INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
PRINCÍPIOS ATIVOS DO ÓLEO DE *Azadirachta indica* A. Juss EM MATRIZ DE
POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) (PVA) PARA APLICAÇÕES EM VETERINÁRIA**

ANDRÉIA BARBOSA NAVARRO DE ANDRADE

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear –
Materiais**

Orientador:

Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão

**São Paulo
2013**

Dedico este trabalho a todos aqueles que sempre estiveram ao meu lado, em todos os momentos importantes de minha vida.

Aos meus queridos pais Olinda e Edson (*in memoriam*), por todo amor.

Aos meus irmãos Aline e Edson, pela força e incentivo.

Ao Guilherme, meu querido, por todos os momentos vividos juntos e por jamais me permitir desistir.

À Msc. Sizue e Dr. Rogero, pela amizade sincera e por estarem sempre presentes.

Aos meus amigos, por acreditarem no meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Lugão, obrigada pela atenção e dedicação em me passar seus sábios conhecimentos.

À Msc. Sizue, por ter sido mais que uma companheira de trabalho, mas uma amiga de todas as horas.

Ao Dr. José Roberto Rogero por sempre me incentivar e não deixar que eu desistisse quando encontrei dificuldades.

À Dra. Edna Clara Tucci do Instituto Biológico pelos bioensaios e por todo o apoio para realização do meu trabalho.

Ao Dr. Francisco Rolando Valenzuela Diaz, pela colaboração.

À Dra. Áurea S. Cruz do Instituto Adolpho Lutz pelo fornecimento das microplacas para o ensaio de citotoxicidade.

Ao Msc. Daniel Temponi Lebre, pelas análises cromatográficas.

À Mara Tania Alcantara, pelas nossas longas conversas nos finais de tarde.

À Caroline Cristina Ferraz pela constante compreensão em todos os momentos difíceis e por ser minha companheira.

À Dra. Maria Claudia, obrigada pela colaboração e apoio na parte experimental do trabalho.

Ao Gustavo Varca por estar sempre ali, com alguma palavra de incentivo e força.

À Verônica, ao Henrique Perez, ao Eleosmar, por toda ajuda.

Ao Dr. Oscar, por sempre se preocupar com o andamento de meu trabalho.

Ao Sousa por ser o amigo de todas as horas.

Aos queridos amigos Vanessa, Giovana, Henrique, Sandra, Beth, Maria, Washington, D. Severa, Nemias, Cleide, Cristina, Neusa, Juan, Geraldo e Arnaldo pela amizade sincera e por toda força.

À toda equipe dos laboratórios de polímeros e de biomateriais poliméricos que sempre acreditaram no meu trabalho.

Aos funcionários da secretaria do CQMA e do Ensino, pelos serviços prestados.

A todos os professores das disciplinas de pós-graduação por contribuírem em meu aprendizado.

À Dra. Helene Mariko Ueno, minha supervisora de estágio do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino por ter me ensinado tantas coisas.

A CAPES, pela bolsa de mestrado.

À equipe da Evonik, da Basf, da Sarfan e à Dirce da Corn Products pela colaboração.

Obrigada a todos que estiveram sempre presentes e me deram a honra de serem meus amigos e companheiros em todos os momentos. Sem vocês eu jamais teria mais essa conquista.

Desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de princípios ativos do óleo de *Azadirachta indica* A. Juss em matriz de poli(álcool vinílico) (PVA) para aplicações em veterinária

Andréia Barbosa Navarro de Andrade

Resumo

Sistemas de liberação controlada vêm sendo cada vez mais utilizados em diferentes áreas tendo em vista sua aplicabilidade que os tornam uma tecnologia capaz de atender as necessidades econômicas e ambientais uma vez que permitem a utilização de princípios ativos em quantidades precisas e apenas nos locais desejados. Dentre a diversidade de opções de matrizes utilizadas nesses sistemas o poli(álcool vinílico) tem sido bastante empregado e pode ser obtido pela técnica de ciclos térmicos. Azadiractina, um princípio ativo encontrado em óleo de semente de Nim tem sido descrita como repelente de diferentes tipos de insetos e apresenta grande aplicabilidade na agricultura. Com base nas propriedades desse composto, propôs-se o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada para combate a pulgas *Ctenocephalides felis felis*. No presente trabalho, foram realizadas caracterizações físico-químicas das matrizes e dispositivos através de ensaios de fração gel, intumescimento, calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica de varredura e caracterizações biológicas quanto à citotoxicidade do óleo de Nim, matrizes e dispositivos e bioensaio para análise do comportamento das pulgas na presença do óleo de Nim. As caracterizações físico-químicas permitiram a escolha da matriz mais adequada para o desenvolvimento do dispositivo. As caracterizações biológicas demonstraram ausência de citotoxicidade do óleo de Nim, das matrizes e dos dispositivos e o bioensaio resultou em 40% de mortalidade das pulgas testadas. Na cinética de liberação, verificou-se que todos os agentes encapsulantes utilizados permitiram a liberação de princípios ativos do óleo de Nim.

Development of a controlled delivery system of *Azadirachta indica* A. Juss active agents oil in poly(vinyl alcohol) (PVA) matrix for veterinary applications

Andréia Barbosa Navarro de Andrade

Abstract

Controlled release systems has been increasingly used into different purposes due to its applicability that turns it onto a technology able to supply economic and environmental needs, once that allows using precise amounts of active ingredients and only on aimed locations. Among the variety of matrix options used in this systems, poly (vinyl alcohol) has been largely employed and can be obtained by thermal cycles technics. Azadirachtin, an active ingredient found in Neem seed oil has been described as a repellent of different kinds of insects and has great agriculture's applicability. Based on compound properties, was proposed to develop a controlled release system to combat flea *Ctenocephalides felis felis*. In the present study was performed physicochemical characterizations of matrix and devices through gel fraction, swelling tests, differential scanning calorimetry, scanning electron microscopy and biological characterizations by cytotoxicity assay of Neem's oil, matrix and devices and analysis of flea's behavior at neem's oil presence by bioassay. The physical-chemical characterizations has enabled to choose the most suitable matrix to device's development. The biological characterizations has been demonstrated absence of oil's cytotoxicity, matrices and devices and bioassay has resulted in 40% mortality of fleas. On kinetic's release, was checked that all used encapsulating agents has allowed the release neem's oil active principles.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	15
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1. Sistemas de liberação controlada	16
3.2. Microencapsulação em sistemas de liberação controlada.....	19
3.3. Polímeros como dispositivos para sistemas de liberação controlada	21
3.4. Poli(álcool vinílico)	21
3.5. Ciclos de congelamento e descongelamento.....	23
3.6. Azadiractina como repelente e inseticida	24
3.7. A pulga <i>Ctenocephalides felis felis</i>	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Material	33
4.2. Métodos.....	33
4.2.1. Preparo das matrizes	33
4.2.2. Preparo dos dispositivos	34
4.2.3. Caracterização físico-química	36
4.2.3.1. Fração gel	36
4.2.3.2. Intumescimento	37
4.2.3.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	38
4.2.3.4. Difractometria de raios X (DRX)	38
4.2.3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	39
4.2.4. Caracterização biológica	39
4.2.4.1. Teste de citotoxicidade.....	39
4.2.4.2. Bioensaio com pulgas <i>Ctenocephalides felis felis</i> utilizando óleo de Nim.....	42
4.2.5. Doseamento de princípios ativos do óleo de Nim	45
4.2.5.1. Análise em CLAE-EM/EM.....	46
4.2.5.2. Análise em CLAE-UV/Vis.....	48
4.2.6. Cinética de liberação de azadiractina das amostras de dispositivos de PVA.....	51
4.2.6.1. Preparo das amostras para cinética de liberação	52

4.2.6.1.1. Coletadas em “swab”	52
4.2.6.1.1. Liberadas em solução	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1. Fração gel.....	55
5.1.1. Matrizes.....	55
5.1.2. Dispositivos	57
5.2. Intumescimento	58
5.2.1. Matrizes.....	59
5.2.2. Dispositivos	62
5.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	64
5.4. Difratomia de Raio-X	70
5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	71
5.5.1. Matrizes.....	71
5.5.2. Dispositivos	73
5.6. Teste de citotoxicidade	74
5.7. Bioensaio com pulgas	77
5.8. Doseamento de princípios ativos do óleo de Nim.....	79
5.8.1. Coletadas em “swab”	79
5.8.2. Liberadas em solução.....	81
6. CONCLUSÃO	84
APÊNDICE A – Fluxograma de preparo de amostras de matrizes e dispositivos	86
APÊNDICE B – Cópia do certificado sobre manutenção de colônias de pulgas <i>Ctenocephalides felis felis</i> em laboratório (frente)	87
APÊNDICE C – Cópia do certificado sobre manutenção de colônias de pulgas <i>Ctenocephalides felis felis</i> em laboratório (verso).....	88
REFERÊNCIAS	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Principais efeitos inseticidas da azadiractina.....	28
TABELA 2 - Resultados do ensaio de fração gel de amostras de PVA com agentes encapsulantes.	57
TABELA 3 - Resultados do ensaio de fração gel de amostras de PVA com agentes encapsulantes + óleo de Nim.	58
TABELA 4- Resultados da viabilidade celular do ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> de amostras de PVA, óleo de Nim, e PVA com agentes encapsulantes.	75
TABELA 5 – Resultados da mortalidade <i>in vitro</i> das pulgas adultas na presença de óleo de Nim após 24 horas.....	77
TABELA 6 - Resultados da cinética de liberação coletadas em swab.....	79
TABELA 7- Resultados da cinética de liberação dos dispositivos por CLAE/UV-Vis liberadas em solução.	81

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÃO 1 - Concentração de fármaco convencional multidosagem (a) e sistema de liberação controlada (b)	16
ILUSTRAÇÃO 2 - Exemplos de mecanismos de liberação controlada temporal	19
ILUSTRAÇÃO 3 - Saponificação do poli(acetato de vinila) produzindo poli(álcool vinílico) e o éster acetato de metila.	21
ILUSTRAÇÃO 4 - <i>Azadirachta indica</i>	25
ILUSTRAÇÃO 5 - Molécula de azadiractina.....	26
ILUSTRAÇÃO 6 - Ciclo de vida das pulgas.....	30
ILUSTRAÇÃO 7 - <i>Ctenocephalides felis felis</i>	31
ILUSTRAÇÃO 8 - Diluição seriada das amostras e controles e adição em microplacas para acondicionamento em incubadora.....	41
ILUSTRAÇÃO 9 – Microplaca após o ensaio para contagem em espectrofotômetro.	42
ILUSTRAÇÃO 10 - Obtenção das pulgas para o bioensaio. A) Gaiola para criação da gata. B) Resíduos contendo ovos retirados da gaiola. C) Estufa para incubação dos ovos. D) Frascos contendo ovos a serem incubados.	44
ILUSTRAÇÃO 11 - Tubos contendo pulgas adultas na presença de óleo de Nim. Grupo controle e grupo tratado.....	45
ILUSTRAÇÃO 12 - Fotomicrografias de fraturas de amostras de PVA submetidas a 3 ciclos de congelamento/descongelamento. A) ciclos de 2 horas. B) ciclos de 12 horas.....	71
ILUSTRAÇÃO 13 - Fotomicrografias dos dispositivos com óleo de Nim encapsulado. Aumento de 500x. A) amido pré-gelatinizado RD545. B) maltodextrina Globe A1920 C) Aerosil R805. D) Aerosil R972 .E) fécula de mandioca e F) Kollidon SR.	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema da distribuição dos extratos das amostras e dos controles na microplaca.....	40
FIGURA 2 - Cromatograma de solução do padrão de azadiractina.....	47
FIGURA 3 - Ampliação do cromatograma do padrão de azadiractina no tempo de retenção de 7,10 minutos.	47
FIGURA 4 - Cromatograma da análise do óleo de Nim.	48
FIGURA 5 – Cromatograma da análise em CLAE-UV/Vis do padrão de azadiractina.	49
FIGURA 6 - Tempos de retenção dos compostos encontrados na solução do óleo de Nim. Marcador 1 (M1) 3,6 minutos; Marcador 2 (M2) = 3,9 minutos e Marcador 3 (M3) = 5,7 minutos).....	50
FIGURA 7 - Curvas analíticas (linearidade de 0,25 a 10 mg/mL).	51
FIGURA 8 - Fração gel (%) de amostras submetidas a ciclos de 2 e 12 horas de congelamento/descongelamento secas por liofilização (2L = ciclos de 2 h; 12L = ciclos de 12 h).....	55
FIGURA 9 - Fração gel (%) de amostras submetidas a ciclos de 2 e 12 horas de congelamento/descongelamento sem secagem prévia (2S = ciclos de 2 h; 12S = ciclos de 12 h).....	56
FIGURA 10- Ensaio de intumescimento das amostras de PVA de 1 a 7 ciclos de 2 horas secas em liofilizador (I a VII = número de ciclos; 2 e 12 = quantidade de ciclos; L = secas por liofilização).	59
FIGURA 11 - Ensaio de intumescimento das amostras de PVA de 1 a 7 ciclos de 12 horas secas em liofilizador (I a VII = número de ciclos; 12 = quantidade de ciclos; L = secas por liofilização).	60
FIGURA 12 - Ensaio de intumescimento das amostras de PVA de 1 a 7 ciclos de 2 horas sem secagem prévia (I a VII = número de ciclos; 12 = quantidade de ciclos; S = sem secagem prévia).....	61
FIGURA 13 - Ensaio de intumescimento das amostras de PVA de 1 a 7 ciclos de 12 horas sem secagem prévia (I a VII = número de ciclos; 12 = quantidade de ciclos; S = sem secagem prévia).....	62
FIGURA 14 - Grau de intumescimento (%) em função do tempo (h) para amostras de PVA contendo agentes encapsulantes.	63

FIGURA 15 - Grau de intumescimento (%) em função do tempo (h) para amostras de PVA contendo agentes encapsulantes e óleo de Nim.	63
FIGURA 16 - Termograma de DSC de PVA 10% reticulado por 3 ciclos de 2 horas.	65
FIGURA 17 - Termograma de DSC de PVA 10% reticulado por 3 ciclos de 12 horas.	66
FIGURA 18 - Termograma de DSC de PVA 10% + fécula de mandioca.	67
FIGURA 19 - Termograma de DSC de PVA 10% + fécula de mandioca e óleo de Nim..	68
FIGURA 20 - Termograma de DSC de PVA 10% + Aerosil R805.....	69
FIGURA 21 - Termograma de DSC de PVA 10% + Aerosil R805 e óleo de Nim.	70
FIGURA 22 – Difratoograma de Raio-X de amostras de PVA 10% sem ciclos e PVA + maltodextrina em diferentes regiões da mesma amostra.	71
FIGURA 23 - Curvas de viabilidade celular de amostras de óleo de Nim, PVA e PVA com agentes encapsulantes no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo método de incorporação do vermelho neutro.	76
FIGURA 24 – Cinética de liberação de amostras coletadas em swab.	80
FIGURA 25 - Curvas da cinética de liberação dos dispositivos liberados em solução.	82

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de liberação controlada, desde seu desenvolvimento, têm demonstrado grande importância em diferentes áreas devido às vantagens que apresentam em suas aplicações (FORTUNATO et al., 2007) uma vez que essa técnica implica na regulação do fornecimento de um princípio ativo por um dispositivo que tem como objetivo transportá-lo e promover sua liberação a uma taxa específica por um período definido de tempo (JAIN, 2008). Essas formulações apresentam também um potencial para reduzir problemas ambientais associados à utilização de inseticidas fornecendo segurança ao manipulador e a organismos não-alvo, além de permitir uma redução na quantidade de princípio ativo utilizado uma vez que há um aumento de sua persistência no local de ação desejado.

A escolha do sistema de liberação controlada mais adequado para a liberação do princípio ativo numa quantidade suficiente para atingir o efeito desejado com o mínimo de efeitos secundários biológicos ou ecológicos depende de vários fatores como propriedade do princípio ativo e suas interações com a matriz, natureza do polímero como grau de reticulação, comportamento térmico e compatibilidade com o princípio ativo, estabilidade da combinação durante o processamento, velocidade de liberação desejada, forma e tamanho do produto final, duração, condições sazonais, custo e facilidade de formulação e aplicação (DEVI et al., 2011).

Poli(alcool vinílico) (PVA), é um dos polímeros bastante empregado como matriz em dispositivo de sistemas de liberação controlada. De origem sintética, é produzido a partir do poli(acetato de vinila). É solúvel em água, biocompatível e biodegradável e suas propriedades dependem dos graus de polimerização e hidrólise (UHRICH et al., 1999).

Uma das opções para a obtenção do dispositivo de PVA é a reticulação por processo físico através de ciclos de congelamento e descongelamento, onde ocorre a formação de cristalitos ao longo das cadeias poliméricas. As propriedades do material obtido através desse processo dependem de alguns parâmetros como peso molecular do polímero, concentração da solução aquosa, temperatura, tempo e número de ciclos de congelamento e descongelamento (STAUFFER et al., 1992).

Princípios ativos contidos em óleo vegetal podem ser de grande interesse para uso em sistemas de liberação controlada. No entanto, para que seja possível a miscibilidade do óleo em solução aquosa de PVA, este deve ser protegido por um agente encapsulante que tenha compatibilidade em ambos. A microencapsulação é um processo tecnológico empregado para envolver partículas líquidas, sólidas ou gasosas com o objetivo de proteger um agente ativo, estabilizar ou controlar a liberação do conteúdo de uma matriz (SUAVE et al., 2006; YOW et al, 2009).

Azadirachta indica, uma planta da família Meliaceae, conhecida popularmente por Nim é amplamente empregada na agricultura por conter uma variedade de compostos com atividade inseticida e/ou repelente de insetos. Dentre estes, o principal é a azadiractina, um limonóide, abundante nas sementes da planta. De acordo com seu mecanismo de ação apresenta como vantagem a baixa possibilidade de aquisição de resistência dos insetos (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema de liberação controlada de princípios ativos contidos em óleo de *Azadirachta indica* utilizando matriz polimérica de PVA obtida pela técnica de ciclos térmicos para aplicação em pulgas *Ctenocephalides felis*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Sistemas de liberação controlada

A tecnologia de liberação controlada faz-se presente na indústria farmacêutica há algum tempo. Seus objetivos iniciais eram produzir a liberação controlada de princípios ativos para manter seus níveis efetivos no corpo humano por um período de tempo mais prolongado, visto que a concentração dos fármacos tradicionais na corrente sanguínea apresentava um aumento, atingiam um pico máximo e então declinavam (ILUSTRAÇÃO 1). Assim, grandes quantidades de fármacos eram administradas para obter o efeito farmacológico desejado, o que acarretava o aparecimento de toxicidade para o organismo (JAIN, 2008).

ILUSTRAÇÃO 1 - Concentração de fármaco convencional multidosagem (a) e sistema de liberação controlada (b)

Nos últimos anos, sistemas de liberação controlada de princípios ativos têm se tornado de grande importância devido às vantagens que apresentam em relação aos sistemas de liberação convencionais (FORTUNATO et al., 2007).

Atualmente, a liberação controlada é utilizada com o intuito de diminuir e até eliminar os efeitos causados pelas altas doses de fármacos aplicadas, bem como reduzir o número destas aplicações, controlando sua velocidade de liberação no organismo, modulando a velocidade com que os fármacos atravessam as barreiras biológicas, penetram na circulação e atingem o alvo farmacológico. Entre os sistemas utilizados estão incluídos lipossomas, micelas, emulsões e polímeros (UHRICH et al., 1999).

A liberação controlada implica na regulação do fornecimento de um princípio ativo por um dispositivo, que tem como objetivo transportar o princípio ativo e promover sua liberação a uma taxa específica por um período definido de tempo (JAIN, 2008).

Além de aplicações na área farmacêutica, essas formulações apresentam um potencial para reduzir problemas ambientais associados à utilização de inseticidas promovendo segurança ao manipulador e a organismos não-alvo, além de permitir uma redução na quantidade de princípio ativo utilizado uma vez que há um aumento de sua persistência no local de ação desejado (DEVI, et al., 2011).

Formulações de liberação controlada poliméricas podem ser divididas em combinações físicas e combinações químicas sendo que nas combinações físicas o polímero atua como um controlador da velocidade do dispositivo e nas combinações químicas o polímero atua como um veículo para o princípio ativo (AKELAH, 1996).

A escolha do sistema de liberação controlada mais adequado para a liberação do princípio ativo numa quantidade suficiente para atingir o efeito desejado com o mínimo de efeitos secundários biológicos ou ecológicos depende de vários fatores como propriedade do princípio ativo e suas interações com o polímero, natureza do polímero como grau de reticulação, comportamento térmico e compatibilidade com o princípio ativo, estabilidade da combinação durante o processamento, velocidade de liberação desejada, forma e tamanho do produto final, duração, condições sazonais, custo e facilidade de formulação e aplicação (DEVI et al., 2011).

De acordo com o mecanismo de taxa de liberação os sistemas de liberação controlada podem ser classificados por: difusão, intumescimento, osmose e erosão ou reação química controlada (DEVI et al., 2011).

Em sistemas controlados por difusão do princípio ativo através do polímero este é severamente afetado por fatores ambientais e, para esse mecanismo, existem dois tipos de sistemas de difusão: sistemas reservatórios e sistemas monolíticos.

Nos sistemas reservatórios o princípio ativo é liberado para o ambiente por difusão através de microporos das paredes do dispositivo. Nesse caso o princípio ativo encontra-se rodeado ou encapsulado por uma fina camada de membrana polimérica e as técnicas comumente utilizadas são microencapsulação, nanoencapsulação, coacervação e encapsulação de pulverização (NAGPAL et al., 2001).

Em sistemas monolíticos o princípio ativo é disperso ou dissolvido no polímero e a liberação deste pode ser realizada por difusão ou lixiviação com difusão concomitantemente no caso de interação entre o polímero e o ambiente. Utilizando-se um ativo solúvel na matriz, fluidos biológicos ou ambientais podem penetrar facilmente na matriz dissolvendo-o e canais interconectados são formados, através dos quais a liberação é facilitada. Trata-se de uma técnica bastante aplicada, por não haver necessidade de interação entre o princípio ativo e o polímero (DEVI et al., 2011).

Em sistemas controlados por intumescimento o princípio ativo disperso ou dissolvido na matriz polimérica é capaz de difundir-se sendo liberado lentamente quando o sistema polimérico entra em contato com um solvente ou fluido compatível de maneira que ocorra o intumescimento do polímero (DEVI et al., 2011).

Sistemas controlados por osmose constituem-se geralmente de princípios ativos sólidos e solúveis em água os quais são delimitados por uma membrana polimérica com uma pequena abertura, permeável à água, porém impermeável ao princípio ativo. Nesse caso, a água é transportada para dentro do núcleo por permeação e pressão hidrostática e consequentemente, o princípio ativo que é dissolvido pela água é liberado (DEVI et al., 2011).

Nos sistemas controlados por erosão o princípio ativo é fisicamente imobilizado na matriz polimérica que passa pelo processo de erosão onde ocorrerá a liberação controlada (DEVI et al., 2011).

A ILUSTRAÇÃO 2 mostra alguns exemplos de mecanismos de liberação controlada.

ILUSTRAÇÃO 2 - Exemplos de mecanismos de liberação controlada temporal

Fonte: Uhrich et. al., 1999.

3.2. Microencapsulação em sistemas de liberação controlada

A microencapsulação é um processo tecnológico que tem como objetivo proteger um agente ativo, estabilizar ou controlar a liberação do conteúdo de uma matriz (YOW et al., 2009; SUAVE et al., 2006).

Existem registros de tentativas da aplicação desta técnica desde a década de 30 quando Bungen burg de Jon e Kan prepararam esferas de gelatina por um processo de coacervação (ANKIT et al., 2011). Porém, o primeiro produto com material encapsulado surgiu apenas em 1954 em um papel de cópia sem carbono produzido pela empresa norte-americana NCR National Cash Register. Nesta mesma década também surgiram as primeiras pesquisas na área farmacêutica que contribuíram muito com o desenvolvimento de formulações de sistemas de liberação controlada (SUAVE et al., 2006).

Atualmente, existem diversas áreas que utilizam a microencapsulação como a alimentícia (ANWAR et al., 2010), cosmética (KIM et al., 2012), farmacêutica (SIMÕES et al., 2010), têxtil (RODRIGUES et al., 2008), médica (TERAMURA et al., 2010), entre outras.

As micropartículas apresentam diâmetro entre 1 e 1000 μm independente de sua estrutura interna ou externa e, de acordo com a técnica utilizada para promover a microencapsulação de uma partícula, o produto obtido pode ser classificado como uma microesfera ou uma microcápsula (SINGH et al., 2010).

Microesferas são partículas compostas de uma mistura bastante homogênea de material encapsulante e agente ativo (SINGH et al., 2010). Possuem diâmetro menor que 200 μm (ANKIT et al., 2011).

Microcápsulas são produtos que apresentam núcleo, composto pelo agente ativo, e material encapsulante, que é diferente do material que compõe o núcleo. Nesse caso, há um domínio do agente ativo em relação ao agente encapsulante. Os tamanhos podem variar entre 50nm a 2mm (SINGH et al., 2010).

As microcápsulas podem ser dispersas em diferentes formas farmacêuticas. Nestas aplicações, a encapsulação pode ser usada para imobilizar moléculas incompatíveis em determinado material como, por exemplo, moléculas hidrofóbicas em matrizes hidrofílicas. Portanto, para que isso seja possível, se faz necessária a escolha do agente encapsulante adequado para a liberação desejada (SINGH et al., 2010).

3.3. Polímeros como dispositivos para sistemas de liberação controlada

Polímeros sintéticos e naturais são amplamente investigados para aplicações em sistemas de liberação controlada por tratar-se de produtos viáveis economicamente, de grande disponibilidade, não tóxicos, que permitem modificações químicas, são biodegradáveis e geralmente biocompatíveis (BENEKE et al, 2009).

3.4. Poli(álcool vinílico)

O poli(álcool vinílico) (PVA) foi obtido pela primeira vez em 1924 por Herrman e Haehnel através da hidrólise do poli(vinil acetato) com hidróxido de potássio na presença de etanol. Nos dias atuais, o PVA é produzido comercialmente pela polimerização do poli(vinil acetato) (PVAc) seguido de hidrólise através da substituição do grupo éster do vinil acetato por um grupo hidroxila (ILUSTRAÇÃO 3). Esse processo pode ser realizado de duas maneiras: utilizando base em presença de água ou utilizando álcool, metílico ou etílico, na presença de um catalisador ácido ou básico. Este polímero sintético pode ser reticulado por métodos químicos utilizando reagentes, método físico pela técnica dos ciclos de congelamento e descongelamento ou através de irradiação (LIU, et al., 2010).

ILUSTRAÇÃO 3 - Saponificação do poli(acetato de vinila) produzindo poli(álcool vinílico) e o éster acetato de metila.

Suas características físicas dependem do grau de polimerização e do grau de hidrólise, podendo ser classificado como parcialmente hidrolisado e totalmente hidrolisado sendo o grau de hidrólise determinado pelo tempo no qual a reação de saponificação é interrompida (NUGENT, 2007).

Por meio de análises térmicas, observa-se que o PVA não funde como um termoplástico, mas decompõe-se perdendo água, vinda dos grupos hidroxila adjacentes, em temperatura de 150°C. Sua temperatura de fusão e sua entalpia de fusão (ΔH_f) são de

aproximadamente 220°C e 73,3 J/g, respectivamente. Sua temperatura de transição vítrea é de aproximadamente 85°C.

Quanto à toxicidade, o PVA apresenta uma longa história de uso seguro. É utilizado mundialmente no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e de revestimento de suplementos alimentares regulamentados como medicamentos. Em produtos cosméticos, é usado como formador de película, agente ligante, e como agente de aumento da viscosidade (KELLY et al., 2003).

O PVA encontra-se entre os produtos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para o uso como forma farmacêutica em várias aplicações médicas, como sistemas transdérmicos, hidrogéis e em formulações de comprimidos de liberação imediata e liberação controlada. Além disso, encontra-se descrito para uso como excipiente farmacêutico nas Farmacopéias brasileira, dos Estados Unidos, do Japão e da Europa (KELLY et al., 2003).

Em 2003, KELLY e colaboradores publicaram um trabalho com o objetivo de avaliar a toxicidade e a genotoxicidade subclínica¹ do PVA em animais e os resultados demonstraram que o PVA administrado na dieta para machos e fêmeas, em doses de 2000, 3500 e 5000 mg/kg/dia não resultou em quaisquer efeitos toxicológicos adversos, sobre a mortalidade, o peso corporal, consumo de alimentos, hematologia, química clínica, urinálise, avaliações funcionais, atividade motora, dados de peso dos órgãos e observações macroscópicas e microscópicas, sendo, portanto, o NOAEL (nível de efeito adverso não observado) determinado como sendo 5000 mg/kg/dia.

Em conclusão, os dados e informações resumidas no trabalho demonstram que o PVA atende às especificações apropriadas para grau farmacêutico, para uso em filmes de revestimento de aplicações em produtos de suplementos farmacêuticos e alimentares, não apresentando risco para os seres humanos.

Como um produto industrial e comercial, PVA é valorizado pela sua solubilidade e biodegradabilidade, o que contribui para o seu baixo impacto ambiental uma vez que diversos microrganismos são capazes de promover sua biodegradação através de processos enzimáticos. (DeMERLIS et al., 2003).

¹ toxicidade sobre o material genético que não manifesta sinais ou sintomas.

3.5. Ciclos de congelamento e descongelamento

A técnica de reticulação de PVA por ciclos térmicos foi desenvolvida por STAUFFER e PEPPAS e publicada em um artigo intitulado “Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing” em 1992 e nesse artigo os autores citam que desde 1975 seu grupo de estudos já realizava alguns trabalhos nesse sentido.

O estudo citado avaliava a intensidade de dispersão da luz da estrutura supramolecular de PVA, preparado em solução aquosa a 15%, congelada a -20°C por 45-120 minutos e descongelado durante longos períodos de tempo. A porcentagem de luz visível transmitida através do gel foi registrada como uma função do tempo de congelamento e descongelamento de forma a avaliar as propriedades dessas estruturas sob a suposição de que as partículas que formaram o gel comportavam-se como pequenas esferas que aumentavam em tamanho a cada ciclo de congelamento e descongelamento.

Na técnica de ciclos térmicos, o PVA é dissolvido, sob aquecimento, e posteriormente congelado e descongelado repetidamente formando um gel altamente elástico podendo ser alongado de cinco a seis vezes o seu tamanho inicial além de apresentar uma elevada resistência mecânica. Quando em solução aquosa é essencialmente insolúvel, porém sofre significativo intumescimento (STAUFFER et al., 1992).

A reticulação do PVA pela técnica de ciclos de congelamento e descongelamento promove a formação de cristalitos através de pontes de hidrogênio formadas entre os grupos hidroxila ao longo das cadeias poliméricas (LIU et al., 2010). As propriedades do material obtido através desse processo dependem de alguns parâmetros como peso molecular do polímero, concentração da solução aquosa, temperatura, tempo e número de ciclos de congelamento e descongelamento (STAUFFER et al., 1992).

Essa técnica tem sido bastante atrativa por permitir a formação do hidrogel a partir de uma solução aquosa de PVA sem deixar resíduos químicos na matriz (LIU et al., 2010). Além disso, é possível a imobilização de princípios ativos na matriz sem que este sofra alguma interferência pelo método de reticulação como alteração na estrutura química.

3.6. Azadiractina como repelente e inseticida

Qualquer substância que apresente letalidade a insetos é considerada como um inseticida, no entanto nem sempre podem ser utilizadas uma vez que diversas propriedades devem estar associadas à atividade, tais como eficácia mesmo em baixas concentrações, ausência de toxicidade frente a mamíferos e animais superiores, ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e não ser cumulativa no tecido adiposo humano e de animais domésticos. Fica evidente que as características citadas referem-se àquele inseticida tido como ideal, o que raramente será o caso. Dentro da classificação de inseticidas são incluídas também substâncias que repelem e que atraem insetos (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Em todo o mundo é crescente o número de pesquisas com plantas que apresentam atividade contra vírus, bactérias, fungos e parasitas, não sendo diferente na medicina veterinária onde as pesquisas por plantas medicinais objetivam a redução de problemas sanitários no controle de várias doenças que comprometem a produtividade dos animais (ARAÚJO et al., 2009).

Azadirachta indica A. Juss 1830, conhecida popularmente por Neem ou Nim (ILUSTRAÇÃO 4), é uma espécie vegetal originária da Índia, pertencente à família Meliaceae a qual, nos últimos 20 anos, foi difundida em vários países principalmente para reflorestamento e produção de madeira em áreas secas (MORDUE et al., 2000).

ILUSTRAÇÃO 4 - *Azadirachta indica*

No Brasil, foi introduzida em 1986 pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) e hoje é amplamente cultivada devido as suas propriedades bioativas que podem ser empregadas na medicina, agricultura, veterinária entre outras áreas (MORGAN, 2009; PINTO e LANÇAS, 2010; KIKUCHI et al., 2011) uma vez que em diferentes partes da planta existe uma gama de princípios ativos com diversas propriedades como anti-inflamatória, antiarrítmica, antibacteriana, antifúngica, diurética, hipoglicemiante, entre outras (BISWAS et al., 2002).

Além das propriedades citadas, também apresenta ação repelente e inseticida. Os efeitos inseticidas são variáveis podendo ser por toxicidade, esterilidade, modificação do comportamento ou do desenvolvimento ou inibir a alimentação (SCHUMUTTERER, 1990).

Os efeitos observados se devem à presença de alguns metabólitos secundários, triterpenóides da classe dos limonóides, sendo os principais a azadiractina, a salanina, o meliantriol e a nimbina que são encontradas, principalmente, no óleo extraído da planta.

Dentre esses, a azadiractina (ILUSTRAÇÃO 5) apresenta maior potencial repelente e por esse motivo, tem recebido mais atenção dos pesquisadores (SCHMUTTERER, 1990; LEE et al., 1991; SUMAN, 2010).

ILUSTRAÇÃO 5 - Molécula de azadiractina

É encontrada em maior quantidade nos frutos de *A. indica*, podendo as concentrações variar em cada planta de acordo com a região do cultivo, época do ano e forma de extração sendo que a quantidade máxima é obtida no amadurecimento dos frutos e armazenamento (MORGAN, 2009).

A gama de princípios ativos com estruturas aromáticas complexas pode reduzir a possibilidade de tolerância ou do desenvolvimento de resistência nos insetos, sendo esse fato uma vantagem sobre os inseticidas sintéticos (RIBEIRO et al., 2008). Além disso, é biodegradável e instável sob ação da luz, apresentando persistência de 3 a 6 dias no solo e de 8 a 13 dias em ambientes aquáticos não causando problemas ambientais após o seu uso (SUNDARAN, et al., 1997). Apresenta como toxicidade DL_{50} oral para ratos de 5 g/kg de peso corporal e DL_{50} dermal de 2g/kg de peso corporal (COATS, 1994).

É um composto esteroidal que não contém átomos de cloro, fósforo, enxofre ou nitrogênio (MARTINDALE, 1992), altamente polar, sendo consequentemente solúvel em solvente orgânicos polares (etanol, metanol) e ligeiramente solúvel em água (MORGAN, 2009).

Os trabalhos encontrados na literatura que descrevem os efeitos da azadiractina sobre insetos são, na grande maioria, relacionados às pragas encontradas na agricultura.

De modo geral a azadiractina afeta o desenvolvimento dos insetos de diferentes maneiras. Pela sua semelhança com o hormônio da ecdise (processo que possibilita ao inseto trocar o esqueleto externo e, assim poder crescer), perturba essa transformação e, em altas concentrações pode impedi-la, causando a morte do inseto. Por essa razão, as formas jovens de insetos são mais fáceis de controlar. Não causa a morte do inseto imediatamente, dado o seu efeito fisiológico, porém, além de afetar a ecdise, reduz o consumo de alimento, retarda o desenvolvimento, repele os adultos e reduz a postura nas áreas tratadas. Também tem maior ação por ingestão, de modo que os insetos mastigadores são mais facilmente afetados (SUMAN et al., 2010).

Como inibidor alimentar pouco se sabe sobre o modo de ação da azadiractina. Em geral ela bloqueia os impulsos advindos de receptores que respondem a fagoestimulantes e/ou estimula células envolvidas em inibição alimentar (DETHIER, 1982).

A azadiractina apresenta diversos efeitos endócrinos. O maior efeito é a modificação dos níveis de ecdisteróides na hemolinfa por agir sobre os sítios de produção de ecdisteróides (DORN et al., 1986). A TABELA 1, apresenta os principais efeitos observados nos insetos decorrentes da ação da azadiractina.

TABELA 1 - Principais efeitos inseticidas da azadiractina

Efeitos	Alvo	Modo de ação
Antialimentar primário	Parte da boca e quimiorreceptores	Estimulação de células de dissuasão; Inibição de açúcar das células.
Antialimentar secundário	Intestino	Inibição do peristaltismo Redução na produção de enzimas.
Regulação no crescimento do inseto	Cutícula	Alterações nos ecdisteróides e hormônio juvenil pelo bloqueio da liberação de peptídeos morfogenéticos levando a defeitos na muda.
Esterilidade	Órgãos reprodutivos	Alterações nos ecdisteróides e hormônio juvenil levando à redução no número de ovos viáveis e progênie viva.
Processos celulares	Divisão celular	Bloqueio de célula em divisão pós-metáfase em meiose e mitose.
	Músculo	Diminuição no tônus muscular
	Maquinaria sintética da célula	Bloqueio da produção de enzima digestiva no intestino; Inibição da síntese de proteínas em vários tecidos

Alguns estudos realizados têm demonstrado resultados positivos no controle de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835), um dos mais importantes em infestações de cães e gatos, uma vez que a picada pode promover a transmissão de patógenos ou, ainda, desencadear a dermatite alérgica à picada de pulgas (DAPP) decorrentes de componentes existentes na saliva dos sifonápteros (RUST, 2005; CHIN et al., 2010).

Em 1998, Guerrini e Kriticos publicaram um trabalho que demonstrou a correlação do efeito dose-dependente da ação da azadiractina em *Ctenocephalides felis*, os resultados obtidos revelaram reduções significativas da população de pulgas tanto nos animais quanto no ambiente utilizando extratos de *A. indica* combinados com DEET e óleo de citronela pulverizados em cães.

Ribeiro, et al., (2008) em seu trabalho “Atividade do extrato de Nim sobre o desenvolvimento embrionário de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonapeta:

pulicidae)” utilizaram uma solução aquosa de Nim a 10%, em spray, em cães infestados por *C. felis felis* e obtiveram resultados que demonstraram valores significativos em relação a inibição do desenvolvimento embrionário das pulgas, sendo 95,78% de inibição no quarto dia de avaliação do grupo tratado e 82,20% de inibição no décimo quarto dia.

3.7. A pulga *Ctenocephalides felis felis*

As pulgas são ectoparasitas hematófagos quando na fase adulta. O ciclo biológico destes insetos compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (ILUSTRAÇÃO 6) (DRYDEN et al., 1994). Seu início se dá após o repasto sanguíneo, quando a fêmea deposita cerca de 20 ovos nos pelos do animal (OLIVEIRA et al., 2008). Os ovos caem ao solo, tendendo a acumularem-se em grandes quantidades nos locais habitualmente frequentados por possíveis hospedeiros. No entanto, em fortes infestações, podem ser encontrados, no corpo do animal, ovos, larvas e adultos simultaneamente (SILVA et al., 2008).

Após um período de até 10 dias, os ovos eclodem liberando as larvas que têm um tempo médio de desenvolvimento de 5 a 11 dias. Nesse período, as larvas alimentam-se de detritos orgânicos, fezes e sangue seco provenientes das pulgas adultas encontrados frequentemente no pó doméstico e fendas. No final do seu desenvolvimento, a larva deixa de se alimentar e esvazia seu trato digestivo, iniciando a formação da pupa, que irá aderir-se a qualquer partícula ambiental como grãos de areia ou outro tipo de resíduo (DRYDEN et al., 1994).

A emergência das pulgas adultas ocorre em cerca de 5 a 9 dias após o início da pupação, podendo chegar a um tempo longo de até 140 dias, dependendo das condições ambientais. Logo após a emergência, as pulgas iniciam um novo ciclo após o repasto sanguíneo e a oviposição ocorre num tempo máximo de 36 a 48 horas. (DRYDEN et al., 1994). No repasto sanguíneo, uma fêmea de *Ctenocephalides* spp ingere cerca de 13,6µl de sangue por dia, o que representa aproximadamente quinze vezes o seu peso (DRYDEN, 1993; LINARDI, 2004).

ILUSTRAÇÃO 6 - Ciclo de vida das pulgas

Fonte: <http://www.promeris.com.br/inimigos-e-ameacas/pulgas/ciclo-de-vida-da-pulga.html>

O gênero *Ctenocephalides* é constituído por 12 espécies e subespécies. A espécie *C. felis* apresenta quatro subespécies: *C. felis damarensis*, *C. felis strongylus*, *C. felis orientis* e *C. felis felis*, porém no continente americano somente a subespécie *Ctenocephalides felis felis* é encontrada.

Embora seja conhecida popularmente como a “pulga do gato”, *Ctenocephalides felis felis* também é encontrada em cães. Possui ampla distribuição e se adapta a diversas condições ecológicas (OLIVEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2008). Podem ser vistas a olho nú e não demonstram claramente as delimitações entre cabeça, tórax e abdômen como a maioria dos insetos, além de apresentarem o terceiro par de pernas mais longo que os demais de forma a facilitar o salto. Pulgas adultas são, normalmente, de coloração entre o marrom escuro e médio (ILUSTRAÇÃO 7). (SLOSS et al., 1999).

ILUSTRAÇÃO 7 - *Ctenocephalides felis felis*

Fonte: <http://www.roberthooke.org.uk>

A longevidade das pulgas é variável de acordo com as condições climáticas, espécie e com a condição alimentar, sendo assim, *Ctenocephalides felis felis* pode ter uma sobrevida de 30 dias alimentando-se e de 19 dias em jejum (DRYDEN et al., 1993).

A pulga *Ctenocephalides* spp é a causadora de problemas frequentes em cães e gatos e, conseqüentemente, em seus criadores. Como não possui hospedeiro definitivo ataca os animais domésticos causando dermatite com a possibilidade de ocorrência de irritação decorrente da ação alérgica e tóxica da saliva no ato da picada. A falta de controle desse inseto pode causar problemas para os seres humanos devido ao seu contato com os animais infestados (DRYDEN et al., 1994).

Os pulicídeos adultos constituem apenas 5% da população em parasitismo no animal, ficando os 95% restantes no ambiente, distribuídos entre as outras fases de vida, demonstrando, portanto, que a maior parte do ciclo biológico de *C. felis felis* se passa fora do hospedeiro (DRYDEN et al., 1994).

Ctenocephalides felis felis pode atuar como hospedeiro intermediário de *Dipylidium caninum*, um cestóide comum em cães, gatos e ocasionalmente crianças, *Dipetolonema reconditum*, um filarídeo de cães. Pode ainda ser vetor da doença da arranhadura do gato

Bartonella henselae e transmitir algumas riquetsias (AVELAR et al., 2007; REIF et al., 2009).

Existem, no mercado de produtos veterinários, diversos itens utilizados no combate de pulgas, um desses itens é a coleira anti-pulgas que pode apresentar em sua composição, como princípio ativo, organofosforados como diazinon, clorpirifós e diclorvós isoladamente ou em associação, piretróides, como a deltametrina, além de carbamatos, fenilprazoles, nitroguanidinas, neonicotinóides e lactonas macrocíclicas. No entanto, deve-se ter o cuidado com reação alérgica e/ou tóxica, além disso, normalmente ocorre uma seleção de organismos resistentes a esses grupamentos químicos comumente utilizados (RIBEIRO et al., 2008; SILVA et al., 2009).

Nesse sentido, há a necessidade de se desenvolver novos produtos para o efetivo controle do ectoparasito que apresentem maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e baixo impacto ambiental. Uma alternativa promissora para essa demanda são os produtos provenientes de plantas, por apresentarem baixa toxicidade para mamíferos e pouco impacto ambiental (KUMAR, et al., 2005; LANDAU et al., 2009; RIBEIRO et al., 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Para o desenvolvimento desse estudo foi utilizado o seguinte material:

Poli(álcool vinílico) (PVA) Celvol 325[®] (Mw = 85000, grau de hidrólise 98,4%) obtido da Dermet Agekem, para preparo das matrizes poliméricas. Fécula de mandioca Lorenz[®], sílicas Aerosil R972[®] e Aerosil R805[®] gentilmente cedidas pela Evonik, poli(vinil acetato) Kollidon SR[®] gentilmente cedido pela BASF, amido pré-gelatinizado RD545[®] e maltodextrina Globe A1920[®] gentilmente cedidos pela Corn Products, utilizados como agentes encapsulantes e óleo de *Azadiracta indica* Sarfam Campo Neem Oil obtido da Sarfam Indústria, Comércio e Importação Ltda, padrão de azadiractina 95%, obtido da Sigma. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água obtida de um sistema purificador de osmose reversa marca Gehaka modelo OS10LX.

4.2. Métodos

O apêndice A apresenta um fluxograma com os métodos de preparo das amostras e dispositivos.

4.2.1. Preparo das matrizes

Soluções aquosas de PVA 2%, 5%, 10%, 15% e 20% foram preparadas em autoclave a 120°C por 15 minutos. Após resfriamento até temperatura ambiente, as soluções foram colocadas em placas de Petri e submetidas a ciclos térmicos de congelamento e descongelamento.

Dois diferentes ciclos térmicos foram testados, sendo de 2 horas de congelamento/descongelamento e 12 horas de congelamento/descongelamento. Para ambos os tempos, o número de repetições dos ciclos foram de 1 a 7.

Para processamento das amostras das matrizes nos diferentes ensaios, foram utilizados dois métodos de secagem, sendo em liofilizador e em temperatura ambiente.

De maneira a facilitar a análise dos resultados, as amostras foram nomeadas com siglas, conforme descrito a seguir:

I a VII = quantidade de ciclos térmicos

2 ou 12 = duração dos ciclos térmicos

L = seca por liofilização

S = seca em temperatura ambiente

Tendo como exemplo uma amostra que foi preparada por três ciclos térmicos de 2 horas e seca por liofilização a sigla seria III2L.

4.2.2. Preparo dos dispositivos

Os dispositivos foram preparados com óleo de Nim imobilizado em agentes encapsulantes, tendo em vista que além de permitir a dispersão deste, que é pouco solúvel em água, com a solução de PVA, aumentam a estabilidade e participam do controle da liberação dos princípios ativos presentes.

A escolha dos agentes encapsulantes foi baseada primeiramente nas propriedades dos polissacarídeos por tratar-se de uma molécula biodegradável, biocompatível, de baixo custo e anfifílica a qual se demonstrou eficiente na absorção do óleo de Nim e posterior homogeneização da mistura na solução aquosa de PVA.

Partindo desse princípio, optou-se por testar polissacarídeos à base de amido pré-gelatinizado e maltodextrina de forma a verificar uma possível interferência na liberação do princípio ativo uma vez que as diferentes moléculas apresentam algumas modificações na estrutura quando comparadas entre si.

A proposta para a utilização do poli(vinil acetato), Kollidon SR, foi devido a sua cadeia polimérica conter domínios hidrofóbicos que conferem maior afinidade pelo óleo e domínios hidrofílicos que conferem afinidade pela água.

As sílicas Aerosil R805 e R972 foram escolhidas devido à maneira como o óleo seria encapsulado por serem conhecidas como de soluções industriais clássicas. Trata-se de sílicas modificadas, hidrofóbicas, sendo Aerosil R805 com maior teor de carbono e R972 com baixo teor de carbono, elementos que conferem maior afinidade ao óleo.

Os agentes encapsulantes propostos: polissacarídeos, poli(vinil acetato) e sílicas são bastante utilizados na indústria em sistemas de liberação controlada por isso, tornam-se importantes alternativas para o desenvolvimento de diferentes tipo de dispositivos.

Os dispositivos foram preparados com óleo de Nim imobilizado nos diferentes agentes encapsulantes disperso em solução aquosa de PVA a 10% submetidos a 3 ciclos de 12 horas de congelamento/descongelamento.

A quantidade de óleo de Nim pretendida para compor a matriz foi de 2%, portanto, os agentes encapsulantes foram adicionados de acordo com a quantidade necessária para imobilizar a quantidade de óleo desejada.

Em todos os casos foi feita uma mistura física do óleo de Nim com o agente encapsulante que, após completamente homogeneizados foram adicionados à solução de PVA em temperatura ambiente também através de mistura física.

Para fécula de mandioca, amido pré-gelatinizado, maltodextrina e poli(vinil acetato) foram necessárias 3 partes do agente encapsulante para 2 partes de óleo de Nim e para os dois tipos de sílica, foi necessária 1 parte do agente encapsulante para 4 partes de óleo de Nim.

Após imobilização e total homogeneização do óleo de Nim encapsulado na solução de PVA as composições passaram pelos ciclos de congelamento e descongelamento para reticulação física do polímero.

4.2.3. Caracterização físico-química

Na caracterização físico-química, para a realização dos ensaios de fração gel e intumescimento, é necessário que se conheça o valor da massa inicial das amostras, a qual deve ser obtida a partir de secagem até que esta esteja constante de forma a garantir que todo o teor de água nelas contido tenha sido retirado. No entanto, como as amostras são reticuladas por processo físico, quando são secas em estufa, mesmo em baixas temperaturas, por volta de 40°C, verifica-se a ocorrência do processo de hidrólise tendo como indicativo para essa afirmação a mudança na coloração das amostras, que ficam amareladas e a não ocorrência de massa constante.

Partindo dessas observações, o preparo das amostras foi realizado da seguinte maneira: uma amostra inicial foi dividida em duas partes com massas iguais. Uma das partes foi submetida a processo de secagem em temperatura ambiente (parte 1) até massa constante com a finalidade da obtenção de sua massa inicial e a outra foi submetida ao ensaio de fração gel e intumescimento (parte 2) para a obtenção da massa final. A maneira como o ensaio foi conduzido, além de não causar danos às amostras durante o processo de secagem, permitiu que as estruturas formadas durante o processo de reticulação fossem mantidas sem interferência na permeabilidade do solvente nos poros das matrizes e dispositivos.

Além dessa metodologia para obtenção das massas iniciais e finais das amostras, optou-se por realizar os mesmos ensaios com amostras secas em liofilizador partindo do princípio de que o processo de liofilização, por promover uma secagem rápida utilizando baixas temperaturas, não pudesse interferir nas estruturas formadas durante o processo de reticulação das matrizes e dispositivos. O equipamento utilizado para a liofilização das amostras foi um liofilizador marca Terroni, modelo Enterprise II. As amostras dos hidrogéis foram congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente colocadas no liofilizador permanecendo por um período de 24 horas.

4.2.3.1. Fração gel

Todas as amostras foram pesadas em triplicata e continham massa de aproximadamente 0,2 g. Após a pesagem, foram colocadas em béquer contendo 100 mL de água purificada os quais foram acondicionados em agitador marca Tecnal modelo TE-420

com temperatura ajustada em 25°C e agitação de 100 RPM por um período de 72 horas e com troca da água a cada 12 horas.

Após o período de 72h as amostras foram retiradas do agitador, secas em temperatura ambiente e novamente pesadas para calcular a fração gel. O cálculo foi realizado pelas equações 1 e 2 baseado na norma ASTM D 2765 a partir da qual foram realizadas adaptações, tendo em vista que nesta norma o ensaio de fração gel deve ser realizado com solventes sob altas temperaturas, no entanto, como a reticulação por ciclos térmicos é obtida por processo físico torna-se inviável a utilização de altas temperaturas uma vez que esse parâmetro danifica as amostras (ASTM, 2001).

$$FS = (m_i - m_f)/m_i \times 100 \quad (1)$$

$$FG = 100\% - FS \quad (2)$$

Onde: m_i = massa inicial da amostra

m_f = massa do gel seco

FS = fração solúvel

FG = fração gel

4.2.3.2. Intumescimento

O teste de intumescimento foi realizado com as mesmas amostras do teste de fração gel, secas por liofilização e sem secagem prévia. No entanto, as massas dessas foram verificadas de hora em hora nas 3 primeiras horas e a cada 24 horas até um total de 72 horas. O grau de intumescimento foi calculado utilizando a equação 3 de acordo com a norma ASTM D570 (ASTM, 1998).

$$I\% = (m_f - m_i)/m_i \times 100 \quad (3)$$

Onde: I% = grau de intumescimento em porcentagem

m_f = massa final, em gramas

m_i = massa inicial, em gramas

4.2.3.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Análises térmicas, como DSC, são frequentemente utilizadas para descrever o comportamento de uma amostra em função da temperatura. Esse tipo de análise é capaz de revelar transições térmicas, processo de degradação e estudos de estabilidade térmica (EL-SAYERD et al, 2011). Por ser uma técnica muito sensível, é empregada também na determinação e caracterização de pureza de diversas substâncias.

Como as medidas de DSC fornecem informações que se fundamentam nas propriedades físicas das amostras, tendo-se uma amostra pura, ou uma mistura e conhecendo-se cada um dos componentes com suas características definidas, é possível identificar qual ou quais componentes estão envolvidos.

Os ensaios de calorimetria diferencial de varredura foram realizados em um calorímetro marca Mettler-Toledo modelo DSC 822e, calibrado com índio metálico (temperatura de fusão, $T_f = 156^\circ\text{C}$) localizado no Laboratório de Polímeros do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA). A metodologia utilizada foi baseada no trabalho de PARK e colaboradores, publicado em 2001.

Amostras secas em temperatura ambiente com massa de aproximadamente 10 mg foram colocadas em cadinhos de alumínio e aquecidas no forno do equipamento a um intervalo de temperatura de 25°C à 150°C , razão de aquecimento de $20^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ em atmosfera de N_2 mantidas por 5 minutos com o objetivo de remover a água residual da amostra. Após essa etapa, a temperatura foi elevada a 260°C com razão de aquecimento $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ por 5 minutos e resfriadas a $20^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ até temperatura ambiente.

4.2.3.4. Difractometria de raios X (DRX)

Para este ensaio foi utilizado um difratômetro Rigaku modelo MultiFlex, radiação de $\text{CuK}\alpha 1$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), a 40 kV e 20 mA, do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais do IPEN (CCTM/IPEN). Com o objetivo de se verificar alterações nos tamanhos

dos cristais das diferentes amostras indicando interação dos agentes encapsulantes com a matriz de PVA.

4.2.3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras de matrizes e dispositivos foram secas em liofilizador, congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente fraturadas. As fraturas obtidas foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura Tabletop marca Hitachi modelo TM3000, localizado no Laboratório de Microscopia do CCTM.

4.2.4. Caracterização biológica

Nas caracterizações biológicas foram realizados estudos quanto à citotoxicidade do óleo de Nim, das matrizes e dos dispositivos e bioensaio para análise da eficácia de ação do óleo Nim em relação ao comportamento das pulgas.

4.2.4.1. Teste de citotoxicidade

A técnica utilizada para a avaliação da citotoxicidade de todas as amostras foi a de incorporação do vermelho neutro tendo como base as normas internacionais ISO 10993-1 e 10993-5 de 2009.

Foram utilizadas células fibroblásticas de camundongo NCTC clone 929 da American Type Culture Collection (ATCC) cultivada em meio mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e 0,1 mM de piruvato de sódio (MEM-uso).

Microplacas de 96 poços contendo células cultivadas em laboratório foram preparadas e gentilmente cedidas pelo Núcleo de Culturas Celulares do Instituto Adolpho Lutz onde foram adicionados 200µL de uma suspensão celular contendo 5×10^5 células/mL em cada poço. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas antes do ensaio.

Como controle negativo foi utilizado polietileno de alta densidade (HDPE) e como controle positivo foi utilizado filme de látex de borracha natural. Para o ensaio foram

preparados extratos das amostras e dos controles negativo e positivo, onde cada material a ser testado permaneceu imerso em MEM-uso e acondicionado em estufa a 37°C por um período de 24 horas. O óleo de Nim 10% em etanol foi diluído em MEM-uso 1%. Utilizando os extratos obtidos e a solução de Nim foram feitas cinco diluições seriadas de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25% em MEM-uso. Nos poços das microplacas contendo as células foram adicionados, em triplicata, 200µL de cada diluição dos extratos e da solução de Nim (FIGURA 1 e ILUSTRAÇÃO 8).

As microplacas foram acondicionadas em estufa incubadora marca Binder, modelo CB150, com atmosfera úmida e 5% de CO₂ em temperatura de 37°C por um período de 24 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
B	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%
C	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%
D	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%
E	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%
F	MEM	MEM	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	100%	50%	25%	12,5%	6,25%
G	MEM	MEM	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	100%	50%	25%	12,5%	6,25%
H	MEM	MEM	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	100%	50%	25%	12,5%	6,25%

FIGURA 1 - Esquema da distribuição dos extratos das amostras e dos controles na microplaca.

ILUSTRAÇÃO 8 - Diluição seriada das amostras e controles e adição em microplacas para acondicionamento em incubadora.

Após este período, a microplaca foi retirada da estufa, os extratos foram substituídos por 200 μL de solução do corante vermelho neutro e a placa foi incubada a 37°C por 3 horas para incorporação do corante pelas células.

Passadas 3 horas o corante foi desprezado e a microplaca foi lavada 2 vezes com solução tampão fosfato pH 7,4 e em seguida com solução de lavagem composta por 1% de CaCl_2 a 10% em solução de formaldeído a 0,5%. Após esta etapa os poços das microplacas receberam 200 μL de solução de extração composta por 50% de ácido acético a 2% e 50% de etanol para a lise das células vivas e liberação do corante nelas contido.

A leitura da microplaca foi feita por densidade ótica em espectrofotômetro tipo ELISA marca Tecan modelo RC Sunrise no comprimento de onda de 540 nm. Com as densidades óticas (DO) obtidas foram feitos cálculos de porcentagem de viabilidade celular tendo como referência a DO do controle de células (ILUSTRAÇÃO 9).

ILUSTRAÇÃO 9 – Microplaca após o ensaio para contagem em espectrofotômetro.

A toxicidade foi determinada quantitativamente pelo índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$) encontrado no gráfico obtido. Sendo $IC_{50\%}$ a concentração de extrato que provoca a morte da metade da população celular no ensaio.

4.2.4.2. Bioensaio com pulgas *Ctenocephalides felis felis* utilizando óleo de Nim

O bioensaio foi realizado no Laboratório de Parasitologia Animal, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal no Instituto Biológico, localizado em São Paulo.

As pulgas utilizadas no bioensaio, *Ctenocephalides felis felis*, foram cultivadas em laboratório por meio de infestação artificial de uma gata sem raça definida alocada em uma gaiola mantida suspensa sobre uma bancada em biotério para gatos. A colônia teve início a partir de coleta de pulgas em cães sem raça definida. Os animais foram infestados com pulgas adultas 1 ou 2 vezes por semana, de acordo com a demanda de ensaios. Sob a gaiola foi colocada uma bandeja forrada com folhas de papel e diariamente esse local foi varrido

para coleta dos ovos. O material foi peneirado e transferido para frascos de vidro, fechados com tecido na parte superior e mantidos em câmara climatizada sob $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar entre 60 e 80% até a emergência dos adultos. Após 2 ou 3 dias da emergência, as pulgas adultas eram utilizadas nos experimentos e reinfestação das gatas, dando continuidade do ciclo evolutivo.

Os animais foram mantidos segundo os princípios éticos da experimentação animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) conforme cópia do certificado (APÊNDICE A e B).

Aproximadamente 20 dias antes da realização do bioensaio, gaiola e bancada foram varridas com um pincel para colheita dos ovos das pulgas juntamente com resíduos de poeira e areia, colocados em placas de Petri, separados de possíveis impurezas e acondicionados em frascos mantidos em estufa com temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 63% onde permaneceram até o estágio de pulgas adultas (ILUSTRAÇÃO 10).

ILUSTRAÇÃO 10 - Obtenção das pulgas para o bioensaio. A) Gaiola para criação da gata. B) Resíduos contendo ovos retirados da gaiola. C) Estufa para incubação dos ovos. D) Frascos contendo ovos a serem incubados.

Para avaliar a ação do Nim sobre as pulgas foram utilizados indivíduos adultos com idade ≤ 3 dias pós emergência.

Em tubos de ensaio de 10 mL foram colocadas tiras de papel filtro medindo 1,5 x 8 cm, sendo que, em 10 tubos os papéis foram impregnados com 20 μ L de óleo mineral USP (grupo controle) e em outros 10 tubos os papéis foram impregnados com 20 μ L de óleo de Nim, nome comercial Campo Neem Oil fornecido pela Sarfam Comercial Importadora Ltda. (grupo tratado). Em cada tubo, foram adicionadas 10 pulgas, os tubos foram fechados com tampa de borracha e deixados em repouso numa sala climatizada com temperatura de 27°C por um período de 24 horas (ILUSTRAÇÃO 11). Após este período as pulgas foram analisadas visualmente para observação do comportamento das mesmas.

ILUSTRAÇÃO 11 - Tubos contendo pulgas adultas na presença de óleo de Nim. Grupo controle e grupo tratado.

4.2.5. Doseamento de princípios ativos do óleo de Nim

Conforme descrito na literatura, o teor de princípios ativos contidos em produtos de origem vegetal podem variar de acordo com fatores sazonais, métodos de extração e armazenamento (MORGAN, 2009; SILVA et al., 2009).

Partindo dessas informações propôs-se o doseamento dos princípios ativos contidos no óleo de Nim utilizado para o preparo das amostras, em especial a azadiractina, principal componente com potencial repelente/inseticida.

Os ensaios do teor de princípios ativos do óleo de Nim, bem como a cinética de liberação foram realizados no Centro de Espectrometria de Massas Aplicada Ltda., localizado no CIETEC/IPEN.

Nesse ensaio, foi utilizado o CLAE-EM/EM (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas em sequencia) tendo como referência as metodologias de Forim (2010) e Kaushik (2002), com adaptações. No entanto, nos

resultados obtidos não foi encontrada a azadiractina ou outro componente com ação repelente/inseticida citado na literatura como salanina, meliantriol ou nimbina. Por tratar-se de moléculas com potencial para formar ligações de hidrogênio impedindo sua fragmentação partiu-se da hipótese de haver certa dificuldade em ionizá-las no equipamento e por essa razão optou-se por realizar a análise em CLAE-UV/Vis (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com absorção em Ultra Violeta Visível) que, de acordo com os resultados, também não identificou a presença de azadiractina. Na ocasião, com o objetivo de se obter uma referência para a realização da cinética de liberação, foram identificados três marcadores a partir dos picos mais intensos dos cromatogramas da amostra de óleo de Nim. Os marcadores citados são aqui referidos como M1, M2 e M3, sendo M2 utilizado para a quantificação do princípio ativo na cinética de liberação.

4.2.5.1. Análise em CLAE-EM/EM

O equipamento utilizado nesse ensaio foi de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a um Espectrômetro de Massas em sequencia (CLAE-EM/EM), sendo o CLAE da marca Agilent modelo 1100 equipado com bomba quaternária, degaseificador e autoinjeter, usado com coluna cromatográfica marca Agilent Eclipse modelo XDB-C18 (150mm x 4,6mm, 5 μ m) e o espectrômetro de massas marca AB Sciex, modelo API 2000 com detector do tipo triploquadrupolo.

Para essa análise foi preparada uma solução estoque de azadiractina diluindo-se o padrão em metanol e obtendo-se uma concentração final de 95 μ g/mL. A solução de injeção de azadiractina foi preparada utilizando-se a solução estoque do padrão com uma solução de 50% acetonitrila/50% água/0,1% ácido fórmico.

As amostras foram injetadas em volumes de 20 μ L. A fase móvel utilizada consistia numa mistura isocrática entre água/acetonitrila/metanol/THF/ácido fórmico (61:34:4:1:0,5) e vazão de 0,8 mL min⁻¹.

O cromatograma abaixo (FIGURA 2) mostra a análise da solução do padrão de azadiractina na concentração de 1 μ g/mL. Como o pico do composto aparece com uma

intensidade muito baixa, a FIGURA 3 demonstra a região ampliada onde ocorre a presença da molécula com tempo de retenção de aproximadamente 7,10 minutos.

FIGURA 2 - Cromatograma de solução do padrão de azadiractina.

FIGURA 3 - Ampliação do cromatograma do padrão de azadiractina no tempo de retenção de 7,10 minutos.

Ao analisar a FIGURA 4 e comparando-o com os cromatogramas anteriormente apresentados, podemos observar que na análise do óleo de Nim não é verificada a presença de azadiractina, por essa razão, optou-se por confirmar os resultados em Cromatografia

Líquida e Alta Eficiência com absorção da região do ultravioleta visível (CLAE-UV/Vis), conforme descrito a seguir.

FIGURA 4 - Cromatograma da análise do óleo de Nim.

4.2.5.2. Análise em CLAE-UV/Vis

As análises em CLAE-UV/Vis foram realizadas em equipamento com bomba binária modelo 10AD, degaseificador modelo 10ATvp, forno de coluna modelo CTO-10A, injetor automático modelo SIL 10AD, espectrofotômetro UV/VIS modelo SPD 10A, todos da marca Shimadzu. As condições cromatográficas foram: coluna C18 (150 x 4,6 mm 5µm) modelo Eclipse XDB, marca Agilent Technologies, fase móvel preparada em solução 60% água tipo I/40% acetonitrila/0,1% de ácido fórmico (v/v), temperatura da coluna 25°C, fluxo 0,80 mL min⁻¹, volume de injeção 20 µL, tempo de corrida 10 minutos, comprimento de onda fixo em 214 nm e solução para lavagem de agulha ACN:H₂O (60:40) (v/v).

Para a quantificação relativa do teor de princípio ativo foi realizada uma curva de calibração com as concentrações de 0,25mg/mL, 0,5mg/mL, 1,0mg/mL, 2,5mg/mL, 5mg/mL e 10mg/mL de azadiractina. Todas as soluções foram preparadas com o óleo de Nim diluído na solução da fase móvel, agitadas em vortex modelo Vortex Mixer, marca Vivax por 1 minuto e centrifugadas a 2500 RPM e imediatamente injetadas no sistema CLAE-UV/Vis.

A solução padrão de azadiractina utilizada foi a mesma preparada para utilização em CLAE-MS/MS, com concentração de 95µg/mL. Uma solução teste também foi preparada utilizando-se a solução padrão de azadiractina com adição da fase móvel obtendo-se uma concentração de 5µg/mL a qual foi agitada em vortex e imediatamente injetada no sistema CLAE-UV/Vis.

A área do pico do padrão de azadiractina foi obtida pela injeção de 20µL da solução preparada em metanol, com concentração de 5µg/mL. De acordo com o cromatograma (FIGURA 5), podemos verificar que o pico da azadiractina ocorre no tempo de retenção de aproximadamente 6,8 minutos.

FIGURA 5 – Cromatograma da análise em CLAE-UV/Vis do padrão de azadiractina.

Após verificação do tempo de retenção da solução padrão de azadiractina, foi realizada uma análise do óleo de Nim para confirmação da ausência do princípio ativo conforme demonstrado por CLAE-EM/EM.

O cromatograma a seguir (FIGURA 6), obtido pela injeção de 20µL da solução óleo/fase móvel, mostra a ausência de um pico de azadiractina e os picos utilizados como marcadores M1, M2 e M3. Sendo os tempos de retenção de 3,6 minutos, 3,9 minutos e 5,7 minutos, respectivamente.

FIGURA 6 - Tempos de retenção dos compostos encontrados na solução do óleo de Nim. Marcador 1 (M1) 3,6 minutos; Marcador 2 (M2) = 3,9 minutos e Marcador 3 (M3) = 5,7 minutos).

De acordo com as curvas analíticas apresentadas na (FIGURA 7), o composto M2 apresentou melhor coeficiente de linearidade ($r = 0,998$) contra $r = 0,989$ para M1 e $r = 0,998$ para M3, porém com um pico não muito intenso, portanto para quantificar as amostras analisadas foi utilizado o pico de M2.

FIGURA 7 - Curvas analíticas (linearidade de 0,25 a 10 mg/mL).

4.2.6. Cinética de liberação de azadiractina das amostras de dispositivos de PVA

Conforme a finalidade do sistema de liberação controlada desenvolvido, as amostras, para os estudos de cinética de liberação foram coletadas na superfície dos dispositivos, local onde o princípio ativo é liberado.

Ensaio com liberação em solução também foram realizados num processo onde as amostras são lixiviadas e liberam o conteúdo nelas contido conforme o princípio ativo se disponibiliza no sistema desprendendo-se das moléculas dos agentes encapsulantes ou do PVA onde podem estar ligadas de maneira mais ou menos intensa, dessa forma, podendo-se comparar o potencial encapsulante de cada um dos agentes utilizados.

As análises realizadas tiveram como objetivo, além de verificar a liberação ou não do óleo de Nim de cada amostra, fazer um comparativo entre elas sobre a intensidade da liberação e o tempo em que cada uma delas ocorre até o fim da vida útil do dispositivo, ou seja, até que o mesmo estivesse totalmente seco, no caso de liberação na superfície.

4.2.6.1. Preparo das amostras para cinética de liberação

Tendo em vista que a cinética de liberação permite avaliar a quantidade de princípio ativo liberado em função do tempo, trata-se de um ensaio que possibilita o estudo do comportamento da liberação controlada baseado na quantidade de princípio ativo incorporado a uma matriz dando informações sobre a eficiência da incorporação e a compatibilidade com a matriz utilizada.

4.2.6.1.1. Coletadas em “swab”

Foram determinados os tempos 0h00, 1h0, 2h00, 6h00, 12h00 e 24h00 para as coletas com o objetivo de se verificar se houve liberação dos princípios ativos anteriormente observados no óleo de Nim, o tempo e intensidade da liberação nas diferentes amostras.

Em cada tempo determinado, o swab foi deslizado nas superfícies das amostras de maneira uniforme e sistemática. Após a coleta das amostras, o swab foi colocado diretamente em frasco de injeção utilizado em CLAE e foram adicionados 500µL de solução da fase móvel. Os frascos foram submetidos a ultrassom por aproximadamente 30 segundos e o swab removido cuidadosamente e pressionado nas paredes do frasco para escoar a solução nele absorvida. Após o descarte do swab a solução contida no frasco foi centrifugada por 5 minutos e injetada imediatamente em sistema CLAE-UV/Vis.

4.2.6.1.1. Liberadas em solução

Os dispositivos das diferentes amostras foram imersos em 10mL de solução composta por 60% água tipo I/40% acetonitrila, solução esta, utilizada na fase móvel do equipamento de CLAE com o objetivo de se reduzir etapas de extração e/ou diluição das amostras coletadas. Durante todo o período da liberação as amostras foram submetidas à agitação de 80 RPM em temperatura controlada de 25°C.

Os tempos definidos para a coleta das soluções foram de 0h30, 01h00, 02h00, 03h00 e 06h00, períodos nos quais 1mL da solução total foi retirado e adicionado em

frasco âmbar de 1,5mL para injeção no sistema de CLAE-UV/Vis. A cada coleta a solução água/acetonitrila restante foi totalmente descartada e uma nova foi adicionada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes concentrações de PVA preparadas na busca da que melhor se adequasse ao desenvolvimento do dispositivo desejado teve como base padrões normalmente utilizados na indústria em geral.

O critério de escolha da matriz considerada mais adequada para o desenvolvimento do sistema de liberação controlada desejado foi baseado nas características sensoriais como elasticidade e resistência. Nesse caso a matriz selecionada foi a preparada com 10% de PVA. Partindo desse critério, foram realizadas caracterizações físico-químicas das matrizes obtidas por 1 a 7 ciclos térmicos de 2 e de 12 horas de congelamento/descongelamento em duas diferentes condições, de secagem por liofilização e em temperatura ambiente.

As caracterizações físico-químicas se fazem importantes para avaliar as propriedades do material obtido e relacioná-las com o perfil de liberação do princípio ativo de interesse. Além disso, o material deve apresentar propriedades adequadas para a aplicação a que se destina. Nesse caso, a matriz, além de atuar como um reservatório do princípio ativo a partir do qual ele é liberado, também funcionará como um protetor para o mesmo visto que a azadiractina é fotossensível.

Outras aplicações podem ser atribuídas a essas matrizes propostas de acordo com eventuais interesses industriais e sociais como liberação de princípios ativos medicinais, no entanto, para cada tipo de dispositivo a ser desenvolvido são necessárias caracterizações relacionadas à forma de aplicação.

5.1. Fração gel

A determinação da fração gel permite avaliar a reticulação de matrizes poliméricas.

5.1.1. Matrizes

Os gráficos a seguir (FIGURA 8 e FIGURA 9) mostram a porcentagem de fração gel de matrizes preparadas em ciclos de 2 e 12 horas de congelamento/descongelamento secas em liofilizador e em temperatura ambiente, respectivamente.

FIGURA 8 - Fração gel (%) de amostras submetidas a ciclos de 2 e 12 horas de congelamento/descongelamento secas por liofilização (2L = ciclos de 2 h; 12L = ciclos de 12 h).

FIGURA 9 - Fração gel (%) de amostras submetidas a ciclos de 2 e 12 horas de congelamento/descongelamento sem secagem prévia (2S = ciclos de 2 h; 12S = ciclos de 12 h).

A amostra do primeiro ciclo de 2 horas não aparece no segundo gráfico devido à dificuldade em sua manipulação, uma vez que ela se desintegra facilmente durante o processo de agitação devido a pouca quantidade de cristalitos que são formados na estrutura no processo de retirada física.

As amostras secas em liofilizador (FIGURA 8) não apresentaram diferenças significativas nas porcentagens de fração gel dos diferentes ciclos demonstrando que apenas de 2 a 5% do total de moléculas de PVA não participam de nenhum cristal formado no processo de reticulação, quando esses resultados são comparados à FIGURA 9 podemos verificar que o processo de liofilização promoveu uma interferência na formação dos cristais após os ciclos térmicos atuando também como um processo de reticulação física induzindo à cristalização.

Quanto às amostras que não sofreram processo de secagem (FIGURA 9), podemos observar dois eventos diferentes. Para amostras com ciclos de 12 horas, há um percentual máximo de fração gel a partir do quarto ciclo, sendo, portanto, desnecessário o aumento na quantidade de ciclos a partir do quarto ciclo. Para amostras com ciclos de 2 horas observa-se que quanto mais ciclos térmicos são realizados, maior a porcentagem de fração gel, ou seja, a porcentagem de reticulação é proporcional ao número de ciclos.

Fica evidente que o processo de secagem interfere nos resultados das análises físico-químicas das amostras. Observa-se que há alterações nas estruturas das matrizes quando comparamos a secagem por liofilização (rápida) com a secagem em temperatura ambiente (lenta). Essas alterações podem estar relacionadas também com o processo pelo qual o equipamento de liofilização trabalha uma vez que para se submeter as amostras ao processo de liofilização as mesmas devem ser congeladas em nitrogênio líquido em temperatura de aproximadamente -196°C e até que o processo de retirada do gelo fosse completado as amostras permaneceram em temperatura de -40°C controlada pelo equipamento.

Ambas as amostras, a partir do terceiro ciclo, apresentam um alto grau de reticulação, dessa forma, de acordo com o dispositivo desejado, bastam apenas três ciclos de 2 ou de 12 horas para se obter o material desejado.

De acordo com os resultados obtidos a partir das caracterizações físico-químicas das matrizes, optou-se por preparar os dispositivos com 3 ciclos térmicos de 12 horas secos em temperatura ambiente, os quais também foram submetidos às mesmas caracterizações que as matrizes e com elas foram comparados.

5.1.2. Dispositivos

As tabelas a seguir mostram a porcentagem de fração gel obtida de amostras de PVA com agentes encapsulantes e PVA com agentes encapsulantes e óleo de Nim, respectivamente preparadas por 3 ciclos térmicos de 12 horas, sem secagem prévia.

TABELA 2 - Resultados do ensaio de fração gel de amostras de PVA com agentes encapsulantes.

Amostra	$\bar{x}_{mi}$ (g)	$\bar{x}_{mf}$ (g)	fração gel (%)
Aerosil R972	0,1882	0,1383	$73,5 \pm 0,1$
Aerosil R805	0,1866	0,1504	$80,6 \pm 0,2$
Kollidon SR	0,2230	0,1827	$81,9 \pm 0,3$
Fécula de mandioca	0,2474	0,2303	$96,9 \pm 0,1$
Amido pré-gelatinizado RD545	0,2438	0,2267	$96,8 \pm 0,1$
Maltodextrina Globe A1920	0,2910	0,2811	$96,6 \pm 0,3$

Observando a TABELA 2 e comparando os resultados com o terceiro ciclo do gráfico representado pela FIGURA 9, verificamos que apenas amostras com Aerosil R972 apresentam valores próximos aos obtidos nas matrizes, no entanto, as demais amostras apresentaram um aumento no grau de reticulação com a presença dos agentes encapsulantes, indicando que aparentemente os polissacarídeos atuam como centros de cristalização.

TABELA 3 - Resultados do ensaio de fração gel de amostras de PVA com agentes encapsulantes + óleo de Nim.

Amostra	$\bar{x}_{mi}$ (g)	$\bar{x}_{mf}$ (g)	fração gel (%)
Aerosil R972 + óleo de Nim	0,2083	0,1621	77,8 $\pm$ 0,2
Aerosil R805 + óleo de Nim	0,2091	0,1710	81,8 $\pm$ 0,1
Kollidon SR + óleo de Nim	0,2477	0,2104	86,4 $\pm$ 0,3
Fécula de mandioca + óleo de Nim	0,2899	0,2552	94,11 $\pm$ 0,1
Amido pré-gelatinizado RD545 + óleo de Nim	0,2167	0,2024	97,6 $\pm$ 0,1
Maltodextrina Globe A1920 + óleo de Nim	0,2316	0,2120	96,9 $\pm$ 0,1

De acordo com os resultados apresentados na TABELA 2 e comparando-os aos resultados da TABELA 3, verificamos que a presença do óleo de Nim não interfere significativamente no grau de reticulação dos dispositivos.

5.2. Intumescimento

O teste de intumescimento avalia a quantidade de água absorvida pelo material polimérico no equilíbrio, em período de tempo suficiente para que o sistema atinja volume constante.

O grau de intumescimento demonstra a densidade de reticulação alcançada pelo material.

Os resultados do teste de intumescimento podem ser utilizados em conjunto com os de fração gel, visto que ambos revelam dados referentes à qualidade da reticulação do material obtido. Nesse caso, o resultado de um teste pode ser reforçado pelo outro.

5.2.1. Matrizes

As figuras a seguir mostram a curva de grau de intumescimento (%) em função do tempo para amostras de PVA de 1 a 7 ciclos no período de 2 e 12 horas de congelamento/descongelamento, secas por liofilização e em temperatura ambiente, respectivamente. As barras de erros compreendem valores entre 0,1 e 0,5 e devido aos baixos valores não são visíveis em cada ponto dos gráficos.

FIGURA 10- Ensaio de intumescimento das amostras de PVA de 1 a 7 ciclos de 2 horas secas em liofilizador (I a VII = número de ciclos; 2 e 12 = quantidade de ciclos; L = secas por liofilização).

FIGURA 11 - Ensaio de intumescimento das amostras de PVA de 1 a 7 ciclos de 12 horas secas em liofilizador (I a VII = número de ciclos; 12 = quantidade de ciclos; L = secas por liofilização).

De acordo com a FIGURA 10 e FIGURA 11, observa-se que todas as amostras apresentam um perfil de intumescimento muito próximo entre elas, tanto para amostras com ciclos de 2 horas como para amostras com ciclos de 12 horas.

Comparando-se os resultados de fração gel e intumescimento das amostras secas por liofilização, é possível observar concordância nos resultados sugerindo também que o processo de liofilização atuou na reticulação física da matriz de PVA.

Com esses dados podemos sugerir que apenas o processo de liofilização pode ser considerado suficiente para promover um alto grau de reticulação de soluções de PVA talvez sem a necessidade de submeter às amostras a ciclos térmicos de congelamento/descongelamento, o que sugere-se que seja testado em estudos posteriores.

Ao analisarmos os resultados de amostras sem secagem prévia (FIGURA 12 FIGURA 13), é possível notar que há diferenças significativas entre os percentuais de intumescimento das diferentes amostras testadas, sendo que tanto para ciclos de 2 horas como para ciclos de 12 horas quanto maior a quantidade de ciclos a que as amostras são

submetidas, menor o percentual de intumescimento, indicando uma densidade de reticulação crescente com o aumento do número de ciclos térmicos.

FIGURA 12 - Ensaio de intumescimento das amostras de PVA de 1 a 7 ciclos de 2 horas sem secagem prévia (I a VII = número de ciclos; 12 = quantidade de ciclos; S = sem secagem prévia).

FIGURA 13 - Ensaio de intumescimento das amostras de PVA de 1 a 7 ciclos de 12 horas sem secagem prévia (I a VII = número de ciclos; 12 = quantidade de ciclos; S = sem secagem prévia).

5.2.2. Dispositivos

A FIGURA 14 mostra a curva de grau de intumescimento (%) em função do tempo para amostras de dispositivos de PVA contendo agentes encapsulantes e a FIGURA 15 mostra a curva do grau de intumescimento para amostras de PVA contendo agentes encapsulantes e óleo de Nim.

Para as amostras de dispositivos, assim como na fração gel, optou-se por fazer o ensaio de ntumescimento com amostras secas em temperatura ambiente.

FIGURA 14 - Grau de intumescimento (%) em função do tempo (h) para amostras de PVA contendo agentes encapsulantes.

FIGURA 15 - Grau de intumescimento (%) em função do tempo (h) para amostras de PVA contendo agentes encapsulantes e óleo de Nim.

De acordo com os resultados observados na FIGURA 14 e FIGURA 15, podemos verificar que Kollidon SR, Aerosil R805 e Aerosil R972 aumentam o grau de intumescimento em relação à fécula, amido e maltodextrina.

Quando comparamos o gráfico da figura 5 com o da figura 6, podemos perceber que quando adicionamos o óleo de Nim há uma diminuição no grau de intumescimento dos dispositivos, podendo esse fenômeno, ser atribuído à propriedade hidrofóbica do óleo de Nim contido nas matrizes de PVA, dificultando a absorção de água.

5.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Esse ensaio foi realizado com o objetivo de se verificar a interação dos agentes encapsulantes com e sem óleo e a matriz de PVA, no entanto, apenas algumas amostras foram selecionadas para a realização do ensaio sendo: a) PVA 10% reticulado por 3 ciclos térmicos de 2 horas; b) PVA 10% reticulado por 3 ciclos térmicos de 12 horas; c) PVA 10% + Aerosil R805; d) PVA 10% + Aerosil R805 e óleo; e) PVA 10% + fécula de mandioca e f) PVA 10% + fécula de mandioca e óleo, sendo PVA 10% + agentes encapsulantes com e sem óleo também reticulados por 3 ciclos térmicos de 12 horas e todas as amostras secas em temperatura ambiente até massa constante.

As ilustrações a seguir revelam que tanto o número de ciclos como a presença de agentes encapsulantes e óleo promovem uma alteração tanto na fusão dos cristais como na cristalização das amostras analisadas.

É importante ressaltar que algumas amostras apresentaram eventos endotérmicos em temperaturas muito próximas a 150°C, momento onde se deu início à análise, bem como há uma variação nas massas das amostras utilizadas, portanto, os dados observados nas curvas de fusão e de cristalização podem ter alguma interferência.

Em todas as ilustrações é possível verificar, a ocorrência de um pico endotérmico em aproximadamente 220°C indicando a característica do PVA, conforme no item 3.4. No entanto, quando comparamos o PVA 10% reticulado por 3 ciclos de 2 horas (FIGURA 16) com o PVA 10% reticulado por 3 ciclos de 12 horas (FIGURA 17) podemos verificar a presença de um novo pico endotérmico para PVA de 12 horas entre 190°C e 200°C, sugerindo que os ciclos térmicos podem ter atuado em formações de cristalitos menores de

forma que estes apresentem menor ponto de fusão, uma vez que o tempo de descongelamento maior permite que nesse período as moléculas do PVA tenham tempo suficiente para se moverem e formar regiões onde ocorram ligações de hidrogênio formando diferentes tamanhos de cristalitos.

Quando observamos os dados sobre a cristalização das amostras preparadas por ciclos de 2 e de 12 horas, podemos confirmar que quanto mais ciclos a amostra é submetida, maior será sua cristalização, visto que as amostras de 2 horas cristalizam com uma menor temperatura do que amostras de 12 horas.

FIGURA 16 - Termograma de DSC de PVA 10% reticulado por 3 ciclos de 2 horas.

FIGURA 17 - Termograma de DSC de PVA 10% reticulado por 3 ciclos de 12 horas.

Ao analisarmos as amostras de PVA 10% + fécula (FIGURA 18) verificamos um aumento na temperatura de fusão dos dois picos o que pode ser atribuído a um evento de nucleação entre átomos da fécula e do PVA.

FIGURA 18 - Termograma de DSC de PVA 10% + fécula de mandioca.

Quando comparamos PVA 10% + fécula e PVA 10% + fécula e óleo de Nim (FIGURA 19) temos um evento bastante intenso em aproximadamente 190°C em um deslocamento de aproximadamente 5°C na fusão do PVA, sendo menor com a presença do óleo de Nim, sugerindo que o óleo interferiu de forma significativa na formação dos cristalitos demonstrando um efeito plastificante na matriz de PVA.

FIGURA 19 - Termograma de DSC de PVA 10% + fécula de mandioca e óleo de Nim.

Na FIGURA 20, da análise de amostras de PVA 10% + Aerosil R805 verificamos que a presença da sílica modificada impediu a formação de duas regiões cristalinas que são observadas em todas as amostras preparadas por ciclos de 12 horas. Esse fenômeno pode estar relacionado à formação de estruturas cristalinas de PVA com uma distribuição de tamanhos de caráter normal, originando um pico unimodal, podendo a formação de cristalitos durante dos ciclos térmicos ter sido mais lenta, assim como nos ciclos de 2 horas.

FIGURA 20 - Termograma de DSC de PVA 10% + Aerosil R805.

Quando o óleo de Nim é adicionado, podemos verificar que os dois picos de cristais voltam a aparecer no termograma (FIGURA 21), demonstrando que o óleo impediu o efeito observado na presença de apenas Aerosil R805, no entanto, a cristalização de ambas, após o processo de fusão não apresenta diferenças significativas.

FIGURA 21 - Termograma de DSC de PVA 10% + Aerosil R805 e óleo de Nim.

5.4. Difractometria de Raio-X

De acordo com a FIGURA 22 podemos verificar um pico principal em aproximadamente $2\theta \cong 20^\circ$ que podem ser atribuídos à difração dos cristaltos do PVA na amostra (RICCIARDI et al., 2005).

Ao analisar os dados consideramos que este ensaio não foi considerado apropriado para a análise desejada uma vez ao comparar a amostra de PVA 10% sem ciclos com amostra de PVA 10% + maltodextrina reticulada por 3 ciclos de 12 horas verificamos presença de picos heterogêneos. Quando o ensaio é repetido em regiões diferentes da mesma amostra (PVA 10% + maltodextrina) os picos continuam apresentando variações, indicando que numa mesma amostra, a cristalização se dá de maneira diferente de acordo com a região e que os picos observados nas regiões abaixo do 20 não podem ser atribuídos à presença do agente encapsulante uma vez que mesmo quando é feito o Raio-X em amostras contendo apenas PVA submetidos a ciclos térmicos novos picos abaixo do 20 são apresentados. Por esse motivo, optou-se por não dar continuidade aos ensaios.

FIGURA 22 – Difratoograma de Raio-X de amostras de PVA 10% sem ciclos e PVA + maltodextrina em diferentes regiões da mesma amostra.

5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura em fraturas de amostras permite a visualização da formação de poros nas matrizes e nos dispositivos.

5.5.1. Matrizes

ILUSTRAÇÃO 12 - Fotomicrografias de fraturas de amostras de PVA submetidas a 3 ciclos de congelamento/descongelamento. A) ciclos de 2 horas. B) ciclos de 12 horas.

De acordo com as imagens obtidas, é possível observar que amostras submetidas a ciclos de 2 horas apresentam poros maiores que as amostras submetidas a ciclos de 12 horas. Essa análise sugere que, como esperado, quanto maior a duração do ciclo, mais reticulada a matriz, uma vez que há mais tempo para a formação dos cristais.

5.5.2. Dispositivos

ILUSTRAÇÃO 13 - Fotomicrografias dos dispositivos com óleo de Nim encapsulado. Aumento de 500x. A) amido pré-gelatinizado RD545. B) maltodextrina Globe A1920 C) Aerosil R805. D) Aerosil R972 .E) fécula de mandioca e F) Kollidon SR.

As imagens da ILUSTRAÇÃO 13 mostram os dispositivos contendo óleo de Nim em seus respectivos agentes encapsulantes. Podemos observar que, com excessão de amido pré-gelatinizado RD545, todos os demais apresentam-se densos e sem os poros existentes

nas matrizes observadas na FIGURA 7, este fato pode ser atribuído ao processo de secagem que possivelmente tenha sido mais lento devido a presença do óleo de Nim nos dispositivos, promovendo, dessa maneira, alterações nos poros do material.

5.6. Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade permite avaliar a biocompatibilidade do material testado através de ensaio *in vitro* pelo qual se verifica a reação biológica induzida nas células testadas tendo como parâmetro a viabilidade celular.

O teste realizado neste trabalho foi pelo método de incorporação do vermelho neutro onde, através de leitura da densidade ótica, é possível quantificar a morte celular uma vez que o corante utilizado é capaz de penetrar e se fixar nas células vivas.

Com os resultados de densidade ótica obtidos (TABELA 4), foram calculadas as porcentagens de viabilidade celular em relação ao controle de células do ensaio, consideradas 100%. Os valores foram lançados em gráfico em função da concentração do extrato, obtendo-se as curvas de viabilidade celular das amostras analisadas e dos controles.

TABELA 4- Resultados da viabilidade celular do ensaio de citotoxicidade *in vitro* de amostras de PVA, óleo de Nim, e PVA com agentes encapsulantes.

CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO (%)	VIABILIDADE CELULAR (%)									
	Controle positivo	Controle negativo	Óleo de Nim	PVA	PVA Fécula de mandioca	PVA Amido pré- gelatinizado	PVA maltodextrina	PVA Aerosil R805	PVA Aerosil R972	PVA Kollidon SR
100	89 ± 10	1 ± 1	91 ± 11	102 ± 7	110 ± 10	85 ± 3	110 ± 1	95 ± 7	77 ± 7	100 ± 2
50	96 ± 1	84 ± 2	97 ± 12	92 ± 10	112 ± 9	87 ± 2	110 ± 5	99 ± 8	83 ± 10	103 ± 5
25	97 ± 3	104 ± 1	102 ± 4	98 ± 1	105 ± 12	89 ± 2	115 ± 12	100 ± 2	94 ± 14	115 ± 2
12,5	99 ± 6	105 ± 12	103 ± 4	87 ± 10	119 ± 10	91 ± 1	113 ± 5	100 ± 2	94 ± 10	104 ± 5
6,25	92 ± 15	99 ± 17	100 ± 15	93 ± 4	113 ± 13	88 ± 2	107 ± 12	100 ± 3	84 ± 13	99 ± 1

FIGURA 23 - Curvas de viabilidade celular de amostras de óleo de Nim, PVA e PVA com agentes encapsulantes no ensaio de citotoxicidade *in vitro* pelo método de incorporação do vermelho neutro.

De acordo com o gráfico obtido (FIGURA 23), todas as amostras analisadas, com exceção do controle positivo, apresentaram curvas de viabilidade celular acima da linha do $IC_{50\%}$ indicando não serem citotóxicas. O índice de citotoxicidade é obtido na intersecção da curva de viabilidade celular e a linha de 50% de viabilidade (IC_{50}) no gráfico. O $IC_{50\%}$ do controle positivo foi de aproximadamente 60 significando que o extrato, na diluição de 60% causa morte de 50% da população celular no ensaio, ou seja, apresentou comportamento citotóxico.

Como o ensaio detecta a capacidade das amostras em causar morte celular como consequência de danos nas funções básicas das células este apresenta uma boa correlação com a toxicidade aguda em animais e no homem.

Assim sendo, os resultados indicam que as amostras testadas são biologicamente seguras, cumprindo um dos requisitos de segurança exigidos para desenvolvimento de biomateriais.

5.7. Bioensaio com pulgas

Momentos após a colocação das pulgas nos tubos de ensaio não foi observado nenhum comportamento adverso das pulgas de maneira que elas permaneceram sobre o papel filtro contendo o óleo de Nim impregnado demonstrando que este não demonstrou efeito repelente.

Passado o período de 24 horas no qual as pulgas permaneceram nos tubos contendo os papéis impregnados com o óleo de Nim foi feita uma análise visual. O critério empregado para avaliar a morte ou não dos insetos foi o da motilidade. Toda pulga que apresentava um mínimo de motilidade foi considerada viva. Observou-se que parte das pulgas havia morrido. Dessa forma, foram contadas as pulgas mortas e o resultado obtido foi de 40% de letalidade e algumas sobreviventes apresentaram alterações no comportamento letárgico como redução nos movimentos (TABELA 5). Observa-se ainda, que no grupo controle houve apenas uma morte indicando que, de fato, as pulgas mortas do grupo tratado sofreram ação do Nim.

TABELA 5 – Resultados da mortalidade *in vitro* das pulgas adultas na presença de óleo de Nim após 24 horas.

Grupo controle (tubos)	Vivas	Mortas	Total	Grupo tratado (tubos)	Vivas	Mortas	Total
1	10	0	10	1	4	8	12
2	10	0	10	2	5	5	10
3	10	0	10	3	1	9	10
4	9	0	9	4	3	7	10
5	11	0	11	5	5	5	10
6	9	1	10	6	9	1	10
7	10	0	10	7	9	1	10
8	11	0	11	8	10	1	11
9	10	0	10	9	9	1	10
10	10	0	10	10	7	3	10
Total	100	1	101	Total	62	41	103

Com isso, podemos afirmar que a aplicação do óleo de Nim para o controle de pulgas *Ctenocephalides felis* é algo promissor uma vez que trata-se de um produto de origem natural, com muito baixa toxicidade, e que, por ser biodegradável e fotossensível, apresenta persistência no ambiente de apenas poucos dias de forma a não causar problemas

ambientais, sendo, dessa forma, o sistema de liberação controlada uma maneira bastante interessante da aplicação tendo em vista que o mesmo irá manter a liberação de doses numa taxa e num período de tempo desejados.

Partindo das observações realizadas após análise do efeito do óleo de Nim sobre as pulgas num período de 24 horas, podemos sugerir um aumento na concentração do óleo a ser utilizado no desenvolvimento do sistema de liberação controlada permitindo que seja possível um aumento significativo na mortalidade das pulgas. Para tanto, seriam necessários novos testes com pulgas de forma a verificar em qual concentração seria possível atingir o máximo de mortalidade na população do grupo tratado.

Embora não se tenha encontrado a presença de azadiractina, salanina, nimbina ou meliantriol no óleo de Nim utilizado, é conhecido que em óleos vegetais existe uma gama muito grande de diferentes compostos que atuam em conjunto promovendo diferentes efeitos biológicos e a mortalidade das pulgas no bioensaio pode ser atribuída a qualquer molécula presente no óleo o que poderia ser explorado em ensaios futuros.

Há também a necessidade de se investigar o mecanismo de ação do efeito inseticida do óleo de Nim sobre as pulgas, tendo em vista que não são encontrados trabalhos publicados sobre tal efeito em pulgas adultas do gênero *Ctenocephalides* ou mesmo outros gêneros, sendo que a maioria dos trabalhos publicados são voltados para insetos considerados pragas na agricultura os quais ingerem folhas contendo o Nim aplicado por pulverização ou extratos que, ao entrar em contato com os diferentes estágios dos insetos interferem no comportamento, nos processos reprodutivos, alimentares e de crescimento e alteram funções hormonais.

5.8. Doseamento de princípios ativos do óleo de Nim

Conforme descrito nos métodos para doseamento do óleo de Nim, no item 4.2.5, o objetivo principal foi realizar o doseamento do princípio ativo azadiractina, com base em um padrão com 95% de pureza, o qual não foi identificado na amostra do óleo de Nim utilizado, com isso verificou-se se havia então algum outro princípio ativo com propriedade repelente/inseticida comumente citado na literatura, o que também não foi identificado. Por essas razões, optou-se por atribuir um marcador utilizando-se algum pico presente na amostrado óleo de Nim, o qual foi denominado M2 e analisado em CLAE/UV-Vis.

5.8.1. Coletadas em “swab”

A TABELA 6 mostra os resultados obtidos após análise em CLAE/UV-Vis da cinética de liberação dos dispositivos preparados com os diferentes agentes encapsulantes, coletados em swab.

TABELA 6 - Resultados da cinética de liberação coletadas em swab.

Amostra	Concentração (mg/mL)					
	0 h	1h	2h	6h	12h	24h
PVA + amido	1,3	1,1	1,5	0,9	1,0	0,4
PVA + fécula	1,3	0,3	0,6	0,5	0,5	0,2
PVA + Kollidon SR	0,5	1,0	0,4	1,6	0,5	0,2
PVA + maltodextrina	3,4	3,2	1,7	0,5	1,0	0,5
PVA + Aerosil R805	0,7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
PVA + Aerosil R972	2,1	1,0	0,9	1,1	1,3	2,1

O gráfico representado pela FIGURA 24, plotado a partir da TABELA 6, mostra o perfil da cinética de liberação das amostras coletadas por swab, onde podemos verificar que, de acordo com cada agente encapsulante a liberação ocorre numa quantidade e num tempo diferentes.

FIGURA 24 – Cinética de liberação de amostras coletadas em swab.

Observa-se ainda, que as maiores quantidades liberadas, exceto com Kollidon SR, ocorrem na primeira coleta, o que podemos atribuir às moléculas que ficam livres na superfície e, portanto, depois de retiradas, após 1 hora de liberação não são encontradas as mesmas quantidades iniciais.

Com o passar do tempo, as amostras vão sofrendo processo de secagem que contribui para a liberação do óleo de Nim. Nesse processo de secagem, cada agente encapsulante, de acordo com sua afinidade pelo óleo permite maior ou menor liberação do princípio ativo.

Sabendo que em todas as amostras as quantidades de óleo de Nim encapsuladas nos dispositivos são as mesmas, temos que de todos os agentes encapsulantes utilizados, Kollidon SR apresenta maior afinidade pelo óleo de Nim quando comparado com os demais, seguido de PVA + Aerosil R805, PVA + amido e PVA + fécula, respectivamente. Dos que apresentam menor afinidade pelo óleo de Nim observamos, em primeiro lugar PVA + maltodextrina seguido de PVA + Aerosil R972, de acordo com as quantidades de princípios ativos encontrados nas análises.

Quanto à liberação após a primeira coleta, em 0 horas, se levarmos em conta que as duas próximas coletas apresentam um intervalo de uma hora entre elas e as demais, um intervalo muito maior, de várias horas, podemos verificar que, com exceção de PVA + Kollidon SR e PVA + maltodextrina, a maior liberação se dá nas primeiras horas e depois ela passa a ocorrer de maneira lenta e praticamente constante.

Para PVA + Kollidon, observa-se que a liberação aumenta com o tempo até a secagem do material (24 horas), momento em que o óleo de Nim começa a ser esgotado. Já o PVA + maltodextrina, nas duas primeiras horas a liberação se dá muito lentamente EM até 6 horas e depois passa a ficar praticamente constante.

5.8.2. Liberadas em solução

A TABELA 6 mostra os resultados obtidos após análise em CLAE/UV-Vis da cinética de liberação dos dispositivos preparados com os diferentes agentes encapsulantes, liberadas em solução.

TABELA 7- Resultados da cinética de liberação dos dispositivos por CLAE/UV-Vis liberadas em solução.

Amostra	Concentração (mg/mL)				
	0,5h	1h	2h	3h	6h
PVA + amido	37,0	17,7	7,9	1,1	0,5
PVA + fécula	49,3	16,2	5,9	0,6	0,5
PVA + Kollidon SR	49,1	16,8	7,2	1,8	0,6
PVA + maltodextrina	53,1	13,5	4,5	0,6	0,3
PVA + Aerosil R805	30,4	10,8	3,5	0,2	0,4
PVA + Aerosil R972	67,4	19,3	7,6	0,6	0,4

Com os dados obtidos da TABELA 7, a FIGURA 25 apresenta o gráfico com a cinética de liberação dos princípios ativos marcados.

Conforme podemos observar, embora haja uma discreta diferença nos perfis de liberação, todos os agentes encapsulantes permitem que esta ocorra em quantidades e tempos semelhantes mantendo-se a proporção do que foi coletado nos primeiros 30 minutos, indicando que, para o dispositivo proposto, são considerados adequados uma vez que a afinidade do óleo de Nim pelos agentes encapsulantes é tal que permite que os princípios ativos sejam totalmente liberados ao longo do tempo.

FIGURA 25 - Curvas da cinética de liberação dos dispositivos liberados em solução.

Analisando-se a afinidade do óleo de Nim pelos agentes encapsulantes utilizados após a liberação em solução temos PVA + Aerosil R805 e PVA + amido como as amostras que menos liberaram o óleo de Nim na primeira coleta, respectivamente. Quanto ao que apresentou menor afinidade pelo óleo de Nim verificamos PVA + Aerosil R972.

A liberação realizada em solução faz com que esse processo seja forçado uma vez que os dispositivos sofrem intumescimento com o tempo promovendo um alongamento nas cadeias poliméricas e consequentemente um aumento em regiões não cristalinas do material permitindo o desprendimento de moléculas nelas inseridas com a passagem da solução.

Os perfis da cinética de liberação em relação à afinidade do óleo de Nim pelas matrizes não são os mesmo quando comparados às amostras coletadas em swab e isso pode ser devido à presença de água com acetonitrila na solução o que pode interferir nesse processo uma vez que a solução utilizada na liberação pode interagir com o óleo de Nim, encapsulantes ou mesmo com o PVA. Quanto às quantidades liberadas, conforme descrito anteriormente, por tratar-se de um método onde a liberação é acelerada não é possível se fazer um comparativo com as amostras coletadas em swab, no entanto pode-se apenas observar que todos os agentes encapsulantes utilizados permitem que ocorra a liberação do óleo de Nim e seus princípios ativos.

6. CONCLUSÃO

A técnica de ciclos térmicos demonstrou-se eficiente para reticular hidrogéis de PVA;

A quantidade e duração dos ciclos de congelamento e descongelamento irão determinar as propriedades físico-químicas das matrizes obtidas de forma a proporcionar diferentes possibilidades de acordo com o material desejado;

O processo de secagem em temperatura ambiente e liofilização interferem no grau de reticulação, visto que após liofilização observa-se um alto grau de cristalização das amostras o que não é observado nas amostras não liofilizadas;

Hidrogéis reticulados por ciclos térmicos e secos por liofilização apresentam grau de reticulação próximo a 90%, portanto para matrizes secas por liofilização o ideal seria a redução do número e da duração dos ciclos térmicos, tornando-se desnecessário o gasto de tempo com repetições de ciclos;

Os agentes encapsulantes demonstraram-se eficientes em relação ao encapsulamento do óleo de Nim e dispersão na solução aquosa de PVA, sendo que para Aerosil a quantidade utilizada para encapsular o óleo de Nim foi menor do que para fécula de mandioca, maltodextrina, Kollidon SR e amido pré-gelatinizado;

Os ensaios físico-químicos como fração gel, intumescimento e DSC demonstraram que além da quantidade e duração dos ciclos térmicos e do processo de secagem, a presença de encapsulantes e de óleo de Nim nos dispositivos promovem alterações no material;

O teste de citotoxicidade demonstrou ausência de toxicidade para todas as amostras;

O bioensaio com pulgas in vitro demonstrou que o óleo de Nim atua como um inseticida com taxa de letalidade de 40% em 24 horas.

Embora não tenha sido identificado nenhum componente conhecido como repelente/inseticida no óleo de Nim analisado, houve uma mortalidade significativa nas pulgas testadas indicando a presença de componente com propriedade inseticida e não repelente para pulgas *Ctenocephalides felis felis*. Componente este que possivelmente seja volátil, uma vez que a literatura cita o efeito inseticida da azadiractina, salanina, nimbina ou meliantriol após a ingestão das moléculas. Nesse caso, as pulgas não ingeriram o óleo de Nim mas apenas tiveram contato físico e pelo ar.

Os dispositivos desenvolvidos demonstraram diferentes perfis de liberação dos princípios ativos do óleo de Nim, de forma que todos foram considerados adequados para a proposta, no entanto, existe a possibilidade de adição de outros polímeros para que os dispositivos tenham um tempo de vida útil maior como retardamento do tempo de secagem.

APÊNDICE A – Fluxograma de preparo de amostras de matrizes e dispositivos

**APÊNDICE B – Cópia do certificado sobre manutenção de colônias de pulgas
Ctenocephalides felis felis em laboratório (frente)**

<p>SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS INSTITUTO BIOLÓGICO</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB</p>	<p style="text-align: center;">CERTIFICADO</p> <p>Certificamos que o Protocolo nº 110/11 sobre o Projeto: "Manutenção de colônia de pulgas, <i>Ctenocephalides felis felis</i>, em laboratório.", sob a responsabilidade de Edna Clara Tucci, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA).</p> <p>Protocolo aprovado pela CETEA-IB em 23 de março de 2011.</p> <p>São Paulo, 23 de março de 2011.</p> <p style="text-align: right;"> Ricardo Spacagna Jordão Coordenador da CETEA-IB </p>
--	--

**APÊNDICE C – Cópia do certificado sobre manutenção de colônias de pulgas
Ctenocephalides felis felis em laboratório (verso)**

CETEA - IB

Registro

Número : 110/11

Livro : 02

Folha : 10

Data: 23/03/11

REFERÊNCIAS

AKELAH, A. Novel utilizations of conventional agrochemicals by controlled release formulations. **Mat. Sci. Eng.: C.** v. 4, n. 2, p. 83-98, 1996.

ANKIT K.; KUMAR, S.P.; ARUNABHA, B. Microencapsulation as a novel drug delivery system. **Int. Pharm. Sci.**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2011.

ANWAR, S.H.; WEISSBRODT, J.; KUNZ, B. Microencapsulation of Fish Oil by Spray Granulation and Fluid Bed Film Coating. **J. Food Sci.**, v. 75, n. 6, p. E359-E371, 2010.

ARAÚJO, S.A.C. de; TEIXEIRA, M.F.S.; DANTAS, T.V.M.; MELO, V.S.P.; LIMA, F.E.S.; RICARTE, A.R.F.; COSTA, E.C.; MIRANDA, A.M. Usos potenciais de *Melia azedarach* L. (Meliaceae): um levantamento. **Arq. Inst. Biol.**, v. 76, n. 1, p. 141-148, 2009.

AVELAR D.M. de; BUSSOLOTTI, A.S.; RAMOS, M. do C.A.; LINARDI, P.M. Endosymbionts of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) obtained from dogs captured in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **J. Invertebr. Pathol.** v. 94, n. 2, p. 149–152, 2007.

BENEKE, C.E.; VILJOEN, A.M.; HAMMAN, J.H. Polymeric plant-derived excipients in drug delivery. **Mol.**, v.14, n. 7, p. 2602-2620, 2009.

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R.K.; BANDYOPADHYAY, U. Biological and medicinal properties of neem (*Azadiracta indica*). **Cur. Sci.** v. 82, n. 11, p. 1336-1345, jun. 2002.

CHIN, H.C. Infestation with the cat flea, *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: pulicidae) among students in Kuala Lumpur, Malasya. Southeast Asian. **J. Trop. Med. Public Heath**, v. 41, n. 6, p. 1331-1334, 2010.

COATS, J.R. Risks from natural versus synthetic insecticides. **Annu. Rev. of Entomol.** v. 39, n. 1, p. 489-515, 1994.

DETHIER, V.G. Mechanism of host-plant recognition. **Entomol. Exper. App.**, v. 31, n.1, p. 49-56, 1982.

DEVI, N.; MAJI, T.K.. **Neem Seed Oil: Encapsulation and Controlled Release - Search for a Greener Alternative for Pest Control, Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management**. Margarita Stoytcheva (Ed.), 2011.

DORN, A.; RADEMACHER, J.M.; SEHN, E. Effect of azadirachtin on the moulting cycle, endocrine system, and ovaries in last-instar larvae of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. **J. Insect Phys.**, v. 32, n.3 p. 231-238, 1986.

DeMERLIS, C.C. SCHONEKER, D.R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). **Food and Chem. Toxicol.**, v. 41, n. 3, p. 319-326, 2003.

DRYDEN, M. W.; BROCE, A.B. Development of a trap for collecting newly emerged *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in homes. **J. Med. Entomol.**, v. 30, n. 5, p. 901-906, 1993.

DRYDEN, M.W.; RUST, M.K. The cat flea: biology, ecology and control. **Vet. Parasitol.**, v. 52, n. 1-2, p. 1-19, 1994.

EL-SAYED, S.; MAHMOUD, K.H.; FATAH, A.A.; HASSEN, A .DSC, TGA and dielectric properties of carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol blends. **Phys. B**, v. 406, n. 21, p. 4068-4076, 2011.

FORTUNATO, K.A.; DOILE, M.M.; SCHMÜCKER, I.C.; SCHUCKO, S.K.; SILVA, M.A.S.RODRIGUES, P.O. Influência da complexação com β -ciclodextrina sobre liberação do acetato de dexametasona a partir de matrizes hidrofílicas de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e polioxetileno (PEO). **L. Amer. J. Phar.**, v. 26, n. 4, p.513-521, 2007.

FORIM, M.R.; MATOS, A.P.; SILVA, M.F.G.F da; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B. Uso de CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de Nim: reprodutibilidade da ação inseticida. **Quim. Nova**. v. 33, n. 5, p. 1082-1087, 2010.

GUERRINI, V. H.; KRITICOS, C. M. Effects of azadirachtin on *Ctenocephalides felis* in the dog and the cat. **Vet. Parasitol.** v. 74, p. 289-297, 1998.

JAIM, K.K. Drug delivery systems: an overview. **Methods Mol. Biol.**, v. 437, p.1-50, 2008.

KAUSHIK, N. Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC. **Anal Bioanal Chem.**, v. 374, n. 7-8, p. 1199-1204, 2002.

KELLY, C.M.; DeMERLIS, C.C.; SCHONEKER, D.R.; BORZELLECA, J.F. Subchronic toxicity study in rats and genotoxicity tests with polyvinyl alcohol. **Food and Chem. Toxicol.**, v. 41, n. 5, p. 719-727, 2003.

KIM, H.J.; KIM, T.H.; KANG, K.C.; PYO, H.B.; JEONG, H.H. Microencapsulation of rosmarinic acid using polycaprolactone and various surfactants. **Int J Cosm Sci.**, v. 32, n. 3, p. 185-191, 2012.

KUMAR, P.; POEHLING, H.M.; BORGEMEISTER, C. Effects of different application methods of azadirachtin against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius (Hom., Aleyrodidae) on tomato plants. **J. Appl. Entomol.**, v. 129, n. 9-10, p.489-497, 2005.

LANDAU, S.Y.; PROVENZA, F.D.; GARDNER, D.R.; PFISTER, J.A.; KNOPPEL, E.L.; PETERSON, C.; KABABYA, D.; NEEDHAM, G.R.; VILLALBA, J.J. Neem-tree (*Azadirachta indica* Juss) extract as a feed additive against the American dog tick (*Dermacentor variabilis*) in sheep (*Ovis aries*). **Vet. Parasitol.**, v.165, p. 311-317, 2009.

LEE, S.M. et al. Insecticidal constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae) – naturally occurring pest bioregulators. v. 449, n. 1, p. 293-304, 199.

LINARDI, P.M. Biologia e epidemiologia das pulgas. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, suplemento, p. 103-106, 2004.

LIU, Y.; GEEVER, L.M.; KENNEDY, J.E.; HIGGINBOTHAM, C.L.; CAHILL, P.A.; McGUINNESS, G.B.. Thermal behavior and mechanical properties of physically crosslinked PVA/gelatina hydrogels. **J Mech Behav Biomed Mater.**, v. 3, n. 2, p. 203 – 209, 2010.

MORDUE (LUNTZ), A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **An. Soc. Entomol. Brasil.**, v. 29, n.4, p. 615-632, 2000.

MORGAN, E.D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorg. Md. Chem.** v.17, p. 4906-4105, 2009.

NAGPAL, B.N.; SRIVASTAVA, A.; VALECHA, N.; SHARMA, V.P. Repellent action of neem cream against *An. culicifacies* and *Cx. quinquefasciatus*. **Current Sci.**, v. 80, n. 10, p. 1270-1271, 2001.

NUGENT, M.J.D.; HIGGINBOTHAM, C.L. Preparation of a novel freeze thawed poly(vinyl alcohol) composite hydrogel for drug delivery applications. **Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 67, n. 2, p. 377-386, 2007.

OLIVEIRA, A.C de; MACHADO, J. de A.C.; ANTÔNIO, N.S.; NEVES, M.F. *Ctenocephalides canis e Ctenocephalides felis*: revisão da literatura. **Rev. Cient. Eletr. Med. Vet.** Ano VI, n.11, 2008.

PARK, J.S. Thermal and dynamic mechanical analysis of PVA/MC blend hydrogels. **Pol.**, v. 42, n. 9, p. 4271 – 4280, 2001.

PINTO, J.S.S.; LANÇAS F.M. Hidrólise do óleo de Azadirachta indica em água subcrítica e determinação da composição dos triglicerídeos e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução a alta temperatura e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 2, p. 394-397, jan. 2010.

REIF, K. E.; MACALUSO, K. R. Ecology of *Rickettsia felis*: A Review: **J. Med. Entomol.**, v. 46, n. 4, p. 723-736, 2009.

RIBEIRO, F.A.; CORREIA, T.R.; FERNANDES, J.I.; MELO, R.M.P. dos S; VIEIRA, V.P. da C.; BEZERRA, L. de L.; SCOTT, F.B. Atividade do extrato de Nim sobre o desenvolvimento embrionário de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.17, supl.1, p.87-91, 2008.

RICCIARDI, R.; MANGIAPIA, G.; Lo CELSO F.; PADUANO, L.; TRIOLO, R.; AURIEMMA, F.; De ROSA, C.; LAUPRÊTRE, F. Structural Organization of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Obtained by Freezing and Thawing Techniques: A SANS Study. **Chem. Mater.**, v. 17, n. 5 p. 1183-1189, 2005.

RODRIGUES, S.N.; FERNANDES, I.; MARTINS, I.M.; MATA, V.G.; BARREIRO, F.; RODRIGUES, A.E. Microencapsulation of limonene for textile application. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 47, n. 12, p. 4142–4147, 2008.

RUST, M. K. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs: Trends in Parasitology. v. 21, n. 5, p. 232-236, 2005.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *azadirachta indica*: KAnn. **Rev. Entomol.**, v. 35, n. 1, p. 271-297, 1990.

SILVA, H.C.; VERONEZ, V.A.; CASTAGNOLLI, K.C; PRETTE, N.; BORGES, F.A.; MIYASAKA, D.S.; OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J. Implantação de colônia de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) e determinação do período de desenvolvimento dos estágios imaturos sob condições controladas. **Ambiência – Rev. Setor Cienc. Agr. E Amb.** v.4, n.3, p.473-481, 2008.

SILVA, A.B.; BATISTA, J.L.; BRITO, C.H. Atividade Inseticida do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss). **Rev. Verde de Agroecol. Desenvolv. Sust.**, v.4, n.4, p. 7-15, 2009.

SIMÕES, M.M.S.G.; DE OLIVEIRA, M.G. Poly(vinyl alcohol) films for topical delivery of s-nitrosoglutathione: effect of freezing–thawing on the diffusion properties. **J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.**, v. 93, n. 2, p. 416-424, 2010.

SINGH, M.N.; HEMANT, K.S.Y.; RAM, M.; SHIVAKUMAR, H.G. Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. **Res. Pharm. Sci.**, vol. 5, n. 2, p. 65-77, 2010.

SLOSS, M.W; ZAJAC, A.M; KEMP, R.L. **Parasitol. Clin. Vet.** Ed. Manole. 6 ed. p. 134-135, 1999.

STAUFFER, S.R.; PEPPAS, N.A. Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing. **Pol.**, v. 33, n. 1, p. 3932 – 3936, 1992.

SUAVE, J.; DALL’AGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Rev. Saúde e Amb.**, v.7, n.2, p. 12-20, 2006.

SUMAN, D. S.; PARASHAR, B. D.; PRAKASH, S. Efficacy of Various Insect Growth Regulators on Organophosphato Resistant Immatures of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Different Geographical Areas of India. **J.Entomol.**, v. 7, n.1. p 33-43, 2010.

SUNDARAM, K.M.S.; SUNDARAM, A.; CURRY, J.; SLOANE, L. Formulations selection, and investigation of azadirachtin-A persistence in some terrestrial and aquatic components of a forest environment. **Pesticide Sci.**, 51: 74-90, 1997.

TERAMURA, Y.; IWATA, H. Bioartificial pancreas: microencapsulation and conformational coating of islet of Langerhans. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 62, n. 7-8, p. 827-840, 2010.

UHRICH, K.E.; CANNIZZARO, S.M.; LANGER, R.S; SHAKESHEFF, K.M. Polymeric systems for controlled drug release. **Chem. Rev.**, v. 99, n. 11, p.3181-3198, 1999.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quim. Nova**, v.26, n.3, p. 390-400, 2003.

YOW, H.N.; ROUTH, A.F. Release profiles of encapsulated actives from colloidosomes sintered for various durations. **Lang.**, v.25, n.1, p. 159-166, 2009.