



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**“NANOCOMPÓSITOS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
Syzygium aromaticum: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO
E ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA O *Aedes aegypti*”.**

Adriana de Jesus Santos

SÃO CRISTOVÃO

Abril

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**“NANOCOMPÓSITOS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
Syzygium aromaticum: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO
E ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA O *Aedes aegypti*”.**

Adriana de Jesus Santos

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rogéria de Souza Nunes

SÃO CRISTOVÃO

Abril

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S237n Santos, Adriana de Jesus
“Nanocompósitos contendo óleo essencial de *syzygium aromarticum* : obtenção, caracterização e atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*” / Adriana de Jesus Santos ; orientadora Rogéria de Souza Nunes. – São Cristóvão, 2012.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. Farmacologia. 2. *Aedes aegypti*. 3. *Syzygium aromaticum*. 4. Essências e óleos essenciais. 5. Nanocompósitos. I. Nunes, Rogéria de Souza, orient. II. Título.

CDU 615.285:582.661.51

Adriana de Jesus Santos

**“NANOCOMPÓSITOS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
Syzygium aromaticum: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO
E ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA O *Aedes aegypti*”.**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 29/04/2014

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rogéria de Souza Nunes

1º Examinador: Prof. PhD. Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti

2º Examinador: Prof. Dr. Rogério Machado

PARECER

A capacidade de sonhar sempre foi o grande segredo daqueles que mudaram o mundo. Os sonhos alimentam a alma e dão asas a inteligência. É no solo fértil da memória onde semeamos os sonhos que farão grande diferença em nossa existência. Os sonhadores mudaram a história da humanidade. Eles fizeram da derrota, o pódio para a vitória; das críticas, o palco, de onde receberam os aplausos.

(Augusto Cury)

DEDICATÓRIA

A Deus, por guiar-me sempre.

Ao meu filho Lucas, razão da minha vida por ter me acompanhado com paciência e compreendido minha ausência, no decorrer deste curso. Ao meu esposo, Cochiran, por sua existência, por estar sempre ao meu lado, pelo companheirismo, respeito e incentivo, pela paciência e sabedoria para transmitir seu conhecimento. Amo-te.

Agradecimentos

A Deus pela vida e por seu infinito amor. Por ter me dado forças quando pensei em fraquejar e ter me ensinado que quando estou fraco é que sou forte, pois o seu poder se aperfeiçoa em nossas fraquezas.

A minha mãe Rivanda e meu irmão Adelmo pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva.

A minha sogra Maria, que sempre me apoiou para realização deste curso, e pela dedicação e amor infinito a seu neto.

A minha orientadora Prof^a. Rogéria, meu muito obrigado por me aceitar em seu laboratório e confiar na realização deste trabalho. Agradeço pela orientação, dedicação, amizade, compreensão, paciência e disponibilidade que demonstrou durante estes anos. Como disse Isaac Newton: “Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”. Obrigada professora.

A Prof^a. Zélia por ser uma das maiores responsáveis pelo meu crescimento profissional. Você é uma grande amiga, sempre me apoiando e disponível a me ajudar. A minha eterna gratidão pelos ensinamentos, pelas oportunidades concedidas e por sempre acreditar e confiar na minha capacidade.

Ao Prof. Mário Ernesto, meu muito obrigado por sempre contribuir com seus conhecimentos.

A Lícia pela enorme ajuda nos trabalhos experimentais, assim como pela amizade, carinho e companheirismo nas horas em que eu mais precisei. Te adoro!

A Joyce pela paciência, amizade, sugestões e pela grande ajuda na realização deste trabalho.

A todos do LADEF, em especial a Jú, Gaby, Alyne e Sarah pela amizade, companheirismo, presença nos momentos difíceis e alegres, pelo apoio e principalmente pela disponibilidade em sempre me ajudar. Obrigada pela colaboração na realização desse trabalho.

Agradeço ao Prof. Victor e Prof. Sócrates pela disponibilidade quando busquei algumas orientações.

A todos da secretaria, em especial a André, Jaqueline e Natalia sempre dispostos em ajudar;

Enfim, a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Resumo

Os óleos essenciais tais como o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (OESA), têm despertado interesse ao controle das larvas do *Aedes aegypti* uma vez que apresentam comprovada ação larvicida. O uso direto destes óleos apresenta limitação quanto à solubilidade em meio aquoso, o meio de proliferação das larvas. Logo, a obtenção de sistemas que favoreçam a dispersão destes óleos em meio aquoso se faz necessária. Assim, o presente trabalho teve por objetivo obter e caracterizar nanocompósitos contendo o OESA para o controle larvicida do *Ae. aegypti*. Os nanocompósitos (bentonita/PVP) foram obtidos pelo método de intercalação argila/polímero em solução hidroalcoólica, variando as proporções entre argila e polímero (2:1; 1:1 e 1:2 p/p), e caracterizados por técnicas de difração de raios X (DRX), análise termogravimétrica (TG/DTA), determinação de umidade pelo método de Karl Fischer, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectrofotometria de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). A atividade larvicida foi avaliada a partir da determinação da concentração letal média (CL_{50}) contra as larvas do *Ae. aegypti*. Os resultados das análises de DRX mostraram um aumento do espaçamento basal da bentonita de 13,61 Å para 27,13 Å após a formação do nanocompósito, caracterizando, assim, intercalação argila/polímero. Com a incorporação do óleo ao nanocompósito não foi observado diferença nos valores do espaçamento basal. As curvas de TG/DTA e DSC sugeriram ganho de estabilidade térmica para o óleo incorporado ao nanocompósito. A determinação de umidade pelo método de Karl-Fischer foi utilizada para corroborar os resultados do TG. Foi possível observar nos espectros de FTIR o desaparecimento e o deslocamento de algumas bandas do OESA em 3075 cm^{-1} , 2944 cm^{-1} e 1751 cm^{-1} , sugerindo a incorporação do OESA aos nanocompósitos. O OESA apresentou CL_{50} de 40,74 ppm enquanto o seu componente majoritário eugenol apresentou CL_{50} de 48,19 ppm. O nanocompósito na proporção 2:1 p/p apresentou uma CL_{50} de 27,4 ppm, menor que a do óleo puro, o que sugere a viabilidade do sistema.

Palavras-chave: dengue, óleos essenciais, *Syzygium aromaticum*, nanocompósitos.

Abstract

The essential oils, such *Syzygium aromaticum* essential oil has attracted great interest due to their known larvicidal activity against the *Aedes aegypti*. However, these oils present a limited use in aqueous media, the proliferation media of *Ae. aegypti*. In this sense, the achievement of systems that improve the oil dispersion in aqueous media is highly necessary. The aim of the present work was to produce and characterize nanocomposite containing OESA as release system for larvicidal control of *Ae. aegypti*. The (bentonite/PVP) nanocomposites were produced via clay/polymer intercalation method using a hidroalcoholic solution. Samples with clay to polymer ratio of 2:1, 1:1 and 1:2 p/p were produced and they were characterized by X-ray diffraction (XRD), thermogravimetric analysis (TG/DTA), moisture determination by Karl Fischer method, differential scanning calorimetry and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The larvicidal activity was evaluated through the determination of the median lethal concentration (CL₅₀) for *Ae. aegypti* larvae. From XRD results, an increase in the basal spacing (d_{001}) of bentonite from 13.61 Å to 27.13 Å could be observed after the nanocomposite formation, which characterizes the clay/polymer intercalation. When the oil was incorporated to the nanocomposite no difference could be detected in the basal spacing values. The TG/DTA and DSC curves suggested higher thermal stability for oil incorporated nanocomposite. The moisture determination by the Karl-Fischer method was used to confirm the TG results. From FTIR spectra it was possible to detect the vanishing and shifting of some OESA bands at 3075 cm⁻¹, 2944 cm⁻¹ e 1751 cm⁻¹, which suggest the OESA incorporation to nanocomposite. The OESA presented CL₅₀ of 40.74 ppm, while its major component eugenol presented CL₅₀ of 48.19 ppm. The nanocomposite produced with a ratio of 2:1 p/p presented a CL₅₀ of 27.34 ppm, which is less than the pure oil, suggesting the viability of the system.

Keywords: dengue, essential oils, nanocomposites.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1. Dengue	20
2.1.1. Considerações gerais	20
2.1.2. Casos da Dengue no Brasil	21
2.1.3. Controle da Dengue.....	22
2.2. Óleos Essenciais	23
2.2.1. Óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	25
2.3. Compósitos.....	27
2.3.1. Argilas.....	29
2.3.2. Bentonita.....	29
2.3.3. Polímero (Polivinilpirrolidona - PVP).....	31
2.3.4. Principais Técnicas de Caracterização dos Nanocompósitos:.....	33
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo geral.....	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Material.....	39
4.1.1. Solventes e reagentes	39
4.1.2. Equipamentos e acessórios.....	39
4.2. Métodos	40
4.2.1. Extração e caracterização do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> . 40	
4.2.1.1. Extração do óleo essencial	40
4.2.1.2. Determinação da densidade do óleo	41
4.2.1.3. Identificação dos constituintes químicos do óleo após a extração dos botões florais	41
4.2.2. Validação do método de quantificação do eugenol por espectrofotometria UV-Vis.....	41
4.2.2.1. Varredura espectrofotométrica.....	42
4.2.2.2. Linearidade	42
4.2.2.3. Precisão	42

4.2.2.4. Exatidão	42
4.2.2.5. Seletividade	43
4.2.2.6 Robustez.....	43
4.2.2.7 Determinação do OESA por espectrofotômetro UV-Vis.....	43
4.3. Obtenção e Caracterização dos nanocompósitos	44
4.3.1. Obtenção dos nanocompósitos inertes e com OESA	44
4.3.2 Caracterização dos nanocompósitos	44
4.3.2.1 Difração de Raios X (DRX)	44
4.3.2.2 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	44
4.3.2.3. Termogravimetria (TG/DTG).....	45
4.3.2.4 Determinação de umidade por Karl Fischer.....	45
4.3.2.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	45
4.3.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução (MEV/FEG) ...	46
4.4. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> , eugenol e do nanocompósito contendo óleo de <i>Syzygium aromaticum</i>	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Extração e caracterização do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	47
5.1.1. Identificação dos constituintes químicos do óleo após a extração dos botões florais	48
5.2. Validação do método de quantificação do eugenol por espectrofotometria UV-Vis.....	49
5.2.1. Varredura espectrofotométrica (UV-Vis)	49
5.2.2. Linearidade	49
5.2.3. Precisão	50
5.2.4. Exatidão.....	51
5.2.5. Seletividade	52
5.2.6. Robustez.....	53
5.2.7. Determinação do OESA por espectrofotômetro UV-Vis.....	53
5.3. Caracterizações dos nanocompósitos	54
5.3.1. Difração de Raios X (DRX)	54
5.3.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	59

5.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	66
5.3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução (MEV/FEG)	68
5.4. Avaliação da atividade Larvicida.....	69
6. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

Índice de figuras

Figura 1: Cravo da Índia.....	26
Figura 2: Estrutura química do eugenol.	26
Figura 3: Estrutura dos Nanocompósitos (silicato lamelar e polímero).	28
Figura 4: Estrutura da Montmorilonita.	30
Figura 5: Estrutura química do PVP.	32
Figura 6: Representação da Difração de raios X no ponto de vista da Lei de Bragg.....	34
Figura 7: Esquema de extração do óleo essencial <i>Syzygium aromaticum</i>	40
Figura 8: Cromatograma (CG/EM) do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> ..	48
Figura 9: Espectro de varredura na região do ultravioleta do Eugenol no λ de 200 a 800 nm.	49
Figura 10: Curva analítica do método de validação do Eugenol (0,005 – 0,06 mg/mL).	50
Figura 11: Varredura espectrofotométrica da bentonita, na faixa de 190 a 600 nm, obtida por espectrofotometria UV.....	52
Figura 12: Varredura espectrofotométrica do PVP, na faixa de 190 a 600 nm, obtida por espectrofotometria UV.....	52
Figura 13: Varredura espectrofotométrica Mistura Física (bentonita/PVP), na faixa de 190 a 600 nm, obtida por espectrofotometria UV.	53
Figura 14: Difratoograma do PVP, Bentonita e Mistura Física (bentonita/PVP).....	55
Figura 15: Difratoograma dos nanocompósitos inertes na proporção 2:1 (Bentonita/PVP) no tempo reacional de 15 min, 1 h e 24 h.....	56
Figura 16: Difratoograma dos nanocompósitos inertes na proporção 1:1 (Bentonita/PVP) no tempo reacional de 15 min, 1 h e 24 h.....	56
Figura 17: Difratoograma dos nanocompósitos inertes na proporção 1:2 (Bentonita/PVP) no tempo reacional de 15 min, 1 h e 24 h.....	57
Figura 18: Difratoograma dos nanocompósitos com OESA nas proporções 1:1 (Bentonita/PVP), 1:2 (Bentonita/PVP) e 2:1 (Bentonita/PVP) no tempo reacional de 1 h.	58
Figura 19: Espectro no infravermelho dos componentes isolados: a) PVP; b) Bentonita; c) Mistura Física (Bentonita/PVP) e d) OESA.	60

Figura 20: Espectro no infravermelho dos nanocompósitos inertes e com óleo: a) 1:2 (Bentonita/PVP) inerte; b) 1:2 (Bentonita/PVP) com óleo; c) 1:1 (Bentonita/PVP) inerte; d) 1:1 (Bentonita/PVP) com óleo; e) 2:1 (Bentonita/PVP) inerte e f) 2:1 (Bentonita/PVP) com óleo no tempo reacional de 1 h.....	60
Figura 21: Curvas de TG/DTG dos componentes isolados: a) OESA, b) PVP, c) Mistura Física (Bentonita/PVP) e d) Bentonita. Obtidas na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	62
Figura 22: Curvas de TG/DTG dos nanocompósitos inertes: 2:1 (Bentonita/PVP), 1:1 (Bentonita/PVP) e 1:2 (Bentonita/PVP) em um tempo reacional de 1 h. Obtidas na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	63
Figura 23: Curvas de TG/DTG dos nanocompósitos contendo OESA: 2:1 (Bentonita/PVP) com óleo, 1:1 (Bentonita/PVP) com óleo e 1:2 (Bentonita/PVP) com óleo em um tempo reacional de 1 h. Obtidas na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	64
Figura 24: Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos componentes isolados: PVP, Bentonita e Mistura Física (Bentonita/PVP). Obtidas na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	66
Figura 25: Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos nanocompósitos inertes no tempo reacional de 1 h na proporção p/p: 2:1 (Bentonita/PVP), 1:1 (Bentonita/PVP), e 1:2 (Bentonita/PVP). Obtidas na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	67
Figura 26: Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos nanocompósitos com OESA no tempo reacional de 1 h na proporção p/p: 2:1 (Bentonita/PVP), 1:1 (Bentonita/PVP) e 1:2 (Bentonita/PVP). Obtidas na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	68
Figura 27: Imagens de MEV/FEG das amostras: a) Bentonita; b) Nanocompósito inerte 2:1 p/p (Bentonita/PVP); c) Nanocompósito com OESA 2:1 p/p (Bentonita/PVP).....	69

Índice de tabelas

Tabela 1: Constituintes químicos do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> determinado por CG-EM.	48
Tabela 2: Repetibilidade do método de quantificação do eugenol por espectrofotometria UV.....	50
Tabela 3: Precisão intermediária do método de quantificação do eugenol por espectrofotometria UV realizada por dois analistas diferentes em dias consecutivos.....	51
Tabela 4: Exatidão do método de quantificação do Eugenol por espectrofotometria UV.	51
Tabela 5: Determinação da robustez do método de quantificação do eugenol por espectrofotometria UV variando o pH e a temperatura.	53
Tabela 6: Teor de incorporação (%) e teor (mg/MG) OESA dos nanocompósitos obtidos por espectrofotometria UV.	54
Tabela 7: Espaçamento interlamelar.....	55
Tabela 8: Espaçamento interlamelar dos componentes isolados, dos nanocompósitos inertes e com OESA no tempo reacional de 15 min, 1 h e 24 h. 58	
Tabela 9: Perdas de massa do OESA, Bentonita, Mistura Física (Bentonita/PVP), PVP, Nanocompósitos Inertes e com OESA nas proporções de 1:1 (Bentonita/PVP), 1:2 (Bentonita/PVP) e 2:1 (Bentonita/PVP), em intervalos de temperaturas diferentes.	65
Tabela 10: Determinação da umidade por Karl Fischer.	65
Tabela 11: CL ₅₀ do OESA, eugenol e da amostra 2:1(Bentonita/PVP), frente às larvas do <i>Ae. aegypti</i> em L3/L4, após 24 h de exposição.	70

Lista de siglas e abreviaturas

Oes - Óleos essenciais

OESA- Óleo essencial de *Zyzygium aromaticum*

Ae. Aegypti - *Aedes aegypti*

DRX - Difração de raios X

LADEF - Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico

OMS - Organização Mundial de Saúde

FTIR - Espectrofotometria de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier

TG - Termogravimetria

DTA - Análise Térmica Diferencial

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

MEV/FEG – Microscópio Eletrônico de Varredura de alta resolução

PVP - Polivinilpirrolidona

CL₅₀ – Concentração letal que mata 50% das larvas

L3/L4- Terceiro a quarto estágio das larvas de *Aedes aegypti*

ppm- Partes por milhão

1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença viral aguda transmitida pelas picadas da fêmea infectada de mosquitos do gênero *Aedes aegypti* L., e está presente nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo.

Nos últimos anos, o número de casos registrados e óbitos têm aumentado expressivamente, provavelmente associados ao fato do vetor ter adquirido resistência aos inseticidas utilizados. A resistência adquirida resulta em um aumento na dosagem, o que gera problemas ao meio ambiente e a saúde humana. Sendo assim, estratégias de controle ao vetor através de utilização de produtos alternativos têm sido sugeridas e investigadas.

A utilização de produtos naturais apresenta-se como alternativa para o controle do *Ae. aegypti*. Os óleos essenciais têm se apresentado como potenciais candidatos. Estes óleos são definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, apresentam odor forte e são sintetizados em diversos órgãos das plantas aromáticas. Apresentam diversas atividades biológicas, como antiinflamatória, analgésica, antimicrobiana, antineoplásica, inseticida e larvicida.

O óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (OESA) é extraído a partir dos botões florais do cravo-da-índia através da hidrodestilação. Esta espécie pertence à família *Myrtaceae* tendo como constituinte majoritário o eugenol, que apresenta-se como um líquido incolor a amarelo claro, volátil, com baixa solubilidade em água, cheiro forte e aromático.

No entanto, o OESA apresenta limitação quanto à solubilidade no meio aquoso em virtude da sua natureza lipofílica. Assim como a maioria dos óleos essenciais, o OESA é volátil, quimicamente instável na presença da luz e insolúvel em água, inviabilizando o uso. A fim de favorecer sua dispersão em meio aquoso, tem sido sugerido uma associação dos óleos essenciais a sistemas de fácil dispersão em meio aquoso.

Neste sentido, a utilização de sistemas nanoestruturados tem se mostrado bastante pertinente, em especial, os nanocompósitos contendo argila/polímero, os quais foram investigados neste trabalho.

Os compósitos, em geral, são capazes de combinar propriedades de dois ou mais materiais, sejam eles metálicos, poliméricos ou cerâmicos, resultando assim em propriedades superiores as dos materiais individuais.

A bentonita é uma cerâmica resultante de processos vulcânicos, constituída predominantemente de montmorilonita (espécie de argila natural do grupo esmectita), cujas propriedades são aplicáveis à produção farmacêutica como agente ligante e desintegrante, pois formam géis em baixas concentrações através do intumescimento em meio aquoso.

A polivinilpirrolidona (PVP), também conhecida por povidona, é um homopolímero de *N*-vinil-2-pirrolidona obtido por polimerização via radical em água ou em álcool isopropílico, de natureza higroscópica e compatível com uma ampla cadeia de resinas hidrofílicas e hidrofóbicas. A associação entre o polímero e a cerâmica (PVP-Bentonita) formam estruturas lamelares, os quais podem veicular substância entre as lamelas, tais como os óleos essenciais.

Através de estudos avançados, a utilização de produtos naturais surge como uma alternativa ao controle químico, sendo necessária a investigação de novos sistemas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Dengue

2.1.1. Considerações gerais

A dengue é considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem, em termos de morbidade e mortalidade, e constitui um sério problema de saúde pública no mundo. Esta doença ocorre especialmente nos países tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais favorecem o desenvolvimento e a proliferação do vetor. Nas últimas décadas, tornou-se elevado o número de casos e novos países acometidos pela doença (GLAUBER, 2008 e JANSEN e BEEBE, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectam anualmente em mais de 100 países de todos os continentes, exceto a Europa, aproximadamente 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue. De acordo com a OMS (2008), durante uma epidemia de dengue, as taxas de infecção entre indivíduos suscetíveis ao vírus são de 40 a 50%, podendo chegar de 80 a 90% (WHO, 2009).

Dependendo da forma como se apresenta, esta arbovirose caracteriza-se por estado febril agudo que pode ser assintomática, clássica ou grave (dengue severa). A dengue clássica, em geral, se inicia abruptamente com febre alta (39 a 40 °C), seguida de cefaleia, mialgia, náuseas, vômitos, prurido cutâneo e dor abdominal generalizada (COLLER e CLEMENTS, 2011).

Na dengue severa, os sintomas iniciais são semelhantes aos da dengue clássica, mas no terceiro ou quarto dia o quadro se agrava com dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, sinais de debilidade profunda, agitação ou letargia, manifestações hemorrágicas espontâneas, cianose e diminuição brusca da temperatura (MS/SVS, 2013). Sem tratamento adequado, o índice de mortalidade causada por febre hemorrágica da dengue pode exceder 20% (Murrell e Butler, 2011).

O vírus da dengue pertence à família Flaviviridae, apresentando quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). A fêmea do vetor transmite o vírus ao ser humano através da picada durante sua alimentação, e estes apresentam sintomas idênticos e requerem os mesmos cuidados e tratamento. Ao ser infectado

por um dos sorotipos, o indivíduo, por exemplo, fica imune a este sorotipo, mas não para os demais. A cada nova infecção, aumentam as chances do paciente desenvolver uma forma grave, caso a doença não seja identificada (GLAUBER, 2002).

Na década de 1950, a dengue severa foi reconhecida pela primeira vez, durante epidemias nas Filipinas e Tailândia. Até a década de 1970, nove países apresentavam epidemias de febre hemorrágica da dengue, e atualmente, este número quadruplicou. Os países com maior incidência localizam-se, principalmente, nas Américas e na Ásia, onde há circulação de todos os quatro sorotipos. A febre hemorrágica da dengue tornou-se uma das principais causas de hospitalização e morte entre as crianças em vários países (WHO, 2008).

Atualmente, não existe nenhum tratamento ou vacina disponível para a dengue, e, por conseguinte, o controle do vetor é o único meio de prevenção disponível. No entanto, este método é ameaçado por crescentes relatos de resistência do *Ae. aegypti* a classes comuns de inseticidas organoclorados, incluindo os organofosforados, carbamatos e piretróides (COLLER e CLEMENTS, 2011).

Novas investigações são necessárias para determinar a atividade larvicida contra *Ae. aegypti* utilizando produtos de diversas origens, dentre elas, as naturais. Conforme Shaalan *et al.* (2005), a utilização de produtos naturais podem não só levar a novas estratégias de controle, como inibir o desenvolvimento da resistência dos insetos aos inseticidas sintéticos existentes.

Do mesmo modo, faz-se necessário identificar as principais substâncias bioativas que possuem atividade larvicida e inibem a eclosão de adultos, a fim de utilizá-las na preparação de uma formulação comercial, capaz de causar mortalidade e/ou inibir a eclosão de adultos (CHUNG, 2010).

2.1.2. Casos da Dengue no Brasil

No Brasil, durante o verão, devido à maior ocorrência de chuvas e ao aumento da temperatura, ocorrem epidemias de dengue. Cerca de 70% dos casos concentram-se entre janeiro e maio, com exceção das regiões Norte e Nordeste, nas quais as chuvas começam tardiamente. Apesar disso, o país tem condições

climáticas favoráveis ao desenvolvimento do mosquito durante todo o ano; sendo mais comum em áreas urbanas, principalmente nas metrópoles, onde há aglomeração de habitantes e maior quantidade de criadouros artificiais (MS, 2009).

Segundo Braga e Vale (2007), a chegada da dengue ao Brasil ocorreu no século XIX, sendo os primeiros relatos em 1846, nas cidades do Rio de Janeiro, São Paulo e Salvador. No entanto, a primeira evidência de epidemia de dengue no Brasil ocorreu em 1982, quando os sorotipos DENV-1 e DENV-4 foram isolados na cidade de Boa Vista (RO).

Em 2008, foram notificados 585.769 casos e novas epidemias causadas pelo sorotipo DENV-2 em diversas partes do país. No Rio de Janeiro, foram notificados 158.000 casos, com 9.000 admissões hospitalares e 230 mortes entre janeiro e abril (MS, 2009). No ano de 2009, Sergipe apresentou 3.628 casos suspeitos de dengue, com 595 casos confirmados (SVS; MS, 2009). Em 2010, foram 1.200.000 casos notificados no Brasil. Sergipe registrou 1.440 casos suspeitos com 313 casos confirmados no mesmo ano (CVE/SES, 2010).

Comparado ao ano anterior, no Brasil houve uma diminuição, com 800.000 casos notificados em 2011; já no estado de Sergipe, foram notificados 4.000 casos (SES, 2012). Em 2012, o Brasil apresentou 600.000 casos notificados e em Sergipe foram notificados 5.000 casos (MS, 2013).

Em 2013, foram notificados 1,4 milhão de casos prováveis de dengue no país, em decorrência de uma maior circulação do subtipo tipo 4 do vírus causador da doença, que respondeu por 60% dos casos. A região Sudeste, responsável por 63,4% dos casos com 936.500 registros, tem o maior número de casos, seguida pela região Centro-Oeste (271.773 casos; 18,4%), Nordeste (149.678 casos; 10,1%), Sul (70.299 casos; 4,8%) e Norte (48.667 casos; 3,3%). Esse aumento se dá devido à circulação do sorotipo DENV-4, assim como a paralisação das ações de controle em alguns municípios (MS, 2013).

2.1.3. Controle da Dengue

De acordo com a literatura, a única abordagem eficaz para minimizar a incidência da dengue é controlando a população de vetores do mosquito, visto que até o momento não existe uma vacina para a prevenção desta doença. O controle

tem como principais objetivos: manejar os problemas existentes como surtos, epidemias, alta mortalidade e alta morbidade; prevenir epidemias das doenças em áreas onde ela foi controlada e reduzir os fatores de risco ambiental da transmissão (BRAGA e VALLA, 2007).

O controle mecânico é feito através de ações como saneamento básico e educação ambiental para remoção ou destruição dos insetos, por meio da redução do número de criadouros artificiais no ambiente (FUNASA, 2001), já o controle químico se baseia no uso de produtos químicos para eliminar ou controlar o vetor. Em geral, os larvicidas são utilizados preferencialmente aos inseticidas por serem aplicados diretamente no foco (VONTAS *et al*, 2012).

Os organoclorados, embora tenham sido largamente adotados pelos programas de controle de insetos, tiveram seu uso descontinuado e chegaram, inclusive, a serem proibidos em vários países devido à sua persistência no ambiente e ao acúmulo em tecidos do organismo de animais e humanos (NKYA *et al.*, 2013).

Com o aumento da resistência aos inseticidas químicos, o controle biológico vem sendo utilizado como alternativa. O uso do *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus* vêm aumentando devido à demanda de compostos seguros e específicos aos vetores (MS, 2009; WHO, 2006).

Atualmente, estratégias como pesquisas de novos produtos eficazes e ecologicamente seguros são alternativas ao controle do vetor da dengue, estudos têm focado no uso de produtos naturais representando fortes candidatos. Esses produtos são derivados de plantas como os óleos essenciais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004; CAVALCANTI *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2008).

2.2. Óleos Essenciais

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas, chamados de óleos etéreos ou essências. São definidos como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste a vapor d'água, bem como, os produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos (SIMÕES *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais apresentam-se geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Sua principal característica, contudo, consiste na volatilidade, que o difere dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas

obtidas normalmente de sementes. Outra característica é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis. São ainda solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter, recebendo, por isso o nome de óleos etéreos (KNAAK e FIUZA, 2010). A produção mundial desses óleos vem crescendo nos últimos anos, destacando-se vários países, entre eles o Brasil, entre os sete países responsáveis por 85% da produção mundial (SILVA, 2008).

Nos vegetais, os óleos essenciais agem como atraentes de polinizadores, na proteção contra predadores, desempenham funções ecológicas e especialmente como inibidores de germinação. Estas características tornam as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais podem ser produzidos em todas as partes das plantas como, por exemplo, em brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, cascas e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células da epiderme ou tricomas glandulares (CRAVEIRO e MACHADO, 1986, BIZZO *et al.*, 2009).

Eles são extraídos a partir de diversas plantas aromáticas, geralmente localizadas em países de clima temperado ou quente, como a região do Mediterrâneo, e nos países tropicais, onde representam uma parte importante da farmacopeia tradicional. A composição química de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente de acordo com a época de coleta, condições climáticas e de solo (BURT, 2004).

Existem aproximadamente 3000 óleos essenciais descritos, dos quais 300 são conhecidos por suas propriedades biológicas, entre elas, a atividade antimicrobiana, antiinflamatória, analgésica, antitumoral, inseticida e larvicida (BAKKALI *et al.*, 2008). Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos a álcoois simples e terpênicos, apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é um composto majoritário, existindo outros em menores percentuais e alguns em baixíssimas quantidades (SIMÕES *et al.*, 2007).

Outro aspecto importante quanto ao uso dos óleos essenciais refere-se à forma de obtenção. Estes podem ser extraídos através de inúmeras técnicas e suas propriedades dependem do tipo de extração. Os métodos mais utilizados são: extração por arraste a vapor, hidrodestilação, prensagem a frio, extração por solventes orgânicos, extração por alta pressão e extração por CO₂ supercrítico (OKOH *et al.*, 2010).

Silva e colaboradores (2008) estudaram a atividade larvicida contra larvas de *Ae. aegypti* de óleos essenciais que apresentam em sua composição em torno de 80% de monoterpenos e encontraram uma CL_{50} de 37 ppm para o D-limoneno.

Silva (2012) desenvolveu complexos de inclusão de óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em β -ciclodextrinas. Os resultados mostraram que as larvas de *Aedes aegypti* foram susceptíveis à composição do óleo essencial de *Citrus sinensis*, d-limoneno e ao complexo obtido por malaxagem e etanol tornando-o uma alternativa importante para o controle de Larvas de *Aedes aegypti*.

É importante ressaltar que nosso grupo de pesquisa vem buscando desenvolver sistemas (por exemplo, BR1020120308991, BR1020120308932, BR1020120187370, BR0000221106778710) capazes de veicular óleos essenciais de modo a minimizar sua volatilização, aumentando assim, sua estabilidade e melhorando a sua dispersão em meio aquoso. Tais sistemas vêm se mostrando eficazes no controle do *Aedes aegypti*.

2.2.1. Óleo essencial de *Syzygium aromaticum*

O cravo-da-índia (Figura 1) é uma especiaria muito apreciada desde a antiguidade, não só por seu sabor e qualidades culinárias, mas também por suas utilizações terapêuticas. Várias aplicações desta especiaria na cultura popular têm sido relatadas na literatura, bem como diversos estudos científicos sobre o uso (SILVESTRE *et al.*, 2010).

A Bahia é o maior produtor de cravo-da-índia do Brasil, principalmente a região do baixo sul, em cidades como Valença, Ituberá, Taperoá, Camamu e Nilo Peçanha (CEPLAC, 2013).



Figura 1: Cravo da Índia

Fonte: <http://www.ceplac.gov.br>

O cravo-da-índia pertence à família das mirtáceas (*Myrtaceae*) e é conhecido cientificamente pelo nome de *Syzygium aromaticum* tendo como principal constituinte majoritário o eugenol (Figura 2), com fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ e massa molecular $164,2 \text{ g.mol}^{-1}$, apresenta-se como um líquido incolor a amarelo claro, volátil, baixa solubilidade em água, cheiro forte e aromático de cravo (MAZZAFERA, 2003 e SILVESTRI *et al.*, 2010).

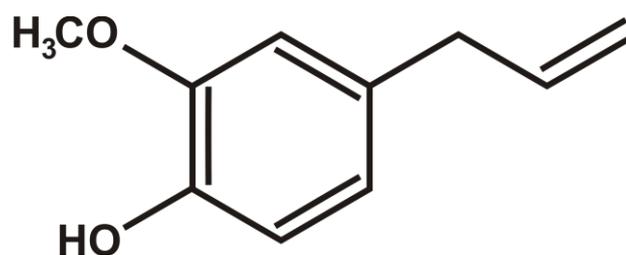


Figura 2: Estrutura química do eugenol.

O eugenol foi isolado pela primeira vez em 1929 e, logo em seguida, começou a ser produzido em escala por um processo que envolve a destilação fracionada. Na odontologia, o uso do eugenol é bastante popular por apresentar eficácia contra dores de dente, e ao ser misturado ao óxido de zinco, forma uma espécie de cimento, utilizado em procedimentos odontológicos. Além disso, é muito usado nas

indústrias de aromas, farmacêutica e flavorizante (CRUZ, 1965), possuindo também, atividade biológica, dentre elas atividade larvicida (BARROSO, 1978, LORENZI, 2002, SILVESTRI *et al.*, 2010).

O cravo-da-índia, frequentemente usado, é o botão floral seco do *S. aromaticum*, uma planta de porte arbóreo com copa alongada característica e que pode atingir em média de 8 a 10 metros de altura. Suas folhas possuem características ovais, aromáticas e tem de 7 a 11 centímetros de comprimento (FURTADO *et al.*, 2010). Suas flores são pequenas, dispostas em corimbos terminais em um tom verde-amarelado mais ou menos impregnado de vermelho, sendo que quanto mais próximas da cor avermelhada melhores estão para coleta (LORENZI, 2002, COSTA *et al.*, 2011).

No entanto, o óleo essencial apresenta problemas quanto à solubilidade no meio aquoso em virtude da sua natureza lipofílica. Essas características estabelecem uma difícil relação entre solubilidade, limitando sua utilização (MATELIC *et al.*, 2008).

Neste sentido, a utilização de sistemas nanoestruturados capazes de veicular óleos essenciais tem se mostrado bastante pertinente, em especial, os nanocompósitos contendo argila/polímero, os quais foram investigados neste trabalho.

2.3. Compósitos

Os compósitos são definidos como materiais formulados pela combinação de dois ou mais constituintes diferindo em forma ou composição química e que sejam essencialmente imiscíveis. Estes componentes devem junto oferecer propriedades sinérgicas diferenciadas de apenas um aditivo, ou seja, propriedades melhores que as de seus componentes individuais (CALLISTER, 2007).

Os nanocompósitos são materiais modificados da mesma forma que os compósitos, no entanto, é possível a obtenção de propriedades especiais ópticas, elétricas e magnéticas e outras ou equivalentes a dos compósitos tradicionais (DJOUN e SBIRRAZZUOLI, 2013). Os nanocompósitos são materiais no qual a fase dispersa apresenta pelo menos uma dimensão de ordem nanométrica (WANG, 2001, CALLISTER, 2007, LAVORGNA *et al.*, 2010).

Durante a última década, os nanocompósitos polímero-argila têm atraído muita atenção na ciência dos materiais devido às suas propriedades de engenharia superiores em relação ao polímero puro (LAVORGNA *et al.*, 2010). A bentonita é bastante utilizada em diversos campos da ciência devido à sua abundância natural, ser de baixo custo, alta capacidade de troca catiônica, seu comportamento de intumescimento, propriedades de adsorção e grande área de superfície (DJADOUN, 2013, DORNELAS, 2010).

Segundo Guimarães *et al.* (2006), podem ser encontradas três formas básicas que definem a estrutura do nanocompósito constituído de argilas/polímeros, como representado na Figura 3:

- Estrutura intercalada: separadas por cadeias poliméricas, porém, com uma ordem estrutural que possibilita ao nanocompósito adquirir propriedades superiores a um compósito convencional;
- Estrutura delaminada ou esfoliada: onde as camadas estruturais estão totalmente desordenadas na matriz, aumentando as interações polímero-argila e trazendo melhorias significativas nas propriedades físicas e mecânicas do compósito;
- Estrutura convencional: são aquelas em que o silicato age como um enchimento convencional caracterizada pela separação da microfase.

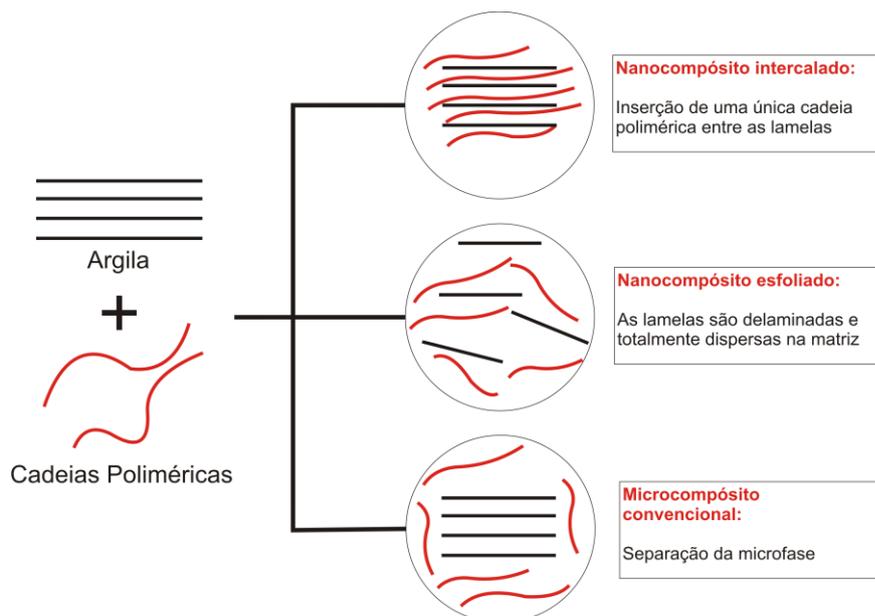


Figura 3: Estrutura dos Nanocompósitos (silicato lamelar e polímero).

Fonte: Adaptado por Ray e Okamoto, 2003.

2.3.1. Argilas

As argilas são comumente definidas como rochas finamente divididas, constituídas essencialmente por argilominerais. É um material natural que quando umedecido em água, apresenta plasticidade. De um modo geral, o termo argila refere-se às partículas do solo que possuem diâmetro inferior a 2 μm e das quais podem fazer parte diferentes tipos de materiais (BERGAYA e LAGALY, 2001, DJADOUN e SBIRRAZZUOLI, 2013).

O interesse pelo estudo das argilas tem aumentado nos últimos anos devido ao seu baixo custo, e por serem utilizadas nas indústrias de plásticos, tintas, inseticidas, produtos farmacêuticos e veterinários, com a finalidade de aumentar o volume e modificar as propriedades desses materiais (COELHO *et al.*, 2007 e LAVORGNA *et al.*, 2010).

2.3.2. Bentonita

A bentonita é uma argila plástica resultante de alterações de cinzas vulcânicas, constituída predominantemente de montmorilonita e outros minerais do grupo das esmectitas, com outros componentes como: caulinita, ilita, feldspatos e quartzo. Descoberto na França em 1847 (Montmorillon) por Damour e Salvétat (LIRA, 2008, DORNELLAS, 2010). A bentonita pode apresentar cores variadas, incluindo branca, cinzenta, amarela e outras dependendo da sua origem e composição química (BAYRAM *et al.*, 2010).

A montmorilonita é um argilomineral que faz parte da família das esmectitas, representado na Figura 4, são dioctaédricas, sendo um filossilicato do tipo 2:1 com estrutura lamelar apresentando duas camadas tetraédricas e uma camada octaédrica central, muito usada para a preparação de nanocompósitos poliméricos (LAVORGANA *et al.*, 2010).

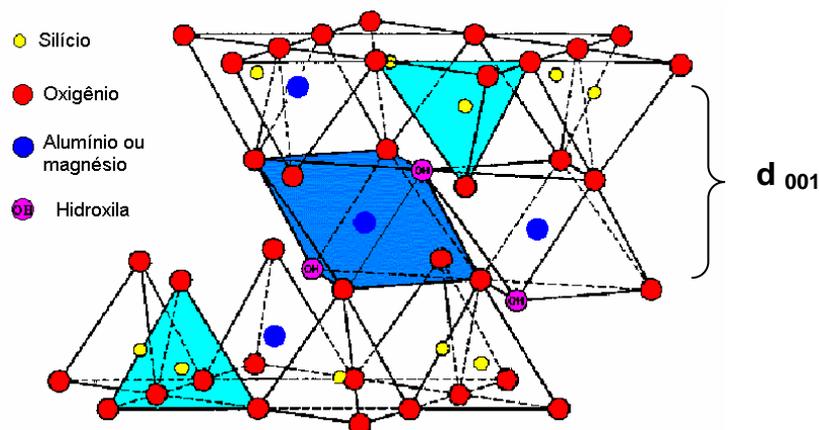


Figura 4: Estrutura da Montmorilonita.

Fonte: (RAY e OKAMOTO, 2003).

A espessura de cada camada é de aproximadamente 1 nm, e as dimensões laterais podem variar de 200 a 300 nm. A substituição isomórfica nas camadas tetraédricas de Si^{4+} por Al^{3+} , enquanto que na camada octaédrica pode ser substituído Al^{3+} por Fe^{3+} ou Mg^{2+} . Essas substituições isomórficas nas camadas tetraédricas e/ou na octaédrica geram um desequilíbrio de cargas negativas nas camadas que são neutralizadas com cátions trocáveis, principalmente por Ca^{2+} , Na^{1+} e Mg^{2+} (VOLZONE, 2007; RISHI *et al.*, 2010).

A capacidade das argilas em trocar os cátions existentes entre as lamelas é uma propriedade única. As trocas catiônicas com fármacos são de interesse especial nas ciências farmacêuticas, à interação entre fármaco-argila modifica a ação do fármaco de diversos modos, tais como aumento da estabilidade, liberação prolongada ou aumento da dissolução (DORNELAS, 2010).

As argilas bentoníticas podem ser classificadas de acordo com o seu poder de intumescimento, caracterizando-se por sua propriedade específica de intumescer até vinte vezes o volume da argila seca, quando imersas em água (SANTOS, 1989). Logo, vem sendo utilizadas como excipientes farmacêuticos, como agente desintegrante em formas sólidas ou ainda, para incremento de viscosidade em formulações líquidas (RAY e OKAMOTO, 2003).

Joshi (2009) e colaboradores avaliaram o efeito da argila como carreadores de fármacos para maleato timolol (MT) e a intercalação de MT na camada intermediária da montmorilonita (MMT) em diferentes valores de pH. Os estudos mostraram que a liberação *in vitro* do MT em MMT ocorreu rapidamente e o

equilíbrio foi atingido dentro de 1 h. Sugerindo, a utilização da MMT como carreador do MT na liberação prolongada em administração oral.

Em 2010, Nguemtchouin e colaboradores utilizaram argila com óleo essencial *Xylopi aethiopica* em formulações de inseticidas visando à proteção do milho. Foram realizados testes de ingestão de contato com inseticidas utilizando o milho gorgulho *Sitophilus zeamais*. Bioensaios indicaram que a mortalidade de *S. zeamais* aumentou com a quantidade de ingrediente ativo. A formulação com base em óleo essencial e argila produziram taxas de mortalidade que variam de 22% a 2,5% (p/p) a 100% a 10% (p/p). A concentração letal que produziu uma taxa de mortalidade de 50% (CL₅₀) foi de 4,35% (p/p). A eficácia depende das condições de armazenamento e duração da formulação, diminuindo de 91 a 37% para a formulação armazenada em caixas fechadas e de 91 a 17% para a formulação armazenada em caixas abertas, após 1 e 15 dias. Logo, o óleo essencial e a argila podem ser uma alternativa eficiente para os produtos sintéticos comumente utilizados para preservação de grãos e, portanto, um método para reduzir a poluição.

Abdollahi (2012) e colaboradores realizaram um estudo no qual a montmorilonita e óleo essencial de alecrim eram incorporados a filmes de quitosana visando melhorar suas propriedades físicas e mecânicas, bem como sua atividade antimicrobiana e antioxidante. Os resultados demonstraram que esta associação melhora a resistência a tração, assim como suas propriedades antimicrobianas, tornando-os um agente promissor na conservação dos alimentos.

Grande parte das reservas nacionais de bentonita, cerca de 62%, estão localizadas no estado da Paraíba, nos municípios de Boa Vista e Cubati. O estado de São Paulo possui cerca de 28% e os estados da Bahia, Minas Gerais e Paraná, os 10% restantes (DPM, 2013).

2.3.3. Polímero (Polivinilpirrolidona - PVP)

Os polímeros são macromoléculas constituídas por grande número de moléculas pequenas que se repetem na sua estrutura e que são denominadas de monômeros. A reação pelas quais se combinam são chamadas de polimerização. O termo polímero vem do grego poli (muitos) e mero (unidade de repetição). Assim, um polímero é uma macromolécula composta por muitas unidades de repetições

denominados de meros, ligados por ligação covalente (CANEVAROLO, 2002, CHIU e LIN, 2012).

Dependendo do tipo de monômero (estrutura química), do número médio de meros por cadeia e do tipo de ligação covalente pode-se dividir os polímeros em três grandes classes: Plásticos, Borrachas (ou Elastômeros) e Fibras (CANEVAROLO, 2002).

A polivinilpirrolidona (PVP) conhecida comercialmente por Povidone é um homopolímero de *N*-vinil-2-pirrolidona obtido por polimerização via radical em água ou em álcool isopropílico, de natureza higroscópica e compatível com uma ampla faixa de resinas hidrofílicas e hidrofóbicas. O PVP é um pó branco, amorfo de fluxo livre que se solubiliza em água e em solventes orgânicos, tendo a capacidade de formar complexos estáveis com polímeros e surfactantes (ULLMANS, 1992).

Muito utilizado em tecnologia farmacêutica como agente ligante e desintegrante para comprimido e agente suspensor para formas farmacêuticas líquidas. A grande frequência de aplicações do PVP e seus copolímeros na medicina e nas indústrias farmacêuticas ocorrem devido as suas propriedades: solubilidade em água e em solventes orgânicos, estável, atóxico, possui capacidade de complexação com diversas substâncias quando em solução aquosa, capacidade de formar filmes e de interagir com outros polímeros (KIBBE, 2000, MANO, 1988).

A fórmula estrutural (Figura 5) lhe confere um caráter anfifílico, o que se deve à existência do grupo amida altamente polar com propriedades hidrofílicas, aos grupos metileno e metil presentes na cadeia principal e ao anel com propriedades hidrofóbicas (KIBBE, 2000).

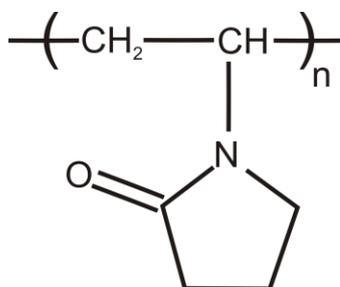


Figura 5: Estrutura química do PVP.

2.3.4. Principais Técnicas de Caracterização dos Nanocompósitos:

Difração de Raios X (DRX)

Desde a sua descoberta em 1912, por Von Laue, a difração de raios X tem sido uma importante fonte de informação para a ciência e a indústria. A maior parte do que é conhecido sobre espaçamento e arranjo dos átomos em materiais cristalinos foi determinada diretamente por estudos de difração (SAZAKI e BLEICHER, 2000).

A difração de raios X é a técnica mais abrangente e informativa no que se refere à identificação e quantificação das fases mineralógicas de um material. Na avaliação da formação de compósitos apresenta-se como a principal técnica. Além disso, é uma técnica de análise não destrutiva, rápida e versátil para a caracterização de materiais diversos (PAIVA, 2008).

Nesta técnica, feixes de raios X são incididos em um cristal, interagem com os átomos do retículo cristalino e originam o fenômeno de difração. A difração ocorre porque a estrutura cristalina funciona como uma espécie de rede de obstáculos tridimensional, na qual os elétrons são desviados para todas as direções. A interferência no espalhamento dos raios X pode ser destrutiva, o que resulta no mínimo de intensidade, mas também pode ser construtiva, resultando no máximo de intensidade (MENESES, 2007).

Para argilas, os difratogramas de raios X permitem determinar variações da distância interlamelar decorrentes dos processos de modificação física e térmica. Além disso, através do DRX é possível confirmar se o material é realmente uma argila. Adicionalmente pode-se ainda adquirir informações quantitativas e qualitativas das fases cristalinas presentes numa amostra. A determinação do espaçamento basal, necessária em muitas ocasiões para a classificação e identificação dos constituintes da argila, é feita com base na aplicação da lei de Bragg descrita pela Equação 1 (DONG e BOYDE, 2011):

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

onde:

n = Ordem de difração (número inteiro);

λ = Comprimento de onda dos raios X incidentes;

d = Distância interplanar da matriz cristalina;

$\sin\theta$ = Ângulo de difração.

A lei de Bragg, representada pela equação (1), permite estudar a direção das difrações de raios X, quando ocorrem interferências construtivas. Para isso, dois feixes de raios X, paralelos entre si, devem incidir sobre dois planos também paralelos, separados por uma distância $2d \sin\theta$, representada na Figura 6.

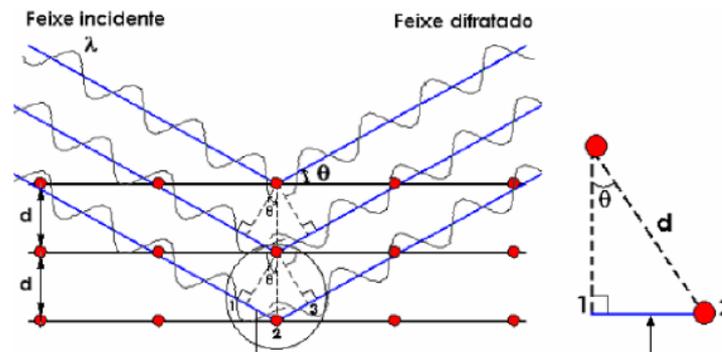


Figura 6: Representação da Difração de raios X no ponto de vista da Lei de Bragg.

Fonte: (Meneses, 2007).

Cada mineral tem a sua estrutura própria e apresenta um padrão de difração distinto, a partir do qual pode ser devidamente identificado. Dentre os diversos planos que podem ser definidos, o plano cristalográfico (001) é o mais importante para a ciência e tecnologia de argilas e argilominerais, visto que fornece a reflexão basal característica de cada grupo de argilomineral. A montmorilonita, por exemplo, pertence ao grupo de argilominerais com distância interplanar basal entre 12 e 15 Å.

Assim, a técnica de DRX permite uma rápida identificação e classificação experimental dos principais grupos existentes, bem como as alterações causadas por tratamentos ou incorporação de espécies químicas na sua estrutura, o que produz modificações na posição e altura dos picos presentes no difratograma (DONG e BOYDE, 2011).

A análise de difração de raios X foi utilizada com o objetivo de observar a variação do tamanho das lamelas da argila após as reações de intercalação de nanocompósitos, tendo em vista que essa técnica permite obter informações importantes e conclusivas a respeito do espaçamento interlamelar.

Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Quase todos os compostos contendo ligações covalentes absorvem várias frequências da radiação eletromagnética na região do infravermelho no espectro eletromagnético. A radiação quando absorvida, converte-se em energia de vibração molecular e, como resultado, as ligações químicas sofrem deformações axiais e angulares (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). O espectro vibracional costuma aparecer como uma série de bandas ao invés de linhas, as linhas se sobrepõem dando lugar às bandas observadas. São estas bandas de vibração que ocorrem entre 4.000 e 400 cm^{-1} , a porção de maior interesse para a investigação das informações estruturais úteis de moléculas orgânicas (PAIVA *et al.*, 2008).

Em nanocompósitos, os espectros de infravermelho apresentam bandas características no processo de organofilização, porém, os grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independente da estrutura da molécula e a presença dessas bandas características que permitem a obtenção de informações referentes à estrutura.

Análise Térmica

A análise térmica é definida como o grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância é medida em função da temperatura, enquanto essa substância é submetida a um programa controlado de temperatura. Os resultados são fornecidos na forma de curvas, as quais contêm as informações a respeito da variação do parâmetro medido (LUCAS *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2007).

São inúmeras as aplicações de análise térmica na indústria farmacêutica, por isso, tem sido extensivamente utilizada como ferramenta analítica confiável e essencial para o controle de qualidade e desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, bem como para o estudo da estabilidade, compatibilidade e das

possíveis interações entre fármacos e excipientes e suas misturas, contribuindo dessa forma para estudos de pré-formulação (WENDLANDT, 1986; SANTOS *et al.*, 2008).

Na Termogravimetria (TG) o parâmetro a ser medido é a massa, por meio da utilização de uma termobalança que permite medir o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra em função de uma variação controlada de temperatura. O transdutor ou sensor utilizado na termogravimetria é uma balança registradora (LUCAS *et al.*, 2001). As curvas obtidas fornecem informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado.

Dada a natureza dinâmica da variação de temperatura da amostra para originar curvas TG, fatores instrumentais: razão de aquecimento, atmosfera (N_2 , ar ou outros), vazão de gás, composição do cadinho, geometria do porta amostra e tamanho e forma do forno, e relacionados às características da amostra (quantidade, granulometria, forma cristalina, empacotamento, condutividade térmica, solubilidade dos gases liberados da amostra e calor de reação envolvido) podem influenciar a natureza, a precisão e a exatidão dos resultados experimentais (WENDLANDT, 1986).

Análise Térmica Diferencial é a técnica pela qual a diferença de temperatura (ΔT) entre a substância e o material de referência (termicamente estável) é medida em função da temperatura, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. A temperatura é medida por termopares conectados aos suportes metálicos das cápsulas de amostra e do material de referência, ambos contidos no mesmo forno.

As variações de temperatura na amostra são devido às transições de entalpias ou reações endotérmicas ou exotérmicas. As curvas DTA representam os registros de Δ em função da temperatura (T) ou do tempo (t), de modo que os eventos são apresentados na forma de picos. Os picos ascendentes caracterizam os eventos exotérmicos e os descendentes os endotérmicos (WENDLANDT, 1986).

A DTA, a DSC e a TG podem ser utilizadas, por exemplo, na compreensão dos mecanismos físico-químicos relativos a processos de decomposição térmica ou no estudo e desenvolvimento de novos compostos, entre outros. As curvas TG e DSC fornecem informações importantes sobre a propriedade física das substâncias

como estabilidade, compatibilidade, cinética, decomposição térmica, fase de transição e polimorfismo (SANTOS *et al.*, 2008).

Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução (MEV/FEG)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permite a observação e caracterização de diversos materiais (orgânicos e inorgânicos) sólidos em escala micrométrica (μm) e nanométrica (nm). O microscópio de varredura eletrônica é amplamente utilizado na investigação da microestrutura superficial de materiais como metais, polímeros, vidros e cerâmicos.

Nas análises de MEV a superfície a ser observada é irradiada por um feixe estreito de elétrons e como resultado da sua interação com a amostra, uma série de processos podem ocorrer, como a emissão de: elétrons secundários (ES), elétrons retroespalhados (ERE), raios X característicos, elétrons Auger, fótons, etc.

Os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados. À medida que a amostra é varrida pelos elétrons primários, os sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações de superfície. Os sinais dos ES fornecem imagem de topografia e são responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, enquanto os sinais dos ERE fornecem a imagem característica da variação da composição do material (GOLDSTEIN *et al.*, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Obter nanocompósitos (argila/polímero hidrofílico) contendo óleo essencial de *Syzygium aromaticum* para controle larvicida do *Ae. aegypti*.

3.2. Objetivos específicos

- Extrair e caracterizar o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (OESA);
- Obter nanocompósitos a partir de argila/polímero hidrofílico;
- Caracterização através de métodos físicos, físico-químicos e analíticos;
- Validar o método analítico de quantificação do constituinte majoritário por espectrofotometria UV-Vis;
- Determinar o teor de OESA incorporado nos nanocompósitos por espectrofotometria UV-Vis;
- Avaliar a atividade larvicida contra larvas de *Ae. aegypti*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Solventes e reagentes

- Óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (OESA), extraído no Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico (LADEF);
- Eugenol (SIGMA) com pureza de 99%;
- Água destilada;
- Água mineral;
- Tween 80 (SYNTH[®]);
- Etanol (IMPEX);
- PVP K-30 - Fornecedor (Sigma);
- Bentonita - Fornecedor (Bentec).

4.1.2. Equipamentos e acessórios

- Balança analítica (DENVER[®] APX-200);
- Balança semi-analítica (ACCULAB[®] VIC-612);
- Agitador magnético (FISATOM[®]);
- Moinho de facas (SOLAB[®]);
- Dessecador (MARCONI[®]);
- Clevenger modificado;
- Pipeta automática;
- Pipeta graduada;
- Manta aquecedora (QUIMES[®]);
- Bomba de vácuo (FISATON[®]);
- Centrífuga (CENTRIOBIO[®]);
- Difratorômetro de raios- X (Modelo Dmax-2000 da Rigaku);
- Espectrofotômetro de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (PERKIN ELMER[®]);

- Termobalança TGA-50;
- Calorímetro Exploratório Diferencial DSC-50;
- Cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (SHIMADZU® QP 5050 A);
- Espectrofotômetro FEMTO® 800 XI.

4.2. Métodos

4.2.1. Extração e caracterização do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*

4.2.1.1. Extração do óleo essencial

O óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (OESA) foi obtido dos botões florais, em único lote, trituradas em um moinho de facas e levadas a um aparelho extrator do tipo Clevenger modificado (Figura 7) por 3 h, para obtenção do óleo. Depois, foi acondicionado em frasco âmbar e armazenado sob-refrigeração para posteriormente ser filtrado em funil de separação, separando a água do óleo, e colocado em frasco de vidro para seu armazenamento em freezer à -20 °C. O cravo-da-índia foi adquirido no mercado Municipal Albano Franco em Aracaju-SE.



Figura 7: Esquema de extração do óleo essencial *Syzygium aromaticum*.

4.2.1.2. Determinação da densidade do óleo

A densidade do óleo foi determinada pela técnica da picnometria. Um picnômetro de 5 mL foi calibrado com água destilada a 20 °C. O óleo foi colocado no picnômetro e pesado após o ajuste da temperatura. O resultado foi obtido pelo quociente entre a massa obtida do óleo dividida pela massa obtida da água, segundo estabelecido na Farmacopeia Brasileira (2010).

4.2.1.3. Identificação dos constituintes químicos do óleo após a extração dos botões florais

A análise qualitativa da composição química do óleo essencial foi realizada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas CG-EM, equipado com um autoinjeter AOC-20i (Shimadzu) e coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific (5%-phenil-95%-dimethylpolisiloxano) de 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de filme, usando He como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min, a temperatura foi programada mantendo 50 °C por 1,5 min, seguido de um aumento de 4 °C/min até atingir 200 °C, depois a 10 °C/min até atingir 250 °C mantendo constante esta temperatura por 5 min; temperatura do injetor de 250 °C e temperatura do detector (ou interface) de 280 °C; foi injetado um volume de 0,5 µL em acetato de etila; taxa de partição do volume injetado de 1:83 e pressão na coluna de 64,20 kPa.

As condições do EM foram: detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1000 u/s; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da. A análise foi realizada no Departamento de Química da UFS .

4.2.2. Validação do método de quantificação do eugenol por espectrofotometria UV-Vis

A validação de um método analítico é definida como o processo pelo qual é estabelecida, por estudos laboratoriais, que as características de eficiência do

método correspondem aos requerimentos necessários à aplicação analítica desejada (MOURA *et al.*, 2008).

Os parâmetros necessários para validação de uma metodologia analítica, linearidade, precisão, exatidão, robustez e seletividade foram avaliados de acordo com as normas estabelecidas pela RE n° 899/03 (BRASIL, 2003).

A quantificação foi realizada a partir de uma solução padrão de eugenol, na concentração de 1 mg.mL⁻¹, utilizando como solvente o etanol. Em seguida, foram feitas as devidas diluições, com água destilada, para dar andamento às análises.

4.2.2.1. Varredura espectrofotométrica

Para identificar qual o comprimento de onda de absorção máxima do eugenol (λ máx), foram preparadas amostras na concentração de 100 mg/mL e realizada uma varredura num comprimento de onda de 200 a 800 nm.

4.2.2.2. Linearidade

A linearidade foi determinada através da média de três curvas analíticas, com seis concentrações crescentes do OESA e do constituinte majoritário, o eugenol, 0,005; 0,01; 0,015; 0,04; 0,05 e 0,06 mg/mL. Cada concentração foi realizada em triplicata. A análise de regressão linear foi estimada utilizando ajuste de dados pelo método dos mínimos quadrados.

4.2.2.3. Precisão

Foram preparadas três concentrações de baixa (0,005 mg/mL), média (0,04 mg/mL) e alta (0,06 mg/mL), em triplicata. A precisão do método foi avaliada nos níveis de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrída). As análises foram realizadas em dois dias diferentes e por analistas diferentes.

4.2.2.4. Exatidão

Foram realizadas determinações com três concentrações diferentes, baixa (0,005 mg/mL), média (0,04 mg/mL), e alta (0,06 mg/mL), em triplicata. O coeficiente

de variação (C.V. %) e a porcentagem de recuperação foram utilizados para avaliar a exatidão definida como:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

4.2.2.5. Seletividade

A seletividade do método foi determinada pela avaliação da interferência de componentes do nanocompósito na quantificação do eugenol, através da varredura espectrofotométrica na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm. Os componentes avaliados foram bentonita (10 mg), PVP (10 mg) e bentonita-PVP (10 mg) todos diluídos em etanol absoluto e depois em água para análise. A análise das amostras foi realizada em triplicata.

4.2.2.6 Robustez

A robustez do método de quantificação foi verificada a partir da variação de temperatura (25 °C e 37 °C) e do pH da água (8,3 e 5,0) utilizada para leitura. A mesma concentração (0,04 mg/mL) foi avaliada e realizada em triplicata. Os resultados da avaliação da robustez foram submetidos à análise estatística utilizando o teste de *One-way* ANOVA, seguido de Pós-Teste de Tukey's com o auxílio do software GraphPad Prism versão 5.0.

4.2.2.7 Determinação do OESA por espectrofotômetro UV-Vis

A Quantificação do teor OESA foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis Femto modelo espectrofotômetro 800 XI. Primeiramente, 10 mg dos nanocompósitos nas três proporções 2:1, 1:1 e 1:2 p/p, foram pesados e colocados em balões de 10 mL e completados com etanol. As amostras foram homogeneizadas por 3 minutos em vórtex e posteriormente, centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram diluídas em água na razão de 1:5 para análise em espectrofotômetro UV-Vis, utilizando comprimento de onda de 273 nm. A análise foi realizada em triplicata.

O Teor foi realizado com base na % incorporada e na relação “massa” de óleo para peso de nanocompósito.

4.3. Obtenção e Caracterização dos nanocompósitos

4.3.1. Obtenção dos nanocompósitos inertes e com OESA

O nanocompósito PVP/Bentonita foi obtido pelo método de intercalação em solução água/etanol na proporção 1:1. Foram pesadas quantidades estequiométricas de PVP e de argila, de modo que se mantivessem nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2 (p/p); o sistema foi deixado sob agitação contínua em vários tempos reacionais de 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 24 h, 48 h e 72 h em temperatura ambiente; a remoção do solvente foi feita através de centrifugação a 4000 rpm por 30 minutos (DORNELAS *et al.*, 2010). O mesmo processo foi realizado na preparação dos nanocompósitos contendo OESA, sendo o óleo essencial adicionado durante o processo de agitação.

4.3.2 Caracterização dos nanocompósitos

4.3.2.1 Difração de Raios X (DRX)

A cristalinidade dos compostos foi obtida pelo método do pó em um difratômetro da marca Rigaku Ultima+RINT 2000/PC, utilizando radiação $\text{CoK}\alpha$, ($\lambda = 1,7889 \text{ \AA}$), velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$, intervalo de $1\text{-}20^\circ$ (2θ) em passos de $0,020$, a 40 kV e 40 mA. As análises foram realizadas no Departamento de Física da Universidade Federal de Sergipe.

4.3.2.2 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros foram obtidos em equipamento PerkinElmer[®], na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} . Os componentes em pó e o OESA foram analisados pelo método de pastilhas de KBr, na região de $4000\text{-}400$

cm⁻¹. As análises foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe.

4.3.2.3. Termogravimetria (TG/DTG)

As curvas TG/DTG foram obtidas respectivamente por meio da termobalança TGA-50, na faixa de temperatura de 30 a 800 °C, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL/min) em uma razão de aquecimento de 10 °C/min, utilizando cadinho de platina contendo aproximadamente 10 mg. O equipamento foi calibrado com oxalato de cálcio monohidratado (Merck®) com pureza de 99,999% e obtidas as curvas em branco para avaliar a estabilidade da linha de base do sistema. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. As análises termogravimétricas foram realizadas no Laboratório Multiusuário - Multilab, no Departamento de Física da Universidade Federal de Sergipe.

4.3.2.4 Determinação de umidade por Karl Fischer

Para determinação do teor de umidade do OESA, dos componentes isolados e dos nanocompósitos inertes e com o OESA foi utilizado um Titulador Potenciométrico da marca Metrohm, modelo 803 Ti Stand, com o reagente Karl Fischer. O método aplicado é uma modificação da norma ASTM D1744. O solvente de titulação empregado foi uma mistura de metanol seco (pureza 99,8%) e clorofórmio (pureza 99%) na proporção 3:1. As análises foram realizadas em triplicata no Núcleo de Estudos de Sistemas Coloidais (NUESC) da Universidade Tiradentes (UNIT) – Aracaju-SE.

4.3.2.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC foram executadas em instrumento DSC-TA Instruments, as amostras de aproximadamente 2 mg foram colocadas em porta-amostras de alumínio. O aparelho foi programado na faixa de 25 a 400 °C sob razão de aquecimento de 10 °C/min. As curvas de DSC foram obtidas a partir do primeiro ciclo de aquecimento sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min). O equipamento foi previamente calibrado com índio (pureza de 99,999%) e, como referência, utilizou-se porta-amostras vazias de alumínio. As análises foram realizadas no

Laboratório Multiusuário - Multilab, no Departamento de Física da Universidade Federal de Sergipe.

4.3.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução (MEV/FEG)

As imagens das superfícies da bentonita e das amostras de nanocompósitos inerte e com óleo na proporção de 2:1 p/p, foram geradas com ampliações de 9.000 a 15.000 vezes e com energia de 5 e 15 kV. Os ensaios de MEV foram realizados em um Microscópio Eletrônico de Varredura da marca Jeol, modelo JSM – 7500F pertencente aos Laboratórios do Centro Multiusuários de Nanotecnologia (CMNano) da UFS.

4.4. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *Sizygium aromaticum*, eugenol e do nanocompósito contendo óleo de *Sizygium aromaticum*

Os ovos de *Ae. aegypti* foram produzidos no insetário e mantidos secos, aderidos em tiras de papel até o uso, utilizando amostras de campo e Rockfeller do *Ae. aegypti*. Ovos desta espécie podem ser mantidos no laboratório por aproximadamente quatro meses, sem perda da viabilidade.

Para a utilização nos ensaios, tiras de papel contendo ovos foram colocadas em um recipiente retangular com água e aproximadamente 200 mg de ração. O recipiente foi mantido no insetário, com temperatura controlada (26 a 28 °C) de modo a permitir a eclosão e o desenvolvimento das larvas, por quatro dias, quando as larvas estão de terceiro a quarto estágio (L3/L4). As larvas Rockfeller do *Ae. aegypti* foram adquiridas no insetário do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Morfologia da UFS.

Para a determinação da atividade larvicida do OESA e do componente majoritário (eugenol), foram utilizados 100 mg do OESA ou eugenol dispersos em tween 80 (0,25 mL) em um béquer de 10 mL. Água mineral (4,75 mL) foi adicionada como solvente para uma solução padrão (20.000 ppm). Essa solução foi utilizada para preparar soluções aquosas de 100 mL, variando na faixa de 5 a 100 ppm, onde foram adicionadas 20 larvas Rockfeller L3/L4. Os ensaios foram realizados em

triplicata. Após 24 h, foi verificado o número de larvas mortas, sendo considerada morta a larva que não apresentava movimentos.

A atividade larvicida do nanocompósito foi realizada na proporção 2:1 no tempo reacional de 1 h. As concentrações dos nanocompósitos utilizadas no ensaio larvicida foram determinadas através do teor. O ensaio foi realizado em triplicata, as concentrações dos nanocompósitos variaram na faixa de 20 a 100 ppm e as condições utilizadas foram as mesmas pré-estabelecidas anteriormente.

A análise estatística foi realizada a partir da determinação da concentração letal capaz de reduzir 50% das larvas (CL_{50}) e o intervalo de confiança para cada composto foi calculado. Os dados foram submetidos à análise probítica de acordo com Finney (1971).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração e caracterização do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*

Para a extração dos óleos essenciais foi empregado o método de hidrodestilação, que é um processo simples e bastante utilizado para extração de óleos voláteis. Neste processo, quando as misturas formadas por água em uma matriz vegetal entram em ebulição, os vapores de água e os voláteis são conduzidos para o condensador, onde ocorre uma troca térmica e os vapores são condensados.

O rendimento médio obtido da extração do OESA obtido foi 8% e a densidade determinada do óleo essencial foi de 1,03 g/mL. Numa determinada espécie, o rendimento do óleo essencial e a concentração de cada um dos constituintes do óleo podem variar durante o desenvolvimento do vegetal. A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem influência direta na composição e rendimento. Diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar óleos essenciais com composição química, caracteres físico-químicos e odores bem distintos (AGOSTINI *et al.*, 2005). O método de extração do óleo, a forma de secagem e o tempo de extração também influenciam no rendimento e na composição química dos óleos essenciais.

5.1.1. Identificação dos constituintes químicos do óleo após a extração dos botões florais

A composição química do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, obtido a partir da extração dos botões florais do cravo-da-índia, está representada na Figura 8. O OESA apresentou como principal constituinte o eugenol com 71,92%, além de outros terpenos, como o β -cariofileno com 22,80%, α -humuleno com 2,39% e Acetato de chavibetol com 2,89 % apresentado na Tabela 1.

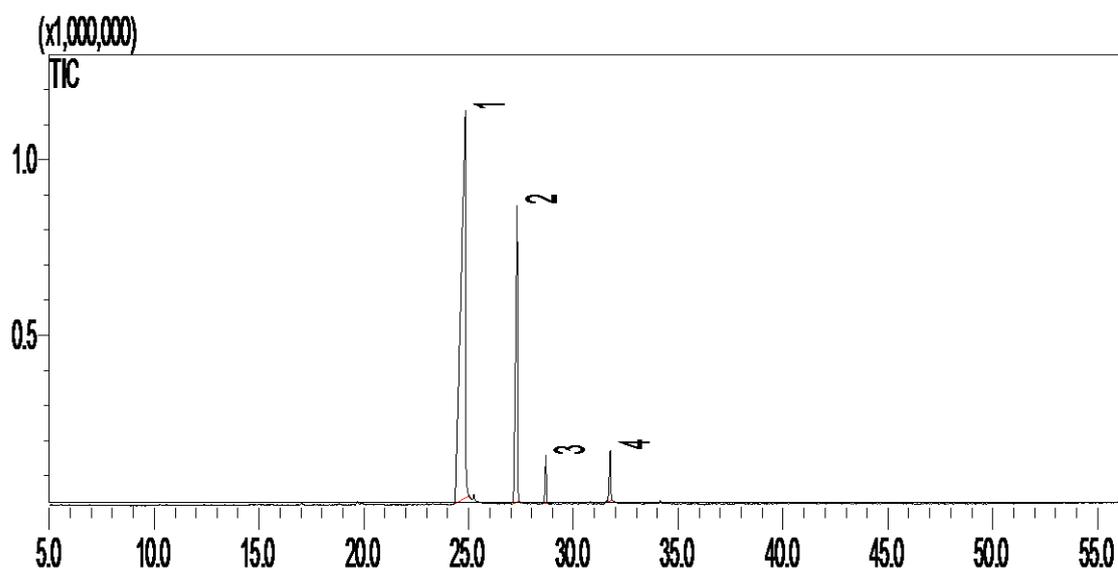


Figura 8: Cromatograma (CG/EM) do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.

Tabela 1: Constituintes químicos do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* determinado por CG-EM.

PICO	TR	Composto	GC/MS %	GC/FID %	IR cal	IR lit
1	24,849	Eugenol	71,92	71,47	1363	1356
2	27,318	β -cariofileno	22,80	24,35	1425	1417
3	28,679	α -humuleno	2,39	2,45	1460	1452
4	31,754	Acetato de chavibetol	2,89	1,73	1532	1524

Resultados semelhantes foram encontrados em trabalho realizado por MELO (2012), quando identificou o eugenol (74,62%) como sendo o principal constituinte do OESA.

5.2. Validação do método de quantificação do eugenol por espectrofotometria UV-Vis

5.2.1. Varredura espectrofotométrica (UV-Vis)

A validação do método analítico de quantificação do eugenol iniciou-se pela obtenção do espectro de varredura do OESA. Na Figura 9, pode-se observar que o comprimento de absorção máxima foi de 273 nm. Logo, utilizou o comprimento para a determinação da curva de linearidade e demais parâmetros requeridos.

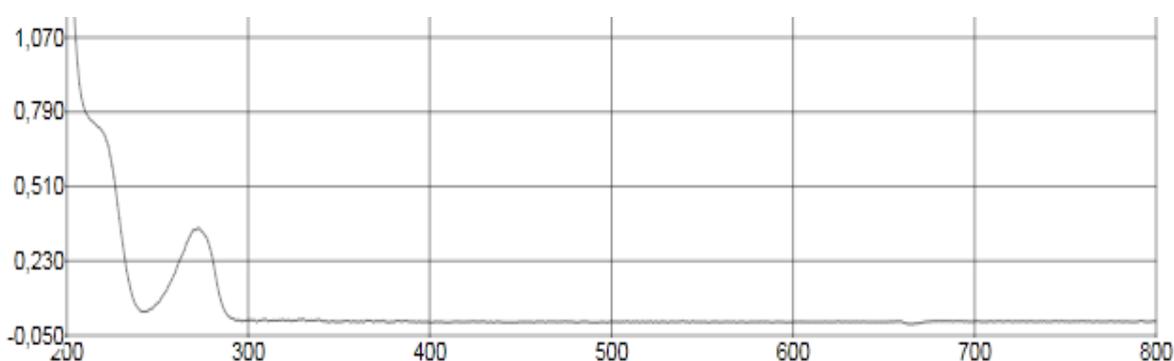


Figura 9: Espectro de varredura na região do ultravioleta do Eugénol no λ de 200 a 800 nm.

5.2.2. Linearidade

O método proposto apresentou linearidade na faixa de concentração de 0,005 a 0,06 mg/mL, faixa de concentração escolhida para a realização dos trabalhos posteriores. A linearidade está expressa pelo coeficiente de correlação da curva analítica com $R^2 = 0,9999$. Dessa forma, é possível utilizar este método para as análises quantitativas do eugenol por apresentar uma boa correlação entre a concentração e a absorvância. A curva analítica obtida está representada na Figura 10.

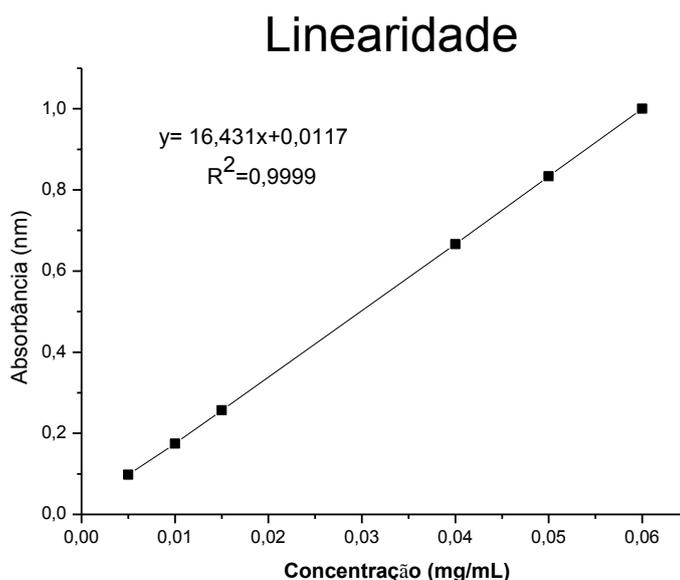


Figura 10: Curva analítica do método de validação do Eugenol (0,005 – 0,06 mg/mL).

5.2.3. Precisão

Para o ensaio de precisão, três amostras foram analisadas em triplicata, sendo realizados os testes de repetibilidade e precisão intermediária.

A repetibilidade revelou um coeficiente de variação entre 0,70 e 1,91%, valores que estão de acordo com o estabelecido pela RE 899/03, no qual o C.V.% deve ser menor que 5% (Tabela 2).

Tabela 2: Repetibilidade do método de quantificação do eugenol por espectrofotometria UV.

Concentração de eugenol (mg/mL ⁻¹)	Absorbância média (nm)	D.P.	C.V. %
0,005	0,0963	0,0012	1,1987
0,040	0,7443	0,0142	1,9063
0,060	1,1370	0,0087	0,7617

*D.P. = Desvio Padrão, C. V. % = Coeficiente de Variação em porcentagem.

Para a realização da precisão intermediária, as leituras foram realizadas por dois analistas e em dias diferentes representados na Tabela 3.

Tabela 3: Precisão intermediária do método de quantificação do eugenol por espectrofotometria UV realizada por dois analistas diferentes em dias consecutivos.

Precisão Intermediária				
	Concentração de eugenol (mg/mL⁻¹)	Absorbância média (nm)	D.P.	C.V. %
Analista 1 – 1° Dia	0,005	0,1123	0,0032	2,8616
	0,040	0,7747	0,0157	2,0260
	0,060	1,0440	0,0259	2,4849
Analista 1 – 2° Dia	0,005	0,0963	0,0012	1,1987
	0,040	0,7443	0,0142	1,9063
	0,060	1,1370	0,0087	0,7617
Analista 2 – 1° Dia	0,005	0,1283	0,0050	3,9220
	0,040	0,7673	0,0282	3,6776
	0,060	1,1173	0,0317	2,8335
Analista 2 – 2° Dia	0,005	0,0927	0,0015	1,6484
	0,040	0,5627	0,0145	2,5714
	0,060	0,8763	0,0067	0,7598

* D.P. = Desvio Padrão, C. V. % = Coeficiente de Variação em porcentagem.

A precisão intermediária demonstrou que o método é preciso para análises realizadas por analistas diferentes em um mesmo dia e em dias diferentes, estando o coeficiente de variação encontrado dentro dos limites, ou seja, não ultrapassando os 5% regulamentado pela ANVISA.

5.2.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação do analito. A Tabela 4 mostra uma média de exatidão de 102% e o maior coeficiente de variação de 2,24%. Os resultados de exatidão demonstraram que pequenas variações da concentração de eugenol podem ser quantificadas por espectrometria UV-Vis.

Tabela 4: Exatidão do método de quantificação do Eugenol por espectrofotometria UV.

Concentração de eugenol (mg.mL⁻¹)	Absorbância média (nm)	D.P.	C.V. %	Exatidão (%)
0,005	0,0927	0,0021	2,2464	98,54
0,040	0,6933	0,0068	0,9817	103,70
0,060	1,0640	0,0135	1,2644	106,73
Média				102,99

*C.V. % = Coeficiente de Variação em porcentagem

5.2.5. Seletividade

A seletividade tem por finalidade comparar os resultados obtidos entre amostras contaminadas, com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes, para demonstrar que os resultados dos testes não são afetados pelos compostos presentes (BRASIL, 2003).

Os resultados de varredura representados nas Figuras 11, 12 e 13 mostraram que os compostos presentes na formulação do nanocompósito não absorvem na faixa de comprimento de onda de 190 a 600 nm, ou seja, não interferem na quantificação do analito.

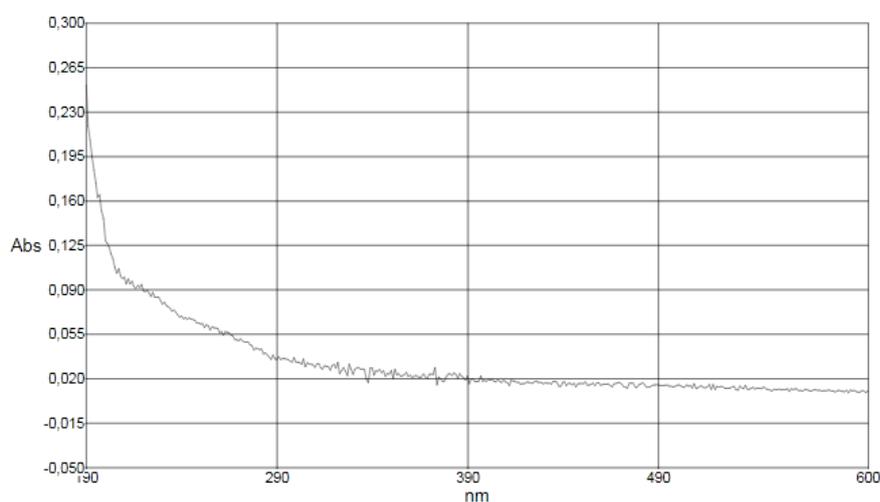


Figura 11: Varredura espectrofotométrica da bentonita, na faixa de 190 a 600 nm, obtida por espectrofotometria UV.

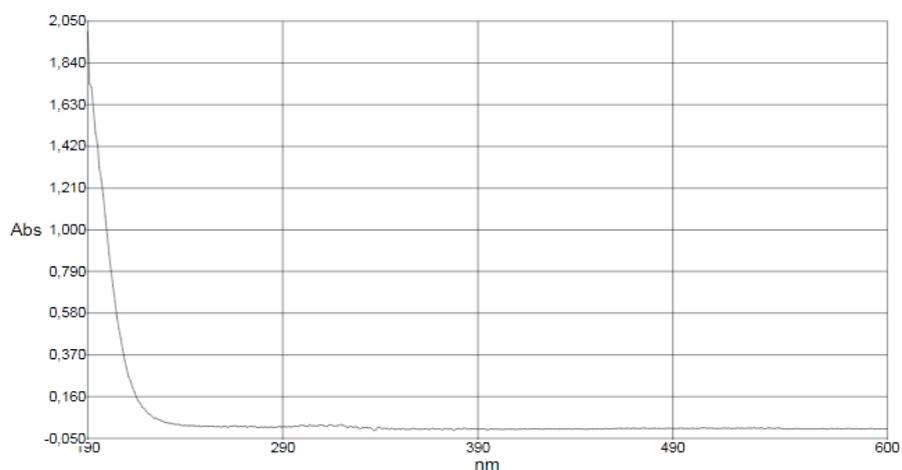


Figura 12: Varredura espectrofotométrica do PVP, na faixa de 190 a 600 nm, obtida por espectrofotometria UV.

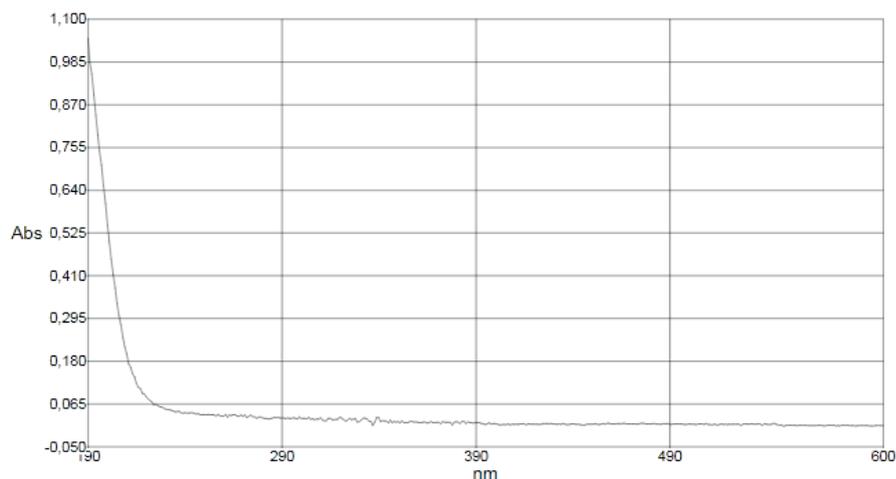


Figura 13: Varredura espectrofotométrica Mistura Física (bentonita/PVP), na faixa de 190 a 600 nm, obtida por espectrofotometria UV.

5.2.6. Robustez

As variações da temperatura e pH não afetaram a quantificação do eugenol. De acordo com a análise estatística ANOVA, não há diferença significativa entre os resultados obtidos, apresentando um valor de $p < 0,05$. Sendo assim, pode-se afirmar que o método é robusto, com 95% de confiança e representado na Tabela 5.

Tabela 5: Determinação da robustez do método de quantificação do eugenol por espectrofotometria UV variando o pH e a temperatura.

Amostras	pH	Temperatura (°C)	Absorbância média (nm)	D.P.	C.V. (%)
1	8,3	25	0,700	0,0046	0,6595
2	5,0	25	0,719	0,0187	2,6020
3	8,3	35	0,715	0,0267	3,7398
4	5,0	35	0,712	0,0136	1,9129

*Todas as amostras foram realizadas com a concentração de $0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$.

5.2.7. Determinação do OESA por espectrofotômetro UV-Vis

Na Tabela 6, observa-se que o nanocompósito na proporção 2:1 obteve um teor maior quando comparado com os demais, apresentando 35,9% de incorporação, seguido dos nanocompósitos de 1:2 e 1:1 com, respectivamente, 33,9% e 31,9%.

Tabela 6: Teor de incorporação (%) e teor (mg/MG) OESA dos nanocompósitos obtidos por espectrofotometria UV.

<i>Teor de OESA nos nanocompósitos</i>				
Amostra	Massa¹ experimental (mg)	Massa teórica² (mg)	Teor de³ incorporação %	Teor⁴ mg/mg
2:1	0,924	2,575	35,889	0,092
1:1	0,821	2,575	31,901	0,082
1:2	0,875	2,575	33,995	0,088

*¹ Massa experimental – quanto foi possível quantificar, quanto foi possível extrair dos nanocompósitos.

*² Massa teórica – quanto de óleo foi colocado em 1 mg do nanocompósito.

*³ Teor de incorporação – percentagem de incorporação.

*⁴ Teor mg/mg – quanto de óleo extraído por 1 mg do nanocompósito.

5.3. Caracterizações dos nanocompósitos

5.3.1. Difração de Raios X (DRX)

O polivinilpirrolidona (PVP) apresenta um halo alongado, evidenciando um comportamento amorfo conforme Chahal *et al* (2011) e Giri *et al* (2011).

Nos difratogramas de raios X da bentonita é possível observar picos característicos da montmorilonita, no ângulo de $2\theta = 7,55^\circ$. O espaçamento basal d_{001} de 13,58 Å, é característico do grupo das esmectitas presente na bentonita, estes resultados foram encontrados por Akat *et al* (2008).

Conforme a Figura 14, o espaçamento interlamelar da Mistura Física mostrou uma sobreposição da bentonita com um pequeno deslocamento para ângulos menores com d_{001} de 14,05 Å, enquanto isso, o espaçamento interlamelar da argila foi de 13,58 Å.

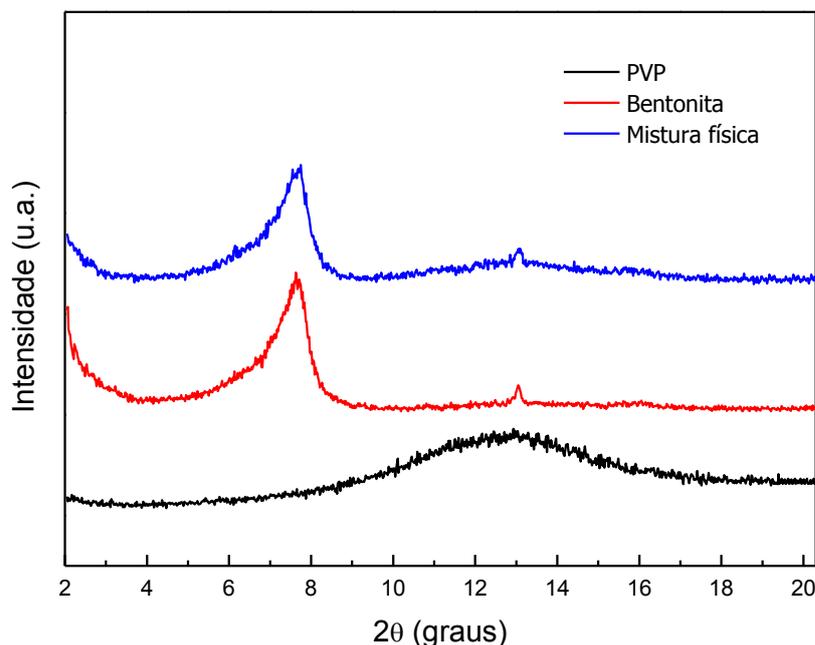


Figura 14: Difratograma do PVP, Bentonita e Mistura Física (bentonita/PVP).

Tabela 7: Espaçamento interlamelar.

Material	2θ	d (Å)
Bentonita	7,55	13,61
Mistura Física	7,30	14,08

Os nanocompósitos inertes no tempo reacional de 1 h apresentaram espaçamento basal (d_{001}) para a amostra 2:1 de 27,13 Å, para a amostra 1:1 de 27,35 Å e para amostra 1:2 de 27,57 Å, evidenciado através do deslocamento do pico para ângulos menores de 2θ . A intercalação do polímero nas camadas interlamelares da argila ocorreu devido à expansão do espaçamento basal, o que comprova a organofilização da argila através da intercalação do polímero nas camadas da argila apresentado nas Figuras 15, 16 e 17, respectivamente.

Segundo DJADOUN e SBIRRAZZUOLI (2012), quando ocorre à formação de um novo pico em ângulos menores da argila, um nanocompósito intercalado é formado, e quando o pico é formado na mesma posição ou para ângulos maiores apenas um sistema aglomerado ou imiscível é formado.

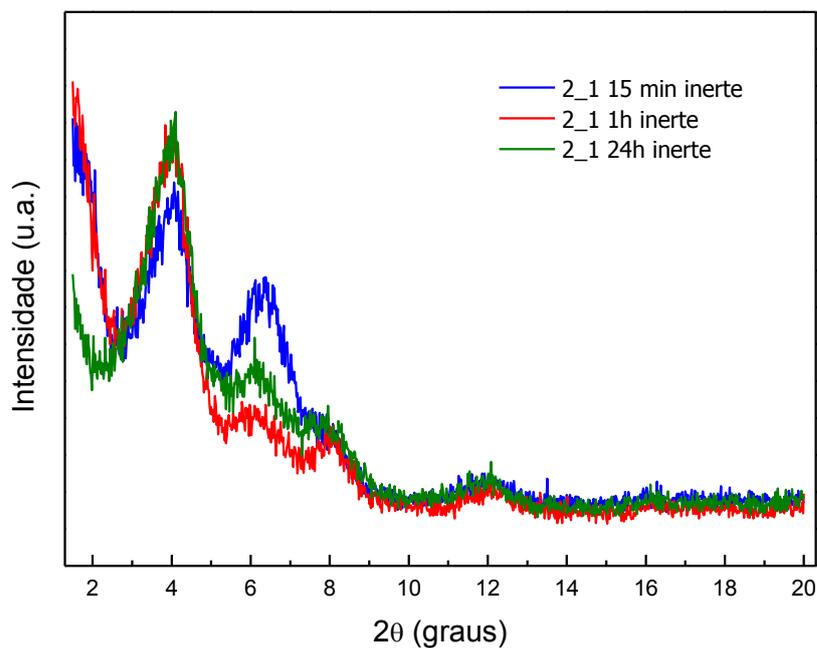


Figura 15: Difratograma dos nanocompósitos inertes na proporção 2:1 (Bentonita/PVP) no tempo reacional de 15 min, 1 h e 24 h.

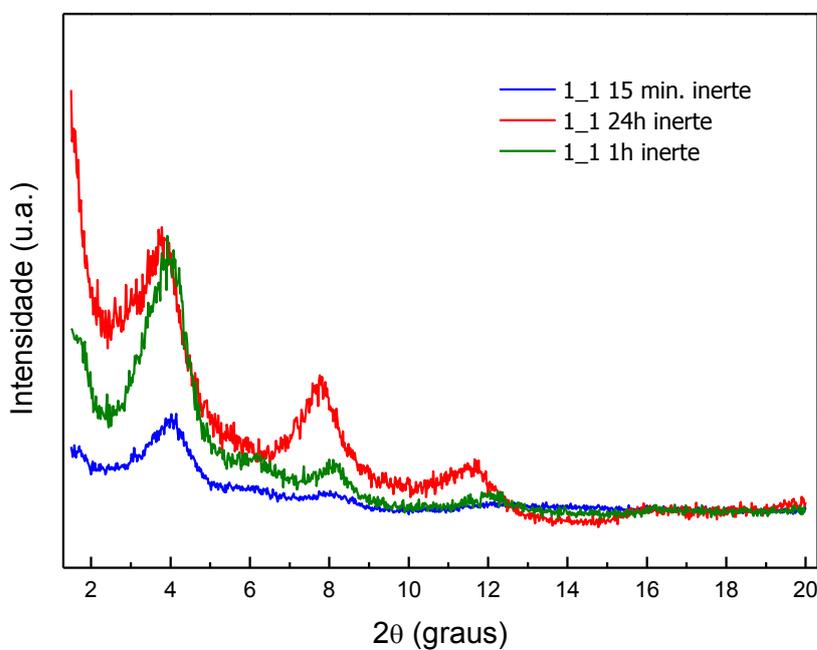


Figura 16: Difratograma dos nanocompósitos inertes na proporção 1:1 (Bentonita/PVP) no tempo reacional de 15 min, 1 h e 24 h.

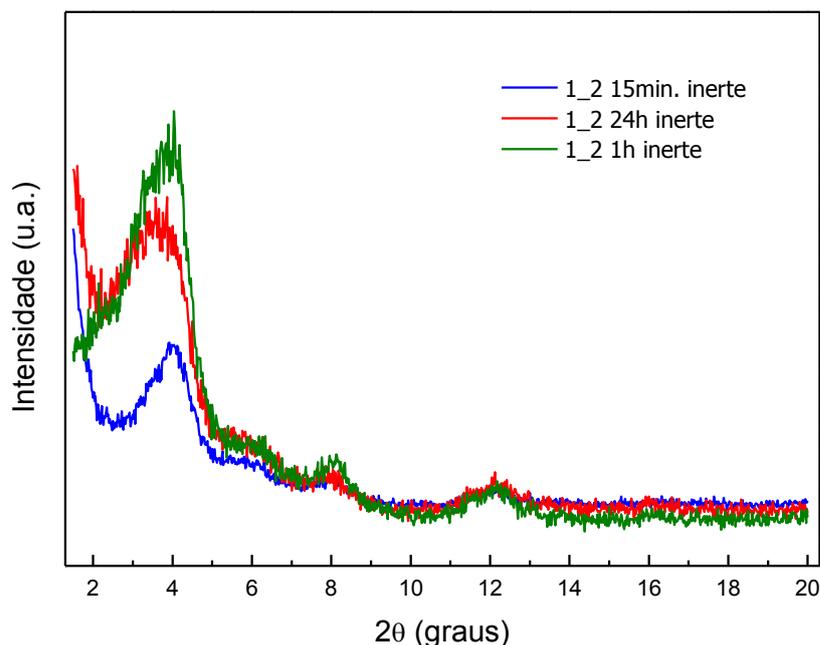


Figura 17: Difratograma dos nanocompósitos inertes na proporção 1:2 (Bentonita/PVP) no tempo reacional de 15 min, 1 h e 24 h.

Nos difratogramas de raios X na Figura 18 dos nanocompósitos com óleo pode ser verificadas uma sobreposição dos nanocompósitos inertes com pequenos deslocamentos, evidenciando que o óleo está presente entre as camadas de silicatos devido à formação de uma estrutura intercalada.

Considerando-se o espaçamento original da bentonita, observa-se que o PVP provavelmente se inseriu no interior do espaço interlamelar, originando um nanocompósito intercalado, possivelmente na forma de uma monocamada. Nota-se que houve um aumento d_{001} de 13,58 Å para d_{001} de 27,13 Å.

Verificando-se os valores de espaçamento interlamelar obtidos após a intercalação. Não foram observadas diferenças significativas quanto ao espaçamento basal nos diferentes tempos considerados, sendo considerado 1 h como melhor tempo para trabalho.

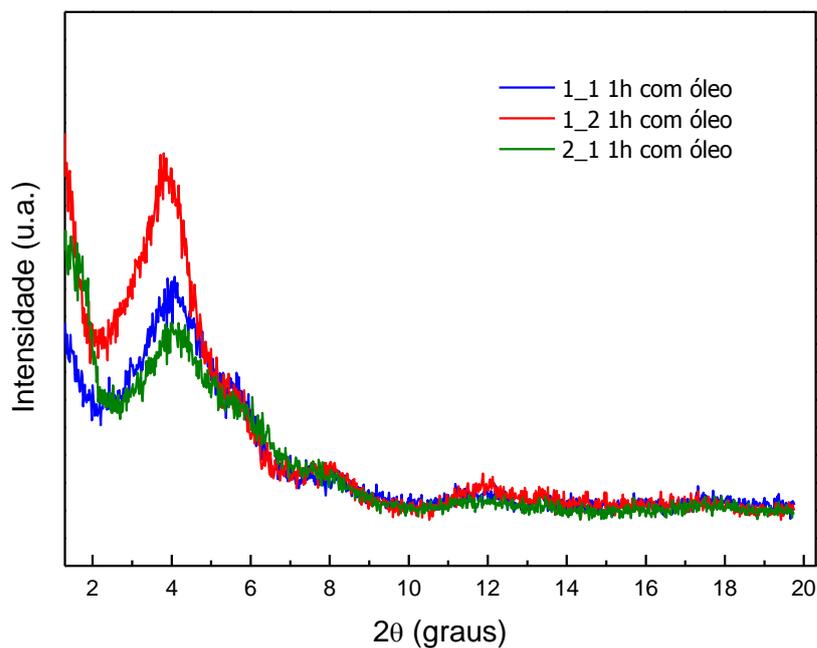


Figura 18: Difratograma dos nanocompósitos com OESA nas proporções 1:1 (Bentonita/PVP), 1:2 (Bentonita/PVP) e 2:1 (Bentonita/PVP) no tempo reacional de 1 h.

Tabela 8: Espaçamento interlamelar dos componentes isolados, dos nanocompósitos inertes e com OESA no tempo reacional de 15 min, 1 h e 24 h.

Tempo reacional	Amostra	2θ (graus)	Distância interplanar (Å)
15 minutos inerte	1:1	4,02	25,51
	1:2	4,00	25,64
	2:1	4,03	25,45
1 hora inerte	1:1	3,75	27,35
	1:2	3,72	27,57
	2:1	3,78	27,13
1 hora com óleo	1:1	3,78	27,13
	1:2	3,75	27,35
	2:1	3,76	27,28
24 horas	1:1	3,99	25,71
	1:2	4,04	25,39
	2:1	4,07	25,20

5.3.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de absorção no infravermelho na Figura 19, o PVP apresentou uma banda de estiramento axial de OH em 3451 cm^{-1} , uma banda de média intensidade em 2958 cm^{-1} , referente a estiramento assimétrico de CH_2 . A ocorrência de bandas na região entre 1657 e 1515 cm^{-1} são referentes à deformação axial C=O, em 1291 cm^{-1} deformação angular de CH_2 . Esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Chahal *et al* (2011) e Giri *et al* (2011).

O espectro da bentonita apresentou uma banda forte em 3624 cm^{-1} e outra em 3441 cm^{-1} e se deve a vibração axial dos grupamentos OH da estrutura e hidroxilas de água envolvidas em ligações de hidrogênio, em 1648 cm^{-1} mostra-se banda referente ao estiramento assimétrico de Si-O-Si e outra banda de baixa intensidade em 1461 cm^{-1} correspondente ao estiramento Si-O. As bandas que decorrem das vibrações das lamelas do silicato podem ser observadas entre $1024 - 469\text{ cm}^{-1}$ (LIRA, 2008 e BHATTACHARYA *et al.*, 2008).

Para a mistura física, verificou-se que há uma sobreposição das bandas de absorção características da Bentonita e do PVP. A presença de bandas em 3616 cm^{-1} se deve a vibração axial dos grupamentos OH estruturais, em 2938 cm^{-1} apresenta uma banda média de CH_2 , em 1648 cm^{-1} mostra pico de estiramento assimétrico de Si-O-Si, e outra banda de baixa intensidade em 1024 cm^{-1} correspondente ao estiramento Si-O.

O espectro do óleo apresentou bandas em 3542 cm^{-1} referente à deformação axial do grupo funcional hidroxila O-H, em 3075 cm^{-1} correspondente a deformação axial aromática C-H, outra banda em 2936 cm^{-1} mostrando deformação axial do grupo metila C-C e em 1751 cm^{-1} referente à deformação axial do grupo funcional aromático C=C (Costa *et al.*, 2011).

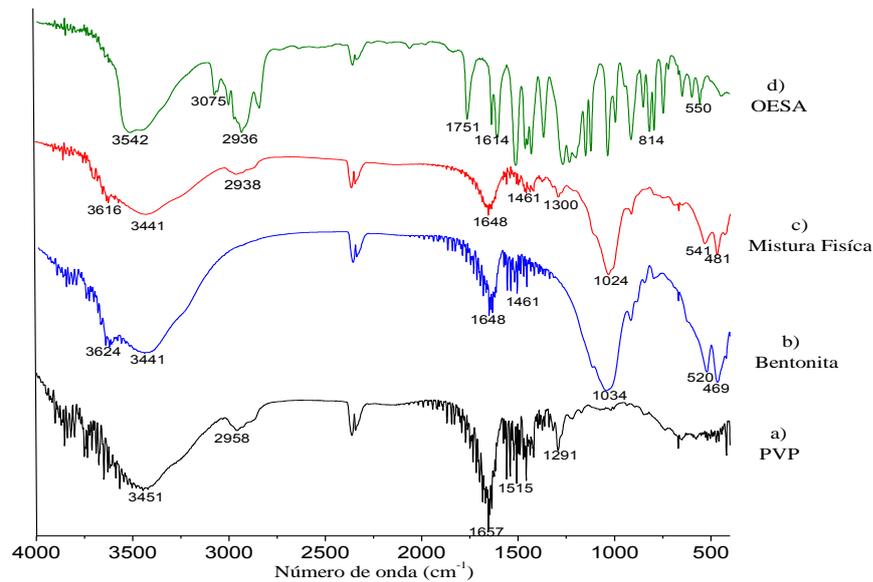


Figura 19: Espectro no infravermelho dos componentes isolados: a) PVP; b) Bentonita; c) Mistura Física (Bentonita/PVP) e d) OESA.

A análise de FTIR dos nanocompósitos inertes e com óleo mostrou que não existe a formação de novas bandas de absorção (Figura 20) o que leva a conclusão que não houve nenhuma reação química evidente entre argila/polímero e o OESA. Provavelmente, o polímero está entre as camadas do silicato lamelar formando uma organofilização e o óleo está presente na matriz.

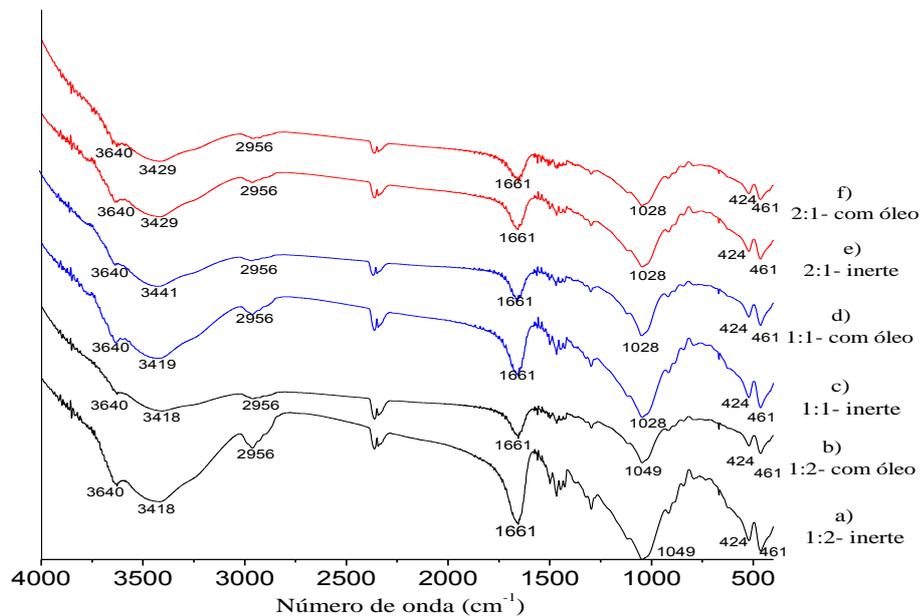


Figura 20: Espectro no infravermelho dos nanocompósitos inertes e com óleo: a) 1:2 (Bentonita/PVP) inerte; b) 1:2 (Bentonita/PVP) com óleo; c) 1:1 (Bentonita/PVP) inerte; d) 1:1 (Bentonita/PVP) com óleo; e) 2:1 (Bentonita/PVP) inerte e f) 2:1 (Bentonita/PVP) com óleo no tempo reacional de 1 h.

5.3.3. Termogravimetria (TG)

A estabilidade térmica dos componentes isolados, bem como os dos nanocompósitos inertes e com o OESA foi analisada por Termogravimetria (TG). As curvas de TG/DTG, para todas as amostras analisadas, estão apresentadas nas Figuras 21, 22 e 23.

As curvas TG/DTG do PVP mostraram três eventos de perda de massa, o primeiro ocorreu entre 30 °C a 120 °C, por tratar-se de um material higroscópico, com perda de massa de 13,77% correspondente à liberação de água adsorvida. A segunda perda de massa (2,42%), na faixa de temperatura de 120 °C a 350 °C e um terceiro evento envolvendo perda de massa de 72,57% na faixa de temperatura de 350 °C a 550 °C correspondente à decomposição térmica do polímero e eliminação de material carbonáceo, seguido de um patamar de estabilidade (CHAHAL *et al.*, 2011).

As curvas TG/DTG da bentonita apresentaram três eventos envolvendo perda de massa. A primeira perda de massa numa faixa de temperatura de 30 °C a 120 °C, atribuída à água adsorvida no material com perda de massa de 8,09%. A segunda e a terceira perda de massa de 1,21% (120 a 350 °C) e de 4,84% (350 a 550 °C) respectivamente, correspondem a desidroxilação da argila (DORNELLAS, 2010; LAVORGANA *et al.*, 2010).

Para a mistura física as curvas TG/DTG mostraram que os eventos térmicos obtidos nas curvas dos constituintes isolados se sobrepuseram durante a decomposição térmica dos materiais. A primeira perda de massa (11,72%) ocorreu entre 30 °C e 120 °C, e está relacionada às curvas TG/DTG do PVP correspondente à perda de água do polímero. A segunda perda de massa de 2,02% (120 a 350 °C) e a terceira perda de massa de 42,74% (350 a 550 °C) respectivamente, está relacionada à sobreposição das curvas TG/DTG do PVP e bentonita, correspondente à decomposição térmica dos componentes em suas respectivas temperaturas.

Na curva do TG/DTG do OESA observa-se uma pequena perda de massa no primeiro evento de 30 °C a 120 °C de 2,95% atribuída à liberação de água adsorvida na amostra. A segunda perda de massa foi mais acentuada na faixa de temperatura de 120 °C a 350 °C, resultando em 91,52% devido à volatilização de alguns constituintes do óleo. A terceira perda de massa nas temperaturas entre 350 °C e

550 °C foi de apenas 0,4% correspondem à decomposição térmica e eliminação de material carbonáceo (COSTA *et al.*; 2011).

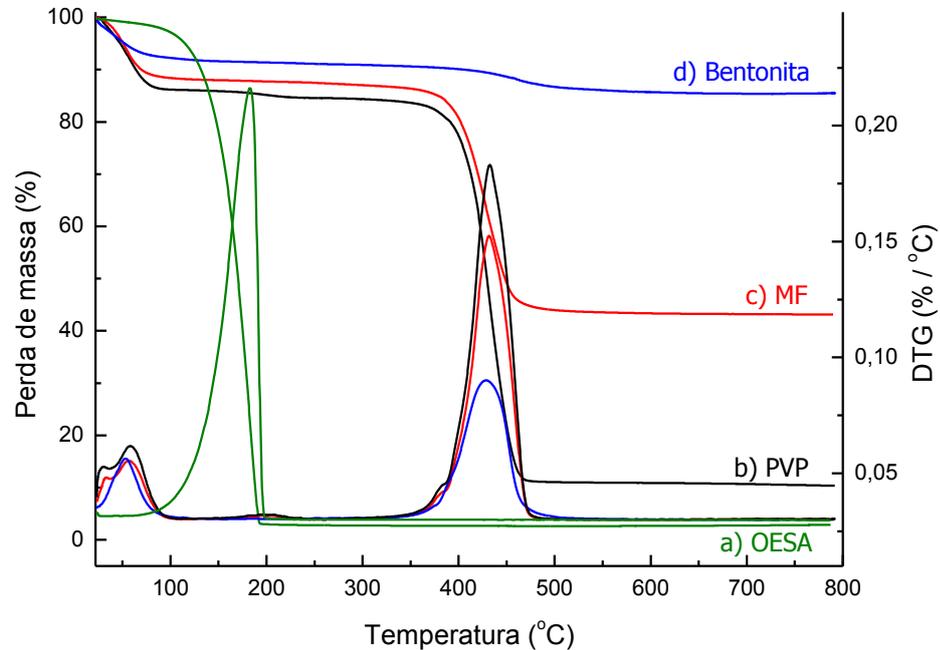


Figura 21: Curvas de TG/DTG dos componentes isolados: a) OESA, b) PVP, c) Mistura Física (Bentonita/PVP) e d) Bentonita. Obtidas na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Na Figura 22 as curvas TG/DTG dos nanocompósitos na proporção 1:1 mostraram perda de massa de 7,87% na faixa de temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ devido à evaporação da água presente no sistema, à segunda com perda de massa de 3,01% na faixa de temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ um terceiro evento envolvendo perda de massa de 16,37% na faixa de temperatura de $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ se refere a sua decomposição.

A amostra 1:2 mostrou perda de massa de 8,87% numa faixa de temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, um segundo evento entre $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ com perda de massa de 3,18% e um terceiro evento entre $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ com perda de massa de 21,21%. Já na amostra 2:1, pode-se observar que houve uma menor perda de massa, com valor de 10,04% de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de um evento correspondente à faixa de temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ com perda de massa de 1,84% e no terceiro evento podemos observar que houve um aumento na estabilidade térmica devido ao alto teor de argila com perda de massa de 12,39%.

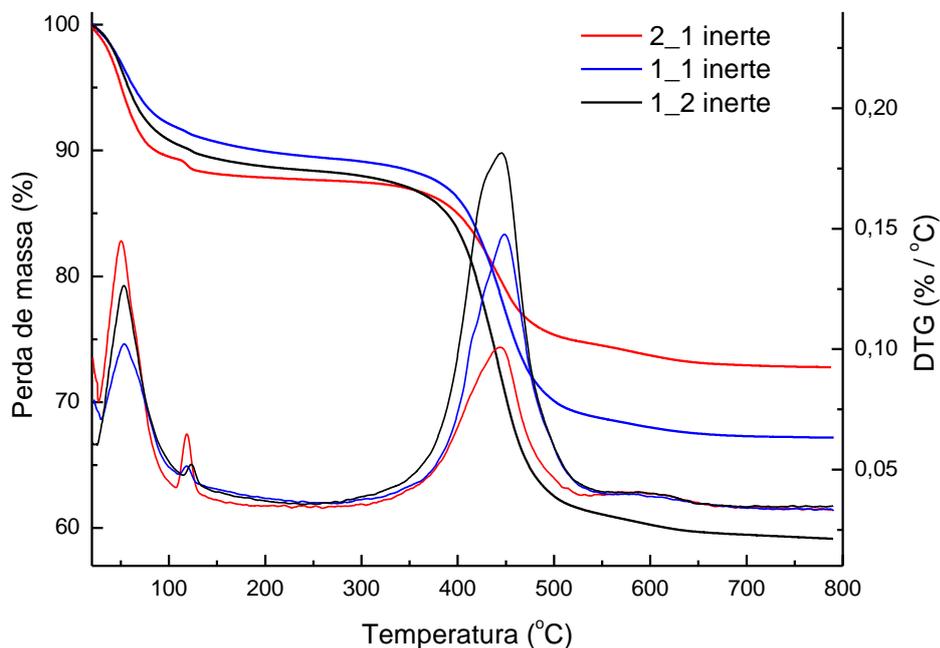


Figura 22: Curvas de TG/DTG dos nanocompósitos inertes: 2:1 (Bentonita/PVP), 1:1 (Bentonita/PVP) e 1:2 (Bentonita/PVP) em um tempo reacional de 1 h. Obtidas na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Quanto ao TG/DTG dos nanocompósitos contendo OESA apresentado na Figura 23, as curvas termogravimétricas dos nanocompósitos na proporção 1:1 mostraram uma primeira perda de massa de 7,95% correspondente a evaporação da água presente no sistema na faixa de temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, uma segunda perda de massa de 1,87% na temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ e uma terceira perda de 19,75% que se refere a decomposição do material carbonáceo entre $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $550\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A amostra 1:2 mostrou perda de massa de 8,10% a uma temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ corresponde à evaporação da água, um segundo evento em $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ com perda de massa de 2,50% e um terceiro com perda de massa de 25,77%. Na amostra 2:1, pode-se observar que houve uma perda de massa total menor, com valor de 9,05% de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1,24% correspondente à faixa de temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 12,79% de $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$.

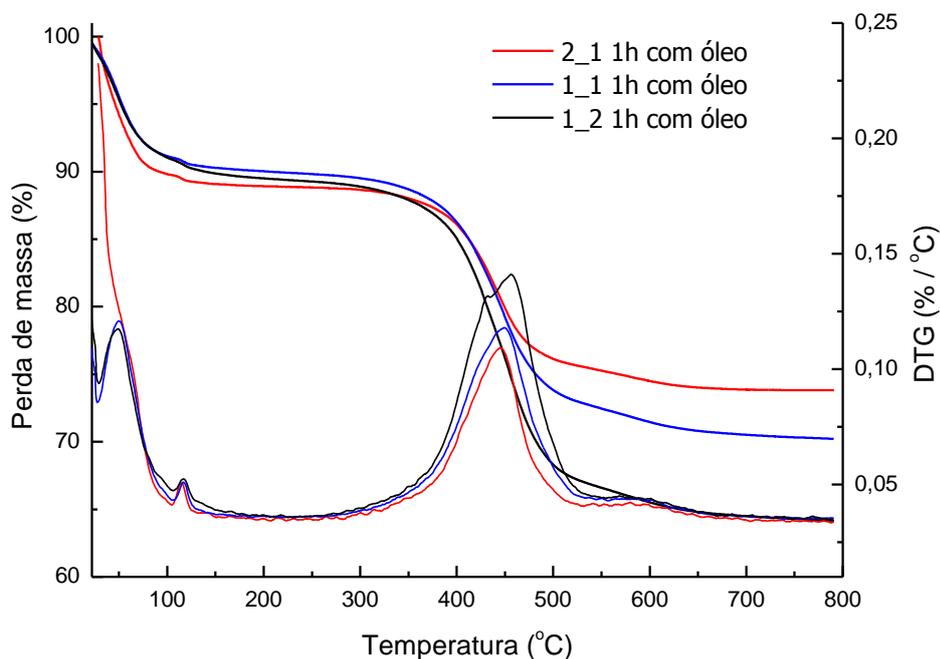


Figura 23: Curvas de TG/DTG dos nanocompósitos contendo OESA: 2:1 (Bentonita/PVP) com óleo, 1:1 (Bentonita/PVP) com óleo e 1:2 (Bentonita/PVP) com óleo em um tempo reacional de 1 h. Obtidas na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Todos os nanocompósitos apresentados nas Figuras 22 e 23 mostraram estabilidade térmica em relação ao polímero puro e ao OESA. Estes resultados demonstraram que a resistência à degradação térmica é melhorada com a adição da argila. A Tabela 9 mostra as perdas de massa calculadas a partir de intervalos específicos para cada material estudado no presente trabalho.

Tabela 9: Perdas de massa do OESA, Bentonita, Mistura Física (Bentonita/PVP), PVP, Nanocompósitos Inertes e com OESA nas proporções de 1:1 (Bentonita/PVP), 1:2 (Bentonita/PVP) e 2:1 (Bentonita/PVP), em intervalos de temperaturas diferentes.

Amostra	Δm_1 (%) 30 – 120 °C	Δm_2 (%) 120 – 350 °C	Δm_3 (%) 350 – 550 °C
OESA	2,95	91,52	0,40
Bentonita	8,09	1,21	4,84
Mistura Física	11,72	2,02	42,74
PVP	13,77	2,42	72,57
1:1 inerte	7,87	3,01	16,37
1:2 inerte	8,87	3,18	21,21
2:1 inerte	10,04	1,84	12,39
1:1 com óleo	7,95	1,87	19,75
1:2 com óleo	8,10	2,50	25,77
2:1 com óleo	9,05	1,24	12,79

No entanto, é importante observar que os resultados obtidos pelas análises termogravimétricas não conseguem distinguir entre perdas de massa do óleo e água dos nanocompósitos. Sendo assim, esses resultados foram complementados pela análise de determinação de água pelo método de Karl Fischer no sentido de estimar perdas totais do óleo nas curvas TG. Analisando a Tabela 10 pode-se observar que as porcentagens de água referentes aos nanocompósitos foram menores quando comparadas com o OESA e o PVP.

Tabela 10: Determinação da umidade por Karl Fischer.

Amostra	Representação da umidade % (n-2)
OESA	2,10
Bentonita	8,89
Mistura Física (Bentonita/PVP)	12,48
PVP	13,89
1:1 (Bentonita/PVP) inerte	7,50
1:2 (Bentonita/PVP) inerte	9,17
2:1 (Bentonita/PVP) inerte	10,69
1:1 (Bentonita/PVP) com óleo	8,18
1:2 (Bentonita/PVP) com óleo	8,86
2:1 (Bentonita/PVP) com óleo	9,33

5.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Na Figura 24 estão representadas as curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) das amostras de PVP, bentonita e Mistura Física (Bentonita/PVP). O comportamento térmico do PVP é esperado, por se tratar de um material higroscópico e amorfo. A curva DSC do PVP apresentou um largo evento endotérmico em 108 °C devido a desidratação do polímero. Esse resultado está de acordo com os resultados encontrados por Chahal *et al.*, 2011.

A bentonita apresentou um evento endotérmico em torno de 72 °C correspondente à perda de água e/ou grupos hidroxila ligados às moléculas da argila (DORNELAS, 2010). Este evento pode ser confirmado ao analisar a curva TG da bentonita, a qual exibiu perda de massa em uma temperatura próxima.

A partir da análise das curvas DSC citadas, observa-se ausência do evento endotérmico do polímero para a mistura física mostrando uma sobreposição dos eventos endotérmicos do PVP e da bentonita, com um pequeno deslocamento em torno de 86 °C. Este evento pode ser confirmado ao analisar as curvas TG/DTG da MF, a qual exibiu perda de massa devido à perda de água do polímero.

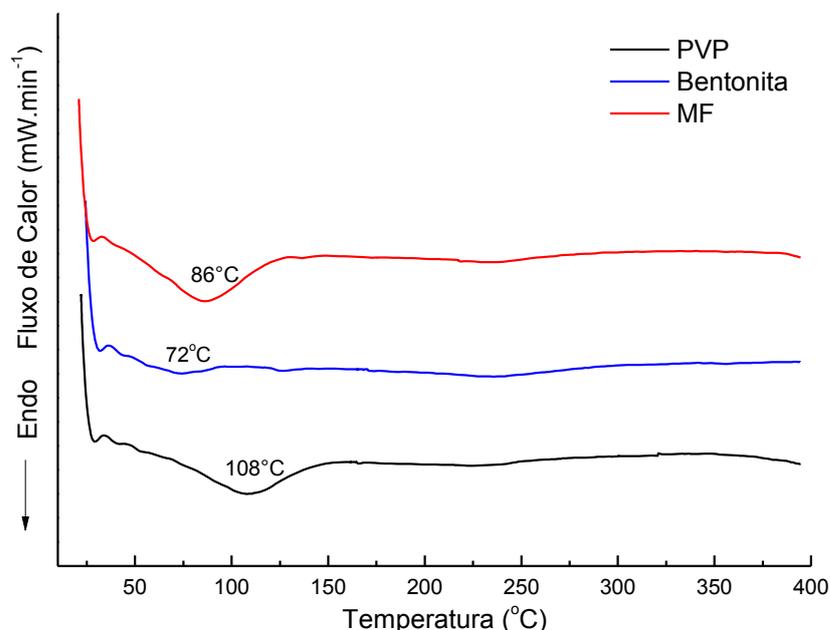


Figura 24: Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos componentes isolados: PVP, Bentonita e Mistura Física (Bentonita/PVP). Obtidas na razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹.

Através das curvas DSC dos nanocompósitos inertes nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2 em 1 h de reação apresentadas na Figura 25, pode-se observar que os materiais se intercalaram, com um evento endotérmico em torno de 115 °C.

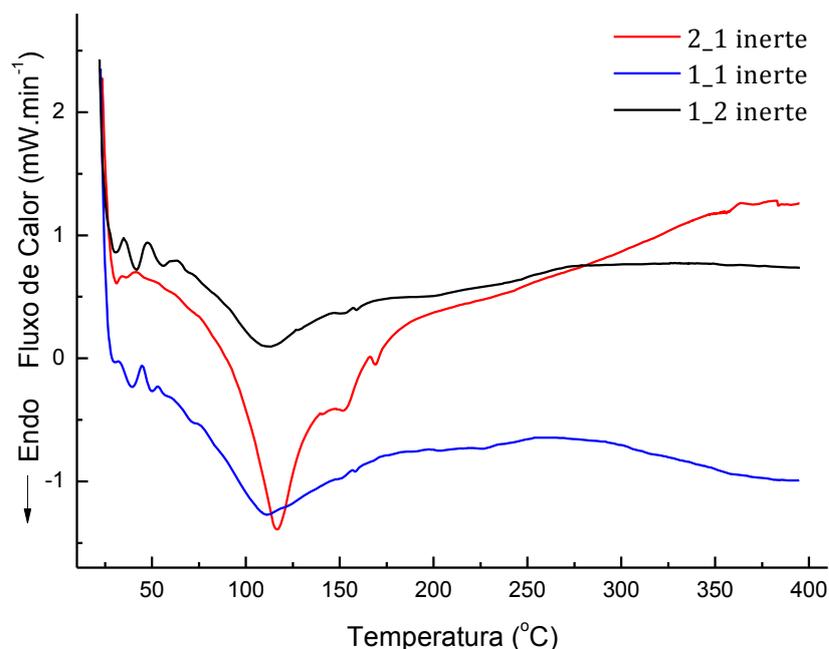


Figura 25: Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos nanocompósitos inertes no tempo reacional de 1 h na proporção p/p: 2:1 (Bentonita/PVP), 1:1 (Bentonita/PVP), e 1:2 (Bentonita/PVP). Obtidas na razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹.

Através das curvas DSC dos nanocompósitos com OESA no tempo reacional de 1 h apresentados na Figura 26 na proporção 1:2 (Bentonita/PVP), observamos um evento endotérmico em 66 °C, na proporção 1:1 (Bentonita/PVP), houve um deslocamento com evento endotérmico em 54 °C e na proporção 2:1 (Bentonita/PVP), é possível visualizar o evento endotérmico em 102 °C sugerindo uma possível interação com os componentes da formulação dando maior estabilidade ao sistema devido à adição da argila.

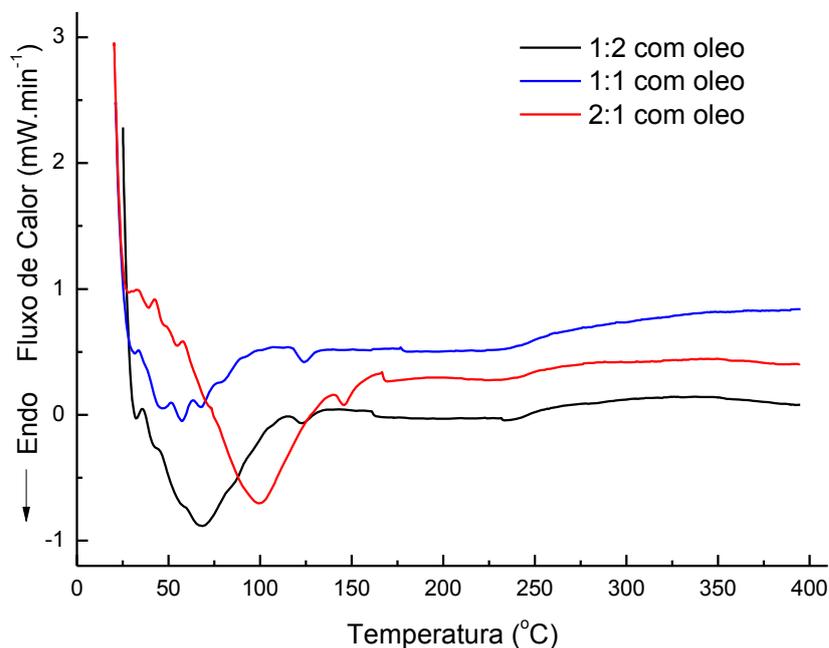


Figura 26: Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos nanocompósitos com OESA no tempo reacional de 1 h na proporção p/p: 2:1 (Bentonita/PVP), 1:1 (Bentonita/PVP) e 1:2 (Bentonita/PVP). Obtidas na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

5.3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução (MEV/FEG)

A morfologia das amostras de bentonita, nanocompósito inerte e com OESA, Figura 27, foram obtidas através de micrografias do MEV/FEG. A análise da superfície da bentonita demonstrou irregularidades na distribuição do tamanho de partículas por possuir maior diâmetro devido à formação de partículas aglomeradas. Quanto aos nanocompósitos, observa-se que a utilização de PVP facilitou a formação dos mesmos, uma vez que foi possível evitar a agregação das partículas.

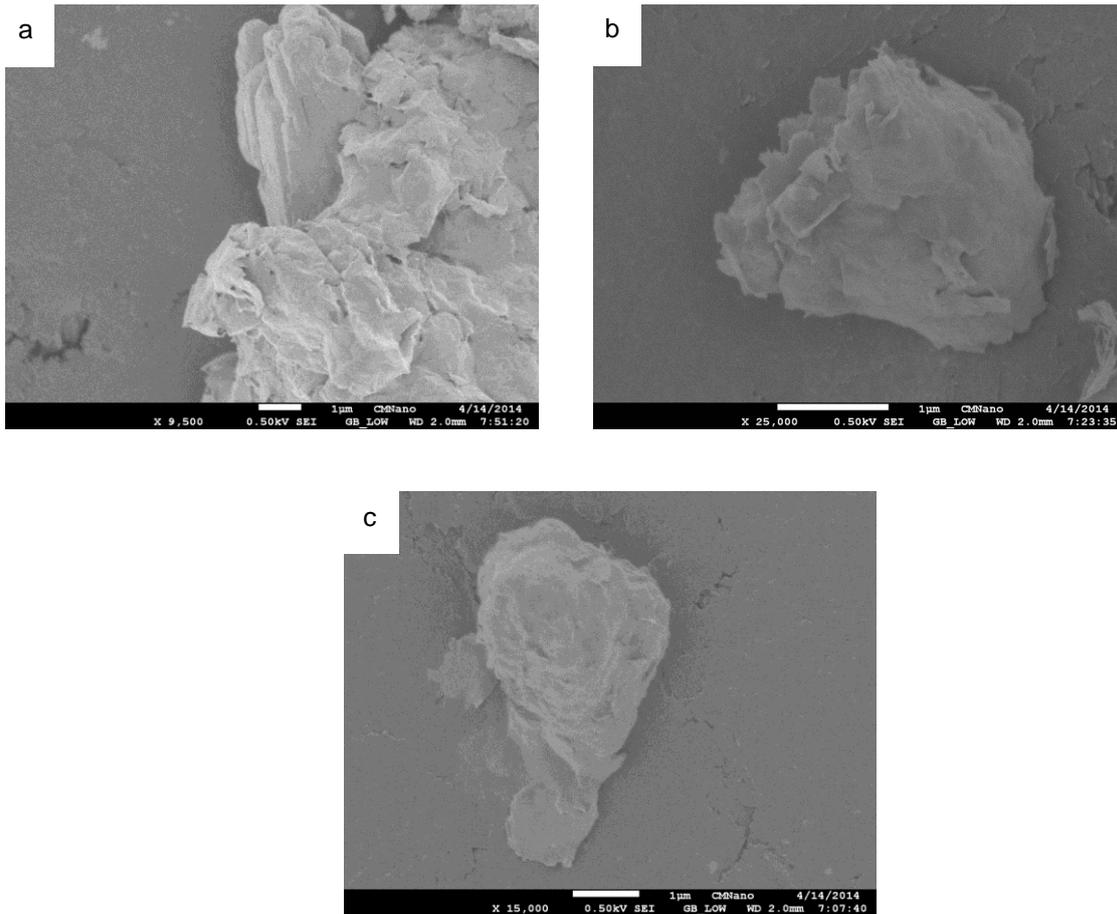


Figura 27: Imagens de MEV/FEG das amostras: a) Bentonita; b) Nanocompósito inerte 2:1 p/p (Bentonita/PVP); c) Nanocompósito com OESA 2:1 p/p (Bentonita/PVP).

5.4. Avaliação da atividade Larvicida

Os resultados obtidos para a atividade larvicida do OESA e para o Eugenol (Tabela 11) foram compatíveis com os da literatura. De acordo com o resultado pode-se observar que o OESA apresentou maior atividade larvicida frente às larvas do *Aedes aegypti*, quando comparado com o componente majoritário, o eugenol. Isto pode ser explicado pelo efeito sinérgico dos outros componentes (β -cariofileno, α -humuleno, Acetato de chavibetol) do óleo com o eugenol.

Tabela 11: CL₅₀ do OESA, eugenol e da amostra 2:1(Bentonita/PVP), frente às larvas do *Ae. aegypti* em L3/L4, após 24 h de exposição.

Amostra	CL₅₀ (95% IC) PPM
OESA	40,74 (40,29-41,20)
Eugenol	48,19 (47,70-48,69)
2:1 (Bentonita/PVP)	27,34 (27,02-27,52)

*95% IC – intervalo de confiança com probabilidade de 95%.

*CL₅₀ – concentração letal necessária para matar 50% da população exposta.

ppm – partes por milhão

Em relação aos nanocompósitos pode-se observar que o nanocompósito na proporção 2:1 p/p (Bentonita/PVP), apresentou uma CL₅₀ menor que a do OESA, o que comprova a viabilidade do método para óleos essenciais.

6. CONCLUSÃO

- O método escolhido para a extração do óleo essencial proporcionou bom rendimento.
- A validação do método analítico utilizado para o OESA mostrou-se linear, preciso, exato, seletivo, robusto e a determinação do teor adequados à curva de calibração, sendo importante para as determinações analíticas.
- Baseado nos resultados obtidos foi possível verificar, a partir dos difratogramas de DRX, a modificação na estrutura da argila, por meio da expansão do espaçamento basal d_{001} , verificado pelo deslocamento do pico para ângulos menores. Os resultados mostraram que os componentes intercalaram entre si de modo que o óleo essencial estivesse incorporado entre as camadas lamelares da argila. A partir disso, pode-se concluir que o método de intercalação foi viável para a obtenção do nanocompósito e as análises colaboraram para o estudo de intercalação dos materiais. Os demais métodos apresentaram informações suplementares que corroboraram com a formação dos nanocompósitos.
- As larvas de *Ae. aegypti* foram susceptíveis à composição do OESA, eugenol e o nanocompósito 2:1 p/p (Bentonita/PVP), tornando-os alternativa importante para o controle das larvas de *Ae. aegypti*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHI, M. REZAEI, M.; FARZI, G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**. vol. 111, p. 343–350, 2012.
- AGOSTINI, F.; SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; PANSERA, M. R.; ZALTERA, F.; WASUM, R. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Rev Bras de Farmacogn**. vol. 15, n.3, p. 215-220, 2005.
- AKAT, H.; TASDELEN, A.; PREZ, F. D.; YAGCI, Y. Synthesis and characterization of polymer/clay nanocomposites by intercalated chain transfer agent. **European Polymer Journal**, vol. 44, p. 1949–1954, 2008.
- ALBUQUERQUE, M. R.; SILVEIRA, E. R.; De AUDE.; LEMOS T. L, SOUZA, E. B.; SANTIAGO G. M. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils from *Eupatorium betonicaeforme* (D.C.) Baker (Asteraceae). **J Agric Food Chem**. vol. 52, n. 22, p. 6708-11. 2004.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., & IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food Chem Toxicol**, 46, 446 – 475, 2008.
- BAYRAM, H.; ONAL, M.; YILMAZ, H.; SARIKAYA, Y. Thermal analysis of a white calcium bentonite, **Therm Anal Calorim**, vol. 101, p. 873-879, 2010.
- BARROSO, G. M. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. São Paulo: EDUSP. vol. 1, p. 255, 1978.
- BERGAYA, F.; LAGALY, G. Surface Modification of Clay Minerals. **Applied Clay Science**. vol. 19, p. 1-3, 2001.
- BHATTACHARYA, S. N.; KAMAL, M. R.; GUPTA, R. K. Polimeric Nanocomposites, **Theory and Practice**. Munich: Hanser Verlag, p. 383 ,2008.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**. vol. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BRAGA, I, A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. vol. 16, n. 2, p. 113-118. 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 94, p. 223-253, 2004.

CALLISTER, JR., **Ciência e Engenharia de Materiais**: Uma Introdução. 8° Ed., Rio de Janeiro, LTC, 2007.

CANEVAROLO, Jr.; SEBASTIÃO, V. **Ciência dos Polímeros**: Um Texto Básico para Tecnólogos e Engenheiros. Artliber Editora. São Paulo, 2002.

CAVALCANTI, E. S. B.; DE MORAIS, S. M.; LIMA, M. A. A.; SANTANA, E. W. P. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 99, n. 5, p. 541-544, 2004.

CAVALCANTI, S. C. H.; SILVA, W. J.; DORIA, G. A. A.; MAIA, R. T.; NUNES, R. S.; CARVALHO, G. A.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; MARÇAL, R. M. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 3251–3255, 2008.

CAVALCANTI, S. C. H.; SANTOS, R. L.; ALVES P. B., BLANK, A. F.; SANTOS, R. L.; MACEDO, Z. S.; LIRA, A. A. M.; ALVES, L. O.; SANTOS, A. J.; GALVÃO, J. G.; LIMA, A. D. **Misturas de óleos essenciais e pesticidas...** INPI BR 10 2012 0187370. 2012.

CHAHAL, R. et al. Effect of ultraviolet irradiation on the optical and structural characteristics of in-situ prepared pvp-ag nanocomposites. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**. vol. 6, p. 299-306, 2011.

CHIU, C-W.; LIN, J-J J. Self-assembly behavior of polymer-assisted clays. **Progress in Polymer Science**. vol. 37, p. 405-444, 2012.

CHUNG, I. M.; SEO, S.; KANG, E. Y.; PARK, W.; MOON, H. I. Larvicidal effects os the major essential oil of *Pittosporum tobira* against *Aedes aegypti* *Aedes aegypti* (L.). **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. vol. 25, n. 3, p. 391-393, 2010.

COELHO, A. C. V.; SANTOS, P. S.; SANTOS, H. S. Argilas especiais: O que são caracterização e propriedades, **Química Nova**, vol. 30, p. 146, 2007.

COLLER, B. A. G.; CLEMENTS, D. E. Dengue vaccines: progress and challenges. **Current Opinion in Immunology**. vol. 23, p. 391–398, 2011.

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - (CEPLAC). Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cravo.htm>> Acessado em 14 de setembro de 2013.

Coordenação de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde (CVE/SE). Sergipe. Informe epidemiológico sobre a situação da dengue em 2010. Disponível em: http://www.saude.se.gov.br/userfiles/dados_janeiro_dezembro_2009.pdf

COSTA, A. R. T.; AMARAL, M. F. Z. J.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. vol. 13, n. 2. 2011.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de Plantas do Nordeste**. Fortaleza, Editora UFC, p. 210,1981.

CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. L. L. De aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje**, vol. 4, p. 54-63, 1986.

CRUZ, G.L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil**. Belo Horizonte: Velloso. p. 400-401, 1965.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL (DPM). Disponível em: https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=7133> Acessado em 21 de setembro de 2013.

DJADOUN, S.; KADI, S.; SBIRRAZZUOLI, N: Thermal stability and kinetic study of poly(ethyl methacrylate-co-acrylonitrile) nanocomposites prepared by in situ polymerization in presence of an Algerian bentonite: **Thermochimica Acta**. vol. 569, p. 127–133, 2013.

Dong, Y.; Boyd, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal of Pharmaceutics**. vol. 417, p. 101– 111, 2011.

DORNELAS, C. B. - **“Preparação e caracterização de novos nanocompósitos de PVP – montmorilonita organofílica como excipiente farmacêutico”**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil 2006.

DORNELAS, C. B. et al. Estudo do Processo de Intercalação via Solução PVP-Bentonite. A Avaliação da Influência do Tempo reacional, da Proporção de Polímero-Argila e da Massa Molar Média. **Polímeros: Ciências e Tecnologia**, vol.20, n. 4, p. 275-279, 2010.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Cambridge, England: Cambridge University Press, p. 31, 1971.

FUNASA (Fundação Nacional da Saúde). Dengue instruções para combater o vetor: manual de normas técnicas. In: Saúde Md, editor. 2001; 3ª ed: 84. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf>.

Acessado em 11 de janeiro de 2013.

FURTADO, K.; GOETZ, P.; LE JEUNE, R. *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier. **Phytotherapie**. vol. 8, p. 37-43. 2010.

GIRI, N.; NATARAJAN, R. K.; GUNASEKARAN, S.; SHREEMATHI, S. C. NMR and FTIR spectroscopic study of blend behavior of PVP and nano silver particles. **Archives of Applied Science Research**. vol. 3, n. 5, p. 624-630, 2011.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 68, p. 335-357, 2002.

GLAUBER, D, J. A emergência global/ressurgimento de arboviroses como problemas de saúde pública. **Arch Med Res**. vol. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

GLAUBER, D. J. The global pandemic of dengue/dengue hemorrhagic fever: Current status and prospects for the future. **Annals of the Academy of Medicine, Singapore**, vol. 27, p. 227-234, 2008.

GUIMARÃES, T. R.; PAIVA L. B. MORALES, ANA. R. Propriedades Mecânicas de Nanocompósitos de Polipropileno e Montmorilonita Organofílica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 16, n. 2, p. 136-140, 2006.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes and infection**, vol. 12, p. 272-279, 2010.

JOSHI, G. V.; KEVADIYA, B. D.; PATEL, H. A.; BAJAJ. H. C.; JASRA, R. V. Montmorillonite as a drug delivery system: Intercalation and in vitro release of timolol maleate. **International Journal of Pharmaceutics**. vol. 374, p. 53–57, 2009.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 3 edition, p. 440, 2000.

KNAAK, N.; FIUZA, M. L. Potential os essential plant oils to control insects and microorganisms. **Neotropical Biology and Conservation**. vol. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.

LAVORGNA, M.; PISCITELLI, F., MANGIACAPRA, P., BUONOCORE, G. G. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, vol. 82, n. 2, p. 291–298, 2010.

LIRA, L. M.; DORNELAS, C.B.; CABRAL, L. M. Avaliação de bentonita sódica purificada e bentonita sódica intercalada como promotores de dissolução de clorpropamida em comprimidos preparados por granulação úmida e compressão direta. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. vol. 29, n. 2, p. 151-160, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J.; **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA: São Paulo, 2002.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de Polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: Editora E-papers, 2001.

MANO, E. B. **Introdução a Polímeros**. 3d. São Paulo: Edgard Blucher, 1988.

MATELIC, J.; JERKOVIC, I.; BLAZEVIC, I.; POLJAK-BLAZI, M.; BOROVIĆ, A. A comparative study on the anti-oxidant and biological activities of carvacrol, thymol and eugenol derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 56, p. 3989-3996, 2008.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, vol. 26, n. 2, p. 231-238, 2003.

MENESES, C, T. **Estudo da cristalização de nanopartículas de NiO por difração e absorção de raios-X**. Tese apresentada departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, Brasil (2007).

Ministério da Saúde Brasil. Fiocruz. Fundação Oswald Cruz: Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf. Acessado em 11 de janeiro de 2013.

MOURA, M. P. S.; LIRA, M. C. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Validação de Método Analítico Espectrofotométrico UV para Determinação de Ácido Úsnico em Lipossomas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 44, n. 4, 2008.

MURRELL, S.; WU, S. C; BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. **Biotechnology Advances**, vol. 29, p. 239-247, 2011.

NGUEMTCHOUI, M. M. G.; NGASSOUM, M. B.; NGAMO, L. S. T.; GAUDU, X.; CRETIN, M. Insecticidal formulation based on *Xylopi* aethiopia essential oil and kaolinite clay for maize protection. **Crop Protection**. vol. 29, p. 985-991, 2010.

NIKKHAH, S. J.; RAMAZANI, A. S. A.; BANIASADI, H.; TAVAKOLZADEH, F. Investigation of properties of polyethylene/clay nanocomposites prepared by new in situ Ziegler–Natta catalyst. **Materials and Design**. vol. 30, p. 2309–2315, 2009.

NKYA, T. E.; AKHOUAYRI, L.; KISINZA, W.; DAVID J. P. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. **Insect Biochem Mol Biol**. vol. 43, p. 407-416, 2013.

NUNES, R. S.; LIRA, A. A. M.; LIMA, A. D.; CAVALCANTI, S. C. H.; SANTOS, R. L.; ALVES P. B., COSTA, A. M. B., GONSALVES, J. K. M.; SILVA, V. F.; FERREIRA S. G. **Sistema Polimérico microparticulado contendo...** INPI 11064153. 2011.

NUNES, R. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; SANTOS, R. L.; ALVES P. B.; BLANK, A. F.; SILVA, G. F.; CERPE, P.; LIMA, A. D.; FERREIRA, S. G.; SANTOS, D. A.; CRUZ, E. M. O.; FRANÇA, F. R. M. **Complexos de inclusão do óleo de *Lippia gracilis*...** INPI BR 10 2012 0308991. 2012.

NUNES, R. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; SANTOS, R. L.; ALVES, P. B.; LIRA, A. A.M.; SARMENTO, V. H.V.; TRINDADE, G. G.G.; LIMA, A. D.; FERREIRA, S. G.; SANTOS, A.; FREITAS, L. S. **Sistemas emulsionados contendo óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.)...** INPI BR 1020120308930. 2012.

Organização Mundial da Saúde [OMS] Instruções para determinar a susceptibilidade ou resistência de larvas de mosquitos aos inseticidas. WHO/VBC/81.807. *Organização Mundial da Saúde*, Genebra, Suíça (1981). Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf>. Acessado em 11 de janeiro de 2013.

Organização Mundial da Saúde, 2008. Dengue e febre hemorrágica. Ficha nº 117. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acessado em 10 de janeiro de 2013.

Organização Mundial de Saúde. Diretrizes para o diagnóstico, tratamento, prevenção e controle. Genebra, 2009. SVS/MS. 2008 a. *Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de 2007*. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_010208.pdf>. Acessado em 14 de janeiro de 2013.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinun officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**. vol.120, p. 308-312, 2010.

PAIVA, L. B., MORALES, A. R., DIAZ, F. R. V. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização (*Organophilic clays: characteristics, preparation methods, intercalation compounds and characterization techniques*). **Cerâmica**. vol. 54, p. 213-226, 2008.

RAY, S. S. & OKAMOTO, M. - **Progress in Polymer Science**. vol. 28, p. 1539, 2003.

RISHI PAL CHAHAL; R. P. MAHENDIA, S.; TOMAR, A. K.; KUMAR, S. Effect of ultraviolet irradiation on the optical and structural characteristics of in-situ prepared pvp-ag nanocompósitos. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**. vol. 5, n. 3, p. 569-575, 2010.

SANTOS, P. S. **Ciência e tecnologia de argilas**. Ed. Edgard Blucher Ltda., São Paulo- SP, v. 1. 2ª edição, p. 408, 1989.

SANTOS, A. F. O.; BASÍLIO Jr, I. D.; SOUZA, F. S.; MEDEIROS, A. F. D.; PINTO, M. F.; DE SANTANA, D. P.; MACÊDO, R. O. Application of thermal analysis of binary mixtures with metformin. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, vol. 93, p. 361–364, 2008.

SASAKI, J. M.; BLEICHER, L., “Introdução à Difração de Raios x em Cristais”, 2000. Disponível em <www.fisica.ufc.br/raiosx/download/apostila.pdf>. Acessado em 21 de outubro de 2013.

SHAALAN, E. A-S., CANYON, D.; YOUNES, M. W. F.; WAHAB, H. A.; MANSOUR, A-H. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**. vol. 31, n. 8, p. 1149–1166. 2005.

SILVA, V. F. - “**Complexos de inclusão de óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em β -ciclodextrinas: Obtenção, caracterização e avaliação da atividade larvicida contra larvas do *aedes aegypti***”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Sergipe-UFS, Brasil 2012.

SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 3, 2007.

SILVA, H. G. G.; GERIS, R.; RODRIGUES FILHO, E.; ROCHA, C.; SILVA, I. G. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. vol. 50, p. 25-28, 2008.

SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividade antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb). **Revista Ceres**. vol. 57, n. 5, p. 589-594, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª edição, Editora: LTC, p. 86-87, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; L. A.; SVS/MS. 2008a. Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de 2007. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletimdengue010208.pdf>> Acessado em 10 de janeiro de 2013.

ULLMANS, **Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Wiley-VCH. vol. 21, p. 752-754, 1992.

VOLZONE, C. Retention of pollutant gases: Comparison between clay minerals and their modified products, **Applied Clay Science**. vol. 36, p. 191, 2007.

VONTAS, J.; KIOULOS, E.; PAVLIDI, N.; MOROU, E.; TORREC, D. A.; HANSON, H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. vol. 104, p. 126–131, 2012.

WANG, K. H.; CHOI, M. H.; KOO, C. M.; CHOI, Y. S. & CHUNG, I. J. - **Polymer**. vol. 42, p. 9819, 2001.

WENDLANDT, W.W. **Thermal Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 3.ed. 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, 2006). Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance. Ed.6. (Online). Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75303/1/9789241504034_eng.pdf>. Acessado em 16 de janeiro de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, 2009). Treatment, prevention and control dengue.