

## AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES POLIMÉRICAS DE GOMA DO CAJUEIRO CARREADORAS DE CHALCONA

<sup>1A</sup>Freitas, K.S.; <sup>2B</sup> Abreu, F.O.M.S.; <sup>3B</sup> Nascimento, J.F.; <sup>4B</sup> Santos, H.S.;

<sup>5A</sup> Bessa, N.U.C.; <sup>6B</sup> Mendes, F.R.S.; <sup>7C</sup>Muniz, C.R.7; <sup>8B</sup>Morais, S.M;

<sup>A</sup> Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências e Tecnologia /Química.

<sup>B</sup> Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências e Tecnologia/Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais.

<sup>C</sup> Embrapa Agroindústria Tropical do Ceará, Laboratório de Bioimagem.

<sup>1A</sup> e-mail: [Kariny.freitas@aluno.uece.br](mailto:Kariny.freitas@aluno.uece.br) ; <sup>2B</sup>e-mail: [flavia.monteiro@uece.br](mailto:flavia.monteiro@uece.br)

<sup>3B</sup>email: [joice.nascimento@aluno.uece.br](mailto:joice.nascimento@aluno.uece.br) ; <sup>4B</sup>e-mail: [helcio.silva@uece.br](mailto:helcio.silva@uece.br)

<sup>5B</sup>e-mail: [nathalia.castro@aluno.uece.br](mailto:nathalia.castro@aluno.uece.br) ; <sup>6B</sup>e-mail: [rogenio.mendes@uece.br](mailto:rogenio.mendes@uece.br)

<sup>7C</sup>e-mail: [celli.muniz@embrapa.br](mailto:celli.muniz@embrapa.br); <sup>8A</sup>e-mail: [selenemaiademorais@gmail.com](mailto:selenemaiademorais@gmail.com)

### RESUMO

Este trabalho busca analisar a estabilidade de nanoemulsões de goma do cajueiro carreadoras de chalcona [(1E, 4E)-1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4- dien-3-ona) - DB4METOX], comparando-se o método de emulsificação para avaliar o potencial larvicida da emulsão mais estável. Avaliou -se a estabilidade físico-química, microscopia óptica e pH, a fim de eleger a nanoemulsão com maior estabilidade. Os resultados mostraram que a amostra denominada DBO1S, produzida pelo método combinado, apresentou maior estabilidade, em função do menor grau de formação de creaming (inferior a 4%) e sedimentação (0,1%), pH constante ao longo do tempo e morfologia com gotículas mais uniformes e dispersas. A caracterização complementar revelou valores de tamanho de partícula de  $201,4 \pm 107,0$  nm, potencial zeta de  $-56 \pm 4,85$  mV e índice de polidispersão de  $0,56 \pm 0,06$ , comprovando sua estabilidade. A nanoemulsão DBO1S obteve uma CL50 de 7,17 ug/ml após 72 h contra larvas de *Aedes aegypt*, demonstrando potencial no controle larvicida, sendo uma alternativa no combate a ploriferação do mosquito da dengue.

**Palavras-chave:** Nanoemulsão, chalcona, estabilidade.

### 1. INTRODUÇÃO

Nanoemulsões (NEs) são dispersões coloidais metaestáveis com tamanho expresso em escala nanométrica<sup>(1)</sup>. Com base nessa característica, faz-se necessário a escolha de tensoativos e estabilizantes específicos para aumentar a estabilidade do

sistema e assegurar a eficácia da dispersão por um maior período<sup>(2)</sup>. As chalconas são cetonas aromáticas pertencentes à classe dos flavonoides e têm demonstrado grande potencial com propriedades antioxidantes, antinociceptiva, anti-inflamatória, ansiolítica, anticonvulsivante<sup>(3)</sup> e antivirais<sup>(4)</sup>.

Desse modo, como as nanoemulsões apresentam uma elevada versatilidade para a solubilização de fármacos e estabilidade de compostos ativos, elas são propícias para carrear as chalconas<sup>(5)</sup>. Logo, com o propósito de aperfeiçoar as características das nanoemulsões, surgiu a necessidade de utilizar polímeros naturais provenientes de polissacarídeos como componentes-chave para a produção de nanoemulsões, visando aprimorar tanto a biocompatibilidade quanto a biodegradabilidade dos sistemas<sup>(6)</sup>.

O mosquito *Aedes aegypti* é conhecido principalmente por transmitir doenças virais, como a febre amarela e a dengue. Sendo comumente encontrado em áreas com climas subtropicais e tropicais, ambientes que favorecem a sua proliferação. Atualmente as medidas de proteção se encontram no controle do vetor, porém, devido a resistência crescente dos mosquitos aos inseticidas convencionais, há uma busca por alternativas eficientes e não prejudiciais ao ambiente<sup>(7)</sup>.

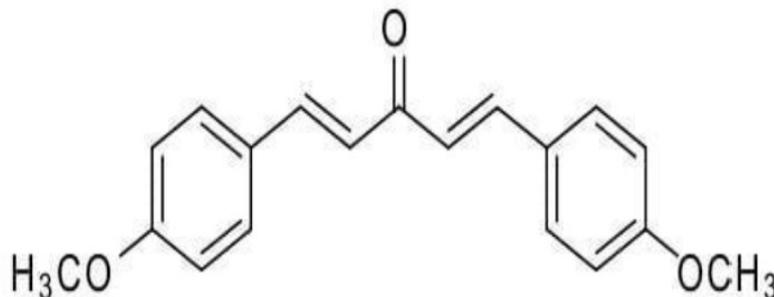
Nesse ínterim, os produtos naturais oferecem uma solução promissora para o controle larvicida. Dado que pesticidas naturais são pouco solúveis, logo, o uso de nanoemulsões pode ser uma alternativa viável para aumentar sua atividade inseticida, visto que, as nanoemulsões permitem a incorporação de substâncias de baixa polaridade, oferecendo um menor impacto ambiental<sup>(8)</sup>. O objetivo deste trabalho é avaliar a estabilidade de nanoemulsões de goma do cajueiro carreadoras de chalcona, comparando o método de preparo utilizado, a fim de apontar a formulação mais eficaz, assim como buscar uma abordagem natural, utilizando nanoemulsões para o controle das larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

Para o preparo das nanoemulsões, foi utilizado a solução de goma do cajueiro 1%, surfactante Tween 80® (VETEC), DMSO, óleo vegetal de canola e a chalcona sintética [(1E, 4E) 1,5-bis(4-metoxifenil) penta-1,4-dien-3-one (DB4METOX)], que foi produzida e cedida pelo laboratório de química de produtos naturais da UECE.

**Figura 1 – Chalcona sintética [(1E, 4E) 1,5-bis(4-metoxifenil) penta-1,4-dien-3-one (DB4METOX)]**



Fonte: Elaborado pela autora.

## **2.2 Preparo de nanoemulsões poliméricas**

Foram preparadas 3 nanoemulsões onde variou -se o método de produção utilizado.

### **2.2.1 Método combinado (Ultrassom e Ultra stirrer)**

A chalcona sintética [(1E, 4E) 1,5-bis(4-metoxifenil) penta-1,4-dien-3-one (DB4METOX)] foi misturada ao DMSO, e adicionada em um béquer com óleo vegetal de canola e surfactante Tween 80®. A mistura foi homogeneizada no ultrassom (Sonicador de Ponteira Ultrassônico) com potência 550W por 30 segundos. Posteriormente essa mistura foi adicionada lentamente com o auxílio de uma seringa em uma solução de goma do cajueiro 1% e homogeneizada em um rotor-estator (Ultra stirrer) a uma velocidade de 18.000 rpm por 3 minutos. A nanoemulsão produzida por esse método foi denominada DBO1S.

### **2.2.2 Método Ultrassom**

A solução aquosa de goma do cajueiro 1% foi misturada com a fase oleosa, composta pela chalcona sintética, DMSO, óleo vegetal de canola e o surfactante Tween 80® em determinado recipiente, e homogeneizada por Ultrassom por 3 minutos com potência 550W. A amostra produzida por essa técnica foi denominada DBO2.

### **2.2.3 Método Ultra stirrer**

A solução aquosa de goma do cajueiro 1% foi misturada com a fase oleosa, composta pela chalcona sintética, DMSO, óleo vegetal de canola e o surfactante

Tween 80® em determinado recipiente, e homogeneizada por um rotor-estator (Ultra stirrer) durante 3 minutos com velocidade de 18.000 rpm. A nanoemulsão produzida por esse método foi denominada DBO3. As quantidades utilizadas no processo de produção das formulações estão expressas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição das nanoemulsões e método utilizado

CÓDIGO	COMPONENTES						MÉTODO
	Tween 80 (mL)	DB4OCH3 (mg)	Óleo vegetal (mL)	DMSO (mL)	Sol.1% Matriz (mL)	Concentração de chalcona (mg/mL)	
DBO1S	0,5	10	1	0,5	60	0,1612 g/mL	STIRRER + ULTRASSOM
DBO2	0,5	10	1	0,5	60	0,1612 g/mL	ULTRASSOM
DBO3	0,5	10	1	0,5	60	0,1612 g/mL	STIRRER

Fonte: Elaborado pela autora.

## 2.3 CARACTERIZAÇÕES

### 2.3.1 Estudo da estabilidade

Primeiramente, cerca de 5 mL de cada amostra foram colocados em tubos de ensaio fechados, onde foram observados durante um período de 42 dias. As nanoemulsões foram analisadas visualmente, logo, observou-se a presença de sinais de instabilidade, como creaming ou sedimentação. Com base na metodologia de Dickinson<sup>(9)</sup>, o volume de creaming foi medido com o auxílio de uma régua, a cada 7 dias. Para calcular a porcentagem de creaming das formulações produzidas, utilizou-se a (Eq.1).

$$\left( \frac{\text{Altura do creaming (cm)}}{\text{Altura da emulsão (cm)}} \right) \times 100 = \% \text{ creaming} \quad (1)$$

O teste da viscosidade da solução do polímero utilizado e das nanoemulsões, foi realizado com base na metodologia de Abreu<sup>(10)</sup>. Com o auxílio de um viscosímetro de Ostwald, mediu-se o tempo de escoamento das amostras em diferentes concentrações, e calculou-se a viscosidade específica a partir da (Eq.2).

$$\eta_{esp} = \left( \frac{t-t_0}{t_0} \right) \quad (2)$$

Onde:  $\eta_{esp}$  = viscosidade específica;  $t$  = tempo de escoamento da solução,

$t_0$  = tempo de escoamento do solvente

A avaliação do pH das nanoemulsões foi realizada com o auxílio de um medidor de pH (pHmetro) digital de bancada da marca AZ modelo 86505. As amostras foram analisadas a cada 7 dias ao longo de um período de 42 dias. Os resultados foram então submetidos à média para cada amostra trabalhada.

### **2.3.2 Análise morfológica das nanoemulsões**

O teste de microscopia óptica foi produzido no Laboratório de Doenças Parasitárias (LABODOPAR). O teste foi realizado em um microscópio da marca Opton do modelo TNB-04T-PL, na qual uma gota de cada nanoemulsão foi colocada em lâmina e revestida por lamínula, onde as amostras foram visualizadas em 100.000x. A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi produzida pela Central Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC), as amostras foram submetidas a uma secagem antes de serem montadas em suportes. As imagens foram então capturadas no equipamento Quanta 450-FEG (FEI), de 20 kV, na ampliação de 100.000x.

### **2.3.3 Tamanho de Partícula, Potencial Zeta e Índice de Polidispersão**

O tamanho de Partícula, Potencial Zeta e Índice de Polidispersão foram efetuados na Embrapa, utilizando o equipamento Zetasizer/Nanoseries Z590 do modelo Malvern, as amostras foram diluídas em proporção 1:100 e deixadas em agitação contínua por um período de 24h antes da leitura.

### **2.3.4 Atividade larvicida**

O teste larvicida foi realizado utilizando larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller), coletadas nas colônias de pesquisa do Núcleo de Controle de Vetores do Estado do Ceará (NUVET-CE), desenvolvidas com base nos parâmetros da Organização Mundial da Saúde (OMS). As concentrações utilizadas nesse teste foram 6, 14, 21, 27, 41  $\mu\text{g/mL}$  da amostra DBO1S e utilizou-se 10 larvas de *A. aegypti* para 10 mL de cada concentração. Os bioensaios foram realizados em triplicata, com contagem de mortalidade em 24h, 48h e 72h. Os experimentos foram

acompanhados por uma triplicata de controle negativo em água destilada.

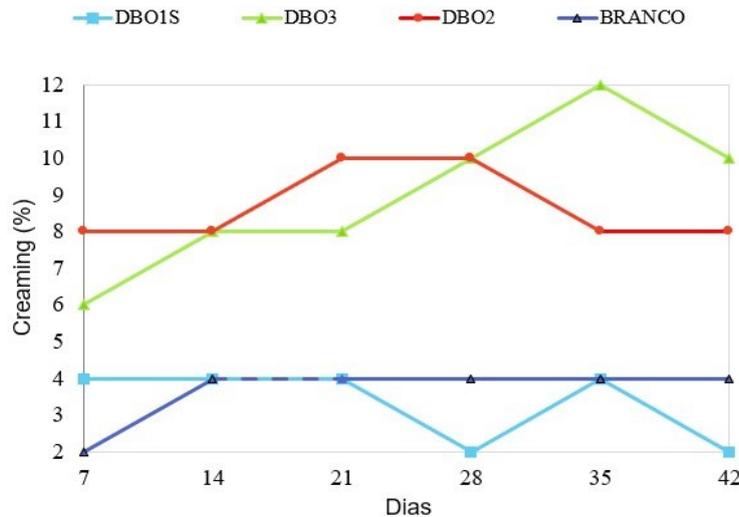
A Concentração letal para 50% das larvas (CL50) foi calculada utilizando a análise Probit baseada no modelo Probit de Finney, utilizando o Software estatístico IBM SPSS Statistics e Microsoft Excel 2021.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Estabilidade Visual

Com base na variação do método utilizado, os resultados preliminares, observados na Figura 2, conclui-se que a técnica mais efetiva no estudo da estabilidade foi o método combinado (Ultrassom e Ultra stirrer). Visto que, a amostra denominada DBO1S, produzida a partir dessa junção, obteve um menor índice de formação de creaming (inferior a 4%), e apresentou uma menor taxa de sedimentação (0,1%). As demais amostras DBO2 e DBO3 apresentaram uma certa variação no valor de creaming obtido, assim como obtiveram vestígios de sedimentação mais aparente (0,3%).

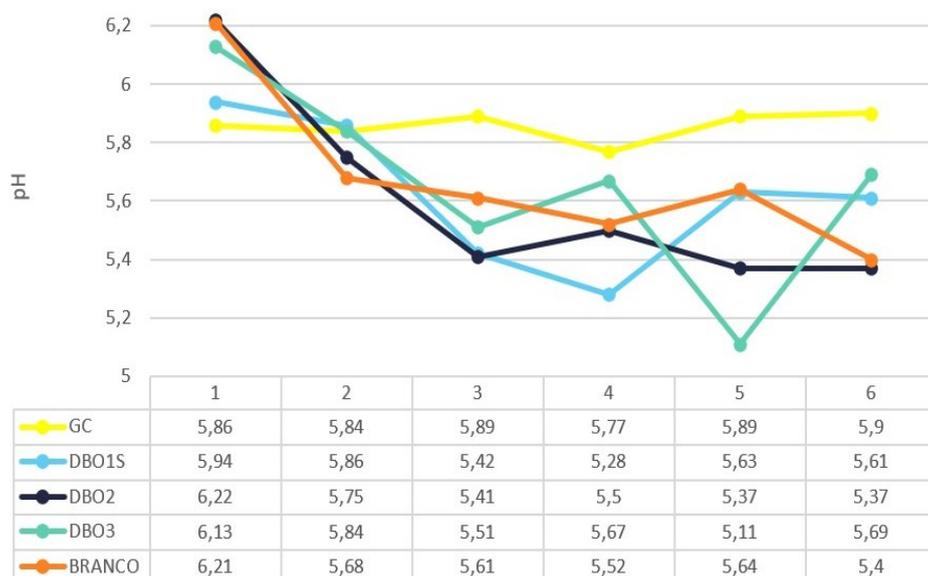
Figura 2 – Porcentagem de creaming das nanoemulsões



Fonte: Elaborado pela autora.

Ao realizar os testes do pH das nanoemulsões, conforme apresentado na Figura 3, foi possível identificar que houve uma diminuição nos valores obtidos ao longo das semanas (de 6,22 a 5,37). Esse decréscimo nos resultados ao longo das semanas é devido a degradação do óleo vegetal de canola por conta de reações químicas, no qual ocorre a hidrólise de ésteres de ácidos graxos em ácidos graxos livres<sup>(11)</sup>.

**Figura 3 – pH das formulações**

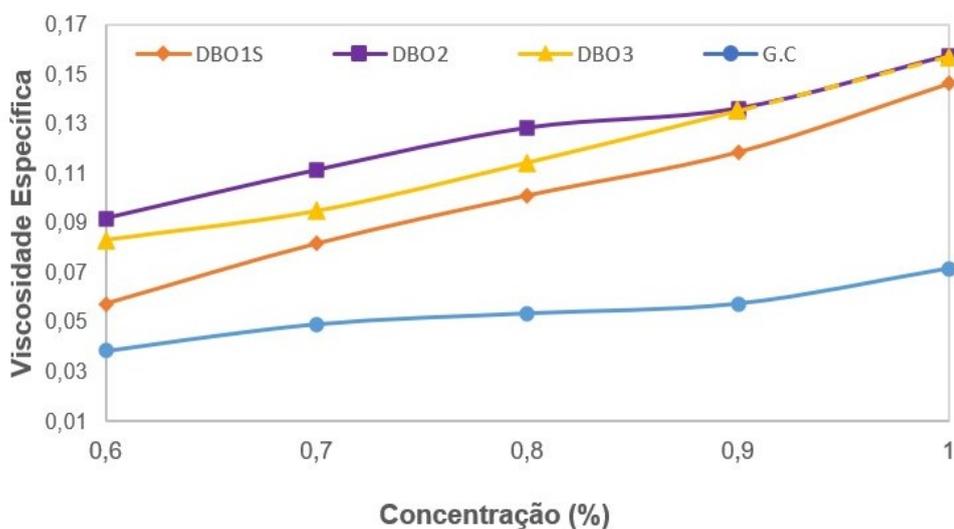


Fonte: Elaborado pela autora.

A viscosidade ( $\eta$ ) é responsável por determinar a capacidade de fluidez de uma amostra, ela desempenha um papel essencial na estabilidade e na eficácia da liberação do fármaco. Em nanoemulsões, o menor valor de viscosidade está diretamente relacionado à estabilidade e ao prolongamento da vida útil da formulação para testes<sup>(12)</sup>. A Figura 4 apresenta o tempo de escoamento das nanoemulsões e da matriz polimérica (GC).

De acordo com os dados obtidos, é perceptível a redução da viscosidade específica assim como a viscosidade reduzida na amostra DBO1S em comparação com as demais formulações, apresentando uma melhor estabilidade.

**Figura 4 – Viscosidade específica das nanoemulsões e da goma do cajueiro (GC)**

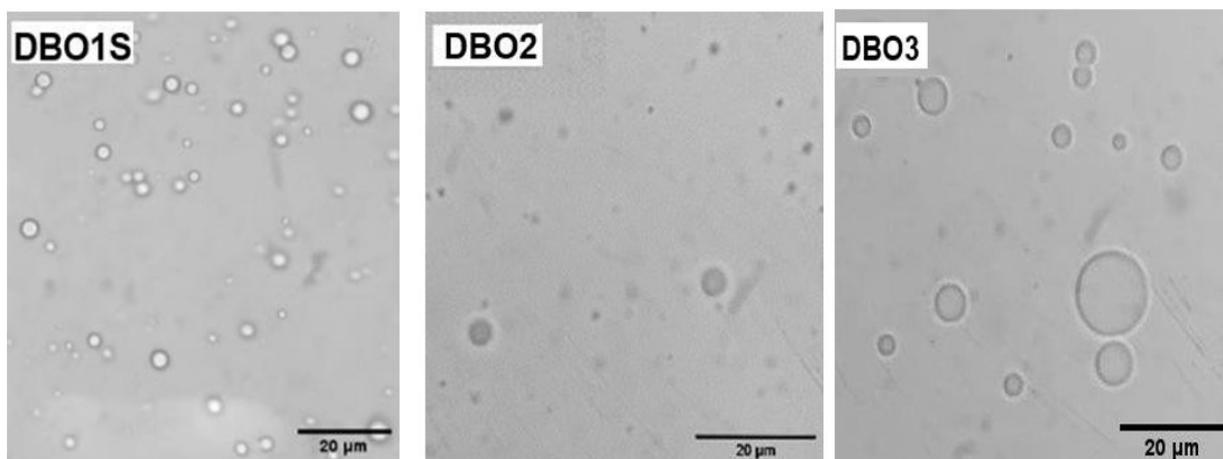


Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.2 Análise morfológica das nanoemulsões

A Figura 5 mostra a análise morfológica das nanoemulsões observadas após 30 dias, onde é possível identificar a dispersão das gotículas. A nanoemulsão DBO3 apresentou gotículas maiores e alguns pontos de coalescência, conferindo uma heterogeneidade no sistema coloidal. A amostra DBO1S e obteve um tamanho de gotículas mais homogêneo que a DBO2, conferindo maior estabilidade.

Figura 5 - Microscopia óptica das amostras

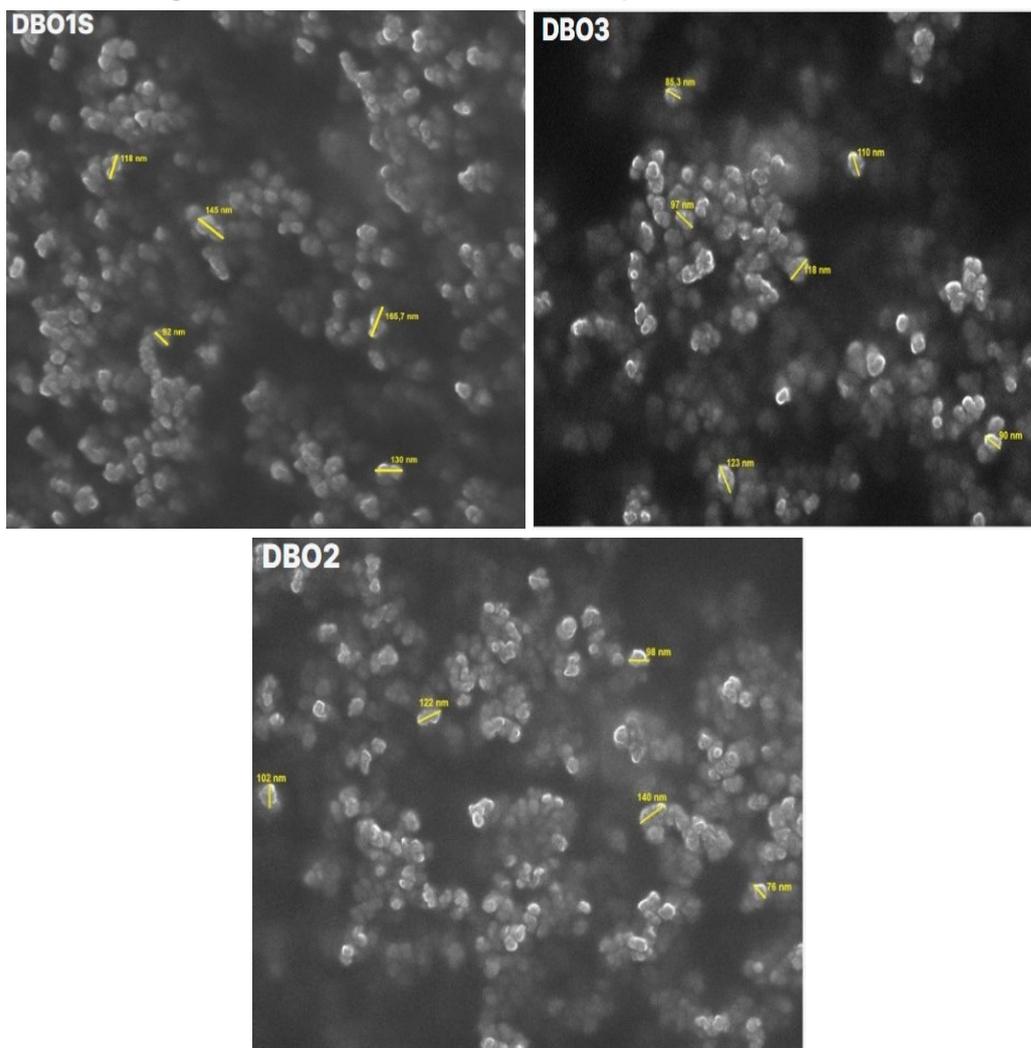


Fonte: Elaborado pela autora

Na avaliação da morfologia pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a superfície da amostra é observada de forma tridimensional. Nesse teste, as imagens são formadas a partir de feixes de elétrons, que são refratados por lentes eletrônicas<sup>(2)</sup>.

Na Figura 6, nota-se que as gotículas das nanoemulsões são expressas em escala nanométrica, apresentando formatos aproximadamente esféricos e domínios uniformes. Além disso, em ambas as formulações analisadas, nota-se a formação de pequenos aglomerados de partículas, devido ao processo de secagem da amostra para realização da análise.

Figura 6 – MEV das amostras na ampliação 100.000x



Fonte: Elaborado pela autora

### 3.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS GOTÍCULAS EM DISPERSÃO

Com base nos dados evidenciados na Tabela 2, observa-se que as gotículas de ambas as formulações analisadas apresentam um tamanho médio de partícula abaixo de 300 nm e valores de potencial zeta e índice de polidispersão excelentes. As amostras DBO2 e DBO3 apresentaram uma distribuição bimodal de tamanhos, indicando uma heterogeneidade com variação no tamanho das partículas, o que confere instabilidade ao sistema. Enquanto a formulação DBO1S possui distribuição de partículas monomodal, sendo mais homogênea, logo, apresentando uma ótima estabilidade cinética.

**Tabela 2 – TP:Tamanho de partícula, PZ: Potencial Zeta PDI: Índice de Polidispersão**

Formulação	TP (nm)	PZ (mV)	PDI
DBO1S	201,4±107,0 (100%)	-56±4,85	0,56±0,06
DBO2	202,4±131,1 (97,0%) 5204±472,3 (3,0%)	-57,9±0,36	0,37±0,005
DBO3	175,3±106,9 (96,1%) 4417±915,8 (3,9%)	-43,6±2,24	0,37±0,01

Fonte: Elaborado pela autora

### 3.4 ATIVIDADE LARVICIDA

A Concentração que mata 50% das larvas expostas (CL50), está expressa como média ± desvio padrão e com intervalo de confiança de 95%, obtido pelo o software estatístico. Os resultados podem ser evidenciados na Tabela 3, nota-se que a média da mortalidade das larvas foi crescendo ao longo das 72h de teste, enquanto que o grupo controle não apresentou letalidade contra as larvas.

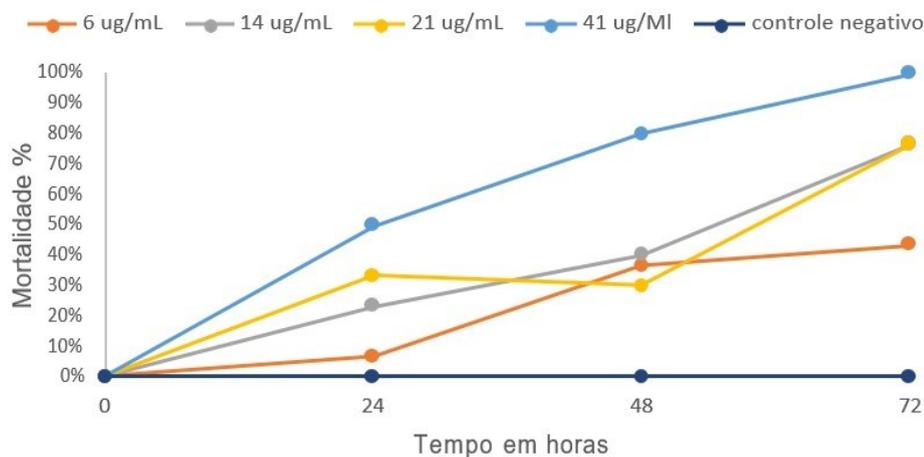
**Tabela 3 – Concentração letal para 50% das larvas (CL50) dada em µg/mL**

Amostra	24h	48h	72h
DBO1S	86,26 ± 15,19	44,80 ± 0,36	7,17±2,96
Controle	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora

Os resultados referentes ao teste de controle larvicida podem ser evidenciados na Figura 7, no qual está expresso em porcentagem a mortalidade das larvas frente a ação da nanoemulsão DBO1S. Observa-se que a maior concentração da amostra analisada (41 µg/mL) obteve 100% de mortalidade ao final das 72h do teste, comprovando assim sua eficácia no controle do vetor.

**Figura 7 - Atividade larvicida de *A. aegypti* da amostra DBO1S dada em %**



Fonte: Elaborado pela autora

#### **4. CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, observou-se que a nanoemulsão denominada DBO1S, produzida pelo método combinado por ultrassom e ultra stirrer, obteve uma melhor estabilização da nanoemulsão, com gotículas menores e mais uniformes, em função do menor índice de creaming e sedimentação. Além disso, a amostra demonstrou potencial no controle larvicida de mosquito *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller). Logo, esses resultados podem ser úteis para incentivar pesquisas sobre o controle de mosquitos através da formulação de nanoemulsões, utilizando produtos naturais e assim oferecendo uma alternativa menos prejudicial ao meio ambiente.

#### **5. REFERÊNCIAS**

- (1) OTONI, Caio Gomide; DE AZEREDO, Henriette Monteiro Cordeiro. Nanoemulsões Poliméricas. In: Nanotecnologia Aplicada a Polímeros. Blucher Open Access, 2022. p. 171-196.
- (2) PORTO, Alice Sperandio. Desenvolvimento de nanoemulsão O/A a base de óleo de copaíba, incorporadas com nanopartículas magnéticas de Zinco. 2016.
- (3) FERREIRA, M. K. A. et al. Chalcones pharmacological potential: A brief review. Revista Virtual de Química, v. 10, n. 5, p. 1455-1473, 2018.

- (4)** ELKHALIFA, Dana et al. A comprehensive review on the antiviral activities of chalcones. *Journal of Drug Targeting*, v. 29, n. 4, p. 403-419, 2021.
- (5)** COELHO, Daniela et al. Polyvinyl alcohol-based electrospun matrix as a delivery system for nanoemulsion containing chalcone against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 198, p. 111390, 2021.
- (6)** NASCIMENTO, Joice Farias; COSTA, Emanuela Feitoza; ABREU, Flávia Oliveira Monteiro. Caracterizações de nanoemulsões de alginato de sódio com óleo essencial de eucalyptus citriodora. *Revista Coleta Científica*, v. 4, n. 8, p. 15-22, 2020.
- (7)** SIMAS, Naomi Kato et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química nova*, v. 27, p. 46-49, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100009>
- (8)** SAAVEDRA, Mayerli Garcia et al. Avaliação da atividade larvicida da nanoemulsão do óleo essencial das raízes de *Philodendron fragrantissimum* (Hook) G. Don (Araceae) contra *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera: Culicidae). 2018.
- (9)** DICKINSON, E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 1473–1482, 2009.
- (10)** ABREU, F.O.M.d.S., do Nascimento, J.F., PINHEIRO, H.N. et al. Formulação de nanoemulsões enriquecidas com compostos à base de chalcona: processo de formulação, estabilidade física e efeito antimicrobiano, 2024.
- (11)** PIRES, Viviane GA; MOURA, Márcia R. de. Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial. *Química Nova*, v. 40, p. 1-5, 2017.
- (12)** LOVELYN, Charles et al. Current state of nanoemulsions in drug delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, v. 2, n. 05, p. 626, 2011.