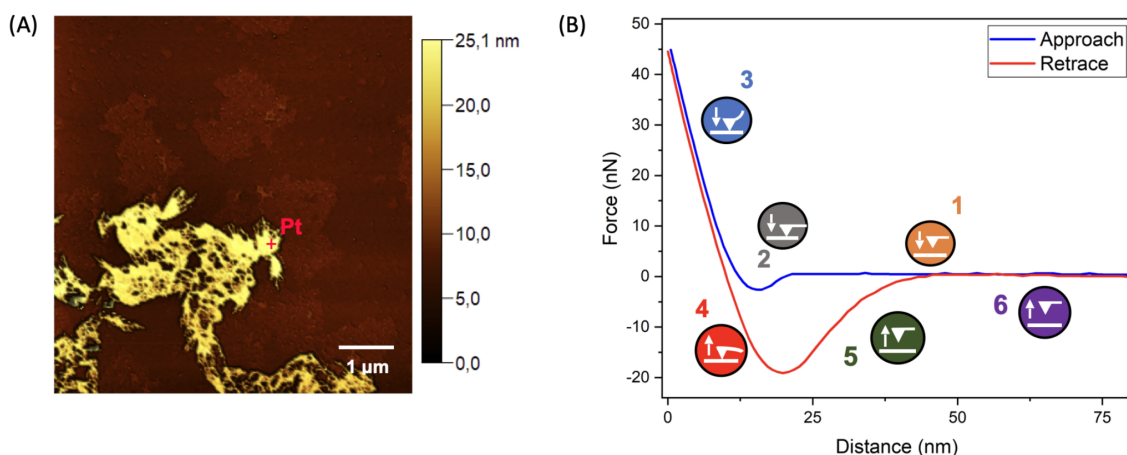


Figura 21: Curvas de Força AFM. (A) Mapa topográfico da amostra, exibindo contrastes distintos para regiões mais altas (áreas mais claras) e regiões mais baixas (áreas mais escuras). O ponto 1 (Pt 1) corresponde à região específica onde a curva de força foi adquirida. (B) Curva de força representativa obtida do Ponto 1 na imagem A, ilustrando os ciclos de aproximação (azul) e retração (vermelho). Os índices ao longo da curva destacam os estágios distintos da interação sonda-amostra, conforme detalhado nas inserções gráficas: (1) a sonda está distante da superfície da amostra, (2) a sonda estabelece contato com a superfície da amostra, (3) o regime linear da curva durante a indentação, (4) a resistência máxima observada durante a separação sonda-amostra, (5) a sonda se retrai da amostra e (6) o ciclo de aproximação-retração conclusivo.

5.1.4 Ensaio *in vitro* contra promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis (LLa)*

As células *LLa* (cepa PH8) foram cultivadas em meio de cultura 199, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado e antibióticos (100 µL/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina). As culturas foram incubadas a 27 °C com subcultura constante. Em placas de 96 poços, a cultura de promastigotas *LLa* foi semeada em meio RPMI 1640, resultando em uma concentração final de 2×10^7 *leishmania*/mL após a adição dos compostos. Os nanogéis foram diluídos em meio RPMI 1640 e adicionados em concentrações variando de 2,2–0,7 mg/mL em *OEPb*. As placas foram então incubadas a 27 °C por 24, 48 e 72 h. A viabilidade dos promastigotas foi determinada usando o método colorimétrico XTT. Uma mistura contendo 20% de XTT:PMS e 60% de solução salina NaCl (na concentração de 0,9%) foi adicionada às placas. As placas foram então incubadas por 4 h a 37 °C com 5% de CO₂. Após esse período, a absorbância foi medida usando um espectrofotômetro com filtros ajustados para 450–620 nm, e a porcentagem de inibição foi estimada por comparação com células não tratadas. A anfotericina B foi usada como controle positivo. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e na ausência de luz. A porcentagem de mortalidade foi calculada com base em na regressão logarítmica da curva de controle feita apenas com *Leishmania* e meio de cultura, iniciando com uma concentração de 2×10^7 *leishmania*/mL e diluída em uma proporção de dois até a concentração de $6,25 \times 10^5$ *Leishmania*/mL.

5.1.5 Avaliação *in vivo* da Atividade Anti-Inflamatória dos Nanogéis

Para caracterizar o efeito anti-inflamatório dos nanogéis produzidos, o protocolo experimental de edema de pata induzido por carragenina foi realizado

em camundongos Swiss machos adultos, seguindo a metodologia de Sulaiman *et al.* (2010) com modificações. Aprovado pelo Comitê de Ética do CEP-UFMA (Comitê de Ética em Pesquisa da AGEUFMA), sob o código de aprovação 23115.038817/2024-44, em 1º de maio de 2024. As formulações tópicas nGF0, nGF2–nGF4 foram avaliadas em relação ao gel de diclofenaco sódico 10 mg/g, que foi selecionado como o medicamento tópico anti-inflamatório padrão. Os animais foram divididos em seis grupos (n=5), da seguinte forma: Controle, que recebeu solução salina NaCl 0,9%; Grupos II, III e IV, que receberam nGF2, nGF3 e nGF4, respectivamente; Grupo V recebeu nGF0, e Grupo VI recebeu gel de diclofenaco sódico 10 mg/g. Após 1 hora, a inflamação aguda foi induzida nas patas traseiras direitas dos animais por injeção intraplantar de 0,05 ml de carragenina (1% p/v). Um paquímetro digital foi utilizado para medir o aumento na espessura da pata (C_t) imediatamente após a injeção de carragenina (0 h) e então a cada hora por 4 h depois disso. Qualquer aumento na espessura da pata foi considerado um indicador de inflamação (Fig. 22). O cálculo da inibição da inflamação é expresso como:

$$\text{Inibição de Edema (\%)} = \frac{[(C_t - C_0)_{\text{grupo controle}} - (C_t - C_0)_{\text{grupo tratado}}]}{(C_t - C_0)_{\text{grupo controle}}} \times 100$$

Onde C_t é a medida da pata após o tratamento com carragenina no tempo t , e C_0 é a medida inicial (basal) da pata.

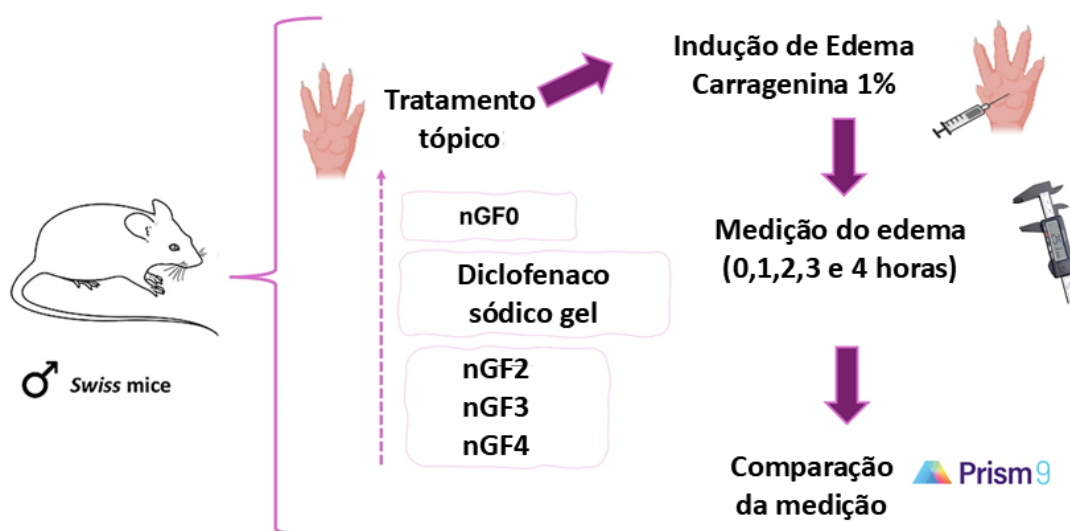


Figura 22: Esquema da sequência experimental para avaliação *in vivo* do potencial anti-inflamatório de nanogéis.

5.1.6 Análise Estatística

Para a análise estatística, os dados foram avaliados usando uma abordagem de critério único por meio de ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para comparações pareadas e Kruskal- Wallis com teste post-hoc de Dunn para dados não paramétricos. A significância estatística foi determinada com base em critérios predefinidos. Todas as análises estatísticas e representações gráficas foram realizadas usando o software Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Valores com diferenças estatisticamente significativas foram explicitamente destacados.

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), surgiu como uma ferramenta indispensável para desvendar as paisagens intrincadas de formulações nano e microestruturadas. Essa técnica, é bem conhecida por sua capacidade de gerar imagens de alta resolução, é crucial na caracterização de materiais em escalas que são frequentemente significativas em formulações farmacêuticas para uma compreensão abrangente de suas propriedades e potenciais aplicações. A análise MEV permitiu examinar a morfologia da superfície e da seção transversal das formulações liofilizadas de nG (formulação com a mistura dos polímeros) e nGP (formulação que contém 1% do OEPb). As micrografias MEV de nG (Fig. 23) mostram que a mistura de polímeros plurônico (F127) e carbopol (974P) tem um padrão morfológico que consiste na natureza porosa da matriz com estruturas interconectadas em forma de canal, características do arranjo reticulado de cadeias de polímero 974P, como resultado da ligação de hidrogênio intermolecular. As imagens MEV também nos permitem observar que uma camada superficial não uniforme cobre as regiões porosas internas (Figs. 23B e 23C). Essas características morfológicas podem ajudar a explicar as propriedades do nG. A distribuição porosa pode ser preenchida pela fase líquida, fazendo com que a viscosidade do nG seja alta devido às fortes ligações de hidrogênio com a água.

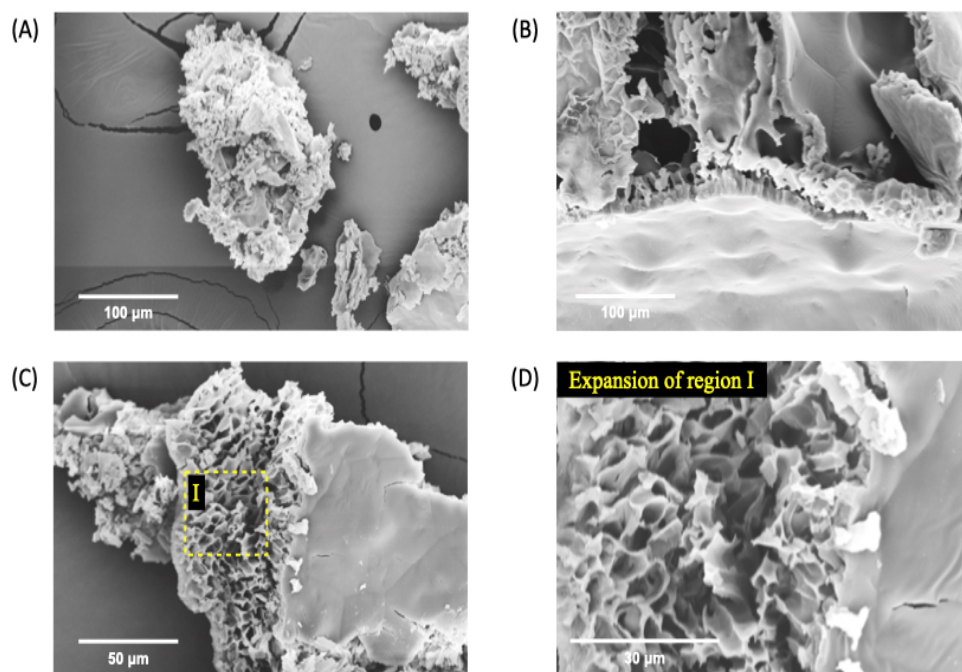


Figura 23: Micrografias MEV de nG com ampliação de 1000x (A), 2000x (B) e (C) e 5000x (D) após o processo de liofilização.

No entanto, a adição de 1% de *EOPb* em nG altera significativamente a morfologia da nanoformulação. As micrografias MEV de nGP mostram regiões planas bem definidas com ausência porosa em todos os materiais analisados (Fig. 24). Conforme observado pela análise FTIR, a forte interação intermolecular entre as cadeias de polímero *EOPb* e PEO previne a formação de poros durante o processo de liofilização. Além disso, a morfologia transversal do nGP mostra planos espessos organizados em camadas (Fig. 25). Essas características morfológicas dão suporte às propriedades físicas do nGP. A forte interação polímero-*EOPb* pode ajudar a explicar sua alta viscosidade, e a organização estrutural bem definida em camadas permite fácil movimentação dos planos, refletindo macroscopicamente em um material com textura macia e alta espalhabilidade.

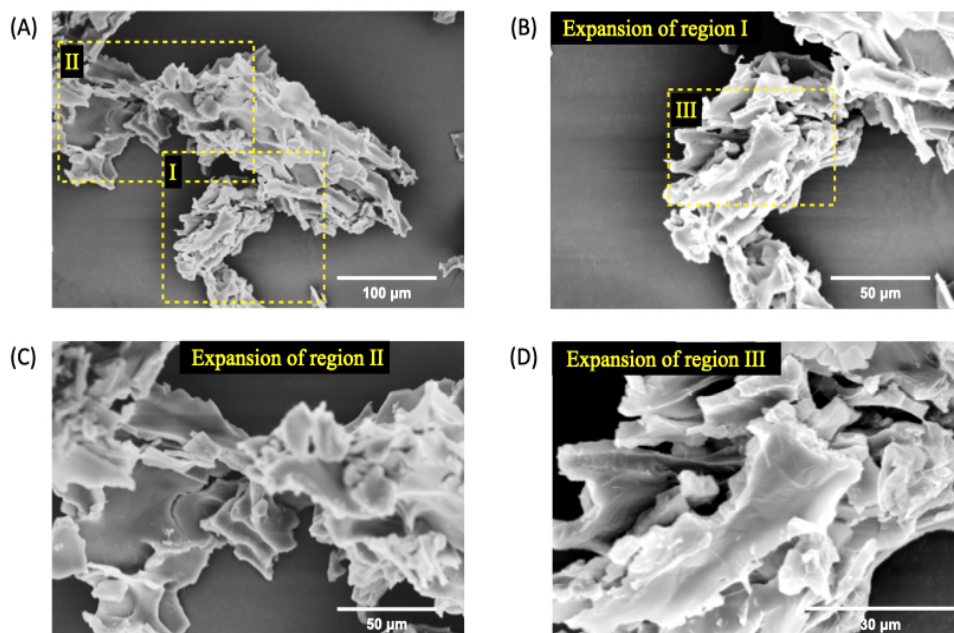


Figura 24: Micrografias MEV de nGP em uma ampliação de 500x (A), 1000x (B), 2000x (C) e 5000x (D) após o processo de liofilização. As micrografias MEV mostram regiões planas bem definidas com a ausência de poros.

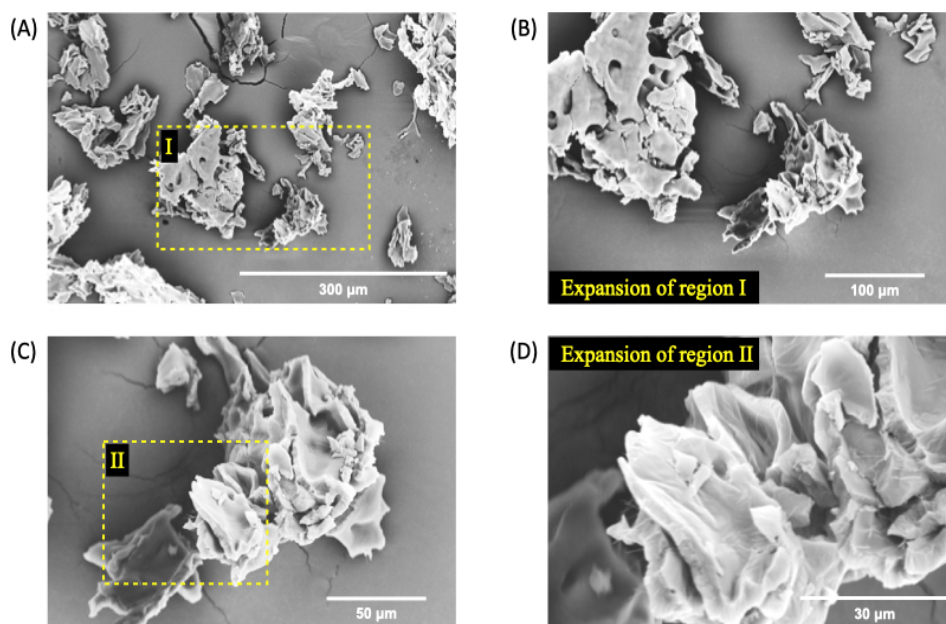


Figura 25: Micrografias MEV de nGP em uma ampliação de 1000x (A), 2000x (B) e (C) e 5000x (D) após o processo de liofilização. As micrografias MEV mostram planos espessos organizados em camadas.

5.2.2 Análise de Microscopia de Força Atômica (AFM)

Análises de Microscopia de Força Atômica (AFM) foram empregadas para obter detalhes morfológicos das formulações nG e nGP. A AFM forneceu imagens de alta resolução das estruturas de gel na nanoescala, oferecendo insights sobre o tamanho da partícula, forma e características de superfície, como módulo de Young e força de adesão. Os mapas topográficos apresentados na Fig. 26 revelam características estruturais detalhadas da formulação nG. Dois domínios distintos são indicados pelas setas amarela e verde Fig. 26A. O domínio indicado pela seta amarela corresponde a uma região relativamente plana com uma altura média de $5,92 \pm 3,00$ nm ($n = 15$), resultante de fortes interações intermoleculares entre os polímeros F127 e 974P. Por outro lado, o domínio indicado pelas setas verdes mostra geometrias relativamente esféricas, com uma altura média de $108,74 \pm 19,41$ nm ($n = 19$) e um diâmetro médio de $279,09 \pm 38,93$ nm ($n = 20$), indicando a formação de micelas F127 Figs. 26A e 26B.

Conforme observado por FTIR, as micelas F127 são estabilizadas por ligações de hidrogênio reticuladas com as cadeias 974P. A presença desses domínios distintos sugere a contribuição das forças de Van Der Waals durante a formação da mistura de polímero F127/974P levando à formação de uma rede estrutural altamente estável, com valores de altura e geometrias consistentes com as características esperadas com base nas propriedades dos componentes individuais. A análise topográfica do nanogel nG também revela a presença de um terceiro domínio, caracterizado por uma estrutura cúbica micelar, conforme ilustrado na Fig. 26C. Esta observação é intrigante, pois sugere a formação de uma fase distinta coexistindo com os domínios esférico e plano. Estudos relatados anteriormente na literatura demonstraram o comportamento polimórfico de copolímeros de bloco anfifílicos em concentrações acima de 5% em massa. Fases de gel com estruturas diversas, incluindo lamelar, normal e hexagonal reversa, cúbica bicontínua normal e reversa e micelar normal e reversa cúbica, foram documentadas na literatura, apoiando nossas descobertas (Lee; Cho; Kim, 2022; Li *et al.*, 2015; Almgren; Brown; Hvidt, 1995).

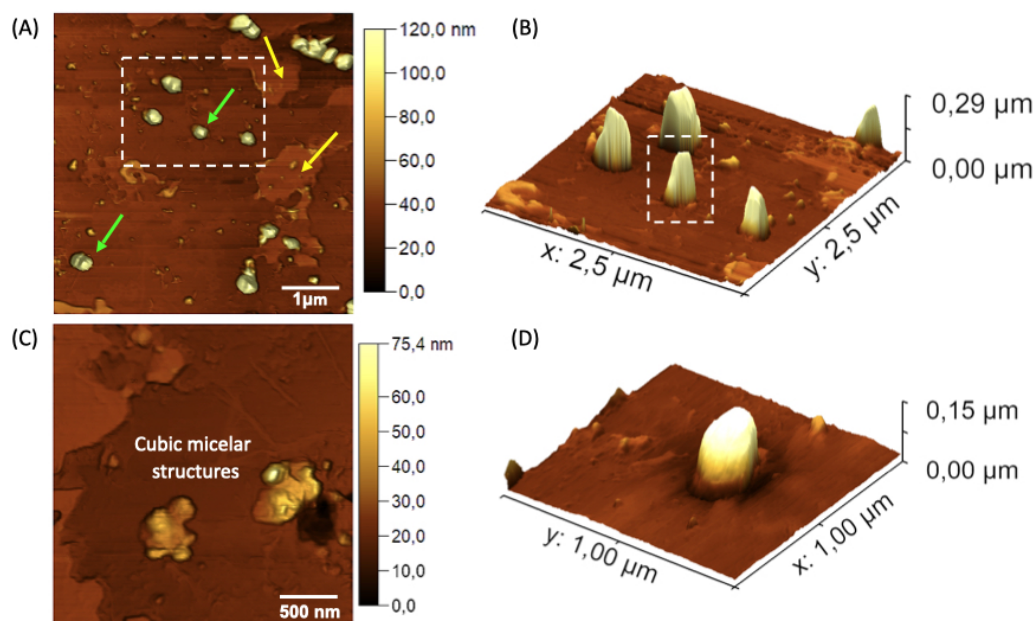


Figura 26: Mapas topográficos AFM do nanogel nG. (A) Setas amarelas indicam estruturas esféricas formadas por micelas F127, com altura média de $108,74 \pm 19,41$ nm ($n = 19$), e setas verdes indicam regiões planas com altura média de $5,92 \pm 3,00$ nm ($n = 15$). (B) e (D) Micrografias 3D expandidas mostrando as estruturas esféricas em detalhes. (C) Estruturas micelares cúbicas formadas por processos agregacionais de micelas F127.

As Figuras 27A e 27B detalham os valores do módulo de Young para os domínios do sistema nG mostrados nas micrografias anteriores. As medições do módulo de Young fornecem insights sobre as propriedades mecânicas dos domínios estruturais. Observa-se que tanto as estruturas micelares relativamente esféricas quanto as formas cúbicas de F127 exibem predominantemente valores mais baixos do módulo de Young. Em contraste, os domínios planos, resultantes das fortes interações intermoleculares entre F127 e 974P, exibem valores relativamente mais altos. Essas descobertas são consistentes com observações de que os domínios F127/974P formam estruturas planas mais rígidas, caracterizadas por regiões mais brilhantes nos mapas do módulo de Young. Enquanto isso, as estruturas micelares de F127, na ausência de OEPb, estão vazias, contribuindo para uma maior fluidez e suavidade desses domínios, como evidenciado pelas regiões mais escuras nos mapas.

As análises de força de adesão derivam de uma combinação de quatro interações distintas entre a sonda AFM e a superfície da amostra: forças de van der Waals, eletrostática, capilar e química (Rates *et al.*, 2022; Rates *et al.*,

2024). É essencial delinear as contribuições individuais de cada interação para o fenômeno geral de adesão. A consistência na composição do material da sonda, parâmetros geométricos (como raio e forma da ponta) e condições ambientais (incluindo temperatura e umidade relativa) é fundamental para garantir a reprodutibilidade e a comparabilidade das análises. Essa padronização permite a elucidação de como as variações no contraste de adesão entre amostras refletem heterogeneidades subjacentes da composição da superfície. Além disso, as características geométricas da sonda, particularmente sua forma cônica, desempenham um papel significativo na minimização do ângulo de contato e, conseqüentemente, na redução da influência das forças capilares (Rates *et al.*, 2024). A investigação sistemática das forças de adesão é crucial para obter insights abrangentes sobre as complexas interações intermoleculares que governam as interações sonda-amostra AFM, fornecendo suporte adicional para a interpretação de que os domínios que exercem as maiores forças de adesão na sonda AFM resultam das fortes ligações de hidrogênio entre F127 e 974P (Figs. 27 C e 27 D). Em contraste, as regiões centrais das micelas F127 resultam em forças de adesão fracas, como uma resposta às interações dipolo e dipolo induzido (forças de Keesom e Debye) entre as cadeias hidrofóbicas PPO e a sonda AFM. Além disso, as estruturas micelares exibem contornos moderadamente claros com valores medianos de força de adesão, corroborando a interpretação de que essas estruturas são estabilizadas por ligações de hidrogênio reticuladas com os domínios planares de F127/974P.

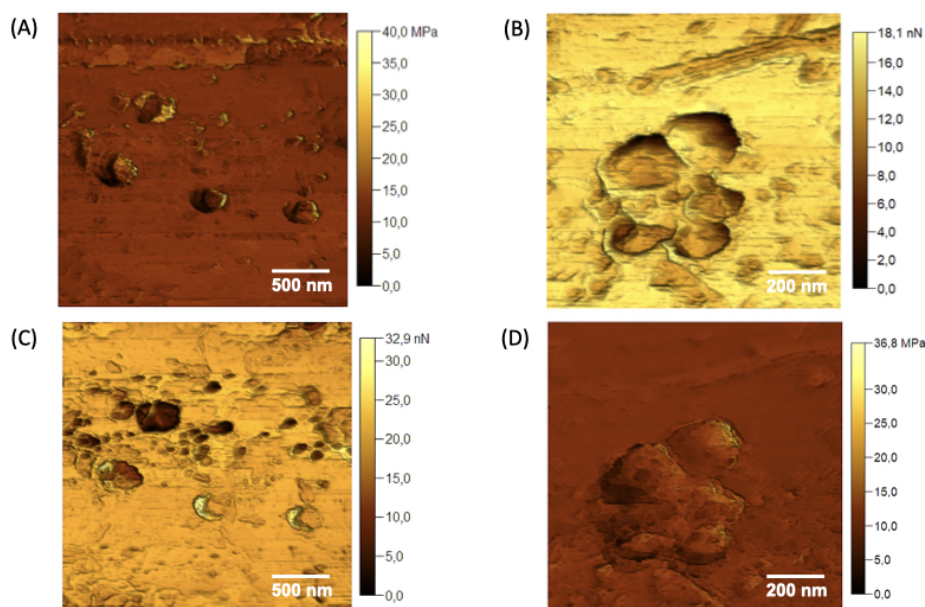


Figura 27: Mapas de módulo de Young (A) e (B) e mapas de força de adesão (C) e (D) foram adquiridos para os diferentes domínios observados no nG.

As micrografias AFM adquiridas para o nanogel nGP revelam um padrão morfológico distinto comparado ao material nG, claramente atribuído à incorporação de 1% (p/p) de *EOPb*. Os mapas topográficos de nGP (Figs. 28A e 28C) indicam que as regiões marcadas com setas vermelhas estão provavelmente associadas às moléculas de *EOPb* incorporadas na superfície do nanogel, formando estruturas em camadas bem definidas e organizadas com uma altura média de $7,39 \pm 0,79$ nm ($n = 17$). A ausência de domínios de geometria esférica e cúbica no material nGP sugere uma reestruturação significativa da arquitetura micelar impulsionada pela incorporação de *EOPb* (indicada pelas setas verdes nas Figs. 28C e 28D). De acordo com as análises de FTIR, a incorporação de *EOPb* na matriz nG aumenta significativamente a intensidade e a energia da banda associada aos modos vibracionais C—H, sugerindo uma forte interação entre as moléculas de *EOPb* e as cadeias PPO das micelas F127, bem como os poros formados pelas interações intermoleculares F127–974P. São observadas pequenas áreas com altura média de $1,37 \pm 0,21$ nm ($n = 20$) e tamanho médio de $40,58 \pm 7,98$ nm ($n = 20$), que são relativamente menores do que as calculadas para os domínios micelares de nG.

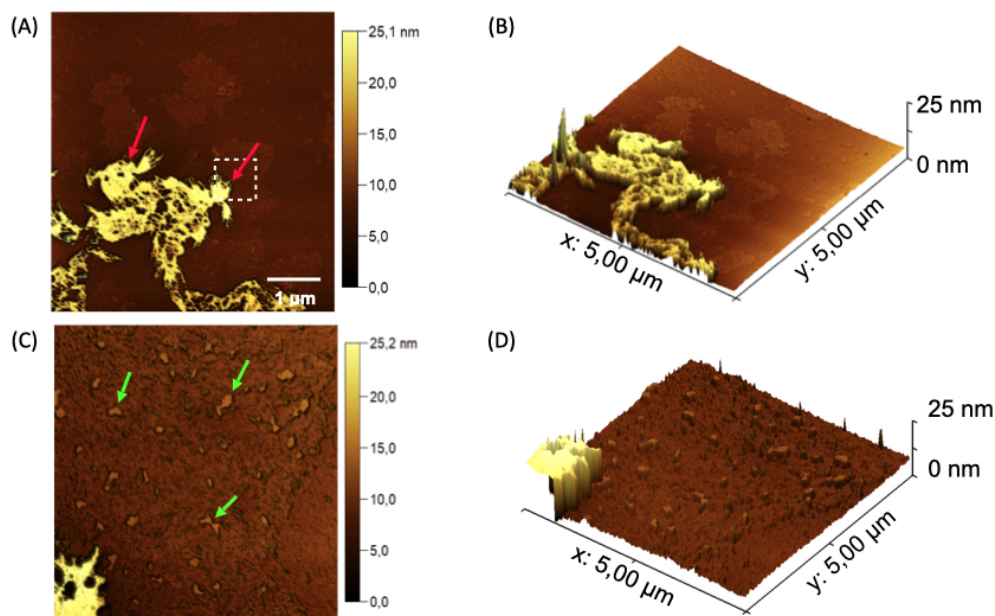


Figura 28: Mapas AFM topográficos do nanogel nGP. (A) Setas vermelhas indicam estruturas planas formadas pela presença de EOPb na superfície da matriz nG, com altura média de $7,39 \pm 0,79$ nm ($n = 17$). (B) Setas verdes indicam a incorporação de EOPb nas estruturas micelares F127 e nos poros do material nG, com valores médios de altura de $1,37 \pm 0,21$ nm ($n = 20$) e tamanho de $40,58 \pm 7,98$ nm ($n = 20$). (C) e (D) Micrografias 3D mostrando as estruturas planas do nGP.

As análises do módulo de Young para o nanogel nGP apoiam a elucidação de suas propriedades mecânicas. Regiões com maiores concentrações de EOPb revelam menores valores de módulo de Young em comparação com regiões com menores concentrações, confirmando a característica emoliente do EOPb (Figs. 29A e 29B). Os mapas de força de adesão mostrados nas Figs. 29A e 29B corroboram essas características, pois regiões com maiores concentrações de EOPb exibem menores valores de força de adesão devido a interações de Van der Waals mais fracas (Figs. 29 C e D).

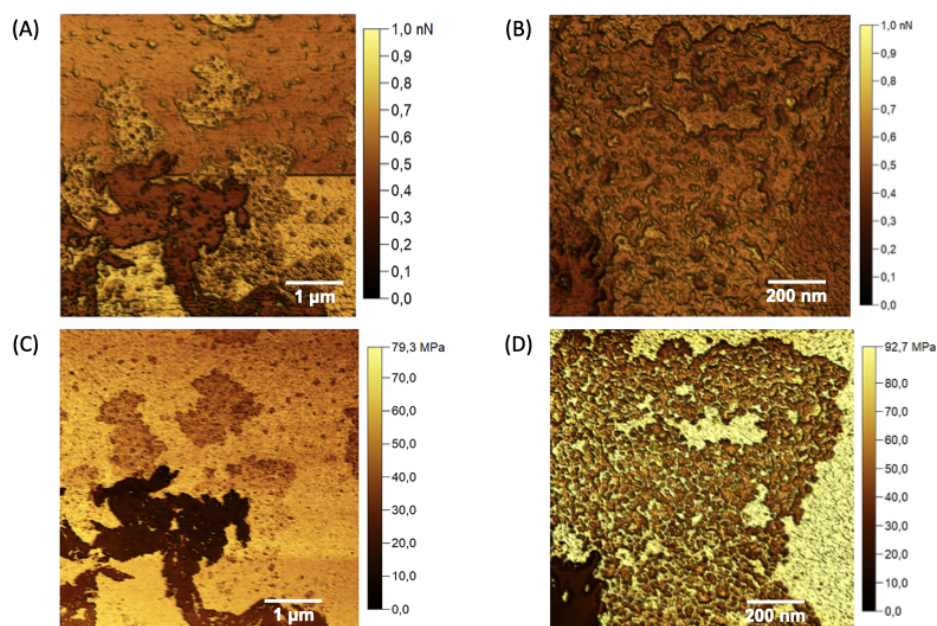


Figura 29: Mapas do módulo de Young (A) e (B) e forças de adesão (C) e (D) adquiridos para o nanogel nGP.

5.2.3 Atividade Leishmanicida *in vitro* do Nanogel

Os resultados da nossa investigação *in vitro* sobre a atividade leishmanicida das formulações de nanogel contra *L. amazonensis* são apresentados na Fig. 30A. Inicialmente, o nanogel vazio nG (mistura de F127 E 974P) foi testado para avaliar a toxicidade dos excipientes da nanoformulação na resposta leishmanicida. Os resultados obtidos revelaram que o nanogel vazio nG não exibiu nenhuma atividade antileishmanial contra promastigotas de *LLa*. Este resultado confirma a natureza inerte do veículo (ou seja, apenas os excipientes da formulação), pois ele não induz nenhuma atividade leishmanicida.

Em contraste, a formulação nGP exibiu uma significativa atividade antileishmanial em todas as concentrações testadas em 24 e 48 h. Notavelmente, na concentração mais alta (2,2 a 0,28 mg/mL em EOPb), nGP atingiu uma taxa de mortalidade promastigota superior a 80% em 24 h, com um aumento para mais de 90% em 48 h. Essas descobertas sugerem uma eficácia dependente do tempo e da concentração, com nGP demonstrando potência significativa contra *LLa*. Na concentração mais baixa testada, 0,07 mg/mL, o nGP ainda manteve um nível notável de atividade, atingindo taxas de

mortalidade de 46 e 68% em 24 e 48 h, respectivamente. Esses resultados demonstram que o nanogel exibe um perfil de liberação controlada do OEPb, evidenciado pelo aumento progressivo das taxas de mortalidade do promastigotas de *LLa* observadas entre 24 e 48 horas. Por se tratar de um nanogel desenvolvido. Assim, é evidente que o potencial citotóxico do nanogel nGP é atribuído à composição de OEPb dentro da matriz do nanogel. A Fig. 30B apresenta imagens representativas de culturas de *Leishmania* tratadas com a formulação de nanogel nGP em concentrações variadas, destacando as alterações morfológicas observadas ao longo de 24 e 48 h. Os efeitos antileishmania pronunciados observados para nGP destacam seu potencial como uma opção de tratamento tópico para leishmaniose cutânea. Dadas as altas taxas de mortalidade de promastigotas alcançadas, particularmente em exposição prolongada, nGP se apresenta como um candidato promissor para investigação posterior. Essa eficácia apoia a possibilidade de desenvolver uma terapia localizada eficaz que pode reduzir a exposição sistêmica e a toxicidade associada. Estudos adicionais para elucidar o mecanismo de ação, juntamente com testes *in vivo*, são necessários para avançar o desenvolvimento de nGP como um agente terapêutico para tratamento de leishmaniose cutânea.

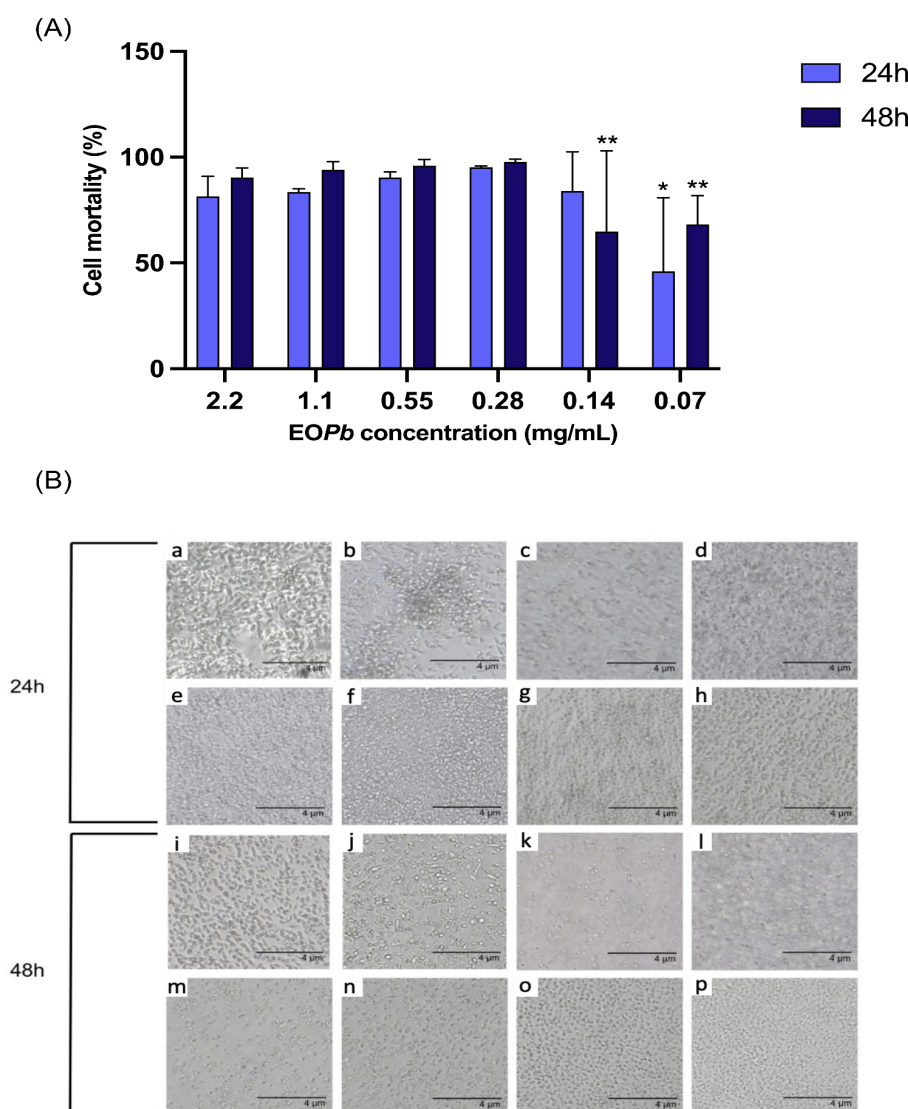


Figura 30: (A) atividade leishmanicida *in vitro* da formulação de nanogel (nGF4) demonstrando concentração e eficácia dependente do tempo contra *LLa* ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dunn). (B) Imagens representativas de culturas de *Leishmania* tratadas com a formulação de nanogel (nGF4): (a) Cultura não tratada após 24 horas. (b) Cultura tratada com o nanogel (nGF0) por 24 horas. (c–h) Culturas tratadas com OEpb em concentrações de 2,2, 1,1, 0,55, 0,28, 0,14 e 0,07 mg/mL, respectivamente, por 24 h. (i) Cultura não tratada após 48 h. (j) Cultura tratada com nGF0 por 48 h. (k–p) Culturas tratadas com OEpb em concentrações de 2,2, 1,1, 0,55, 0,28, 0,14 e 0,07 mg/mL, respectivamente, por 48 h.

5.2.4 Avaliação *in vivo* do Potencial Anti-inflamatório dos Nanogéis

Os resultados da atividade anti-inflamatória dos nanogéis são apresentados na Figura 31. A análise revelou que os tratamentos com os nanogéis nGF2, nGF3 e nGF4 atingiram eficácia máxima 2 horas após a inoculação do agente inflamatório, promovendo reduções de edema de $44,1 \pm 5,8\%$, $62,7 \pm 4,4\%$ e $54,4 \pm 6,7\%$, respectivamente. Com destaque para o nGF3 (Fig. 31), que apesar de não ser o nanogel que possuía maior

quantidade OE**Pb** incorporado, foi o nanogel que apresentou maior redução de edema. Esses dados demonstram que os nanogéis possuem um potencial anti-inflamatório estatisticamente significativo. Embora a eficácia das formulações não tenha alcançado integralmente os níveis observados com o tratamento padrão diclofenaco gel de sódio a 10 mg/g ($65,5 \pm 5,5\%$) – o desenvolvimento de um nanogel ecológico com atividade anti-inflamatória notável evidencia seu potencial como alternativa sustentável e eficaz. Esses resultados são comparáveis aos do estudo de Pires et al. (2024), que investigaram o potencial antiedematoso do óleo essencial de *Pectis elongata* Kunt (Asteraceae), rico em citral (89%), e observaram uma redução superior a 60% do edema em patas de camundongos. A atividade anti-inflamatória e analgésica de óleos essenciais ricos em citral, o principal composto químico presente no OE**Pb**, já foi relatada. Gbenou et al., (2013), por exemplo, atribuíram os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos de *Cymbopogon citratus* e *Eucalyptus citriodora* ao citral, um componente importante presente no OE de ambas as espécies. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para confirmar se realmente o efeito anti-inflamatório é atribuído ao citral ou o sinergismo da mistura dos compostos químicos presentes no OE**Pb**.

É importante destacar que o efeito anti-inflamatório não se manteve nos pontos de tempo subsequentes para nenhuma das formulações, incluindo o medicamento padrão. Os dados gráficos indicam, ainda, que o nanogel nGF2 apresentou uma redução do efeito anti-inflamatório em comparação com os outros grupos, que englobaram diclofenaco sódico, nGF3 e nGF4. Adicionalmente, o tratamento com nGF0 exibiu baixa inibição de edema aos 2 h ($14,9 \pm 4,7\%$), com diferenças estatísticas significativas quando comparado aos demais tratamentos ($p < 0,001$).

Em síntese, as descobertas sugerem que os nanogéis testados, independentemente da dosagem, demonstram ação anti-inflamatória, embora de efeito transitório. Esses resultados ressaltam a necessidade de estudos adicionais, especialmente para as formulações nGF2 e nGF3, a fim de otimizar os métodos de formulação ou os sistemas de entrega para prolongar a eficácia terapêutica. Futuras investigações devem explorar os mecanismos de ação envolvidos, bem como o potencial de estratégias terapêuticas que combinem a

liberação sustentada com outras abordagens, a fim de aprimorar as propriedades anti-inflamatórias dos nanogéis por períodos mais prolongados.

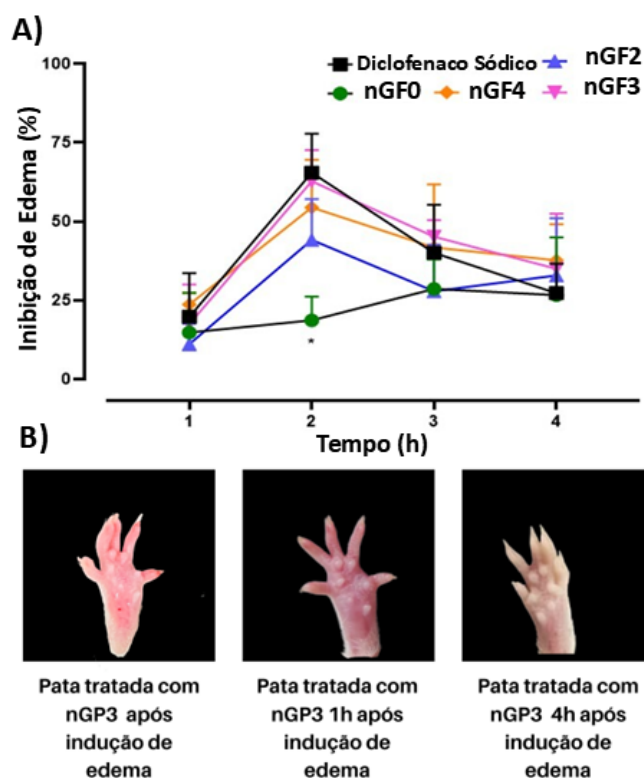


Figura 31: A) Ação anti-inflamatória tópica de nanogéis em um modelo experimental de edema de pata em camundongos ($p < 0,05$, ANOVA, teste de Tukey). B) Fotografias das patas dos Camundongos durante a realização do experimento para o nanogel nGF3 (possui 0,5% de OEPb).

CAPÍTULO 6

Formulação aprimorada de um nanogel combinando curcumina e óleo essencial de *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae) para terapia sinérgica contra leishmaniose.

O combate à Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) continua sendo um desafio significativo, principalmente devido à eficácia limitada das terapias convencionais e à resistência crescente dos parasitas aos tratamentos disponíveis. Neste contexto, terapias combinadas que utilizam nanomateriais emergem como uma abordagem inovadora, oferecendo a possibilidade de sinergia entre diferentes compostos bioativos, além de uma liberação controlada e direcionada. Este capítulo explora o desenvolvimento do nanogel nGPbC, uma nova formulação que combina o OEPb com o fotossensibilizador curcumina, com o objetivo de maximizar a eficácia no tratamento da LC. O nanogel nGPbC foi caracterizado por meio das técnicas de FTIR, DLS e MEV demonstrando propriedades físicas adequadas para a entrega dos princípios ativos. Foi analisada também a reologia do nGPbC para entender suas propriedades mecânicas, estruturais e funcionais. Além disso, foram realizados ensaios citotóxicos frente à *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LLa), (cepa PH8), e os resultados obtidos apresentaram atividade anti-promastigota, tornando assim a formulação como uma forte aliada para o tratamento alternativo de feridas causadas pela LC.

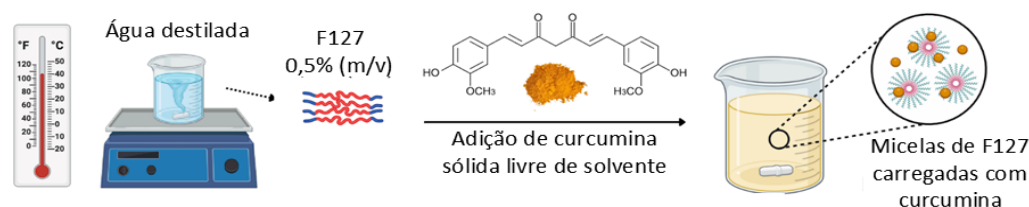
6.1.1 Materiais e Métodos

Copolímero F127 (poli(óxido de etileno)-poli (óxido de propileno)-poli (óxido de etileno)) MM = 12000 g.mol⁻¹; (EO₉₉(PO)₆₇(EO)₉₉), Curcumina, XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide), PMS (*N*-metil dibenzopirazina metil sulfato), penicilina, estreptomicina, soro fetal bovino e anfotericina B, foram adquiridos comercialmente pela Merck Company (Rahway, NJ, EUA). O polímero Carbopol 974P[®] NF foi gentilmente fornecido como cortesia pela IMCD Brasil (São Paulo, SP, Brasil). Água ultrapura,

6.1.2 Desenvolvimento da Formulação nGPC

As formulações nanoestruturadas foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Schmolka, utilizando um procedimento a frio (Schmolka, 1972). Uma porção do copolímero F127 foi lentamente incorporada em água destilada, que foi mantida em banho de gelo a 5-10°C. A solução foi mantida sob agitação lenta para garantir a hidratação das cadeias do polímero F127. Posteriormente, o polímero 974p foi adicionado em pequenas porções até que a solubilidade completa fosse alcançada, levando à formação do nanogel. Em seguida, o *OEPb* foi adicionado e o sistema foi agitado por 30 minutos. Para finalizar a organização das cadeias do polímero, a solução final foi refrigerada (5°C) durante a noite, resultando no nanogel contendo *OEPb*. A preparação do nanogel contendo curcumina seguiu a mesma metodologia, exceto pelo processo de incorporação das moléculas de curcumina nas micelas copoliméricas F127, onde um processo de adição direta foi empregado. Neste caso, uma pequena quantidade de F127 foi colocada em um balão de fundo redondo contendo água destilada a uma temperatura de 40°C com agitação constante. Após solubilizar o F127, uma quantidade de curcumina foi adicionada ao sistema e agitada a 40°C por 30 minutos. Após resfriar o sistema, o processo de preparação descrito para o nanogel contendo *OEPb* foi seguido para obter o material final contendo *OEPb* e curcumina (nGPC) como mostrado na Fig. 32. O nanogel vazio (nG) foi preparado usando as mesmas etapas, exceto a adição de *OEPb* e curcumina.

Etapa 1: Preparação das micelas de F127 carregadas com curcumina através do método de adição direta



Etapa 2: Preparação da formulação de F127/974P carregada com *OEPb*/curcumina

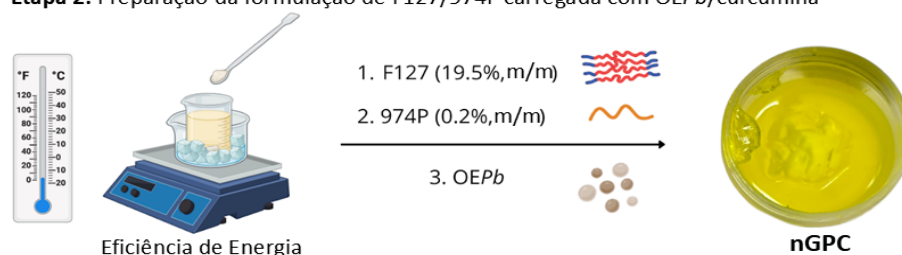


Figura 32: Esquema da preparação do nGPC com adição de curcumina à solução sob condições controladas de temperatura, garantindo a sua dispersão uniforme na matriz polimérica.

6.1.3 Ensaio de Estabilidade das Formulações Nanoestruturadas

O teste de estabilidade acelerada, foi realizado para avaliar a interferência da temperatura nas características de estabilidade física e química da nGPC, seguindo os requisitos do Guia de Estabilidade de Cosméticos da ANVISA e da Farmacopeia dos EUA (Da Costa *et al.*, 2024). Um mililitro da formulação foi centrifugado a 3000 rpm durante 30 min a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A formulação foi armazenada durante todo o estudo tanto em temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) quanto sob refrigeração controlada ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) (a temperatura foi monitorada diariamente). Portanto, as formulações foram submetidas a 7 ciclos de 24 horas a 5°C e 24 horas a 25°C . Assim, a estabilidade física foi determinada observando parâmetros como homogeneidade, separação de fases e características organolépticas (aparência, cor e odor).

6.1.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As análises de FTIR foram realizadas em um espectrofotômetro FTIR Tracer-100 da marca Shimadzu. A amostra de nGPC foi liofilizada e agregada com KBr. Todos os espectros foram adquiridos com dados no Infravermelho Médio (MIR), em uma faixa espectral de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ sob apodização Happ-Genzel. Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente com 50 varrimentos e uma resolução espectral de 8 cm^{-1} .

6.1.5 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As medições do tamanho de partícula e do índice de polidispersão (PDI) foram conduzidas usando espalhamento dinâmico de luz (DLS) com um instrumento Litesizer™ 500 (Anton Paar GmbH, Graz, Áustria) (módulo BM 10). Os diâmetros hidrodinâmicos médios (D_h) dos nanogéis nG e nGPC foram determinados em água ultrapura a temperaturas de 25, 32, 37 e 45°C , usando um laser semiconductor de 40 mW com comprimento de onda de 658 nm. As medições de D_h foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 3,0 mL. Todas as medições foram conduzidas em triplicata (média $\pm$ DP). Os coeficientes de

difusão (D_{if}) foram calculados a partir dos valores de D_h usando a equação de Stokes-Einstein, assumindo a formação de partículas esféricas não interativas (Eq. 1) (Alexander *et al.*, 2011).

$$D_{if} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (1)$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann ($1,3806503 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta e (K) é a viscosidade do meio (Pa s^{-1}).

Para obter os valores da energia de ativação difusional (E_{ad}), bem como da entropia difusional ($\Delta S_d^\#$) e entalpia ($\Delta H_d^\#$), foram empregados os modelos de Arrhenius e Eyring, adaptados para o processo de difusão. O cálculo é determinado usando a seguinte equação de Arrhenius (Eq. 2) (Haillant; Dumbleton; Zielnik, 2011; Griffiths *et al.*, 1995):

$$D_{if} = A e^{\frac{-E_{ad}}{RT}} \quad (2)$$

Onde D_{if} , é o coeficiente de autodifusão, A é o fator de Arrhenius pré-exponencial, R é a constante dos gases $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ e T é a temperatura absoluta em K. O gráfico de $\ln D_{if} = \ln A - \frac{E_{ad}}{RT}$ gives E_{ad} fornece E_{ad} por meio da inclinação. Os cálculos de $\Delta S_d^\#$ e $\Delta H_d^\#$ são obtidos pelo modelo de Eyring adaptado para difusão, (Eq. 3):

$$D_{if} = \frac{RT}{Nh} e^{\frac{\Delta S_d^\#}{R}} e^{\frac{-\Delta H_d^\#}{RT}} \quad (3)$$

Onde $N = 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$, e $h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}$. O gráfico de $\ln\left(\frac{D_{if}}{T}\right) = \ln\left(\frac{RT}{Nh} e^{\frac{\Delta S_d^\#}{R}}\right) - \frac{\Delta H_d^\#}{RT}$ fornece o $\Delta H_d^\#$ usando o coeficiente angular, e o coeficiente linear fornece o $\Delta H_d^\#$. A entalpia de ativação ($\Delta H_d^\#$) é obtida a partir da inclinação do gráfico de $\ln\left(\frac{D_{if}}{T}\right)$, enquanto a entropia de ativação ($\Delta S_d^\#$) é obtida a partir do coeficiente linear. Finalmente, a variação na energia livre de

Gibbs difusiva ($\Delta S_d^\#$) é calculada usando a Eq. 4 (Bhattacharya; Moulik; Panda, 2010; Hwang; Ramsey; Kabanov, 2020):

$$\Delta G_d^\# = \Delta H_d^\# - T\Delta S_d^\# \quad (4)$$

6.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise morfológica dos nanogéis nG e nGPC foi realizada usando MEV. Inicialmente, a amostra foi rapidamente congelada em nitrogênio líquido a -196 °C, seguido por um processo de liofilização de 24 h usando um secador por congelamento Thermo Micro Modulyo (Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, EUA). Para melhorar o contraste da imagem, um revestimento metálico fino foi aplicado usando um BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater (Balzers, Liechtenstein). Após a liofilização, as amostras foram revestidas com uma fina camada de metal usando um BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater (Balzers, Liechtenstein), e sua morfologia foi analisada em ampliações de 100x e 50x usando um microscópio FEI Quanta 250 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Alemanha).

6.1.7 Análise Reológica

As propriedades reológicas do nGPC foram avaliadas usando um reômetro de estresse controlado (MARS II, Haake Thermo Fisher Scientific Inc., Alemanha) equipado com uma geometria de placa paralela consistindo de um cone de aço (C35/2° Ti) com um diâmetro de 35 mm e uma folga fixa de 0,105 mm. Todas as medições foram conduzidas a uma temperatura controlada de 5, 25 e 32 °C. Antes da análise, as amostras foram equilibradas por 1 minuto para garantir a estabilização térmica e estrutural. As curvas de fluxo foram obtidas aplicando taxas de cisalhamento em duas fases: uma rampa ascendente de 0 a 500 s⁻¹ e uma rampa descendente de 500 a 0 s⁻¹. Cada fase durou 150 segundos, garantindo que as condições de estado estacionário fossem alcançadas antes da transição entre as rampas. Este protocolo permitiu a avaliação do comportamento de afinamento de cisalhamento e quaisquer potenciais efeitos de histerese no nGPC.

6.1.8 Ensaio *in vitro* Contra Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis (LLa)*

As células de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (cepa PH8) foram cultivadas em meio de cultura 199 (Gibco®, NY, EUA), suplementadas com 10% de soro bovino fetal inativado (Gibco®, Nova York, NY, EUA) e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina). Foram incubadas em temperatura a 27°C, mantendo repiques constantes. A cultura de promastigotas de *LLa* foi centrifugada e ressuspensa em meio RPMI 1640 na concentração de 4×10^7 *Leishmania*/mL e distribuídas em placas de 96 poços. Os compostos foram diluídos em meio RPMI 1640 e adicionados nas concentrações de 17,5 µg/mL a 2,19 µg/mL para o *OEPb* e 50 µg/mL a 6,25 µg/mL para a *Curcuma longa*. As concentrações e diluições foram as mesmas para o composto combinado. Na sequência, as placas foram incubadas a 27°C por 24, 48 e 72 h. A viabilidade das promastigotas foi determinada pelo método colorimétrico XTT

(2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) (Sigma-Aldrich®). Uma mistura contendo 20% de XTT e PMS (*N*-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) (SigmaAldrich®) e 60% de salina 0,9% foi adicionada nas placas. As placas foram então incubadas por 4h a 37°C com 5% CO₂. Após esse período foi realizada a leitura por espectrofotometria em filtros 450/620 nm, a porcentagem de inibição foi estimada por comparação com células não tratadas. A anfotericina B foi usada como controle positivo. Os experimentos foram realizados em triplicata e na ausência de luz.

6.1.9 Análise Estatística

Na análise estatística dos dados, o teste estatístico de acordo com um único critério foi avaliado utilizando ANOVA e o pós-teste de Tukey, considerando que os valores foram estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. As análises estatísticas e gráficos foram realizadas utilizando o software ORIGIN.

6.2 Resultados e Discussão

6.2.1 Preparo da formulação nGPC

As formulações compostas por *OEPb* e curcumina foram desenvolvidas com base nas descobertas obtidas nos testes de estabilidade acelerada realizados nas formulações nGF1-nGF4 descritas no capítulo 4. Esses ensaios mostraram que adicionar até 1% de *OEPb* resultou em formulações estáveis e transparentes, sem separação de fases, permitindo assim avançar para a otimização e combinação de dois princípios ativos na formulação: o óleo essencial de *P. brevipedunculata* (*OEPb*) e a curcumina. Com os processos otimizados, a partir da formulação nGF4 foi possível preparar os nanogéis nGPC1-nGFPC6, que combinam as propriedades bioativas de dois princípios ativos. A terapia combinada aplicada ao desenvolvimento de formulações nanoestruturadas representa um marco significativo no tratamento de doenças negligenciadas, como a LT. A integração de diferentes moléculas bioativas em uma única formulação não apenas potencializa os efeitos terapêuticos por meio de ações sinérgicas, mas também contribui para a redução de efeitos adversos frequentemente associados ao uso isolado de cada composto (Iqbal *et al.*, 2022).

Para este estudo, a razão F127/974P/*OEPb* foi fixada em 20/0,2/1% (m/m) e curcumina foi adicionado em concentrações variando de 0,01 a 0,05% (p/p), resultando nas formulações nGPC1-nGPC5 descritas na Tab. 7. Foram testadas várias concentrações de curcumina para verificar a quantidade máxima que poderia ser incorporada na matriz de gel contendo 1% (m/m) de *OEPb*. Após o preparo dos nanogéis, dentre as 5 formulações nGPC1-nGPC5 apenas a formulação nGPC5 com 0,05% de curcumina apresentou separação de fase após 24h de preparo, como é possível observar na figura 33. As formulações contendo até 0,04% de curcumina (nGPC1-nGPC4) permaneceram estáveis sem separação de fase após 24h de preparo e foram selecionadas para o teste de estabilidade acelerada.

Para o ensaio *in vitro* contra *LLa* foi preparada uma formulação adicional em que os valores de *OEPb* e curcumina adotados foram os valores de CI_{50} reportados na literatura. O *OEPb* apresentou um CI_{50} de 20 μ g/mL, conforme

Lopes *et al.*, (2024), enquanto a curcumina exibiu um CI_{50} de 7,4 $\mu\text{g/mL}$, de acordo com Pinto *et al.*, (2016). A formulação final foi composta pela combinação das concentrações de água destilada, F127, carbopol, OEPb e curcumina (Tab. 7), cujas concentrações específicas foram ajustadas para garantir a estabilidade físico-química e a eficácia da formulação.

Tabela 7: Diferentes composições (% m/m) de curcumina e água foram incorporadas à base da formulação nGP para atingir nGPC1 a nGPC5 e nGPC $_{I_{50}}$.

Código	Componentes % (m/m)					Estabilidade ^a
	Água	F127	974p	EOPb	Curcumina	
nGPC1	78,79	20	0,2	1	0,01	E
nGPC2	78,78	20	0,2	1	0,02	E
nGPC3	78,77	20	0,2	1	0,03	E
nGPC4	78,76	20	0,2	1	0,04	E
nGPC5	78,75	20	0,2	1	0,05	SF

^aE: Estável; SF: Separação de Fase

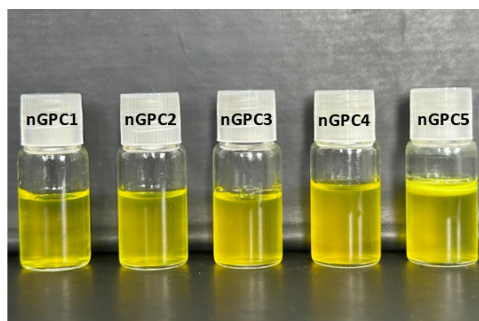


Figura 33: Fotos das formulações de nanogel preparadas com diferentes composições % (m/m) de F127, 974p, H_2O , OEPb e Curcumina de acordo com a Tabela 7.

6.2.2 Ensaio de Estabilidade da Formulação nGPC

Para o teste de estabilidade acelerada foram selecionadas as formulações que não apresentaram separação de fase após 24h de preparo nGPC1-nGPC4. Os Resultados obtidos revelaram que os nanogel não só se enquadra dentro das regulamentações técnicas de padrões de qualidade da USP, como também apresentaram-se formulações estáveis (Fig. 34), com ausência de alterações visíveis, como sedimentação de partículas ou

separação de fases, bem como a preservação das propriedades organolépticas (odor e cor). Essas observações foram mantidas independentemente das condições de armazenamento, evidenciando a resistência das formulações às flutuações de temperatura e exposição à luz ao longo do período de teste acelerado de 12 dias. O ensaio de durabilidade do produto foi realizado por 180 dias em condições refrigeradas (5 °C), reafirmando a integridade física e as características organolépticas das formulações. Essa estabilidade prolongada destaca a adequação das formulações para períodos de armazenamento longos, particularmente em ambientes onde o controle de temperatura é um fator crítico. Portanto, a formulação nGPC4 para caracterizações posterior com base em sua estabilidade e por ser o nanogel com mais quantidade de curcumina incorporada e foi designada ao longo do estudo como nGPC.



Figura 34: Formulação nGPC, evidenciando o comportamento termorresponsivo: (A) formulação à temperatura de 15°C com transição sol-gel e (B) formulação gel à temperatura de 27°C.

6.2.3 Análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As Figs. 35C e 35D apresentam os espectros obtidos na análise de FTIR do material nGPC (1% OEPb e 0,04% curcumina). Observa-se que a banda intensa correspondente ao estiramento das ligações O—H encontra-se desdobrada em três sinais distintos. Os sinais em 3550 e 3475 cm^{-1} são atribuídos ao estiramento das ligações O—H livres das moléculas de curcumina, estando associados, respectivamente, às interações intermoleculares de hidrogênio entre F127/974p e as moléculas de curcumina.

Já o sinal em 3414 cm^{-1} é atribuído às ligações de hidrogênio intermoleculares entre F127 e 974p. Além disso, a presença da banda em 2885 cm^{-1} , atribuída ao estiramento das ligações C—H, sugere que as moléculas de curcumina, devido à sua alta hidrofobicidade, tendem a se associar preferencialmente às cadeias de PPO do F127.

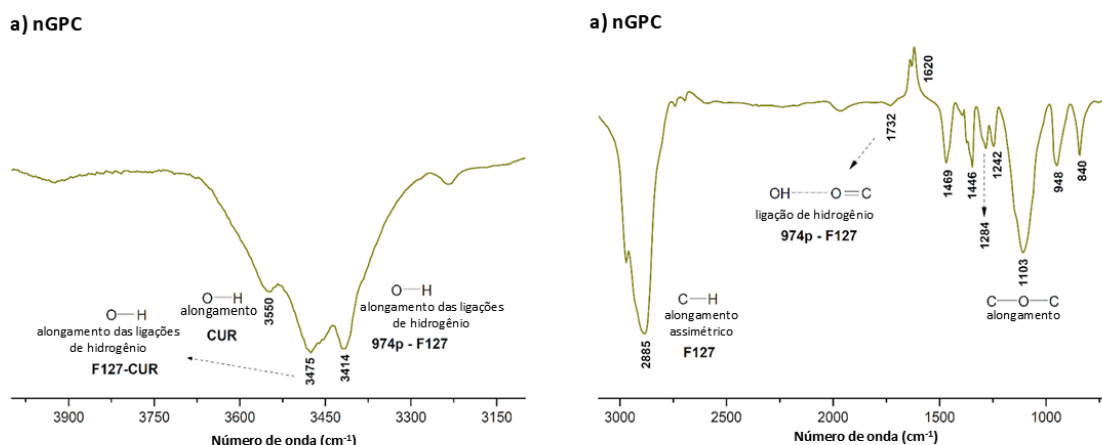


Figura 35: Espectros de FTIR do nanogel nGPC entre $4000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ e (D) 974p entre $2500\text{--}690\text{ cm}^{-1}$.

6.2.4 Análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A técnica DLS é amplamente usada na caracterização de nanogéis devido à sua capacidade de medir tamanhos de partículas em suspensão na nanoescala com precisão. A DLS avalia a distribuição do tamanho de partículas, oferecendo insights valiosos sobre a estabilidade coloidal e propriedades intrínsecas dos nanogéis. Esta técnica é particularmente eficaz no monitoramento de mudanças no diâmetro hidrodinâmico (D_h) em resposta a variações de temperatura, pH e outros fatores ambientais, fornecendo dados cruciais para o desenvolvimento de nanomateriais projetados para aplicações farmacêuticas e medicinais. A análise dos valores de D_h para os nanogéis nG nGPC e revela uma redução acentuada no tamanho de partículas com o aumento da temperatura (Tab. 8).

Tabela 8: Medidas de DLS em função da temperatura para os nanogéis nG e nGP. As medidas foram realizadas em quintuplicata, e os resultados estão expressos como média $\pm$ SD.

Nanogel	
nG	nGPC

Temperatura (°C)	D _h (nm) / PDI	
25	661 ± 6 / 0,34	288 ± 74 / 0,29
32	124 ± 5 / 0,24	296 ± 24 / 0,44
37	17 ± 3 / 0,25	237 ± 17 / 0,42

As medições de DLS foram realizadas em soluções diluídas abaixo de 1% (m/v). Nessas concentrações, que estão abaixo da concentração micelar crítica (CMC) de F127, o processo de desmicelização é favorecido, levando a uma redução no número de partículas menores. Isso ocorre à medida que a entropia total do sistema leva partículas menores a se agregarem em estruturas maiores e mais polidispersas ($D_h = 661 \text{ nm} \pm 6$ e $\text{PDI} = 0,34$). No entanto, como o processo de micelização de copolímeros tribloco é altamente dependente da temperatura, à medida que a temperatura do sistema nG é aumentada de 25 para 32 °C, a temperatura micelar crítica (TMC) compensa a CMC (Alexandridis e Hatton 1995; Wanka; Hoffmann; Ulbricht 1994; Alexander et al., 2012; Brown e Schillin 1992). Isso resulta na formação de partículas menores com polidispersão reduzida ($D_h = 124 \text{ nm} \pm 5$ e $\text{PDI} = 0,24$), indicando um aumento na entropia total do sistema e promovendo difusão de partículas aprimorada, conforme mostrado na análise do D_{if} como uma função da temperatura na Fig. 36A. Esse comportamento destaca a natureza termorresponsiva do nanogel. Em temperaturas mais altas de 32 e 37 °C, os processos de difusão de nG se tornam ainda mais pronunciados, levando a uma redução substancial nos tamanhos das nanopartículas ($D_h = 17 \text{ nm} \pm 3$ e $\text{PDI} = 0,25$). A diminuição em D_h com o aumento da temperatura pode ser atribuída à desidratação dos grupos PEO na corona hidrofílica e no núcleo PPO em temperaturas mais altas, o que leva a uma redução em D_h . Este processo ocorre porque o aumento da energia térmica induz a desidratação gradual em surfactantes não iônicos, aumentando a tendência de separação entre as pseudofases no ambiente aquoso devido a mudanças no equilíbrio dinâmico da micelização. À medida que a temperatura aumenta, a desidratação tanto do núcleo quanto dos grupos PEO se intensifica, causando mudanças

estruturais no copolímero. Além da desidratação, a temperatura mais alta promove um emaranhamento mais eficiente entre os grupos PEO e PPO, resultando em uma redução significativa no tamanho das espécies difusionais no meio. Além disso, a redução em D_h pode estar relacionada ao fato de que copolímeros com menor massa molar permanecem como unímeros em temperaturas elevadas.

Copolímeros de arquitetura tribloco, como F127, exibem um equilíbrio dinâmico entre unímeros e micelas por meio de um mecanismo de inserção-expulsão, e entre micelas de várias geometrias e tamanhos por meio de processos de fusão-fragmentação (Landazuri *et al.*, 2012). Essas características, juntamente com o aumento da temperatura, levam a um maior atrito entre os grupos terminais devido à extrusão da molécula de água, promovendo, em última análise, uma mudança de equilíbrio em direção a micelas menores (Brown e Schillin 1992). À medida que a temperatura aumenta, o copolímero F127 sofre reorganização estrutural impulsionada pela desidratação e maior atrito entre os grupos terminais do copolímero, favorecendo processos de fragmentação e alterando o equilíbrio de micelização. Esse comportamento é atribuído principalmente à conformação do copolímero em solução, onde os blocos PEO hidrofílicos se estendem além do raio da micela, conferindo uma natureza mais fluida em comparação a copolímeros mais hidrofóbicos. Além disso, F127 exibe anomalias relacionadas a relaxamentos macromoleculares, principalmente devido às mudanças conformacionais dos grupos metil nos blocos PPO. Essas mudanças são induzidas pela extrusão de moléculas de água dos segmentos PPO conforme a temperatura aumenta. Essas propriedades únicas do F127 são responsáveis por seu comportamento de autodifusão e equilíbrios de micelização característicos quando comparados a copolímeros mais hidrofóbicos.

A análise dos valores de D_h para o material nGPC revela um padrão distinto quando comparado ao material nG. Ao contrário do nG, o aumento da temperatura não reduz significativamente o tamanho de partícula do material nGPC. Os tamanhos de partícula observados para nGPC, variando de 237 ± 17 nm a 333 ± 22 nm, são consistentes com os estudos de estabilidade. No entanto, a dinâmica de auto-organização desses materiais diverge daquela do nG, com a inclusão de OE**Pb**-curcumina levando a uma redução nos

coeficientes de difusão (D_{if}) dentro do sistema (Fig. 36B). A diminuição observada nos valores de D_{if} para nGPC pode ser atribuída ao impacto do OEPb-curcumina no comportamento de auto-organização do sistema nanogel. A redução nos coeficientes de difusão reflete mudanças nos equilíbrios de micelização dinâmica, que são influenciados pela natureza multicomponente do sistema. Além disso, copolímeros com concentrações $\leq 0,05$ g/mL exibem diferentes equilíbrios de agregação em comparação com aqueles em concentrações próximas ou acima de 0,1 g/mL. Essas mudanças no comportamento de agregação e nas propriedades termodinâmicas sob condições de temperatura variáveis explicam as variações observadas no comportamento do material em solução.

Para obter insights mais profundos sobre os efeitos da temperatura, a energia de ativação difusional (E_{ad}) e os parâmetros termodinâmicos de difusão ($\Delta H_d^\#$ and $\Delta S_d^\#$) foram calculados usando a lei de Arrhenius (Eq. 02) (Figs. 36C e 36D) e a teoria de Eyring (Eq. 03) (Figs. 36E e 36F), ambas adaptadas para processos de difusão. Os parâmetros de ativação desempenham um papel crítico na elucidação dos mecanismos subjacentes à difusão, pois fornecem insights sobre a energia necessária para que esses processos ocorram. Para o sistema nG (Figs. 36C e 36E), o valor E_{ad} calculado (maior que zero, conforme mostrado na Tab. 9, confirma a dependência da temperatura do processo de difusão. Especificamente, um E_{ad} de 208,53 kJ/mol indica que o sistema utiliza energia térmica para facilitar a difusão de espécies em solução. Isso é acompanhado por uma mudança de entalpia ($\Delta H_d^\#$) de 168,20 kJ/mol, significando absorção de energia, e uma mudança de entropia ($\Delta S_d^\#$) de 0,31 kJ/K·mol, refletindo um aumento na desordem do sistema. O aumento da temperatura aumenta a hidrofobicidade do copolímero e aumenta a entropia do sistema, levando à formação de micelas e pré-agregados copoliméricos com diâmetros hidrodinâmicos menores (D_h).

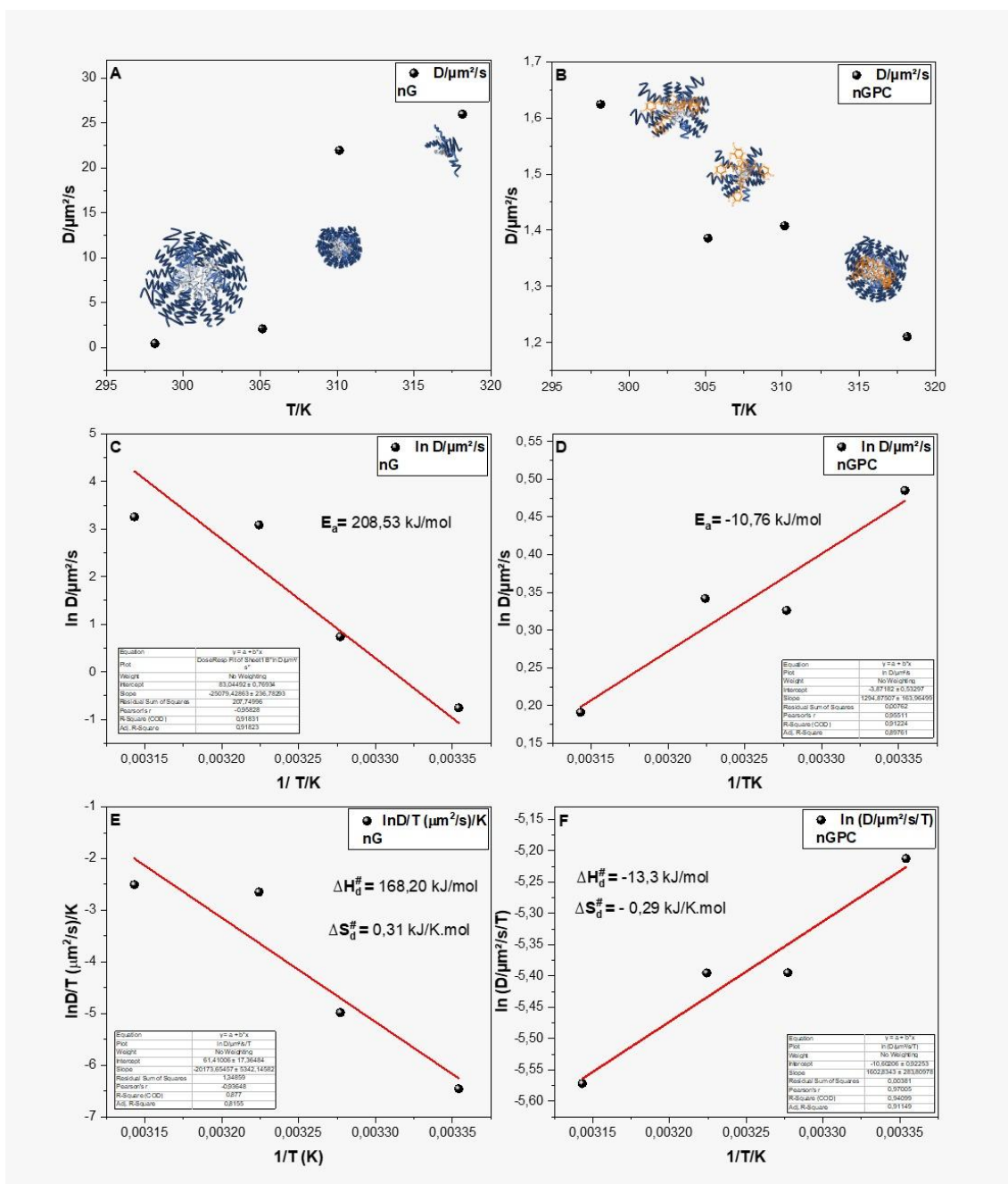


Figura 36. Gráficos de D_{if} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) em função de T (K): (A) nG e (B) nGPC.

Isso, por sua vez, aumenta o volume excluído do copolímero em solução, que se refere ao espaço geométrico ocupado pelos segmentos macromoleculares. À medida que a energia térmica é absorvida, o número de configurações possíveis disponíveis para o sistema se expande, permitindo uma distribuição mais ampla de espécies dentro do sistema nG e promovendo a difusão no meio. Esse comportamento termodinâmico destaca a adaptabilidade do sistema às variações de temperatura e seu potencial para

aplicações sensíveis à temperatura. O sistema nGPC exibiu uma reversão no comportamento térmico, com um valor de E_{ad} de -10,76 kJ/mol, contrastando fortemente com o sistema nG. Essa mudança destaca o impacto da incorporação de OE**Pb**-curcumina, que interrompe significativamente os equilíbrios de micelização do material. Nesse estágio, a energia térmica fornecida ao sistema é predominantemente utilizada em processos alternativos, como reorganização estrutural, em vez de transporte de massa via difusão. Isso é evidente pela natureza exotérmica do processo, refletida por um valor de $\Delta H_d^\#$ de -13,30 kJ/mol. A natureza exotérmica do processo de difusão revela dois pontos-chave. Primeiro, a incorporação de OE**Pb**-curcumina introduz fortes interações intermoleculares entre os componentes, resultando em liberação de energia à medida que o sistema se reorganiza. Isso foi corroborado pela análise FTIR, que mostrou que as moléculas OE**Pb** mais hidrofóbicas são preferencialmente acomodadas nas cadeias PPO de F127. Parte dessa interpretação é baseada no aumento de energia necessário para o alongamento antissimétrico das ligações C—H, conforme indicado pelo aumento da intensidade e do desvio para o azul ($\Delta\nu = 19 \text{ cm}^{-1}$) da banda de 2904 cm^{-1} (nG) para 2885 cm^{-1} no espectro nGPC (Fig. 35), indicando um aumento significativo nas interações hidrofóbicas do sistema, alinhando-se com os processos de interação entálpica observados. Em segundo lugar, a diminuição da entropia difusional ($\Delta S_d^\# = -0,29 \text{ kJ/K}\cdot\text{mol}$) indica uma redução nas possibilidades configuracionais do sistema. À medida que a energia é liberada, o sistema se torna mais ordenado, restringindo o intervalo de configurações difusionais.

O efeito sinérgico dessas mudanças é ainda mais validado por aplicações *in vitro* na leishmaniose cutânea. O sistema nGPC demonstrou eficácia superior em comparação ao material de controle, ressaltando o papel do OE**Pb**-curcumina na alteração da organização dinâmica do nanogel. Essas incorporações foram essenciais para induzir mudanças nos padrões de ativação, resultando em uma inversão do comportamento mecanicista difusional. A influência da temperatura nos sistemas nG e nGPC é ainda mais enfatizada pelos valores da função de energia livre de Gibbs difusional ($\Delta G_d^\#$)

como uma função da temperatura, apresentada na Tab. 9, ilustra as distinções termodinâmicas entre os dois sistemas.

O aumento da temperatura para o sistema nG leva a uma diminuição progressiva nos valores de $(\Delta G_d^\#)$, como mostrado na Fig. 37. Essa tendência indica que temperaturas mais altas promovem processos de difusão, pois menos energia é necessária para que os sistemas micelares se difundam dentro da solução. Essa observação se alinha com reduções em D_h , $\Delta H_d^\#$ e $\Delta S_d^\#$, refletindo dinâmica micelar aprimorada e maior eficiência difusional em temperaturas elevadas. Em contraste, o sistema nGPC exibe uma inversão termodinâmica com o aumento da temperatura, como discutido anteriormente. Isso é caracterizado por valores de E_{ad} negativos e uma tendência monotonicamente crescente em $\Delta G_d^\#$ (Fig. 37). O sistema também mostra uma diminuição em $\Delta S_d^\#$, indicando reorganização molecular e aumento da ordenação de moléculas de água para solvatar micelas monoméricas, pré-agregados micelares, micelas e OE**Pb**-curcumina conforme a temperatura aumenta. Os valores exotérmicos de $\Delta H_d^\#$ observados com o aumento da temperatura sugerem que a transferência de unímeros, pré-agregados micelares e OE**Pb** da solução para a formação de micelas é um processo termodinamicamente favorável. Esse fenômeno é predominantemente impulsionado pelos segmentos PPO hidrofóbicos do copolímero. Esse mecanismo termodinâmico complexo explica os valores monotonicamente crescentes de $\Delta H_d^\#$: conforme o sistema passa por autoassociação e reorganização estrutural, maior energia é necessária para que esses processos progridam. Os perfis de transferência de massa de difusão dos sistemas nG e nGPC revelam comportamentos complexos. As propriedades intrínsecas do F127, combinadas com a incorporação de OE**Pb**-curcumina, amplificam as forças motrizes hidrofóbicas dentro do sistema. Essas interações são responsáveis pelas mudanças estruturais observadas e inversões termodinâmicas, destacando ainda mais a intrincada relação entre arquitetura molecular, temperatura e dinâmica de difusão.

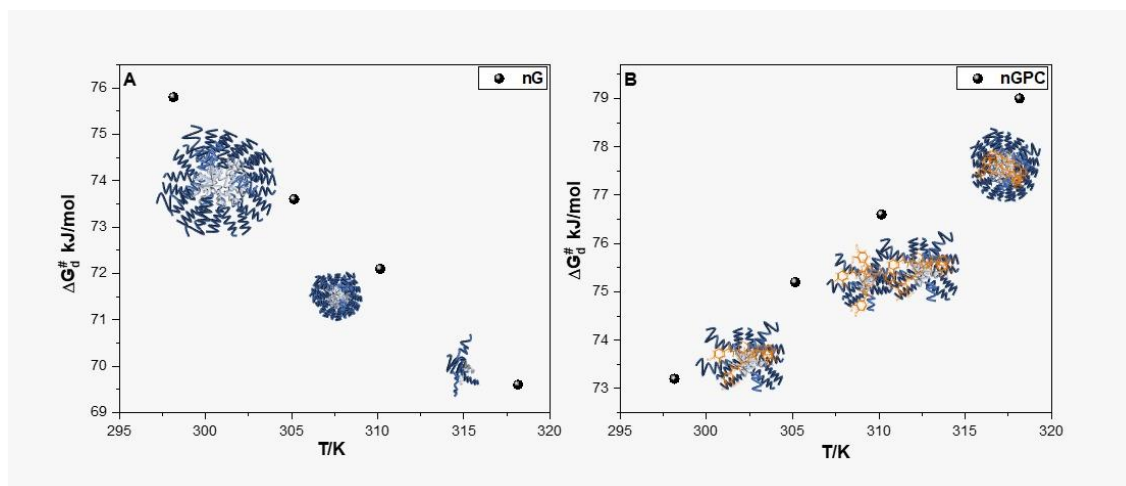


Figura 37. Gráfico de $\Delta G_d^{\ddagger}$ em função da temperatura para nG e nGPC.

Tabela 9. Parâmetros termodinâmicos do processo difusional para nG e nGPC.

nG		nGPC	
Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
E_{ad} (kJ mol ⁻¹)	2085,3	E_{ad} (kJ mol ⁻¹)	-10,76
$\Delta S^{\ddagger}$ (kJ K ⁻¹ mol ⁻¹)	0,31	$\Delta S^{\ddagger}$ (kJ K ⁻¹ mol ⁻¹)	-0,29
$\Delta H^{\ddagger}$ (kJ mol ⁻¹)	168,20	$\Delta H^{\ddagger}$ (kJ mol ⁻¹)	-13,30
$\Delta G^{\ddagger}$ (kJ mol ⁻¹) em diferentes temperaturas			
Temperatura (K)	nG	Temperatura (K)	nGPC
298,15	75,80	298,15	73,20
303,15	73,60	303,15	75,20
305,15	72,10	305,15	76,60
310,15	69,60	310,15	79,00

6.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A técnica MEV tornou-se uma ferramenta essencial para explorar as complexas paisagens estruturais de formulações nano e microestruturadas. Reconhecida por suas excepcionais capacidades de imagem de alta resolução, a MEV desempenha um papel fundamental na caracterização de materiais em escalas altamente relevantes para formulações farmacêuticas, permitindo uma compreensão detalhada de suas propriedades e potenciais aplicações. Neste estudo, a análise MEV foi empregada para investigar a morfologia da superfície

e da seção transversal dos nanogéis nG e nGPC liofilizado. As micrografias (Figs. 38A e 38B) revelam que a matriz do nanogel nG exibe uma arquitetura porosa, apresentando estruturas interconectadas semelhantes a canais, características das cadeias de polímeros reticulados de F127/974P devido à ligação de hidrogênio intermolecular. Essas características morfológicas oferecem insights valiosos sobre as propriedades do nG, sugerindo que sua rede porosa retém efetivamente a fase líquida contendo moléculas de OEPb/curcumina, aumentando assim a viscosidade por meio de fortes interações de ligação de hidrogênio com água. De fato, a incorporação de OEPb/curcumina em nG induz modificações morfológicas notáveis na nanoformulação. As micrografias MEV de nGPC revelam uma textura de superfície mais áspera, sugerindo que os poros foram preenchidos, como evidenciado por sua aparência menos definida (Figs. 38C-38F). Consistente com a análise FTIR, as fortes interações intermoleculares entre OEPb/curcumina e as cadeias de polímero PEO dificultam a formação de poros durante o processo de liofilização

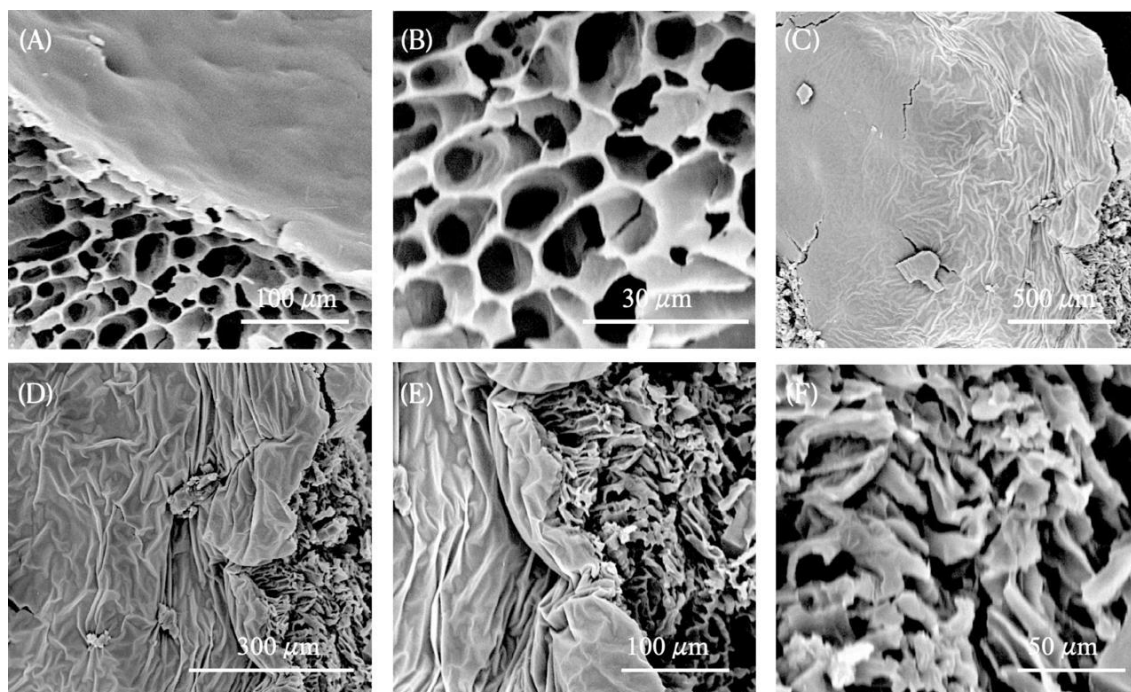


Figura 38: Micrografias MEV de nanogéis após o processo de liofilização: (A) e (B) nG em ampliações de 1000× e 5000×, respectivamente; (C), (D), (E) e (F) nGPC em ampliações de 200×, 500×, 1000× e 2000×, respectivamente.

6.2.6 Análise de Reologia

A análise da curva de fluxo da amostra nGPC, avaliada até uma taxa de cisalhamento de 1500 s^{-1} a $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, revelou comportamento característico do fluido newtoniano (Fig. 39A). A curva de tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento foi linear, começando na origem e atingindo 250 a 1500 Pas^{-1} . Notavelmente, as curvas para frente e para trás se sobrepuseram completamente, indicando a ausência de histerese. Isso reforça a estabilidade reológica do material e descarta efeitos tixotrópicos ou reopéticos. A viscosidade constante, calculada em $0,167 \text{ Pas}$, sugere que o nGPC mantém propriedades reológicas uniformes mesmo em baixas temperaturas, como $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a análise reológica da amostra nGPC demonstrou comportamento não newtoniano, contrastando com as características newtonianas observadas a $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 39B). A curva de tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento exibiu comportamento de afinamento de cisalhamento, onde a viscosidade diminuiu com aumento da taxa de cisalhamento. Isso indica uma estrutura interna de fluido que se reorganiza sob altas forças de cisalhamento, uma característica comum de suspensões ou nanogéis. A curva para frente mostrou uma diminuição na tensão de cisalhamento de 200 s^{-1} para 1500 s^{-1} , sugerindo respostas viscoelásticas ou tixotrópicas, enquanto a curva para trás foi quase linear, indicando recuperação estrutural incompleta do fluido. A $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a amostra nGPC apresentou comportamento reológico característico de sistemas não newtonianos, com um padrão tixotrópico pronunciado (Fig. 39C). Durante o teste, a viscosidade do nanogel diminuiu conforme a taxa de cisalhamento aumentou, mas não se recuperou totalmente após a remoção das forças de cisalhamento. Isso sugere que a estrutura interna do nanogel se reorganiza e se torna mais fluida sob condições de alto cisalhamento. Esse comportamento é típico de materiais onde a viscosidade depende do histórico de cisalhamento, conforme observado em muitos sistemas viscoelásticos ou tixotrópicos. A curva direta exibiu três picos seguidos por quedas na viscosidade, indicando mudanças estruturais contínuas dentro do nanogel conforme a taxa de

cisalhamento aumentou. No entanto, a estrutura não se restaurou totalmente após cada pico. Isso destaca a resposta dinâmica do nanogel ao cisalhamento, tornando-o mais fácil de aplicar em altas taxas de cisalhamento, mas com a viscosidade não retornando ao seu estado inicial. Por outro lado, a curva reversa foi quase linear, mas mostrou uma inclinação mais íngreme do que os experimentos conduzidos a 25 °C. Isso indica que após o cisalhamento, a amostra permaneceu mais fluida, com uma estrutura parcialmente reorganizada que não retornou inteiramente à sua condição anterior.

Esse comportamento reológico tem implicações significativas para as aplicações tópicas de nGPC, particularmente em temperaturas que variam de 25 a 32 °C, que correspondem às temperaturas típicas da pele humana. A redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento facilita a aplicação do nanogel, aumentando sua espalhabilidade sobre a pele. O comportamento tixotrópico, caracterizado por variações no estresse de cisalhamento, é vantajoso para a liberação controlada de compostos bioativos, permitindo uma administração terapêutica mais eficaz e gradual. Este perfil é especialmente desejável em tratamentos tópicos, pois garante ação prolongada e direcionada. Além disso, a estabilidade reológica observada sugere que o nanogel nGPC (Fig. 39D) mantém sua eficácia sob condições fisiológicas, ressaltando seu forte potencial para aplicações dermatológicas onde o desempenho estável e controlado é crítico sob temperaturas variáveis da pele.

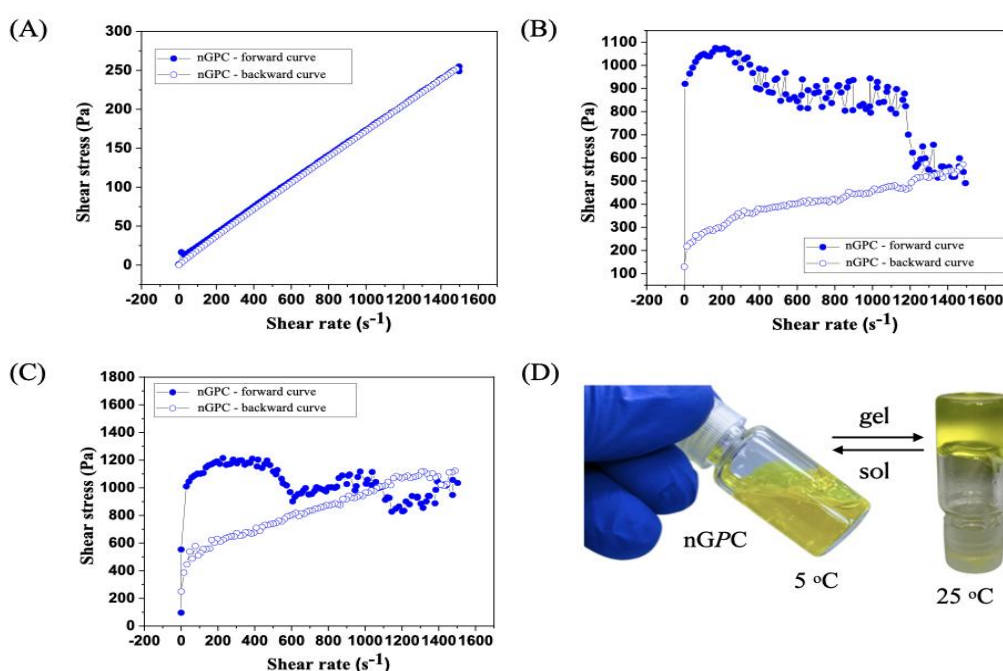


Figura 39: Comportamento reológico da amostra nGPC em temperaturas variáveis: (A) comportamento do fluido newtoniano a 5°C com uma curva de tensão de cisalhamento linear versus taxa de cisalhamento; (B) comportamento de afinamento por cisalhamento a 25°C, demonstrando diminuição da viscosidade com aumento da taxa de cisalhamento; (C) padrão tixotrópico pronunciado a 32°C, com redução da viscosidade e recuperação estrutural incompleta após cisalhamento. As curvas demonstram a resposta dinâmica do nanogel às forças de cisalhamento, destacando sua adequação para aplicações tópicas; (D) imagem real do nanogel nGPC durante a transição sol-gel, mostrando sol a 5°C e gel a 25°C. As curvas demonstram a resposta dinâmica do nanogel às forças de cisalhamento, destacando sua adequação para aplicações tópicas.

6.2.7 Atividade Leishmanicida *in vitro* do Nanogel

O objetivo principal deste estudo foi avaliar se o potencial terapêutico de Curcumina e OEPb, quando incorporados em uma matriz de nanogel F127/974P, seria preservado em comparação com suas formas livres em DMSO como veículo, conforme descrito anteriormente na literatura. Especificamente, concentrações dos compostos próximas aos seus valores de IC₅₀ relatados, quando solubilizados em DMSO, foram selecionadas para esta investigação. O estudo teve como objetivo determinar se essas concentrações manteriam sua eficácia biológica quando encapsuladas na matriz de nanogel, dado que as propriedades da matriz podem influenciar a biodisponibilidade, a cinética de liberação e a eficácia terapêutica geral dos ingredientes farmacêuticos ativos (API). É importante considerar que as quantidades de excipientes usadas na preparação de nanogéis podem influenciar negativamente o potencial citotóxico do API. Isso é particularmente relevante ao avaliar a faixa de concentração do API incorporado nas formulações de nanogel, pois concentrações mais altas podem levar ao aumento da toxicidade, comprometendo potencialmente o perfil de segurança terapêutica da formulação final.

Para testar essa hipótese, a eficácia das formulações de nanogel, incluindo nanogéis vazios (nG), aqueles contendo OEPb (nGP) e a combinação de ambos os compostos (nGPCIC₅₀), foi avaliada. Esse design experimental permitiu uma comparação abrangente dos efeitos de cada formulação, tanto isoladamente quanto em combinação, fornecendo, assim, insights críticos sobre os potenciais efeitos sinérgicos ou aditivos da combinação curcumina-OEPb. Além disso, essa configuração permitiu uma avaliação da influência da própria matriz de nanogel na bioatividade dos compostos,

comparando as formulações encapsuladas com os compostos livres em DMSO. Embora o encapsulamento dos compostos na matriz de nanogel tenha sido hipotetizado para diminuir a biodisponibilidade imediata de Curcumina e OEPb devido ao mecanismo de liberação controlada inerente ao nanogel, também foi antecipado que as propriedades de liberação sustentada do nanogel poderiam oferecer vantagens terapêuticas significativas. Ao prolongar a liberação dos compostos ativos ao longo do tempo, o sistema de nanogel poderia potencialmente aumentar a eficácia terapêutica geral, particularmente para o tratamento de doenças crônicas ou recorrentes, como a leishmaniose. Essa consideração dupla de potencial potência imediata diminuída versus eficácia prolongada forma a base da investigação sobre a eficácia desses sistemas de administração baseados em nanogel.

O efeito das formulações de nanogel na viabilidade das células promastigotas *LLa* foi avaliado em três pontos de tempo diferentes: 24, 48 e 72 h. Curiosamente, o nanogel nG e as formulações de curcumina e OEPb mostraram qualquer atividade antipromastigota em qualquer concentração ou ponto de tempo testado. Em contraste, o nanogel nGPC demonstrou atividade significativa, conforme mostrado na Fig. 40. Na concentração mais alta testada (50 µg/mL de OEPb e 17,5 µg/mL de curcumina), a formulação combinada induziu mais de 88% de mortalidade dos promastigotas em todos os pontos de tempo (24, 48 e 72 h). Esse forte efeito foi observado consistentemente em cada intervalo de tempo, sugerindo uma ação robusta e sustentada dos compostos combinados. Na menor concentração testada (2,19 µg/mL de curcumina e 6,25 µg/mL de OEPb), a formulação combinada ainda exibiu atividade notável, com taxas de mortalidade de 24,15%, 21,35% e 10,40% em 24, 48 e 72 h, respectivamente. Esses resultados demonstram um efeito dependente da dose, com concentrações mais altas da formulação combinada, levando ao aumento da mortalidade de promastigotas. Os dados também sugerem um potencial efeito sinérgico ou aditivo entre os dois compostos, pois a formulação combinada foi mais eficaz do que os compostos isolados sozinhos. As descobertas indicam que a combinação de OEPb e curcumina, quando incorporada à matriz de nanogel, aumenta significativamente o potencial terapêutico contra células promastigotas *LLa*.

Essas descobertas abrem uma nova via de pesquisa para entender melhor os potenciais efeitos sinérgicos do curcumina-OEPb. Estudos futuros terão como objetivo elucidar os mecanismos subjacentes ao sinergismo observado entre essas APIs. No entanto, considerando que o Curcumina é um fotossensibilizador potente, estudos complementares utilizando terapia fotodinâmica (PDT) são necessários. Esses estudos fornecerão insights sobre o potencial fototerapêutico do sistema nGPC. Essa abordagem pode abrir caminho para a descoberta de terapias combinadas, explorando a ação leishmanicida do nanogel tanto na presença quanto na ausência de fontes de luz. Essa linha de investigação pode expandir significativamente as estratégias terapêuticas para leishmaniose, potencialmente aumentando a eficácia do tratamento por meio de novas combinações ativadas por luz.

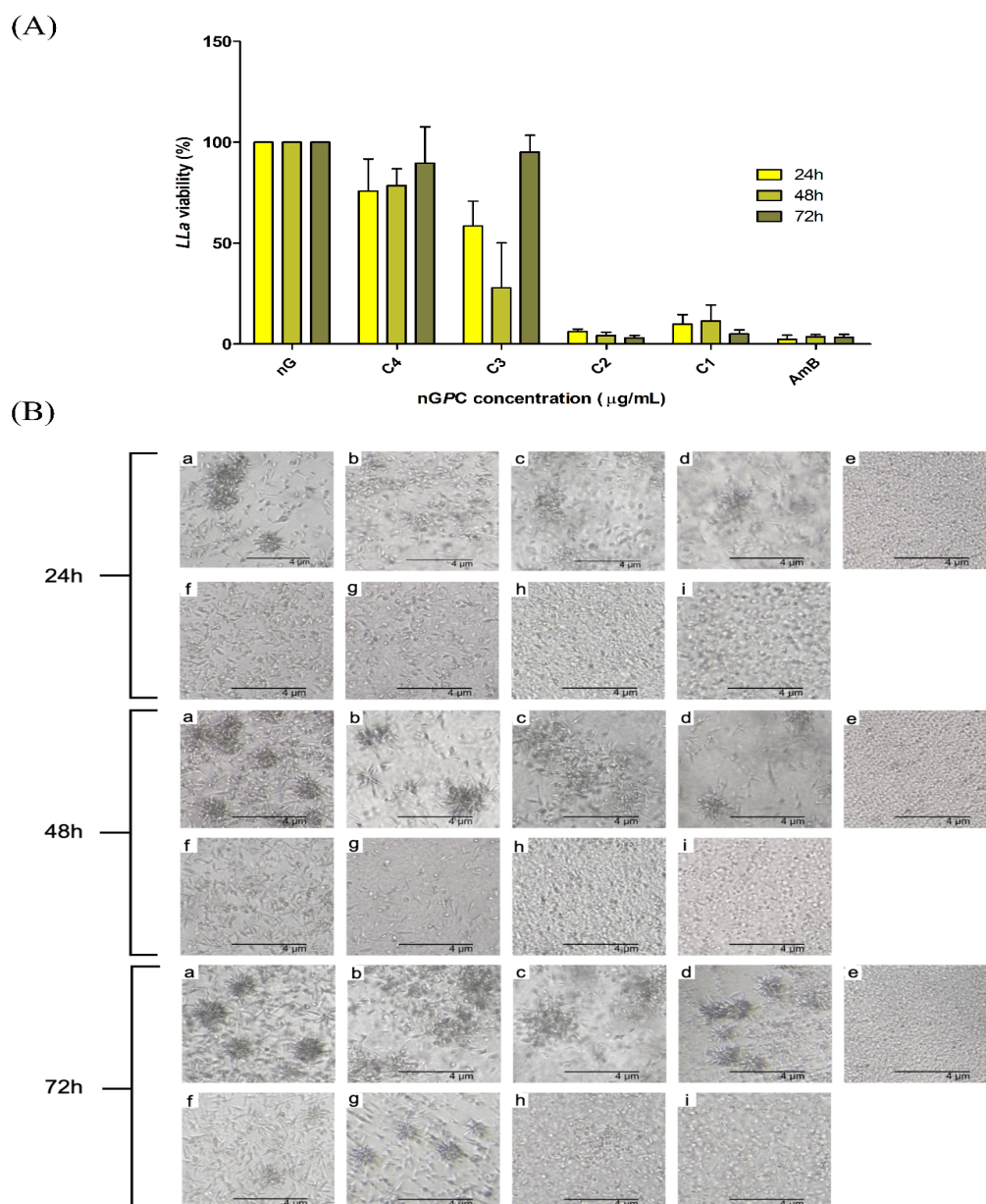


Figura 40: Mortalidade *in vitro* de células promastigotas *LLa* em resposta a diferentes concentrações da formulação de nanogel nGPC em três pontos de tempo (24, 48 e 72 h). As concentrações C1-C4 representam a combinação de (curcumina/OEPb) da seguinte forma: C1 = 50:17,5, C2 = 25:8,75, C3 = 12,5:4,38, e C4=6,65:2,19 (μg/mL). Os dados indicam um aumento dependente da dose na mortalidade celular, com as maiores concentrações induzindo mais de 88% de mortalidade em todos os pontos de tempo.

CAPÍTULO 7

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho sugerem que o nanogel nGP representa uma alternativa viável e ecologicamente correta para o controle de larvas de *A. aegypti*, especialmente em concentrações mais elevadas. A caracterização por UV-Vis e FTIR confirmou a incorporação estável do OEPb dentro da matriz do nanogel. Os resultados das medições de DLS revelaram um diâmetro hidrodinâmico (D_h) de 30,44 nm e um índice de polidispersidade (IPD) de 0,54, indicando uma maior dispersão de partículas na solução. Especificamente, os ensaios *in vitro* demonstraram uma taxa de mortalidade entre 96,0-100,0% após 24-48h em uma concentração de 500 µg/mL. Essa eficácia dependente da concentração sugere que uma maior otimização da formulação poderia aumentar sua aplicabilidade prática em programas de controle de vetores. As caracterizações morfológicas MEV e AFM também confirmaram a estabilidade química e a integridade estrutural dos nanogéis, preservando a composição bioativa do EOPb após o processo de nanoencapsulação em nGP. A nanoformulação nGP apresentou alta eficácia leishmanicida *in vitro*, atingindo taxas de mortalidade acima de 90% em 48h. Os resultados *in vivo* demonstraram uma redução máxima de edema de 62,7% em duas horas de tratamento, sugerindo que os nanogéis avaliados possuem potencial como agentes anti-inflamatórios e podem ser considerados uma alternativa promissora a medicamentos padrão como o diclofenaco. Estudos futuros devem explorar os aspectos mecânicos subjacentes aos efeitos leishmanicidas e anti-inflamatórios dos nanogéis, bem como conduzir ensaios clínicos e testes de campo para validar sua eficácia em cenários do mundo real.

Adicionalmente, a segunda formulação desenvolvida nGPC composta por curcumina e OEPb apresentou-se como uma estratégia terapêutica promissora contra promastigotas *LLa*. A caracterização físico-química confirmou a estabilidade e a termossensibilidade do nGPC, garantindo sua adequação para aplicação tópica. A análise reológica revelou uma transição de comportamento newtoniano para de afinamento por cisalhamento e tixotrópico, facilitando sua aplicação em tratamento tópico. As avaliações biológicas demonstraram que o nGPC aumentou significativamente a atividade

antipromastigota em comparação com a curcumina e *OE**P**b* puros, com mais de 88% de mortalidade na concentração mais alta testada e uma resposta dependente da dose em concentrações mais baixas. Essas descobertas sugerem uma interação sinérgica entre Curcumina e *OE**P**b*, provavelmente mediada pela matriz do nanogel, o que melhora a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica.

Os resultados ressaltam o potencial de nGP e nGPC em superar as limitações dos tratamentos convencionais de leishmaniose, particularmente ao aumentar a estabilidade do medicamento, reduzir a toxicidade e permitir a liberação controlada. Estudos futuros devem se concentrar em elucidar os mecanismos moleculares subjacentes ao sinergismo observado, bem como avaliar o impacto da TFD para melhorar ainda mais os resultados terapêuticos.

8 REFERÊNCIAS

ADAMS, Robert P. **Identificação de Componentes de Óleos Essenciais por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa**. Illinois, EUA: Allured Publishing Corporation, 2007.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R. *et. al.* Volatile constituents of the aerial parts of *Pectis apodocephala* and *Pectis oligocephala*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 6, p. 372–373, 2003.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R. *et al.* Nematicidal and larvicidal activities of the essential oils from aerial parts of *Pectis oligocephala* and *Pectis apodocephala* Baker. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 2, p. 209–213, jun. 2007.

Alexandridis, P.; Hatton, T. A. Poly(ethylene Oxide)-poly(propylene Oxide)-poly(ethylene Oxide) Block Copolymer Surfactants in Aqueous Solutions and at Interfaces: Thermodynamics, Structure, Dynamics, and Modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1995, 96, 1–46. DOI: 10.1016/0927-7757(94)03028-X.

Alexander, S.; Cosgrove, T.; Prescott, S. W.; Castle, T. C. Flurbiprofen Encapsulation Using Pluronic Triblock Copolymers. 677 **Langmuir** 2011, 27, 8054–8060. DOI: 10.1021/la201124c.

Almgren, M.; Brown, W.; Hvidt, S. Self-Aggregation and Phase Behavior of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)- Poly(ethylene oxide) Block Copolymers in Aqueous Solution. **Colloid Polym. Sci.** 1995, 273 (1), 2–15.

ALIPANAH, H. *et al.* Nanoemulsion and Nanogel Containing Eucalyptus globulus Essential Oil; Larvicidal Activity and Antibacterial Properties. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2022, p. 1–9, 31 ago. 2022.

ALMEIDA, L. S.; COTA, A. L. S.; RODRIGUES, D. F. Saneamento, Arboviroses e Determinantes Ambientais: impactos na saúde urbana. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 10, p. 3857–3868, out. 2020.

AMARAL, M. C. P. C.; GARZIERA, L.; PINTO, A. T. M.; GOMEZ, M. **Manual de Procedimentos Criação em Massa de Aedes aegypti – Linhagem (MBR-001-)**. Vol. 1 ed. Juazeiro-BA: Biofábrica MOSCAMED BRASIL, 2018.

Araújo-Filho HG, Dos Santos JF, Carvalho MTB, Picot L, Fruitier-Arnaudin I, Groult H, Quintans-Júnior LJ, Quintans JSS. Atividade anticancerígena do limoneno: uma revisão sistemática das vias de sinalização do alvo. **Phytother Res.** 2021 setembro; 35(9):4957-4970. DOI: 10.1002/ptr.7125. Epub 2021 17 de abril. PMID: 33864293.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

Balaña-Fouce, R.; Oliveira, R. M.; Carvalho, C.; Oliveira, D.; *Gene. Farmacol.* 1998, 30, 435.

BLONDER, J. M. et al. Dose-dependent hyperlipidemia in rabbits following administration of poloxamer 407 gel. **Life Sciences**, v. 65, n. 21, p. PL261–PL266, out. 1999.

BORTOLUZZI, M. M.; SCHMITT, V.; MAZUR, C. E. Efeito fitoterápico de plantas medicinais sobre a ansiedade: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 1, p. e02911504, 1 jan. 2020.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, dez. 2007.

BRASIL, M. DA S. DO. **Leishmanioses: Ministério da Saúde alerta para prevenção.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/agosto/leishmanioses-ministerio-da-saude-alerta-para-prevencao>>. Acesso em: 24 ago. 2024.

BRASIL. **Ministério da Saúde.** Informe semanal nº 07 - COE. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/arboviroses/informe-semanal/informe-semanal-no-07-coe>. Acesso em: 3 fev. 2025.

BRASIL. **Ministério da Saúde.** Saúde lança painéis para monitorar leishmanioses no Brasil. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/setembro/saude-lanca-paineis-para-monitorar-leishmanioses-no-brasil>. Acesso em: 3 fev. 2025.

BRASIL, M. DA S. DO. **MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE Morbimortalidade e resposta nacional no contexto dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável Doenças Tropicais Negligenciadas no Brasil.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br>>.

BRASIL, M. DA S. DO. **Ministério da Saúde elabora plano para enfrentamento da dengue 2024/2025.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/maio/ministerio-da-saude-elabora-plano-para-enfrentamento-da-dengue-2024-2025>>.

BRASIL, M. DA S. DO. **Ministério da Saúde divulga boletim epidemiológico doenças negligenciadas no Brasil.**

BRASIL, M. DO M. A. DO. **Biodiversidade e Biomas.** Disponível em: <Biodiversidade e Biomas — Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima (www.gov.br)>. Acesso em: 5 set. 2024d.

BRASIL, M. DA S. DO. **Leishmanioses: Ministério da Saúde alerta para prevenção.** Disponível em:

<<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/agosto/leishmanioses-ministerio-da-saude-alerta-para-prevencao>>. Acesso em: 24 ago. 2024.

Brown, W.; Schillin, K. Triblock Copolymers in Aqueous Solution Studied by Static and Dynamic Light Scattering and Oscillatory 697 Shear Measurements: Influence of Relative Block Sizes. **American Chemical Society** 1992, 6044, 6038–6044.

BRUSCHI, M. L. et al. Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: *In Vitro* Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 8, p. 2074–2089, ago. 2007.

CAMARA, M. B. P. et al. Seasonal and Circadian Evaluation of the *Pectis brevipedunculata* Essential Oil and Its Acaricidal Activity against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, n. 7, p. 1020–1029, 2023.

CAMPANHOLI, K. DA S. S. et al. Thermo and Photoresponsive Emulgel Loaded with *Copaifera reticulata* Ducke and Chlorophylls: Rheological, Mechanical, Photodynamic and Drug Delivery Properties in Human Skin. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2798, 14 dez. 2022.

CARLA DE MORAIS BRAGA. **Braga CM. Histórico da utilização de plantas medicinais [monografia]. Brasília: Universidade Federal de Brasília; 2011.** Brasília: Universidade Federal de Brasília / Universidade Estadual de Goiás, 2011.

CARVALHO, D. O. et al. Mass Production of Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil. **Journal of Visualized Experiments**, n. 83, 4 jan. 2014.

CARVALHO, D. T. Y. DE et al. Antifungal essential oils in dental practice. In: **Multidisciplinary Perspectives: Integrating Knowledge**. [s.l.] Seven Editora, 2024.

CLAUDIA BARROS MONTEIRO VITORELLO; JÉSSICA FERNANDA MENDES, JOÃO VITOR FERRO MAZZEI, JONATHAN FERREIRA MACEDO, P. F. V. F. **Plantas Medicinais e Fitoterapia: Tradição e Ciência**. FEALQ ed. Piracicaba - sp: [s.n.]. v. 1º

Costa, E. V., Sampaio, M. F. C., Menezes, L. R. A., Dutra, L. M., Costa, C. O. S., Pinheiro, M. L. B., Almeida, F. R. R., Silva, T. B., & Barison, A. (2020). Diversity of the diterpenes in the leaves of *Xylopia laevigata* (Annonaceae) and their cytotoxicities. **Química Nova**, 43(4), 428–434.

<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170504>

COSTA LIMA, C. DA et al. **Plantas Medicinais e Indicações Terapêuticas: À Luz do Estudo Etnobotânico Na Comunidade Quilombola Santo Antônio dos Pretos em Codó, Maranhão**. [s.l.] Editora Científica Digital, 2020.

CROFT, S. L.; BRAZIL, R. P. 1982. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructural and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* *in vitro*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 76(1):37-43.

DA COSTA, C. S. et al. Design of Liquid Formulation Based on F127-Loaded Natural Dimeric Flavonoids as a New Perspective Treatment for Leishmaniasis. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 2, p. 252, 8 fev. 2024.

DA CRUZ ARAUJO, S. H. et al. Contributions of γ -Aminobutyric Acid (GABA) Receptors for the Activities of *Pectis brevipedunculata* Essential Oil against *Drosophila suzukii* and Pollinator Bees. **Plants**, v. 13, n. 10, p. 1392, 17 maio 2024.

DANO, M. E. L. et al. Environmentally responsive systems for topical administration of copaiba oil-resin: The effect of carbomer 974P on the mechanical, rheological, drug release and skin permeation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 96, p. 105711, jun. 2024.

De,M.;Bhattacharya, S. C.; Moulik, S. P.; Panda, A. K. Interfacial Composition, Structural and Thermodynamic Parameters of 683 Water/(Surfactant+n-Butanol)/n-Heptane Water-in-Oil Microemulsion Formation in Relation to the Surfactant Chain Length. 684 **Journal of Surfactants and Detergents** 2010, 13, 475–484. DOI: 10.1007/s11743-010-1186-7.

DE OLIVEIRA BARBOSA BITENCOURT, R. et al. Entomopathogenic fungi and Schinus molle essential oil: The combination of two eco-friendly agents against *Aedes aegypti* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 194, p. 107827, out. 2022.

DE SOUSA, B. M. et al. Use of essential oils extracted from the Caatinga as an alternative for the treatment of infectious diseases and inflammation. In: **Collection of Internacional Topics in Health Sciences V.2**. [s.l.] Seven Editora, 2024.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, v. 19, n. 2, p. 181–222, 15 mar. 2002.

DIAS, L. C. et al. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1552–1556, 2013.

DOMINGUES, P. B. A.; CARLO, F. G. DE C.; PIERI, F. A. Chemical composition and biological activities of essential oils from *Pectis* spp. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 24, n. 3, p. 126–133, 2022.

DOU, Qingqing; ABDUL KARIM, Anis; LOH, Xian Jun. Modification of thermal and mechanical properties of PEG-PPG-PEG copolymer (F127) with MA-POSS. **Polymers**, v. 8, n. 9, p. 341, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym8090341>.

DUSCHATZKY, C. B. et al. Evaluation of Chemical and Antiviral Properties of Essential Oils from South American Plants. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 16, n. 4, p. 247–251, 1 ago. 2005.

ELFAKHRI, K. H. et al. Understanding the impact of formulation design on microstructure and drug release from porous microparticle-based tretinoin topical gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 653, p. 123794, mar. 2024.

FARNESI, L. C. et al. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 124–126, fev. 2009.

FERREIRA FARIAS, A. L. et al. Chemical Characterization, Antioxidant, Cytotoxic and Microbiological Activities of the Essential Oil of Leaf of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray (Asteraceae). **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 34, 4 mar. 2019.

FERREIRA, M. L. et al. Desenvolvimento de uma nanoemulsão (o/a) bioativa incorporada ao óleo essencial de *Coleus aromaticus* Benth (hortelã-grosso). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e18711223516, 22 jan. 2022.

FILIPPIN, Fabíola Branco; SOUZA, Liliete Canes. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 191-202, jun. 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbcf/a/C48LSPy5KcjSFDMygv6L6Mb/>. Acesso em: 3 fev. 2025.

FRANCINETE CARLA NUNES CAVALCANTI VIANA. **ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E ANTIPARASITÁRIA DE PLANTAS MEDICINAIS DA FLORA BRASILEIRA**. Recife: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, 2017.

FREITAS, Thaís A. L. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoníato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 959-966, dez. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/BhTgxxg6L97vmnRSn36Wd9Mz/>. Acesso em: 3 fev. 2025.

FRONZA, M. et al. ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA DE RENDA EM ÁREAS DE SISTEMAS SILVIPASTORIL. In: **Sistemas Integrados de Produção: pesquisa e desenvolvimento de tecnologias**. [s.l.] Editora Científica Digital, 2021. p. 165–183.

GBIF.ORG. ***Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip.** Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/5405460>>.

Gbenou, JD, Ahounou, JF, Akakpo, HB, Laleye, A., Yayi, E., Gbaguidi, F., Gbaguidi, F., Baba-Moussa, L., Darboux, R., Dansou, P., Moudachirou, M., Kotchoni, SO, 2013. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Eucalyptus citriodora* e suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas em ratos Wistar. **Mol. Biol. Rep.** 40, 1127–1134. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2155-1>.

GLAMOČLIJA, J. et al. Chemical characterization of *Lippia alba* essential oil: an alternative to control green molds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1537–1546, dez. 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, abr. 2007.

GOMES JUNIOR, P. P. et al. Efeito larvicida do extrato das folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm. Sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). In: **Impactos da dengue zika e chikungunya: uma análise multidisciplinar**. [s.l.] Seven Editora, 2024.

Griffiths, P. C.; Stilbs, P.; Yu, G. E.; Booth, C. Role of Molecular Architecture in Polymer Diffusion: A PGSE-NMR Study of Linear 681 and Cyclic Poly(ethylene Oxide). *Journal of Physical Chemistry* 1995, 99, 16752–16756. DOI: 10.1021/j100045a041.

GRUPO DE TRABALHO COMPOSITAE (CWG). ***Pectis L.*** Disponível em: <<https://www.compositae.org/gcd/aphia.php?p=taxdetails&id=1076037>>.

GUIMARÃES, L. G. de L.; CARDOSO, M. das G.; SOUSA, P. E. de; ANDRADE, J. de; VIEIRA, S. S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Brasília, v. 42, n. 2, jun. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-66902011000200028>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rca/a/MjxmmxfFtg3WXB5p3WtLPJp/>. Acesso em: 18 mar. 2025.

Haillant, O.; Dumbleton, D.; Zielnik, A. An Arrhenius Approach to Estimating Organic Photovoltaic Module Weathering 679 Acceleration Factors. **Solar Energy Materials & Solar Cells** 2011, 95, 1889–1895. DOI: 10.1016/j.solmat.2011.02.013.

Hellwig, J.; Karlsson, R.-M. P.; Wågberg, L.; Pettersson, T. Measuring Elasticity of Wet Cellulose Beads with an AFM Colloidal Probe Using a Linearized DMT Model. **Anal. Methods** 2017, 9, 4019–4022.

HELTON PATRICK MONTEIRO BARRETO. **ASPECTOS ECOLÓGICOS DE *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* E *Culex quinquefasciatus*: UMA**

REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA. [s.l: s.n.].

Iqbal K, Khalid S, McElroy CA, Adnan M, Khan GM, Dar MJ. Terapia de combinação tripla para leishmaniose cutânea usando nanovesículas elásticas revestidas com hialuronato e sem detergente. **Nanomedicina (Lond)**. Agosto de 2022; 17(20):1429-1447. DOI: 10.2217/nnm-2022-0077. Epub 2022 27 de outubro. PMID: 36301316.

IVANO, L. R. P. F. M.; DE FREITAS, J. F.; NETTO, M. F. ÓLEOS ESSENCIAIS NA INDÚSTRIA COSMÉTICA E MEDICINA ALTERNATIVA: BENEFÍCIOS E DESAFIOS PARA O USO RESPONSÁVEL. **Revista Contemporânea**, v. 3, n. 10, p. 18203–18218, 18 out. 2023.

JAQUILIN P J, R. et al. Recent advances in drug delivery nanocarriers incorporated in temperature-sensitive Pluronic F-127—A critical review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 72, p. 103390, jun. 2022.

JESUS, G. S. DE et al. Antimicrobial potential of *Pectis substriata* essential oil (Asteraceae) against drug-resistant *Staphylococcus* strains. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 4, 2020.

JONES, R. T. et al. Novel control strategies for mosquito-borne diseases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 376, n. 1818, p. 20190802, 15 fev. 2021.

KABANOV, A. V.; VINOGRADOV, S. V. Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 30, p. 5418–5429, 13 jul. 2009.

KHALIQ, N. U. et al. Pluronic F-68 and F-127 Based Nanomedicines for Advancing Combination Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 2102, 9 ago. 2023.

KRETZ, B. et al. First results of clampless distal anastomosis in peripheral vascular bypass with LeGoo, a thermoreversible polymer. **Journal of Vascular Surgery**, v. 55, n. 6, p. 1821–1825, jun. 2012.

KUKHTENKO, H. P. et al. Comparative analysis of carbomer polymers for pharmaceutical and cosmetic practice. **Zaporozhye Medical Journal**, n. 3, 10 jun. 2020.

Lee, S. J.; Cho, A.; Kim, K. T. Morphological Diversity from the Solution Self-Assembly of Block Copolymer Blends Containing 619 High Molecular-Weight Hydrophobic Blocks. **Macromol. Rapid Commun.** 2022, 43 (14), e2100893. 620 42.

Li, X.; Gao, Y.; Boott, C. E.; Winnik, M. A.; Manners, I. Non-Covalent Synthesis of Supramicelles with Complex Architectures 621 Using Spatially Confined Hydrogen-Bonding Interactions. *Nat. Commun.* 2015, 6, 8127. 622 43.

Lee, J.Y.; Shin, H.H.; Cho, C.; Ryu, J.H. Effect of Tannic Acid Concentrations on Temperature-Sensitive Sol–Gel Transition and Stability of Tannic Acid/Pluronic F127 Composite Hydrogels. **Gels** **2024**, *10*(4), 256.

LEITE, A. M.; LIMA, E. de O.; SOUZA, E. L. de; DINIZ, M. de F. F. M.; TRAJANO, V. N.; MEDEIROS, I. A. de. Efeito inibitório de eugenol, beta-pineno e alfa-pineno sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas potencialmente causadoras de endocardite infecciosa. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, mar. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000100015>. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000100015>. Acesso em: 18 mar. 2025.

LIMA, Edson Borges de; PORTO, Cláudia; MOTTA, Jorgeth Oliveira Carneiro da; SAMPAIO, Raimunda Nonata Ribeiro. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111-124, abr. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/5VhvSz6YdrYfdTZhZ4RzV7j/>. Acesso em: 3 fev. 2025.

LOPES, A. C. C. B. et al. Chemical Characterization, Leishmanicidal Activity and *In Vitro* Cytotoxicity of the Essential Oil Extracted from *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. and Its Incorporation into Microemulsion Systems. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 1, p. 87, 9 jan. 2024.

LUBRIZOL. **Produtos poliméricos Carbopol®**. Disponível em: <<https://pt.lubrizol.com/Health/Pharmaceuticals/Excipients/Carbopol-Polymer-Products>>.

LUBRIZOL. **Status de regulação global**. Disponível em: <<https://pt.lubrizol.com/Health/Pharmaceuticals/Regulatory/Global-Regulatory-Status>>.

LUBRIZOL. **Carbopol® 974P NF Polymer**. Disponível em: <<https://pt.lubrizol.com/Health/Pharmaceuticals/Excipients/Carbopol-Polymer-Products/Carbopol-974P-NF-Polymer>>.

LUK, V. N.; MO, G. C.; WHEELER, A. R. Pluronic Additives: A Solution to Sticky Problems in Digital Microfluidics. **Langmuir**, v. 24, n. 12, p. 6382–6389, 1 jun. 2008.

LUZIA, DÉBORA MARIA MORENO; JORGE, NEUZA. Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (Citrus limon). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 489-493, abr.-jun. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000200029>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/tSRVbsY53qQ5sCSYYTCSbWK/>. Acesso em: 18 mar. 2025.

MALECK, M. et al. Óleos essenciais – um breve relato. **Revista Eletrônica TECCEN**, v. 14, n. 2, p. 43–49, 20 dez. 2021.

MARQUES, A. M. et al. Traditional use, chemical composition and antimicrobial activity of *Pectis brevipedunculata* essential oil: A correlated lemongrass species in Brazil. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, n. 10, p. 798–808, 2013.

MARQUES, A. M.; KAPLAN, M. A. C. Preparative isolation and characterization of monoterpene isomers present in the citral-rich essential oil of *Pectis brevipedunculata*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 3, p. 210–215, jun. 2013.

MATSUMURA, Y. et al. Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin. **British Journal of Cancer**, v. 91, n. 10, p. 1775–1781, 12 nov. 2004.

MAURICE, D. M.; SRINIVAS, S. P. Use of Fluorometry in Assessing the Efficacy of a Cation-Sensitive Gel as an Ophthalmic Vehicle: Comparison with Scintigraphy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, n. 7, p. 615–619, jul. 1992.

MENEZES FILHO, A. C. P. DE et al. Avaliação química e atividades antioxidante e antifúngica dos óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *Zanthoxylum rhoifolium* (Lam.). **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**, v. 3, n. 1, p. 172–180, 23 jun. 2020.

MONDELLO, L. **Sabores e Fragrâncias de Compostos Naturais e sintético, banco de dados espectral de massa**. [s.l.] John Wiley & Sons Inc, 2011.

MOUSAVI, S. et al. Disease alleviating effects following prophylactic lemon and coriander essential oil treatment in mice with acute campylobacteriosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 29 mar. 2023.

NASCIMENTO, L. S. et al. Identificação dos constituintes químicos e ensaio biológico do óleo essencial de *Pectis elongate* Kunth (Asteraceae). **RCT - Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 7, 23 abr. 2021.

NATAL, D. BIOECOLOGIA DO *Aedes aegypti*. **Evolution**, p. 205–207, 2002.

NEDELTCHEVA-ANTONOVA, D.; STOICHEVA, P.; ANTONOV, L. Chemical profiling of Bulgarian rose absolute (*Rosa damascena* Mill.) using gas chromatography–mass spectrometry and trimethylsilyl derivatives. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 36–43, dez. 2017.

NEVES, Leandro Ourives; TALHARI, Anette Chrusciak; GADELHA, Ellen Priscilla Nunes; SILVA JÚNIOR, Roberto Moreira da; GUERRA, Jorge Augusto de Oliveira; FERREIRA, Luiz Carlos de Lima; TALHARI, Sinésio. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092-1101, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/BhTgXg6L97vmnRSn36Wd9Mz/>. Acesso em: 3 fev.

2025.

NISHIJIMA, C. M. et al. Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 736, p. 16–25, ago. 2014.

NWAKA, S. Drug discovery and beyond: the role of public-private partnerships in improving access to new malaria medicines. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p. 20–29, jan. 2005.

NWAKA, S. et al. Advancing Drug Innovation for Neglected Diseases—Criteria for Lead Progression. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. e440, 25 ago. 2009.

OLIVEIRA, M. T. R. DE et al. Efeito da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata*. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1200–1204, 2011.

ONU, O. DAS N. U.-. **Mais de 1,6 bilhão precisam de cuidados contra doenças tropicais negligenciadas.** Disponível em: <<https://news.un.org/pt/story/2023/01/1808967>>. Acesso em: 24 ago. 2024.

PANDA, S. K. et al. Editorial: Ethnopharmacological Studies for the Development of Drugs With Special Reference to Asteraceae. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 3 set. 2019.

PARK, J. et al. Prevention of Intra-Abdominal Adhesions Using the Combination of Mediclore® and a Statin. **European Surgical Research**, v. 63, n. 3, p. 123–131, 2022.

PAVIA, DONALD L.; LAMPMAN, GARY M.; KRIZ, GEROGE S.; VYVYAN, J. R. **INTRODUÇÃO A ESPECTROSCOPIA.** Tradução d ed. São Paulo: [s.n.].

PEREIRA, S. F. et al. A Low Energy Approach for the Preparation of Nano-Emulsions with a High Citral-Content Essential Oil. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3666, 16 jun. 2021.

PINK, R. et al. Opportunities and Challenges in Antiparasitic Drug Discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 9, p. 727–740, 1 set. 2005.

PINO, J. A.; ROSADO, A.; FUENTES, V. Chemical Composition of the Leaf Oil of *Pectis prostrata* Cav. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 5, p. 579–580, set. 1996.

PIRES, P. G. DA S. et al. Antiedema and antinociceptive potential of the essential oil of *Pectis elongata* Kunt (Asteraceae) from the Brazilian Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 322, p. 117643, mar. 2024.

Pinto, J.G., Fontana, L.C., de Oliveira, M.A. et al. Avaliação *in vitro* da terapia

fotodinâmica com curcumina em *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis*. **Lasers Med Sci** 31, 883–890 (2016).
<https://doi.org/10.1007/s10103-016-1928-5>

Rates, E. R. D.; Almeida, C. D.; Costa, E. P. F.; Farias, R. J. M.; Santos-Oliveira, R.; Alencar, L. M. R. Layer-by-Layer Investigation of Ultrastructures and Biomechanics of Human Cornea. **Int. J. Mol. Sci.** 2022, 23 (14), 7833.

Rates, E. R.; Almeida, C. D.; de Paula Fiod Costa, E.; Jansen de Mello Farias, R.; Santos-Oliveira, R.; Rebelo Alencar, L. M. Evaluation of Biophysical Alterations in the Epithelial and Endothelial Layer of Patients with Bullous Keratopathy. **Exp. Eye Res.** 613 2024, 240, 109791.

RATH, Susanne; ALVES, Gabriel S.; PINHO, Nísia L. M.; SILVA, José L. M.; LIMA, Antônio M. S.; BESSA, Ercília C.; MARTINS, Deise T.; TAVARES, Wagner M. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 482-489, ago. 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/HvgVwrB5kV5rDxDmRtvSgbD/>. Acesso em: 3 fev. 2025.

Roberts, W. L.; McMurray, W. J.; Rainey, P. M.; **Antimicrobial. Agentes Chemother.** 1998, 42, 1076.

RODRIGUES DOS SANTOS, D. *et al.* New weapons against the disease vector *Aedes aegypti*: From natural products to nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 643, p. 123221, ago. 2023.

ROLNIK, A.; OLAS, B. The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3009, 16 mar. 2021.

SALGADO, V.G.; GUTIÉRREZ, D. G. **Pectis in Flora e Funga do Brasil.** Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB16235>>.

SCHMOLKA, I. R. Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 6, n. 6, p. 571–582, 13 nov. 1972.

SCHULER, P. Doenças tropicais negligenciadas. **FioCruz**, 12 mar. 2021.

SHIN, J. *et al.* Larvicidal composite alginate hydrogel combined with a Pickering emulsion of essential oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 254, p. 117381, fev. 2021.

Silva, T.B.; Menezes, L.R.A.; Sampaio, M.F.C.; Meira, C.S.; Guimarães, E.T.; Soares, M.B.P.; Prata, A.P.N.; Nogueira, P.C.L.; Costa, E.V. Chemical composition and anti-Trypanosoma cruzi activity of essential oils obtained from leaves of *Xylopia frutescens* and *X. laevigata* (Annonaceae). **Nat. Prod. Commun.** 2013, 8, 403–406.

SILVA-RODRIGUES, G. et al. VISÃO GERAL SOBRE OS PRODUTOS NATURAIS E SUAS APLICAÇÕES: UMA REVISÃO. **Centro de Pesquisas Avançadas em Qualidade de Vida**, v. 16, n. V16N1, p. 1, 2024.

SILVA, C. P. DA et al. Os riscos ambientais no Brasil devido ao uso do defensivo Malathion Emulsão Aquosa - EA 44% no controle de *Aedes Aegypti* (Linnaeus, 1762) (díptera; culicidae): uma revisão. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 6, p. 638–646, 6 jul. 2020.

SINGH, G.; NARANG, R. K. Polymeric micelle gel with luliconazole: *in vivo* efficacy against cutaneous candidiasis in Wistar rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 397, n. 9, p. 7001–7015, 16 set. 2024.

SOARES, C. C. et al. Atividade analgésica do extrato da *Pectis jangadensis* (S. Moore). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1a, p. 77–81, mar. 2009.

SOTELO-LEYVA, C. et al. Estudio etnofarmacológico y fitoquímico de las plantas medicinales de mayor uso en Julián Blanco, Guerrero, México. **Acta Agrícola y Pecuaria**, v. 8, n. 1, 1 jan. 2022.

SWARBRICK, J. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. [s.l.] CRC Press, 2013.

TURAP, T. et al. ASPECTOS TAXONÔMICOS, FITOGEOGRÁFICOS E USOS DE *Pectis uniaristata* DC. var. *jangadensis* (S.Moore) Keil (ASTERACEAE). p. 1–17, 2013.

UNITED STATES PHARMACOPEIA - USP.

VERA, L. A. et al. Avaliação da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea em Corte de Pedra, Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 233–237, jun. 2001.

VINOGRADOV, S. V. Nanogels in The Race for Drug Delivery. **Nanomedicine**, v. 5, n. 2, p. 165–168, 11 fev. 2010.

WANG, L.; TANG, X. A novel ketoconazole bioadhesive effervescent tablet for vaginal delivery: Design, *in vitro* and '*in vivo*' evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, n. 1–2, p. 181–187, fev. 2008.

WANG, Y. et al. Insecticide resistance: Status and potential mechanisms in *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 195, p. 105577, set. 2023.

Wanka, G.; Hoffmann, H.; Ulbricht, W. Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)- 693 Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions. **Macromolecules** 1994, 27, 4145–4159. DOI: 10.1021/ma00093a016.

WEYENBERG, W. et al. Characterization and *in vivo* evaluation of ocular minitables prepared with different bioadhesive Carbopol–starch components. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, n. 2, p. 202–209, fev. 2006.

WHO, W. H. O. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. Disponível em:
 <<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-WHOPES-GCDPP-2005.13#:~:text=The document provides guidance on>>.

YOUNES, M. et al. Safety evaluation of crosslinked polyacrylic acid polymers (carbomer) as a new food additive. **EFSA Journal**, v. 19, n. 8, ago. 2021.

YUAN, H. et al. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, 29 abr. 2016.

YUN, P.; DEVAHASTIN, S.; CHIEWCHAN, N. Microstructures of encapsulates and their relations with encapsulation efficiency and controlled release of bioactive constituents: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 1768–1799, 2 mar. 2021.

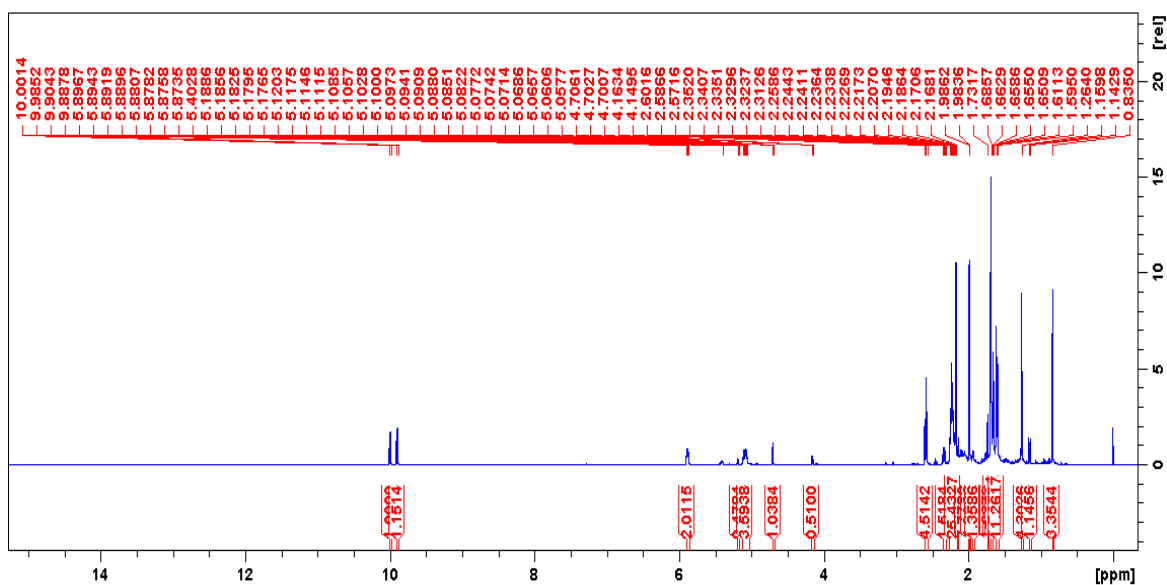
ZHANG, S. et al. Silk-based nano-hydrogels for futuristic biomedical applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 72, p. 103385, jun. 2022.

ZOHRA, T. et al. Green Nano-Biotechnology: A New Sustainable Paradigm to Control Dengue Infection. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2022, n. 1, 8 jan. 2022.

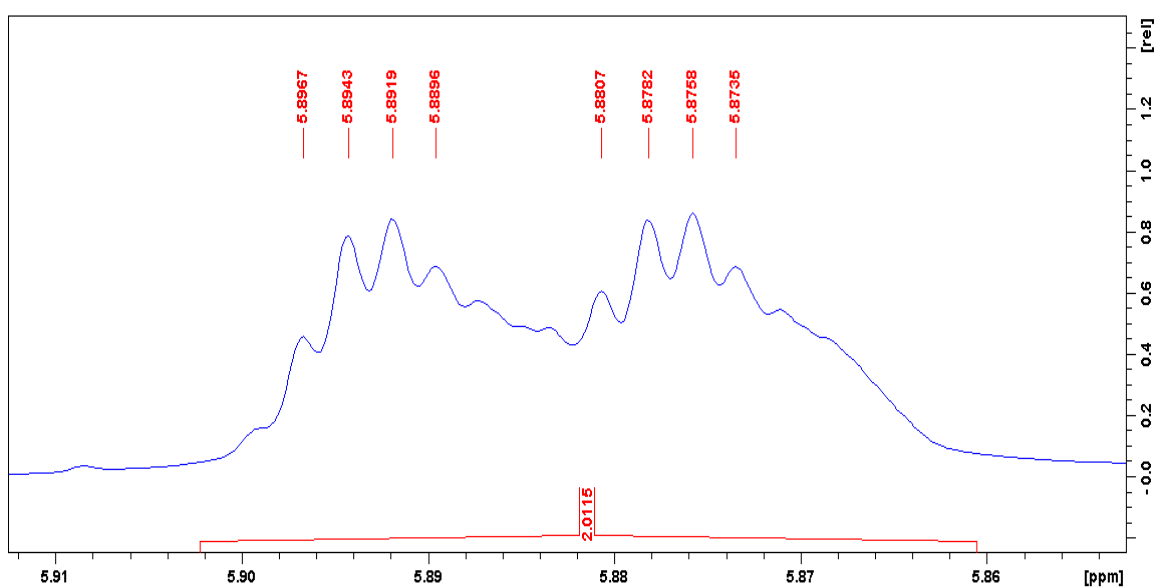
ZOU, S. et al. Injectable Nanosponge-Loaded Pluronic F127 Hydrogel for Pore-Forming Toxin Neutralization. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 16, p. 4239–4250, jun. 2021.

10 APÊNDICE

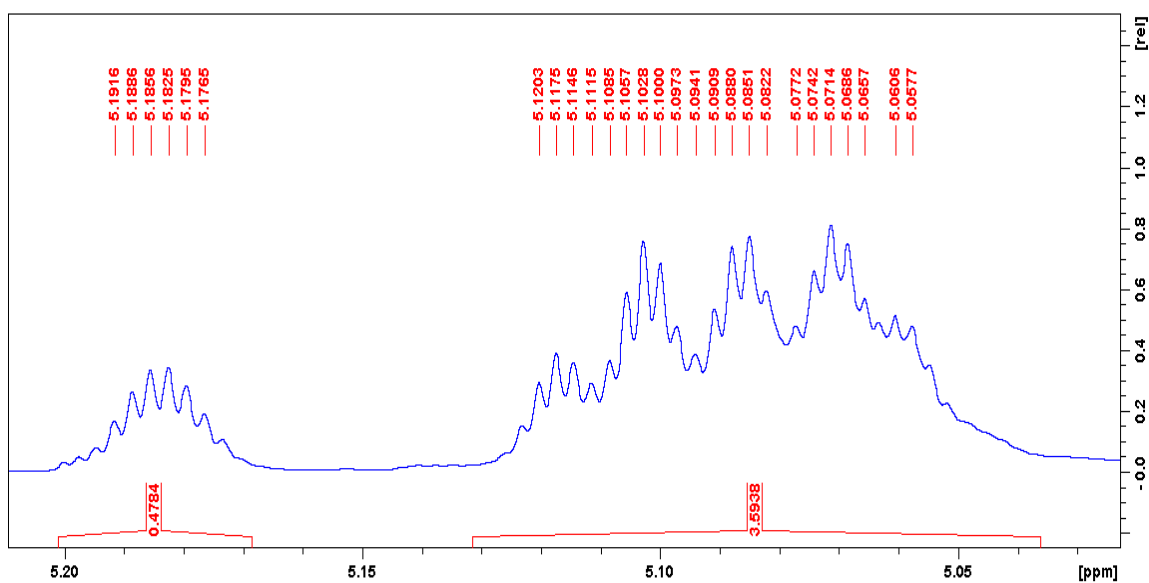
Apêndice: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



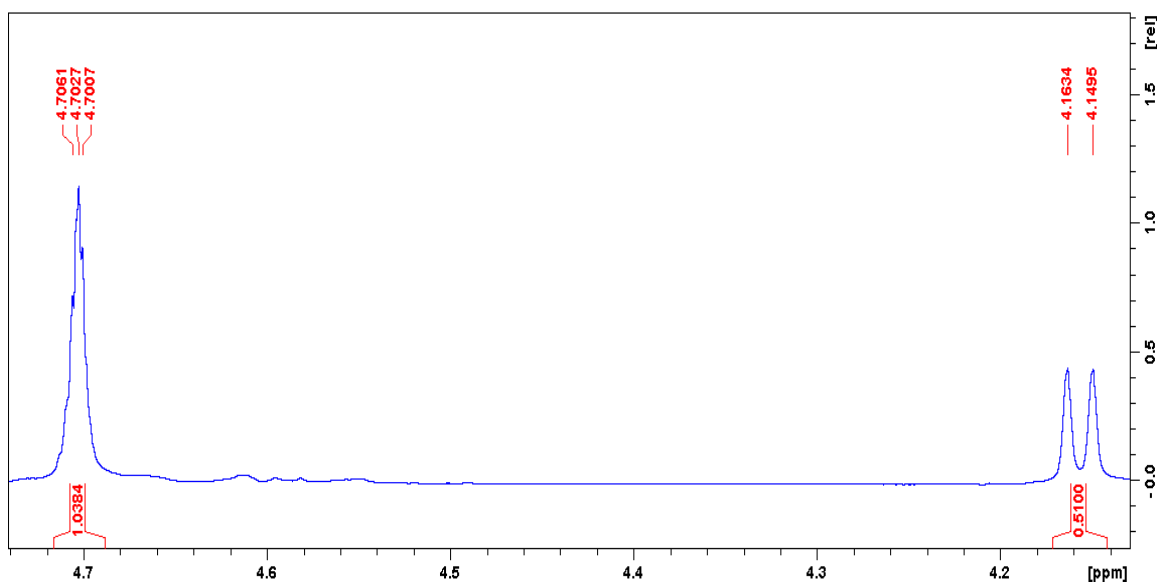
Apêndice: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



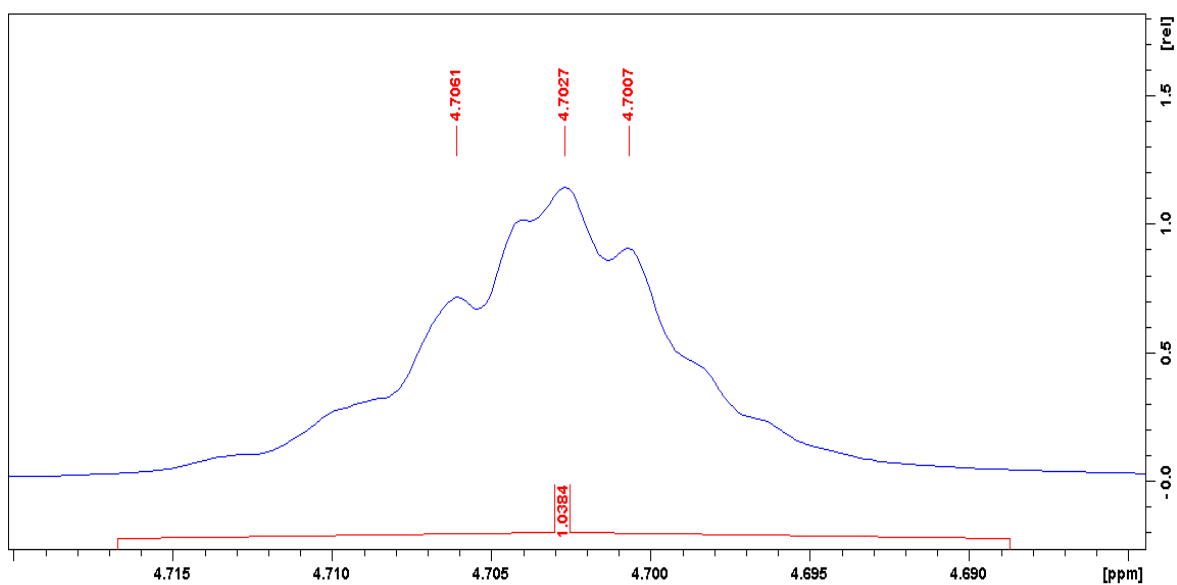
Apêndice: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb)



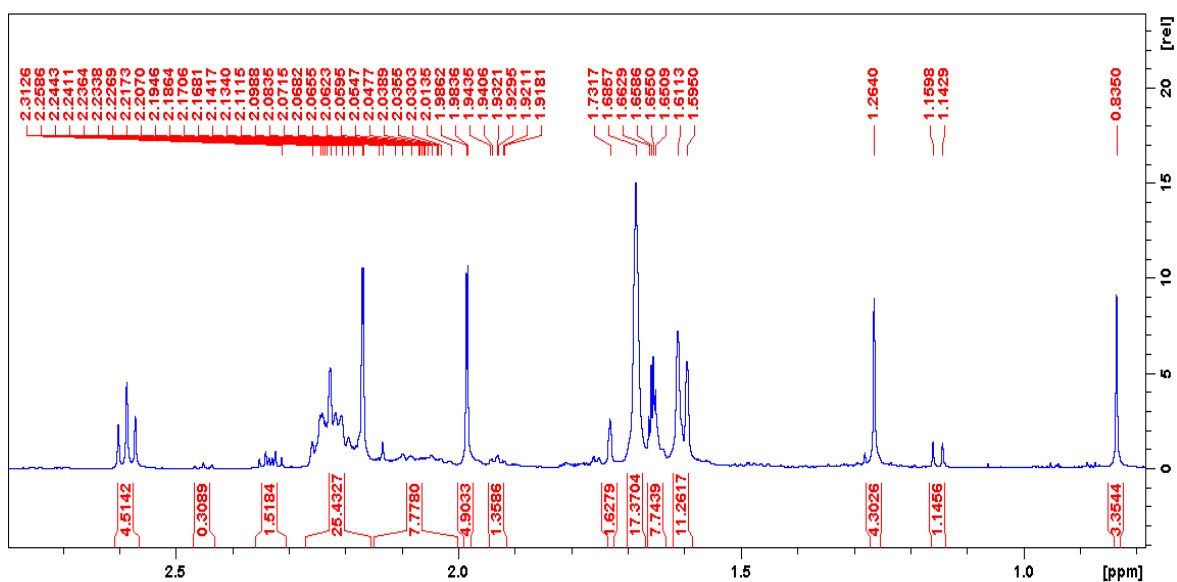
Apêndice: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



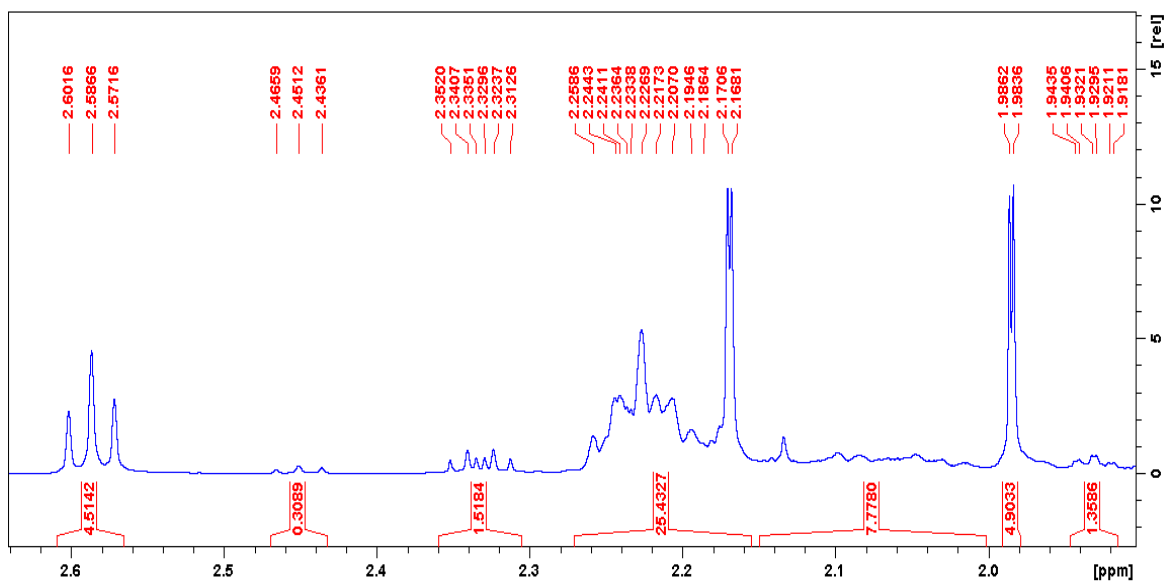
Apêndice: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb)



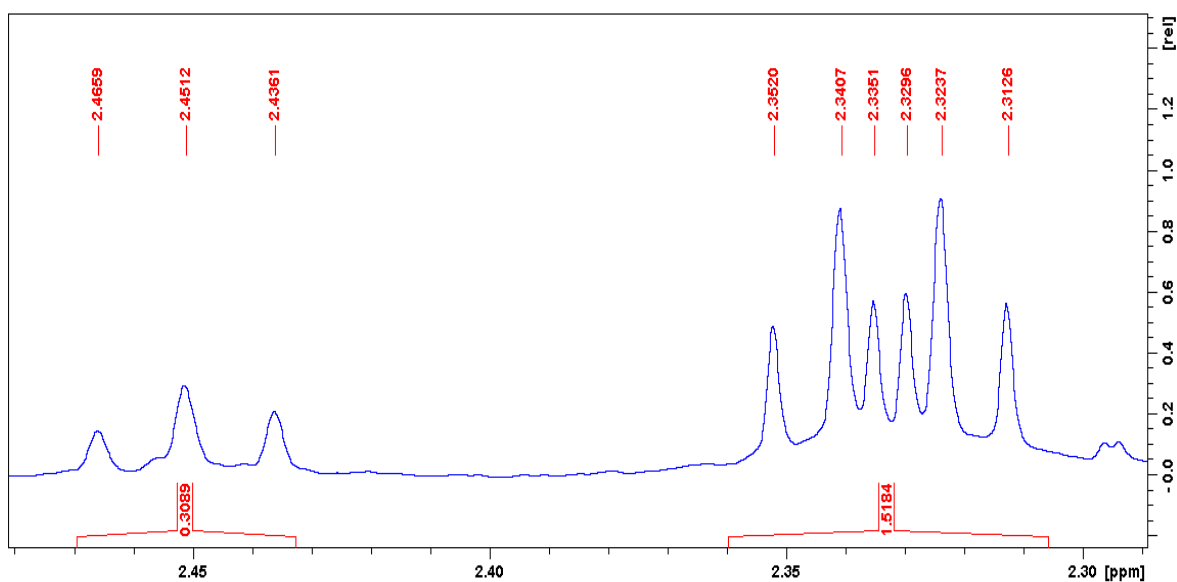
Apêndice: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb)



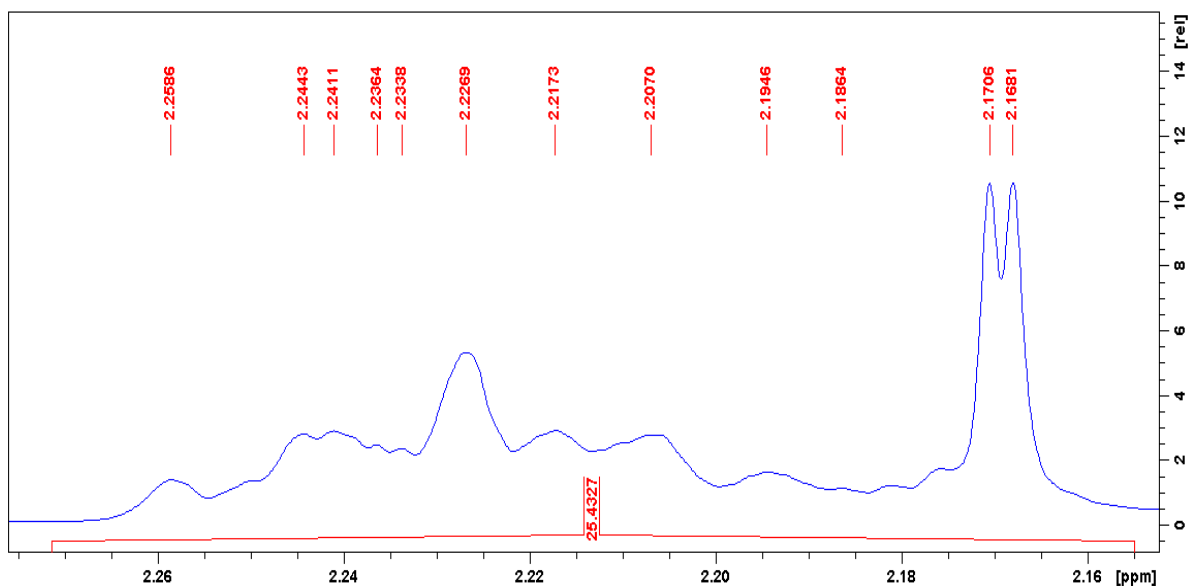
Apêndice: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb)



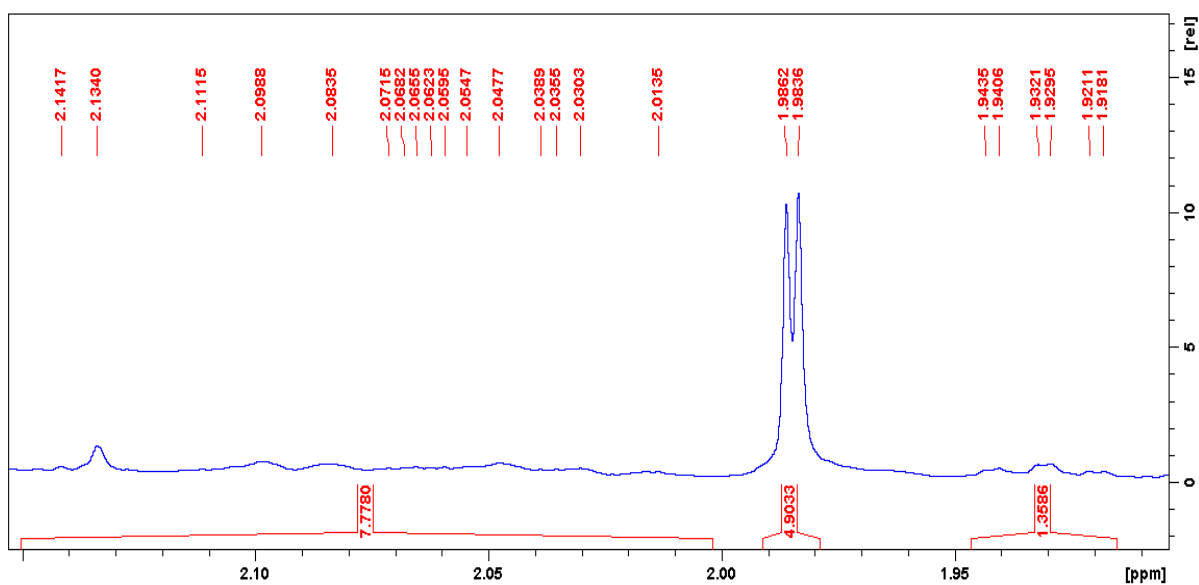
Apêndice: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



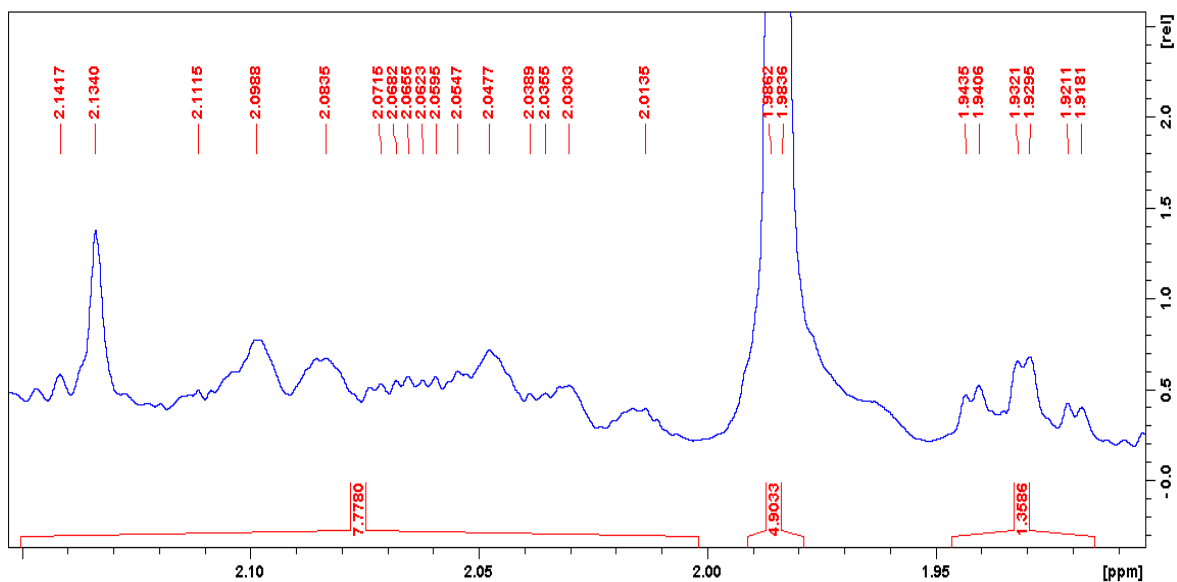
Apêndice: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



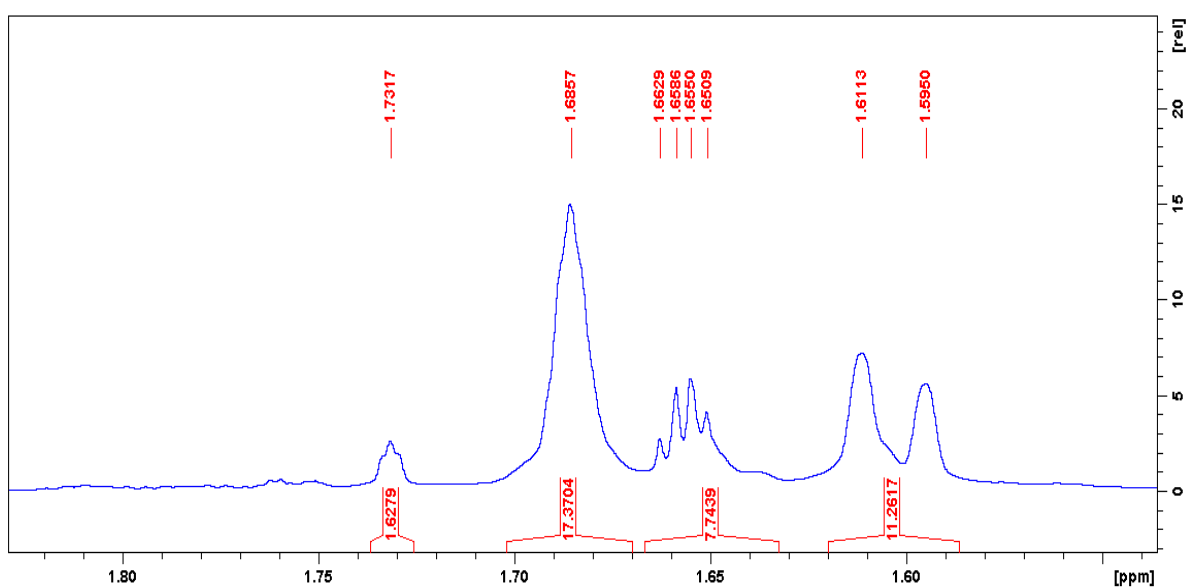
Apêndice: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



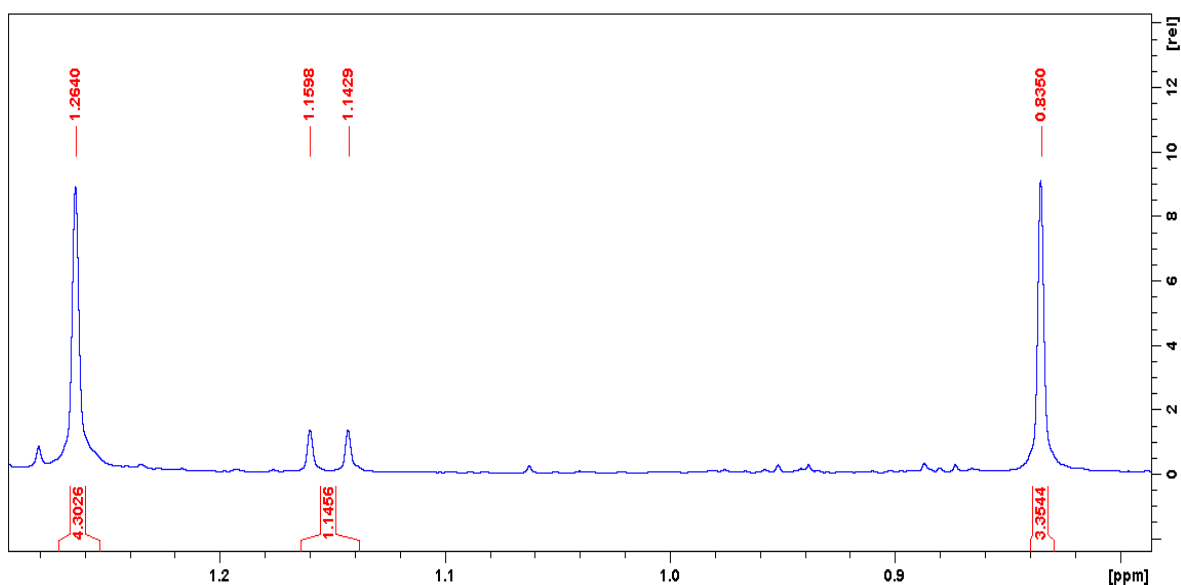
Apêndice: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



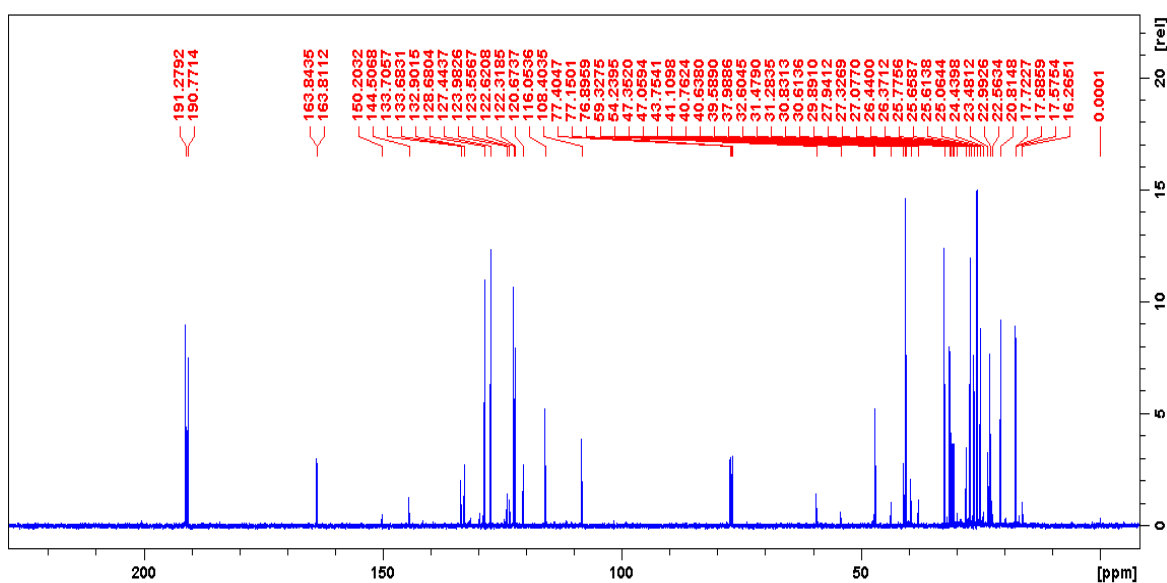
Apêndice: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



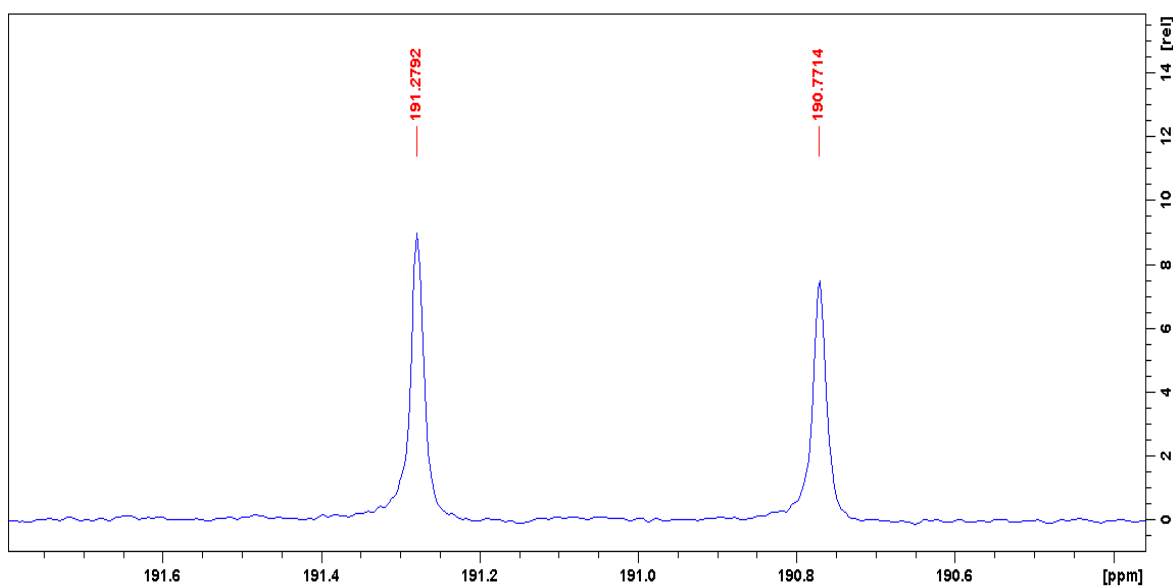
Apêndice: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



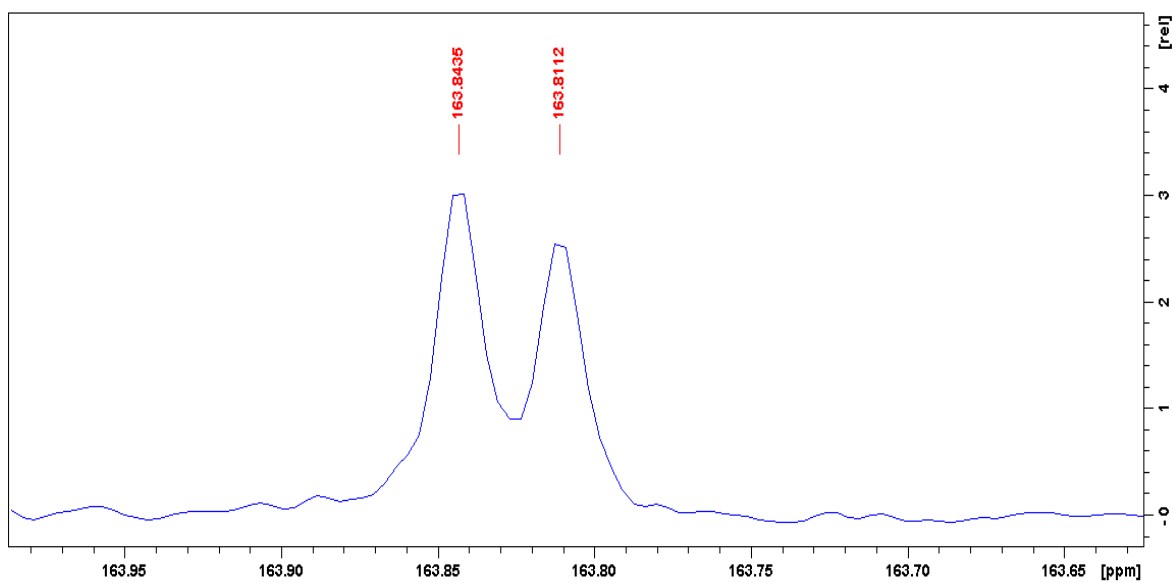
Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



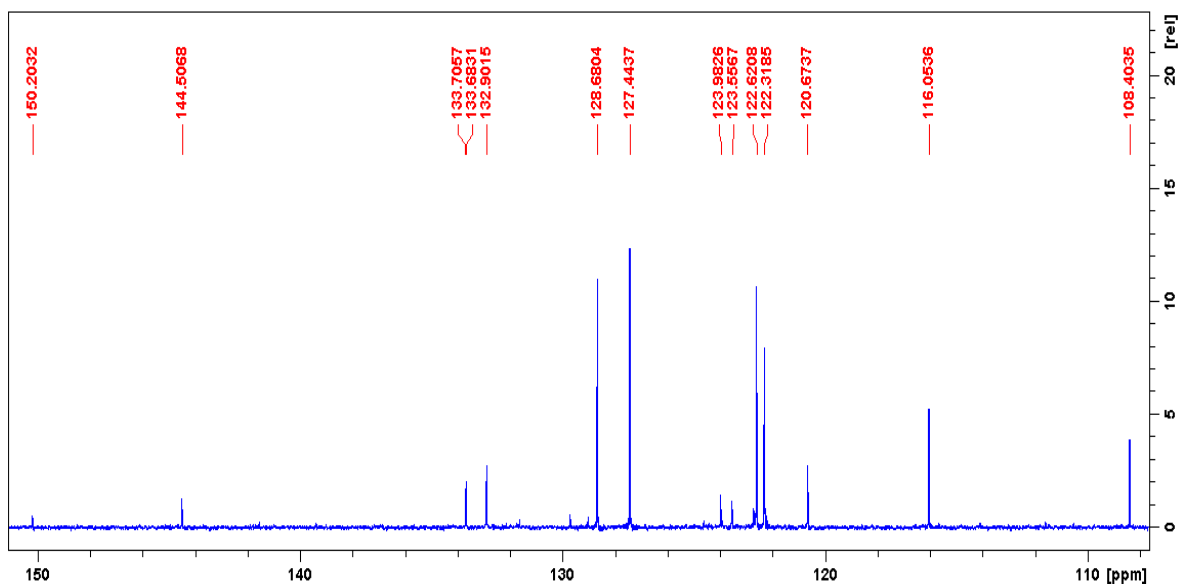
Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



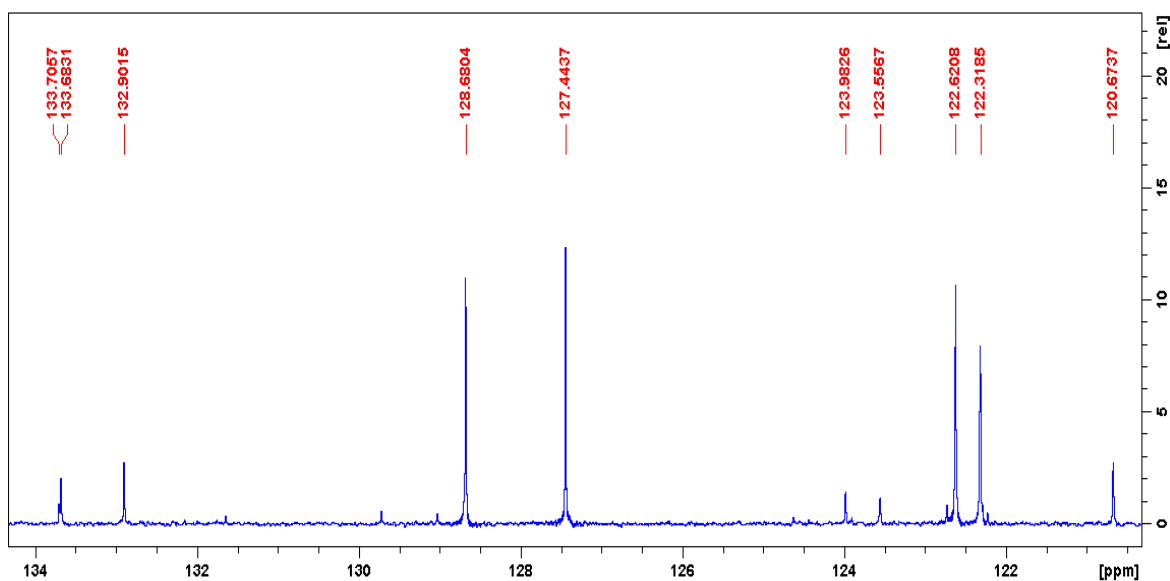
Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



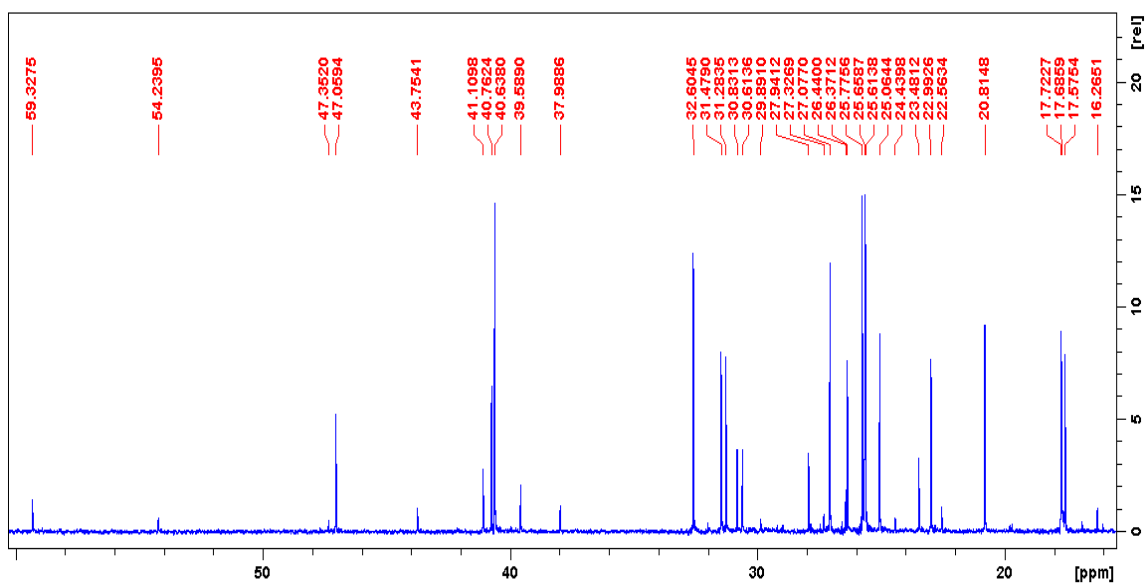
Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



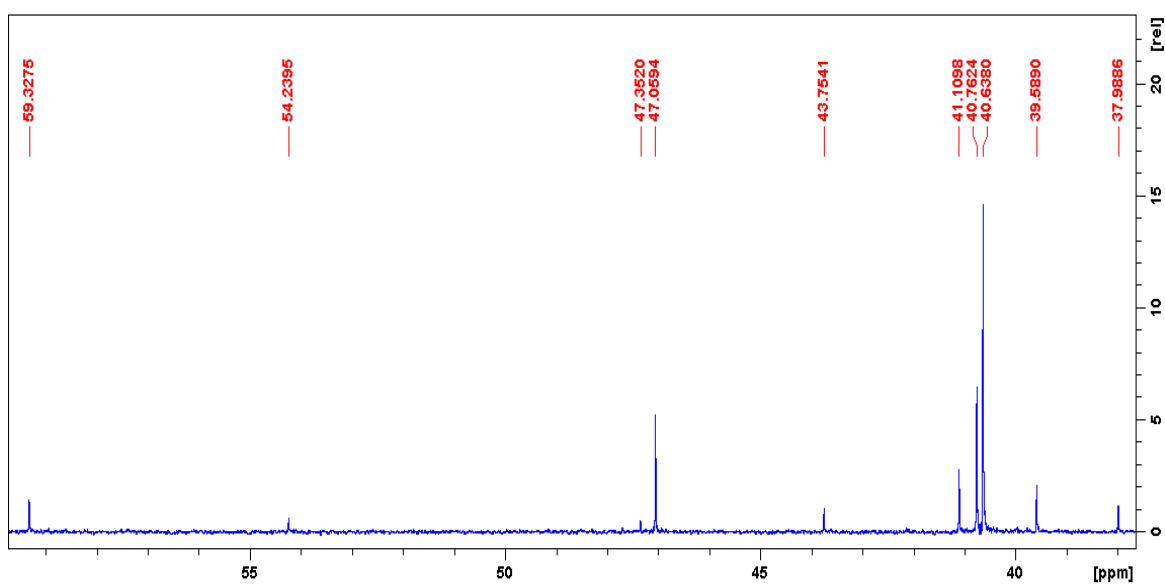
Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



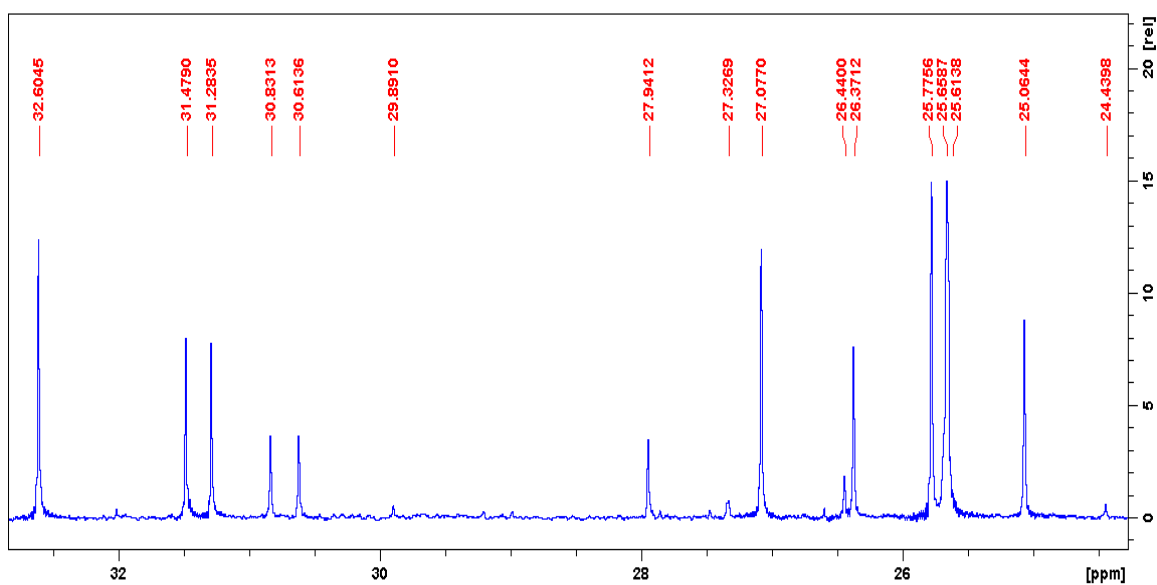
Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



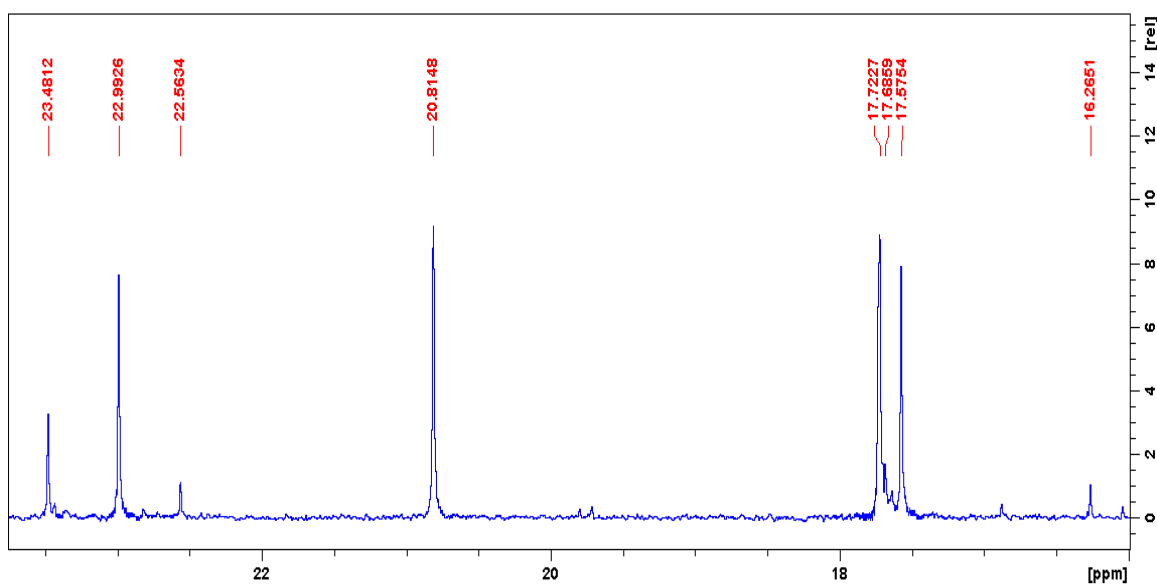
Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



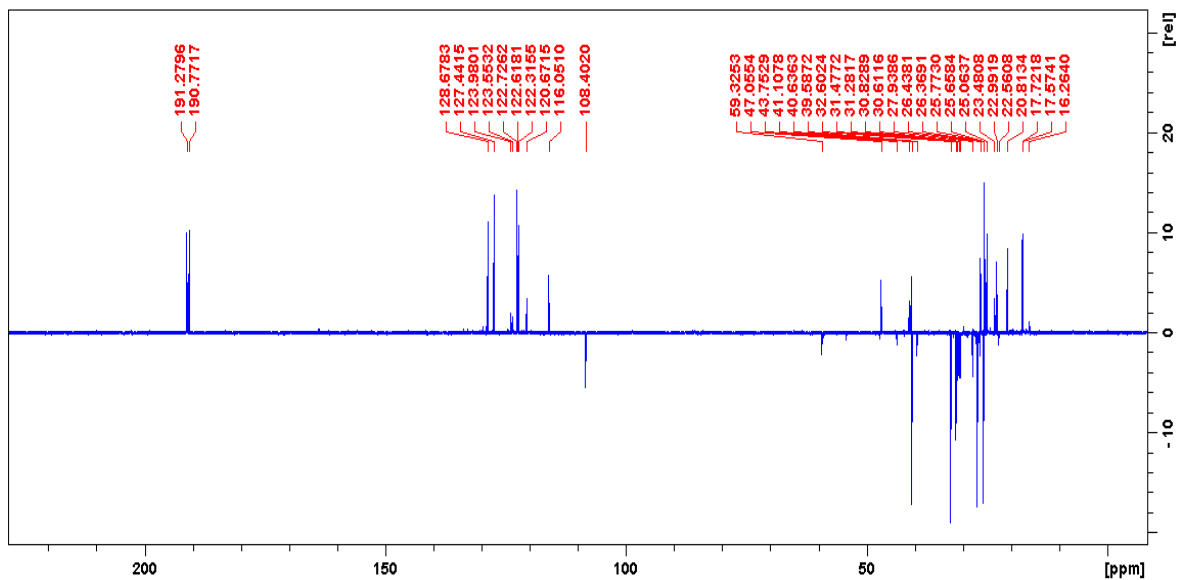
Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



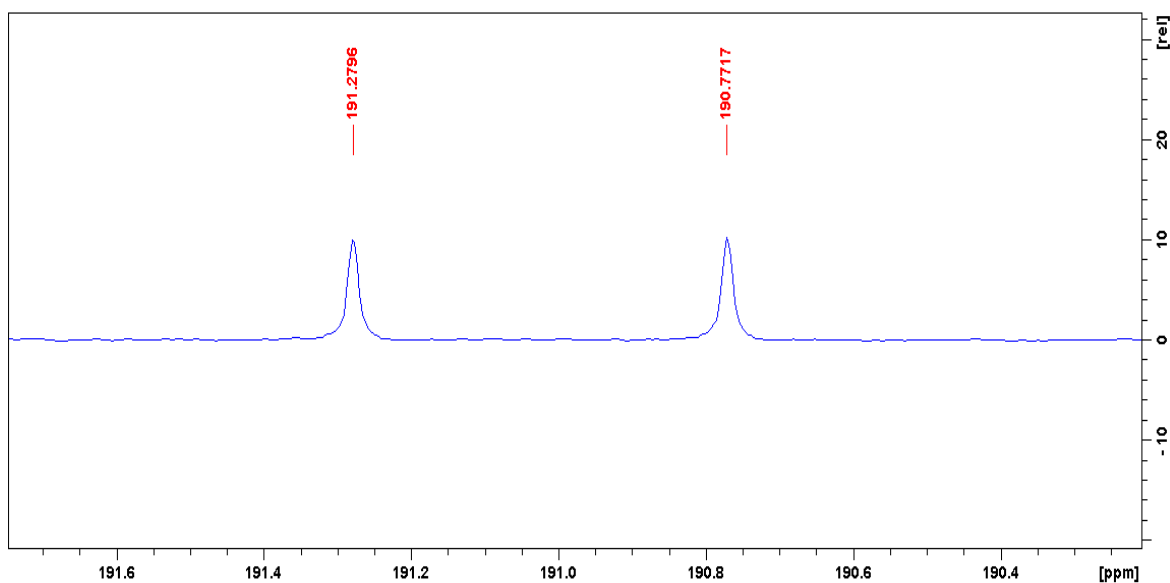
Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



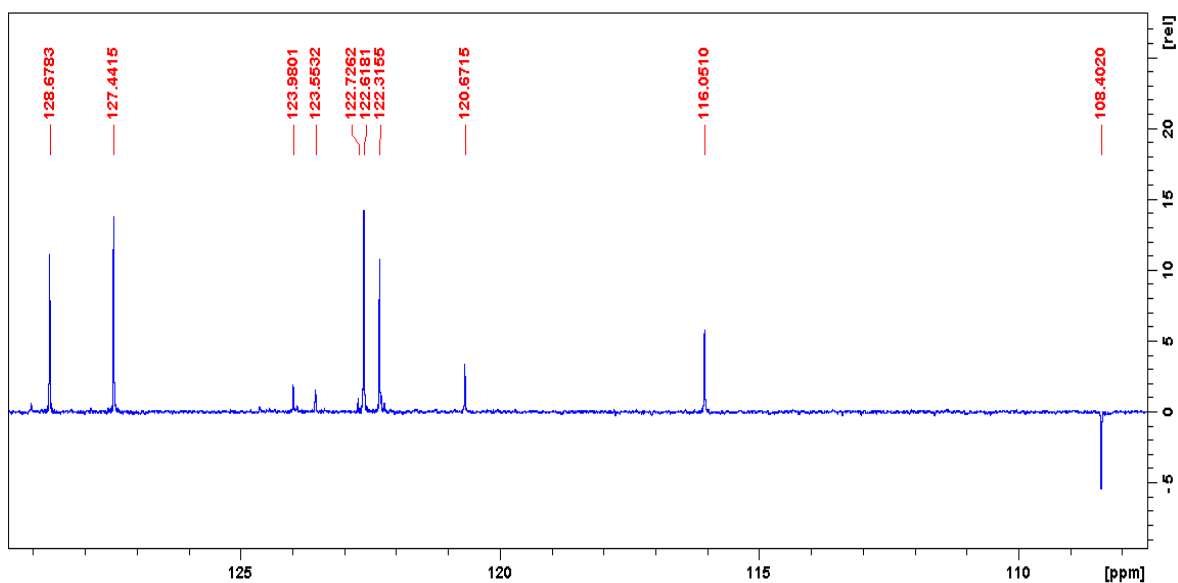
Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



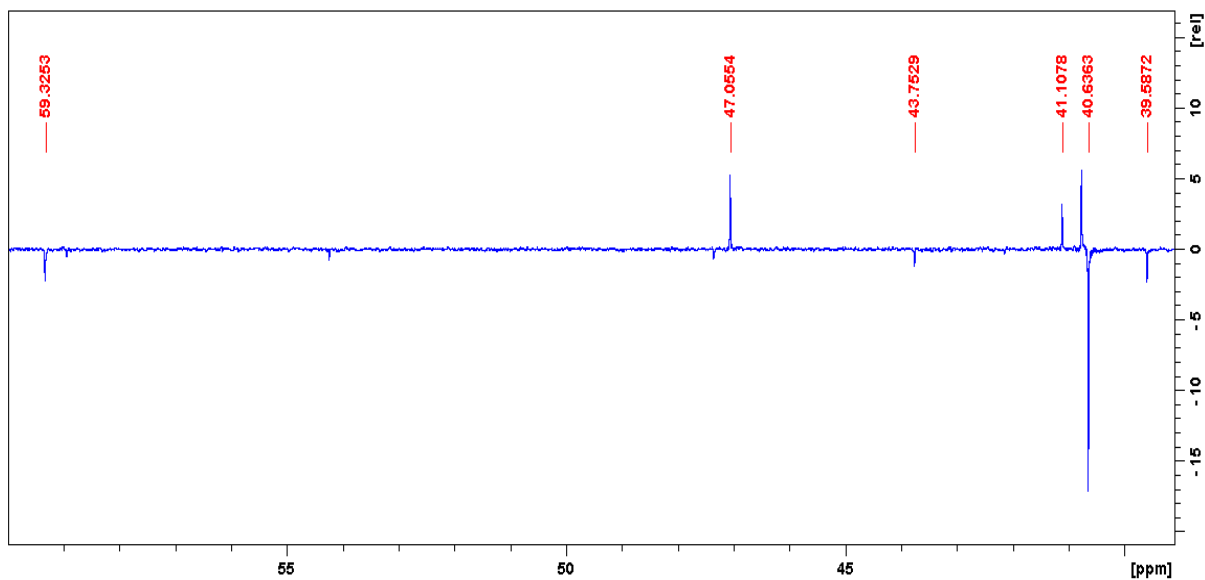
Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



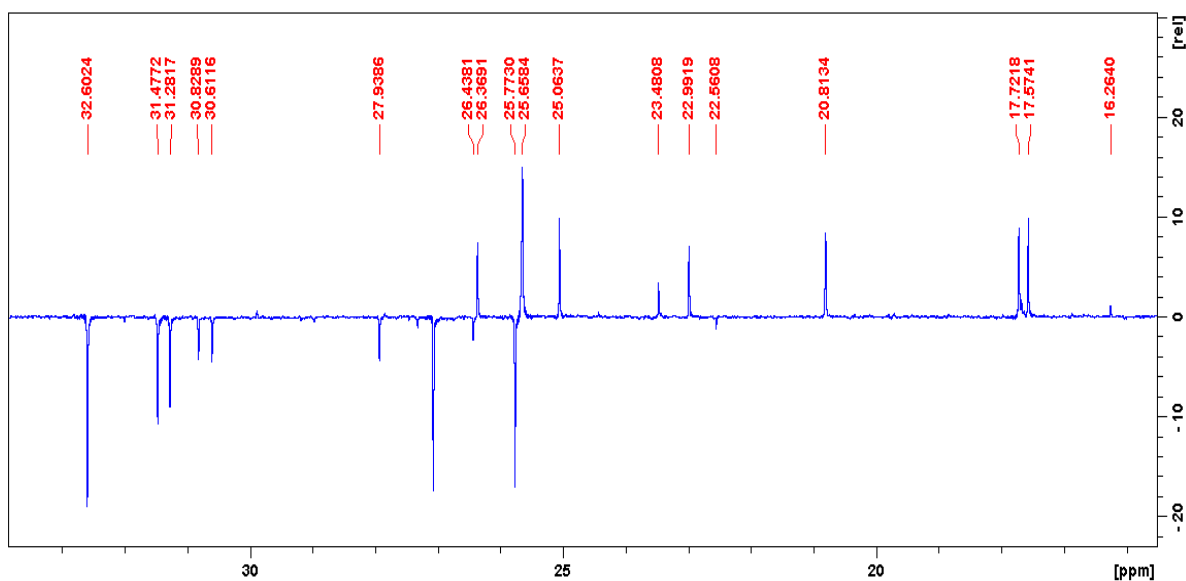
Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



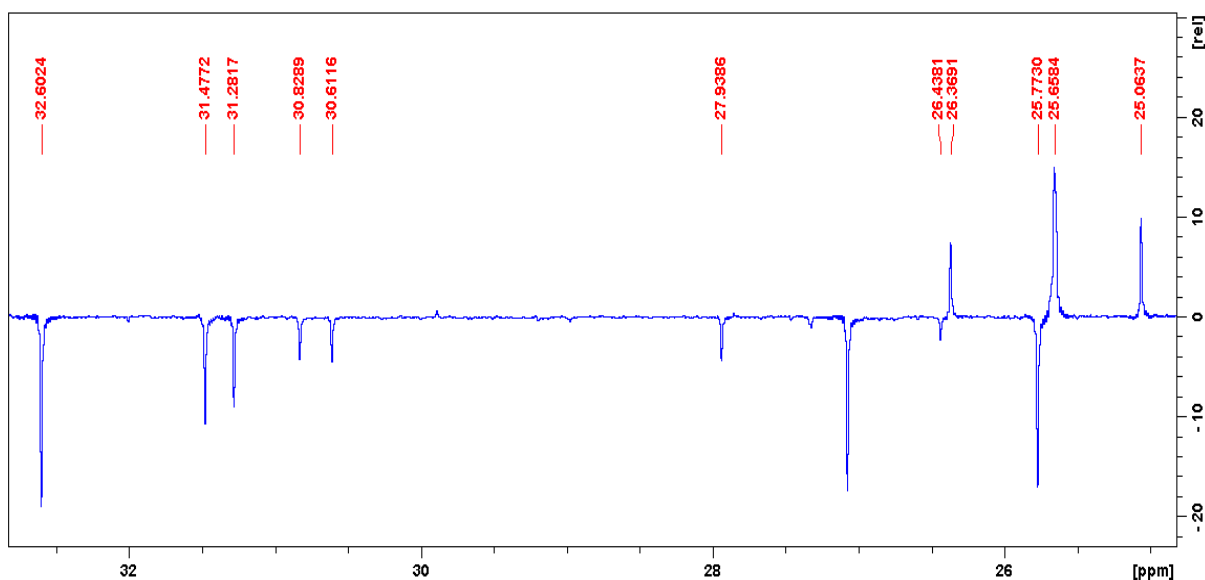
Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



Apêndice: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) *Pectis brevipedunculata* (OEPb).



Apêndice - Sobreposição dos espectros de absorção UV-Vis de amostras F1 (1% de OEPb), F2 (0,5% de OEPb), F3 (0,25% de OEPb), F4 (0,125% de OEPb) e F0 (sem OEPb).

