

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ (UESC)
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS (DCEX)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA (PPGQUIM)

LAURIETH GÓES DE JESUS

**NANAPARTICULAS DE ZEÍNA INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE
CRAVO-DA-ÍNDIA:** Avaliação da cinética de liberação do eugenol e da bioatividade
contra *Sitophilus zeamais*

ILHÉUS-BAHIA
2024

LAURIETH GÓES DE JESUS

**NANAPARTICULAS DE ZEÍNA INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE
CRAVO-DA-ÍNDIA: Avaliação da cinética de liberação do eugenol e da bioatividade
contra *Sitophilus zeamais***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQuim) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade para obtenção do título de mestre em química.

Área e Concentração: Aplicações Biotecnológicas e Energéticas de Biomoléculas e Compostos Bioativos

Orientador: Dr. Rodrigo Luís da Silva Ribeiro dos Santos

ILHÉUS- BAHIA

2024

J58

Jesus, Laurieth Góes de.

Nanopartículas de zeína incorporadas com óleo essencial de cravo-da-índia: avaliação da cinética de liberação do eugenol e da bioatividade contra *Sitophilus zeamais* / Laurieth Góes de Jesus. – Ilhéus, BA: UESC, 2024.

80f.: il.

Orientador: Rodrigo Luis da Silva Ribeiro dos Santos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQIM

Inclui referências e apêndices.

1. Nanotecnologia. 2. Biopolímeros. 3. Compostos bioativos. 4. Estabilidade. 5. Princípio ativo (Farmacologia). 6. Repelente. I. Título.

CDD 620.5

LAURIETH GOES DE JESUS

NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA: Avaliação da cinética de liberação do eugenol e da bioatividade contra Sitophilus zeamais.

Ilhéus-BA, 21 de novembro de 2024.

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente



RODRIGO LUIS DA SILVA RIBEIRO DOS SANTOS

Data: 25/11/2024 15:15:45-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Luís Silva Ribeiro Santos (DCEX-UESC)
Presidente/Orientador

Documento assinado digitalmente



PAULO NEILSON MARQUES DOS ANJOS

Data: 29/11/2024 17:33:22-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Paulo Neilson Marques dos Anjos (DCEX-UESC)
Membro Interno/Avaliador

Documento assinado digitalmente



CARLOS EDUARDO PEREIRA

Data: 26/11/2024 07:49:57-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira (UFSB)
Membro Externo/Avaliador

Documento assinado digitalmente



JULIANA STRACIERI

Data: 27/11/2024 13:39:16-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Dra. Juliana Stracieri (DCAA-UESC)
Membro Externo/Avaliadora

Dedico esse trabalho a minha mãe Luzinete Alves de Góes, que já se foi, mas continua sendo minha maior força e inspiração na vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar e dá forças para traçar essa jornada, mesmo diante dos contratempos e dificuldades.

Ao meu orientador, prof. Dr. Rodrigo Luis, por sua orientação dedicada, sabedoria e paciência ao longo deste processo. Seus feedback construtivo foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

A profa. Dra. Rosilene Aparecida coordenadora do grupo de pesquisa LPPNS da UESC e Dra. Carla Fernanda coordenadora do grupo de pesquisa LACoBSe da UESC pelas contribuições a essa pesquisa e pela autorização do uso de seu laboratório.

Ao prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira da UFSB por me orientar com os bioensaios e ajudar nas análises estatísticas e ao seu aluno Railan dos Santos Silva pela parceria e ajuda nos bioensaios com o *Sitophilus zeamais*.

Ao laboratório de análise da qualidade da água (LACEN/BA), pela autorização para realizar as análises referente ao pH e turbidez.

À minha família e amigos, que estiveram ao meu lado durante toda essa jornada, agradeço pelo apoio incondicional, compreensão e encorajamento.

A amiga Sabryna Couto Araújo por acreditar em mim, por estar sempre ao meu lado, pelo apoio, por não deixar que eu desanimasse ou desistisse e por ser essa pessoa que me faz muito bem. A minha amiga Sandy Oliveira Pinto por pelo convívio e pelo apoio nos momentos em que pensei em desistir.

Não posso deixar de expressar minha gratidão à Universidade Estadual de Santa Cruz e a CAPES pela bolsa de estudos concedida durante todo o processo.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, seja com apoio técnico, discussões produtivas ou simples palavras de incentivo.

NANAPARTICULAS DE ZEÍNA INCORPORADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA: Avaliação da cinética de liberação do eugenol e da bioatividade contra *Sitophilus zeamais*

RESUMO

Óleos essenciais, como o de cravo-da-índia, contêm compostos bioativos com potencial aplicação para o controle de pragas agrícolas. No entanto, sua alta volatilidade e suscetibilidade à fotodegradação limitam a aplicação direta desses óleos. O nanoencapsulamento, então, surge como uma estratégia para viabilizar seu uso na agricultura. Neste contexto, o óleo essencial de cravo-da-índia (OC) e seu principal componente, o eugenol (Eug), foram incorporados em uma matriz proteica biodegradável extraída do milho (zeína), com o objetivo de investigar, *in vitro*, o perfil cinético de liberação do Eug, e realizar testes *in vivo* de bioatividade contra *Sitophilus zeamais*. O óleo essencial de cravo-da-índia foi extraído por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger, com rendimento de 10,3% (m/m) e teor de eugenol de 78,6% (v/v). As nanopartículas de zeína (NPZ), assim como as nanopartículas incorporadas com óleo de cravo-da-índia (NPZ-OC) e eugenol (NPZ-Eug) apresentaram diâmetro médio inferior a 100 nm e formato esférico. Esses três sistemas nanoparticulados foram submetidos a ensaios de estabilidade, cujos resultados indicaram que as NPs apresentaram maior estabilidade quando armazenadas sob refrigeração (10 °C). Estudos *in vitro* do perfil cinético de liberação do Eug nas amostras de NPZ-OC e NPZ-Eug foram realizados em tampão fosfato-salina (pH 3,0 e 7,4), e os resultados demonstraram que o Eug incorporado na matriz proteica foi liberado de forma gradual em até 200 minutos, para ambos os pHs. O modelo cinético de Weibull apresentou o melhor ajuste aos dados ($R^2 > 0,97$), sugerindo uma liberação do Eug predominantemente por difusão. Os estudos de bioatividade *in vivo* foram realizados com as amostras nanoparticuladas (NPZ, NPZ-Eug e NPZ-OC) e também com o OC e Eug em sua forma livre. Os ensaios de toxicidade por contato direto e indireto não apresentaram efeito tóxico significativo na dose testada contra *Sitophilus zeamais*. Contudo, a presença de zeína nos sistemas NPZ-Eug e NPZ-OC potencializou o efeito repelente dos compostos bioativos. No ensaio de desenvolvimento populacional e danos aos grãos tratados, apenas o inseticida comercial (deltametrina) resultou em redução significativa da população de insetos e proteção dos grãos. Por fim, os resultados indicam que o material nanoencapsulado é promissor; no entanto, novos estudos de bioatividade, com doses mais elevadas, poderão explorar melhor o seu potencial como agente bioinseticida.

Palavras-chave: Matriz polimérica. Estabilidade. Princípio ativo. Efeito repelente.

**ZEIN NANOPARTICLES INCORPORATED WITH CLOVE ESSENTIAL OIL:
Evaluation of the release kinetics of eugenol and bioactivity against *Sitophilus zeamais*.**

ABSTRACT

Essential oils, such as clove oil, contain bioactive compounds with potential applications for agricultural pest control. However, their high volatility and susceptibility to photodegradation limit the direct application of these oils. Nanoencapsulation emerges as a strategy to enable their use in agriculture. In this context, clove essential oil (OC) and its main component, eugenol (Eug), were incorporated into a biodegradable protein matrix extracted from corn (zein) to investigate, *in vitro*, the kinetic release profile of Eug and conduct *in vivo* bioactivity tests against *Sitophilus zeamais*. Clove essential oil was extracted by hydrodistillation using a Clevenger apparatus, with a yield of 10.3% (m/m) and eugenol content of 78.6% (v/v). Zein nanoparticles (NPZ), along with nanoparticles incorporated with clove oil (NPZ-OC) and eugenol (NPZ-Eug), presented an average diameter below 100 nm and a spherical shape. These three nanoparticle systems underwent stability tests, which indicated that the NPs were more stable when stored under refrigeration (10 °C). *In vitro* studies of the Eug release profile in NPZ-OC and NPZ-Eug samples were conducted in phosphate-saline buffer (pH 3.0 and 7.4), and the results showed that Eug incorporated into the protein matrix was gradually released over 200 minutes for both pHs. The Weibull kinetic model provided the best fit to the data ($R^2 > 0.97$), suggesting that Eug release was predominantly diffusion-driven. *In vivo* bioactivity studies were conducted with the nanoparticle samples (NPZ, NPZ-Eug and NPZ-OC), as well as with OC and Eug in their free form. Direct and indirect contact toxicity assays showed no significant toxic effect at the tested dose against *Sitophilus zeamais*. However, the presence of zein in the NPZ-Eug and NPZ-OC systems enhanced the repellent effect of the bioactive compounds. In the population development and grain damage assays, only the commercial insecticide (deltamethrin) significantly reduced insect population and protected the grains. Finally, the results indicate that the nanoencapsulated material is promising; however, further bioactivity studies with higher doses may better explore its potential as a bioinsecticide agent.

Keywords: Polymer matrix. Stability. Active ingredient. Repellent effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Sitophilus zeamais</i> (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae: (A) larva; (B) fase adulta	17
Figura 2 - Representação esquemática dos tipos de nanopartículas	21
Figura 3 - Mecanismos de liberação controlada	27
Figura 4- Cromatograma (CG-DIC) dos componentes químicos presentes no óleo essencial do cravo-da-índia extraído da <i>S. aromaticum</i> : eugenol (a), β -cariofileno (b), acetato de eugenila (c), óxido de β - cariofileno (d).....	37
Figura 5 - Sistemas nanoparticulados: (a) Amostras recém preparadas; (b) Efeito Tyndall nas nanopartículas.....	40
Figura 6- Imagem TEM das nanopartículas de zeína (NPZ) e nanopartículas de zeína incorporadas com eugenol (NPZ-Eug)	41
Figura 7- Sedimentação da zeína nas nanopartículas após 90 min de centrifugação	42
Figura 8 - Amostras de NPZ centrifugadas durante 90 min: (a) suspensão na presença do laser para evidenciar o efeito Tyndal; (b) suspensão sem laser	43
Figura 9 - Amostras de NPZ-Eug centrifugadas durante 90 min: (a) suspensão na presença de laser para evidenciar o efeito Tyndal; (b) suspensão sem laser	43
Figura 10 - Amostras de NPZ-OC centrifugadas durante 90 min: (a) suspensão na presença de laser para evidenciar o efeito Tyndal; (b) suspensão sem laser	44
Figura 11 - Avaliação do pH e turbidez das nanopartículas ao longo de 42 dias em testes de estabilidade normal: (a) NPZ- Eug; (b) NPZ-OC; (c) NPZ	45
Figura 12 - Eficiência de encapsulamento (EE%) das nanopartículas armazenadas em temperatura ambiente (amb) a 25 °C e em refrigerador (refr) a 10 ° C	46

Figura 13 - Avaliação do pH e turbidez das nanopartículas ao longo de 42 dias em testes de estabilidade acelerada: (a) NPZ- Eug; (b) NPZ-OC; (c) NPZ.....	48
Figura 14 - Curva de padronização do eugenol (Eug) em pH 3,0 comparadas a amostras de eugenol preparadas em pH 7,4	50
Figura 15 - Perfil de Liberação para as NPZ-Eug e NPZ-OC: (a) em tampão PBC pH 3,0; (b) em tampão PBC pH 7,4	51
Figura 16 - Curva de liberação dos princípios ativos conforme Weibull (a) Sistema de diálise em tampão PBC pH 3,0; (b) Sistema de diálise em tampão PBC pH 7,4	54
Figura 17 - Resultados médios de preferência de <i>Sitophilus zeamais</i> L. após 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas da aplicação diferentes compostos químicos em arenas com chance de escolha (a) NPZ-Eug; (b) NPZ-OC; (c) NPZ; (d) OC (e) Eug; (f) PVA+ ETANOL	58
Figura 18 - Crescimento populacional de <i>Sitophilus zeamais</i> L. ao longo do período de armazenamento (até 49 dias) de grãos de milho tratados com diferentes compostos químicos.....	60
Figura 19 - Mortalidade acumulada de <i>Sitophilus zeamais</i> L. ao longo do período de armazenamento (até 49 dias) de grãos de milho tratados com diferentes compostos químicos	62
Figura 20 - Grãos de milho de milho após 63 dias: (a) grãos saudáveis; (b) grãos perfurados; (c) grãos com galeria.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Compostos químicos identificados no óleo essencial de cravo-da-índia...	38
Tabela 2 - Parâmetros de modelos matemáticos conforme ajuste do dados experimentais	53
Tabela 3- Mediana do número de indivíduos (<i>Sitophilus zeamais</i>) mortos após 24, 48 e 72 horas da aplicação direta e indireta de diferentes compostos químicos.....	55
Tabela 4 - Medianas do crescimento populacional de <i>Sitophilus zeamais</i> L. ao longo do período de armazenamento (até 49 dias) de grãos de milho tratados com diferentes compostos químicos	61
Tabela 5 - Medianas da mortalidade acumulada de <i>Sitophilus zeamais</i> L. ao longo do período de armazenamento (até 49 dias) de grãos de milho tratados com diferentes compostos químicos.....	63
Tabela 6 - Resultados médios de grãos de milho danificados e sem danos mecânicos causados por <i>Sitophilus zeamais</i> L. e teor de água dos grãos aos 63 dias de armazenamento após tratamento diferentes compostos químicos	64
Tabela 7 - Resumo da análise de variância dos dados de preferência de <i>Sitophilus zeamais</i> L. após 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas da aplicação diferentes compostos químicos em arenas com chance de escolha.....	79
Tabela 8 - Resumo da análise de variância dos dados de grãos de milho danificados e sem danos mecânicos causados por <i>Sitophilus zeamais</i> L. e teor de água dos grãos aos 63 dias de armazenamento após tratamento diferentes compostos químicos	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Amb: Temperatura ambiente

CG-DIC: Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

DLS: Espalhamento de Luz Dinâmico

EE: Eficiência de Encapsulamento

EtOH: Etanol

Eug: Eugenol

Refr: Refrigerador

FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (no inglês, Food and Agriculture Organization)

LaCoBSe: Laboratório de Controle Biológico e Semioquímicos

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

M.M: Massa molar

NPs: Nanopartículas vazias e encapsuladas

NPZ: Nanopartículas de zeína vazias sem o ativo

NPZ-Eug: Nanopartículas de zeína incorporadas com Eugenol

NPZ-OC: Nanopartículas de zeína incorporadas com Óleo de Cravo-da-índia

PBC: Tampão fosfato-borato-citrato

PDI: Índice de Polidispersão

pH: potencial hidrogeniônico

PVA: Álcool Polivinílico

OC: Óleo essencial de Cravo-da-índia

OEs: Óleos essenciais

T.R: Tempo de retenção

UESC: Universidade de Santa Cruz

UFSB: Universidade Federal do Sul da Bahia

UV-Vis: Espectroscopia eletrônica de Absorção na região Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Objetivos	15
1.1.1	Geral:	15
1.1.2	Específicos:	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Pragas de grãos e sementes armazenada	16
2.2	<i>Sitophilus zeamais</i> (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae)	17
2.3	Óleo Essencial do cravo-da-índia	18
2.4	Desenvolvimento de Nanopartículas Poliméricas	21
2.4.1	Nanopartículas baseadas em zeína	23
2.5	Estabilidade Coloidal de Sistemas Nanoparticulados	24
2.6	Sistemas de liberação controlada	26
3.	METODOLOGIA	30
3.1	Obtenção e caracterização do óleo essencial de cravo-da-índia	30
3.2	Síntese e caracterização morfológica das NPs	31
3.3	Estabilidade coloidal das nanopartículas	31
3.3.1	Estabilidade explanatória	32
3.3.2	Estabilidade Normal	32
3.3.3	Estabilidade acelerada	32
3.4	Estudo de liberação	33
3.5	Ensaio de bioatividade	33
3.5.1	Criação de <i>Sitophilus zeamais</i> (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae)	34
3.5.2	Avaliação de toxicidade de contato direto e indireto	34
3.5.3	Avaliação do efeito repelente	34
3.5.4	Desenvolvimento populacional de <i>Sitophilus zeamais</i> em grãos de milho tratados	35
3.5.5	Análise estatística	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

4.1	Obtenção e caracterização do óleo essencial de cravo-da-índia.....	37
4.2	Síntese e caracterização morfológica das NPZ	39
4.3	Estabilidade coloidal das nanoparticulas	41
4.3.1	Estabilidade explanatória	42
4.3.2	Estabilidade Normal	44
4.3.3	Estabilidade acelerada	47
4. 4	Estudo de liberação	49
4. 5	Ensaio de bioatividade.....	54
4.5.1	Avaliação de toxicidade de contato direto e indireto.....	55
4.5.2	Avaliação do efeito repelente	57
4.5.3	Desenvolvimento populacional de <i>Sitophilus zeamais</i> em grãos de milho tratados	59
5.	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

Um dos problemas enfrentados pelos agricultores é a infestação de pragas e agentes patógenos que colocam em risco o armazenamento de produtos e suas plantações (NEME et al., 2021). Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), em seu relatório apresentado em 2021, as pragas podem destruir até 40% das plantações globais, causando perdas de aproximadamente US\$ 220 bilhões (EL ARROUD et al., 2024).

Com o intuito de minimizar esse impacto, pesticidas sintéticos são utilizados de forma constante nos cultivos. No entanto, seu uso excessivo prejudica o meio ambiente e a saúde humana, como também, promove a resistência e adaptação de alguns fungos e insetos (CARTAXO, 2020). Diante desse cenário, a nanotecnologia surge como uma alternativa promissora, permitindo o combate às pragas agrícolas sem causar danos significativos à natureza, por meio do desenvolvimento de nanopartículas carregadas com compostos bioativos, como os óleos essenciais (CAMARA et al., 2019).

Óleos essenciais são compostos aromáticos naturais que apresentam pouca solubilidade em água e podem ser extraídos de qualquer parte estrutural de uma planta (SINGH; PULIKKAL, 2022). Dentre os óleos essenciais mencionados na literatura está o óleo de cravo-da-índia (OC), extraído dos botões florais de *Syzygium aromaticum*, o qual possui ação inseticida, antibacteriana e antiparasitária, atribuída em grande parte ao seu composto químico majoritário, o eugenol (Eug) (SARAIVA et al., 2021). No entanto, o óleo de cravo-da-índia apresenta baixa persistência em condições de campo devido à sua alta volatilidade, o que limita a sua aplicação na agricultura (SINGH; PULIKKAL, 2022). Essa limitação pode ser superada por meio da nanotecnologia, através de um processo conhecido como encapsulamento molecular. Nesse processo, os componentes do óleo essencial são “protegidos” de fatores ambientais, prolongando sua estabilidade e persistência no ambiente. (SONI et al., 2022).

O encapsulamento molecular ou nanoencapsulamento é uma técnica utilizada na produção de nanopartículas cujo tamanho situa-se na escala nanométrica entre 1 e 1000 nm (AROUCHE, 2020), este processo consiste no empacotamento de uma substância ativa em uma matriz, com o objetivo de proporcionar a sua liberação de forma gradual sob condições específicas (LEDO et al., 2021).

As nanopartículas poliméricas podem ser sintetizadas a partir de polímeros naturais ou sintéticos. As matrizes naturais são biocompatíveis e biodegradáveis tornando-se mais atraente em comparação aos polímeros sintéticos, visto que, estes podem apresentar toxicidade ao meio ambiente (VELOZ, 2022). Dentre os polímeros naturais que podem ser utilizados com essa finalidade podemos citar a zeína, uma proteína extraída do grão do milho (SARAIVA et al., 2021).

A zeína apresenta excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade sendo considerada segura pela FAO (EL ARROUD et al., 2024). Sua aplicação é aprovada nas indústrias farmacêutica e alimentícia, o que, aliado a essas características, torna-a um material ideal para o desenvolvimento de nanocarregadores (GAGLIARDI et al., 2021; ZHANG et al., 2024).

As nanopartículas de zeína (NPZ) têm sido utilizadas na produção de bioinseticidas ao encapsular óleos ou compostos biativos como por exemplo geraniol, R-citronelal (OLIVEIRA et al., 2018), óleo essencial de cravo-da-índia, eugenol (SARAIVA et al., 2021), Limoneno, carvacrol (MONTEIRO et al., 2021), curcumina (PROENÇA et al., 2024). Na área farmacêutica, as NPZ são utilizadas para melhorar a estabilidade e atividade de fármacos como ciprofloxacina e curcumina (LI; YU, 2020). No entanto, assim como nos demais sistemas nanoestruturados, as NPZ também necessitam de aditivos químicos para assegurar a sua estabilidade coloidal (LI et al., 2022). Pesquisas apontam que a adição de surfactantes pode aumentar a estabilidade coloidal de sistemas nanoparticulados. O álcool polivinílico (PVA), por exemplo, é um surfactante bastante difundido na literatura para aumentar a estabilidade coloidal de diferentes nanopartículas poliméricas visando uma aplicação farmacêutica (MUPPALANENI, 2013).

Nesse trabalho, a zeína foi escolhida como matriz polimérica para a produção de nanopartículas biodegradáveis e o álcool polivinílico (PVA) escolhido como agente estabilizador da suspensão coloidal produzida. O óleo essencial de cravo-da-índia (OC), assim como o eugenol (Eug), composto majoritário desse óleo, foram incorporados nas NPZ, visando a produção de um potencial agente inseticida frente à praga *Sitophilus zeamais* conhecido como gorgulho do milho.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral:

Preparar nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia e eugenol, avaliar a cinética de liberação do princípio ativo e investigar seu efeito inseticida e repelente.

1.1.2 Específicos:

- Preparar nanopartículas de zeína vazias (NPZ), nanopartículas de zeína incorporadas com eugenol (NPZ-Eug) e incorporadas com óleo essencial do cravo-da-índia (NPZ-OC) avaliando sua morfologia por técnicas de microscopia;
- Avaliar o perfil cinético de liberação do eugenol incorporado nas nanopartículas de zeína (NPZ-Eug e NPZ-OC);
- Investigar o efeito inseticida e repelente dos princípios ativos isolados (OC e Eug) e incorporados em nanopartículas de zeína (NPZ-Eug e NPZ-OC) contra *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855);
- Avaliar a taxa de desenvolvimento do *Sitophilus zeamais* e perda dos grãos em milho tratados com os princípios ativos isolados (OC e Eug) e incorporados a nanopartículas de zeína (NPZ-Eug e NPZ-OC);

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pragas de grãos e sementes armazenada

Os insetos pragas de grãos e sementes armazenadas são os principais responsáveis por causar perdas anuais significativas devido aos danos e a contaminação dos produtos armazenados. Grãos e sementes podem ser rapidamente contaminadas por insetos ao ser introduzidas em locais já infestados ou durante períodos longos de armazenamento inadequado (VENDL et al., 2021).

Dependendo do estágio ou da forma em que o produto é atacado, a praga pode ser classificada como primárias ou secundárias. Pragas primárias são aquelas que atacam grãos e sementes sadias e a depender da parte do grão afetada se subdividem em pragas primárias internas ou externas. As pragas primárias internas perfuram grãos e sementes, penetrando neles para completar seu ciclo de desenvolvimento. Elas consomem todo o interior do grão ou semente, facilitando a entrada de outros agentes de deterioração. As pragas primárias externas destroem a parte externa do grão ou semente (casca) e, em seguida, alimentam-se da parte interna sem se desenvolverem dentro delas. Já as pragas secundárias, são aquelas que não conseguem atacar grãos e sementes sadias, elas precisam que estes estejam danificados ou quebrados para se alimentarem (BALIYARSINGH; PRADHAN, 2023; LORINI et al., 2015).

O dano causado pela alimentação direta de insetos reduz o peso, o valor nutricional e a capacidade de germinação dos grãos armazenados. Consequentemente, compradores comerciais podem se recusar a aceitar a entrega de grãos contaminados por insetos ou pagar um valor inferior ao mercado referente ao produto comercializado (KHAN et al., 2024; MNG'ONG'O, 2023).

Além de danificar os grãos ou sementes, essas pragas, ao se alimentarem, também criam um ambiente propício para a proliferação de outros contaminantes, como fungos e bactérias. Dentre as pragas de armazenamento mais comuns que causam perdas consideráveis podemos citar o *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) (Coleoptera: Curculionidae), *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae), *Sitophilus granarius* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae), *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tribolium confusum* (Jacquelin Duval, 1868) (Coleoptera: Tenebrionidae),

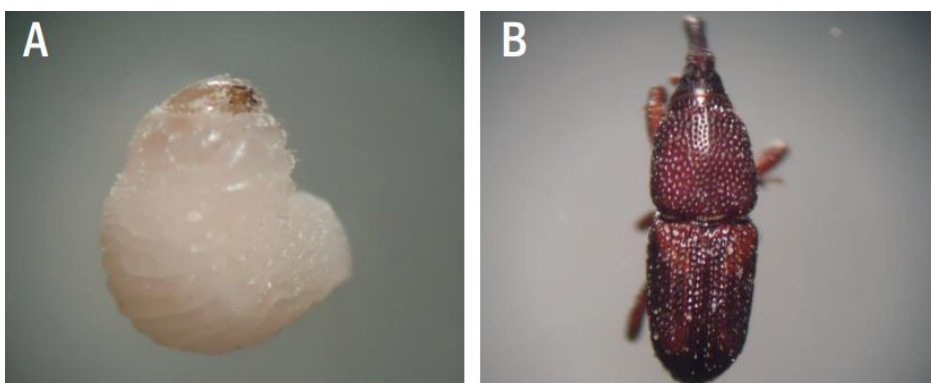
Rhyzopertha dominica (Fabricius, 1792) (Coleoptera: Bostrichidae) e *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Silvanidae) (CHAUDHARI et al., 2021). Dentre os insetos mencionados acima, daremos ênfase para o *Sitophilus zeamais*.

2.2 *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae)

As pragas do gênero *Sitophilus* pertencem a ordem coleoptera e são consideradas as mais destrutivas, as quais incluem as espécies *S. oryzae* (gorgulho do arroz), *S. zeamais* (gorgulho do milho) e *S. granarius* (gorgulho do trigo/celeiro). Essas espécies são muito semelhantes em características morfológicas e podem ser encontradas em grande quantidade nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo (CHAUDHARI et al., 2021).

Os adultos de gorgulhos podem chegar a faixa de 2,0 mm a 3,5 mm de comprimento, de cor castanho-escuro com manchas mais claras nos élitros (asas anteriores), que se tornam visíveis logo após a emergência. Possuem a cabeça projetada para frente, formando um rosto curvado (Figura 1B). Nos machos, o rosto é mais curto e grosso, enquanto nas fêmeas, é mais longo e afilado. As larvas têm coloração amarelo-clara com cabeça marrom-escura, e as pupas são brancas (Figura 1A). O período de oviposição dura 104 dias, com uma média de 282 ovos por fêmea. As fêmeas têm uma longevidade de 140 dias. O período de incubação varia entre 3 e 6 dias, e o ciclo do ovo até a emergência dos adultos é de 34 dias (LORINI et al., 2015).

Figura 1 - *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae): (A) larva; (B) fase adulta



Fonte: Adaptado de Lorini et al (2015)

Esta praga interna é altamente prejudicial devido à sua capacidade de infestação cruzada, afetando grãos tanto no campo quanto nos armazéns, onde

penetra na massa de grãos. Apresentam um alto potencial reprodutivo e possui muitos hospedeiros, como trigo, milho, arroz, cevada e tritcale. Tanto larvas quanto adultos são prejudiciais, atacando grãos e sementes (LORINI et al., 2015).

O controle desta praga é realizado por meio de aplicações de inseticidas sintéticos, como neonicotinoides, carbamatos, piretróides e organofosforados. Dentre os organofosforados, a fosfina tem sido considerada confiável como um tratamento seguro para alimentos e sem resíduos para grãos armazenados. No entanto, o uso repetitivo de fosfina em sistemas de armazenamento levou ao desenvolvimento de resistência em importantes espécies de insetos de grãos armazenados, incluindo o gorgulho do milho, o que está relacionado ao aumento dos custos de produção (PESCHIUTTA et al., 2022).

Nos últimos anos, os óleos essenciais e seus compostos bioativos têm sido utilizados como uma alternativa seguras aos pesticidas sintéticos. Isso se deve à sua baixa persistência no ambiente (sendo ecologicamente corretos), modos de ação variados, baixa toxicidade, ampla disponibilidade, natureza renovável dos materiais de origem e chances mínimas de desenvolvimento de resistência. A mistura de múltiplos componentes nos óleos essenciais causa toxicidade ao interferir em diversos aspectos da fisiologia e bioquímica dos insetos (CHAUDHARI et al., 2021).

2.3 Óleo Essencial do cravo-da-índia

Os óleos essenciais (OEs) são compostos lipofílicos e voláteis que exibem uma coloração levemente amarelada ou até incolor. Após sua extração costumam apresentar baixa estabilidade na presença de luz, calor, ar e umidade (AFFONSO et al., 2012). Os OEs são formados nas glândulas endócrinas e exócrinas das plantas, os quais podem ser armazenados em qualquer parte de sua estrutura vegetal. Além disso, a maior parte dos OEs é composta por monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropenos, aldeídos, cetonas e ésteres ou seus derivados (SINGH; PULIKKAL, 2022). Esses compostos agem por diferentes mecanismos de ação inseticida, o que pode reduzir o risco de desenvolvimento de resistência, tornando-os uma alternativa mais segura aos inseticidas convencionais atualmente utilizados (PESCHIUTTA et al., 2022).

Os OEs podem ser extraídos utilizando métodos como, destilação a vapor, hidrodestilação, destilação seca, extrações mecânicas entre outros (SINGH; PULIKKAL, 2022). O óleo essencial de cravo-da-índia (OC) é extraído dos botões

florais da espécie vegetal chamada de *Syzygium aromaticum* pertencente à família Myrtaceae (JINDAL; KUMAR, 2022). Este óleo é constituído de uma mistura de terpenos voláteis alifáticos, cíclicos e fenilpropanóides (OLIVEIRA et al., 2020).

O OC possui uma ampla atividade biológica, como por exemplo, atividade antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2020), atividade repelente e inseticida podendo ser utilizado na agricultura (SINGH; PULIKKAL, 2022). Na indústria farmacêutica, o OC conta com propriedades analgésica, anti-inflamatória, antialérgica, anticancerígena, antioxidante e antimutagênica (JINDAL; KUMAR, 2022). O OC é composto por uma mistura de terpenos voláteis alifáticos e cíclicos e fenilpropanóides, sendo eugenol (4-alil-2-metoxifenol) o seu componente majoritário (OLIVEIRA et al., 2020).

O eugenol (Eug) é um composto fenólico natural bioativo volátil, o qual faz parte da classe de produtos naturais dos fenilpropanóides. Embora ocorra em várias concentrações dependendo da espécie, a fonte mais rica é *S. aromaticum*, onde constitui entre 9000 e 15000 mg por 100 g de material vegetal fresco, sendo o principal responsável por seu aroma característico (PANDEY et al., 2024). O Eug possui cor clara amarelada, com consistência oleosa e aroma picante, apresenta pouca solubilidade em água, mas se dissolve bem em solventes orgânicos (ULANOWSKA; OLAS, 2021).

O Eug é considerado um composto volátil, com uma pressão de vapor de $2,89 \times 10^{-2}$ mmHg (25 °C). Por este motivo tende a ser evaporado rapidamente comparado a outros compostos, pois quanto mais alta a pressão de vapor, maior será sua volatilidade (VELOZ, 2022). Assim como o extrato bruto de OC, o Eug isolado possui diversas aplicações na área farmacêutica, alimentícia e agrícola (SHARMA, 2022).

Na agricultura, o Eug e o OC têm sido aplicados para minimizar os impactos causados por pragas e agentes patogênicos. Nesta perspectiva, pesquisadores estudaram o efeito inseticida da formulação de neemazal, óleo de gengibre e óleo de cravo-da-índia frente ao terceiro ínstar larval do *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) conhecido como bicho-mineiro. Os resultados indicaram que esses compostos apresentam toxicidade, afetando o processo metabólico e reduzindo a aptidão fisiológica das larvas (AHMED et al., 2022).

Outro grupo de pesquisadores realizou testes em laboratório e em campo com OC e seus constituintes contra grupos de ninfas entre o terceiro ao quinto ínstar e adultos da espécie *Cacopsylla chinensis* (Hemiptera: Psyllidae). Os bioensaios

realizados em laboratório o OC, Eug e β -cariofileno exibiram forte toxicidade de contato contra os adultos com valores de LD₅₀ de 0,730, 0,673 e 0,708 $\mu\text{g/adulto}$, e contra as ninfas com valores de LD₅₀ de 1,795, 1,668 e 1,770 $\mu\text{g/ninfa}$, respectivamente. No ensaio realizado no campo, o OC causou reduções populacionais significativas de 73,01% (4,80 mg/mL), 66,18% (2,40 mg/mL) e 46,56% (1,20 mg/mL) (BAO-LIANG et al., 2015).

Estudos também vem sendo desenvolvidos utilizando o OC e Eug para o combate das espécies da praga primária de armazenamento do gênero *Sitophilus*. Pesquisadores avaliaram o efeito inseticida do Eug, em diferentes doses, com aplicação tópica no *Sitophilus zeamais*. A concentração letal (CL₅₀ = 31 $\mu\text{g/mg}$ inseto; CL₉₅ = 47,6 $\mu\text{g/mg}$ inseto). Além disso, foi avaliado a taxa de crescimento da espécie, a qual foi observado que o Eug reduziu significativamente o consumo de alimentos em adultos de *S. zeamais* quando aplicada com uma dose de 13,2 mg/g de alimento (HUANG et al., 2002).

Em outro trabalho, populações de *Sitophilus Zeamais* resistentes à fosfina e piretróides (PyPhR), a piretróides (PyR1 e PyR2) ou a ambos inseticidas, foram escolhidas para avaliar o desenvolvimento da espécie após a aplicação OC (500uL/kg). Foi observado que a taxa de crescimento populacional foi menos afetada na população PyPhR, no entanto os insetos apresentaram redução respiratória e locomotora. As populações PyR1 e PyR2 reduziram suas taxas respiratórias e apresentaram diminuição crescimento populacional (CORREA et al., 2015).

Outro estudo avaliou os efeitos tóxicos, a repelência e a taxa de respiração causados pelo efeito inseticida presente nos constituintes terpenoides dos óleos essenciais de OC e canela contra *Sitophilus granarius*. Após serem expostos aos constituintes terpenoides e a mistura dos óleos essenciais de OC e canela foi constatado a redução da taxa respiratória e de mobilidade da espécie. Vale ressaltar que o Eug (CL₅₀ = 2,76 $\mu\text{L mL}^{-1}$) obteve uma toxicidade de contato maior do que o óxido de cariofileno (CL₅₀ = 2,78 $\mu\text{L mL}^{-1}$), seguido por α -pineno (CL₅₀ = 4,23 $\mu\text{L mL}^{-1}$), α -humuleno (CL₅₀ = 4,61 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e α -felandreno (CL₅₀ = 5,16 $\mu\text{L mL}^{-1}$) (PLATA-RUEDA et al., 2018).

Nesse sentido, o OC e Eug têm sido alvo de estudos e aplicações por apresentarem uma alternativa mais segura para combater pragas agrícolas (PANDEY, 2024). No entanto, a baixa solubilidade em água, instabilidade química e volatilidade dificultam sua aplicação direta em condições de campo, sendo portanto necessário o

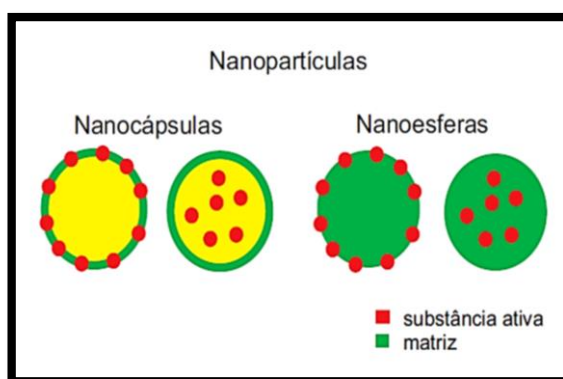
desenvolvimento de formulações para minimizar esse problema (WEISANY et al., 2022).

2.4 Desenvolvimento de Nanopartículas Poliméricas

O encapsulamento molecular é uma técnica empregada para incorporar compostos em uma matriz com dimensões na escala nanométrica (VERMA; RYAN; PADRELA, 2021). Esses sistemas são utilizados para transportar substâncias ativas por meio de sua incorporação (encapsulamento), visando melhorar suas propriedades físico-químicas, controlar o tempo de degradação e possibilitar um sistema de liberação controlada do composto encapsulado (MELO, 2020; WEISANY, 2022).

Conforme sua composição e morfologia, as nanopartículas produzidas podem ser classificadas em dois tipos estruturais: nanocápsulas e nanoesferas (Figura 2). As nanocápsulas apresentam uma camada polimérica ao redor de um núcleo oleoso de forma que a substância ativa esteja dissolvida neste núcleo ou adsorvida à camada polimérica. Já as nanoesferas não contêm óleo em sua composição, mas são constituídas a partir de uma matriz polimérica, em que a substância ativa pode estar dispersa ou solubilizada em seu interior (MARINI, 2014; MURTALA et al., 2023; SILVA, 2019; SOUTO, 2012).

Figura 2 - Representação esquemática dos tipos de nanopartículas



Fonte: Veloz (2022)

As propriedades e estruturas distintas dos nanomateriais têm sido estudadas nos últimos anos e permitem que as nanopartículas poliméricas (NPs) sejam aplicadas na entrega de drogas, bioimagem, catálise, sensoriamento, construção, energia e células de combustível (YAN; BERNARD; GANACHAUD, 2021). Também podem ser utilizadas na área farmacêutica, pois, é possível sintetizar NPs para apresentar

características únicas facilitando a interação com células e tecidos a nível molecular e atômico (VIEGAS; SECK; FONTE, 2022).

A produção das NPs pode ser realizada através de diferentes métodos como, emulsificação-evaporação do solvente, nanoprecipitação, salting-out ou emulsificação-difusão do solvente. Vale ressaltar, que a escolha da técnica utilizada depende principalmente das características de solubilidade do princípio ativo (BEZERRA, 2022; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). No presente trabalho, a técnica escolhida foi a nanoprecipitação.

O procedimento envolvido na produção de NPs por meio da nanoprecipitação divide-se em duas fases: interna e externa. A fase interna consiste na dissolução da matriz polimérica em um solvente orgânico. Já a fase externa é composta por uma solução aquosa contendo um surfactante responsável por prevenir a coalescência das gotículas no sistema nanoparticulado. Além disso, o surfactante aumenta a repulsão eletrostática e estérica das NPs formadas, o que melhora a estabilidade coloidal do nanomaterial produzido. Assim que as duas fases (interna e externa) são misturadas sob agitação magnética, ocorre imediatamente a precipitação das NPs e a suspensão obtida apresenta-se com o aspecto opalescente, típico de suspensões coloidais (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; WANG, 2023).

A nanoprecipitação é um dos métodos mais utilizados para produzir nanocarreadores (GUO, 2023). Utilizando esta técnica é possível obter nanoesferas, quando a substância ativa se encontra dissolvida na solução polimérica, ou nanocápsulas, quando a substância ativa é previamente dissolvida em um óleo e este é adicionado à solução polimérica (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

A nanoprecipitação tem como vantagem, sintetizar NPs de modo espontâneo e eficiente (COSTA, 2020), e formar sistemas que se tornam estáveis por dias (YAN; BERNARD; GANACHAUD, 2021). Esta técnica, promove a formação de NPs com diâmetro inferior a 100 nm (HERDIANA, 2022).

As NPs podem ser sintetizadas a partir de dois tipos de matrizes: polímeros sintéticos ou polímeros naturais. Dentre os polímeros de ocorrência natural existem os baseados em proteínas de origem animal, como albumina e os de origem vegetal, como a zeína. Diferente das matrizes sintéticas, as naturais são biodegradáveis e geralmente apresentam baixa toxicidade (GOMEZ-GAETE, 2014; VELOZ, 2022).

Vale ressaltar, que as proteínas vegetais têm sido investigadas como matrizes na produção das NPs, devido sua propriedade hidrofóbica que impede o uso de

reticulantes químicos tóxicos. Em particular, a zeína promove o encapsulamento de compostos pouco solúveis em água, como também, foi considerada segura pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América e possui aplicação aprovada para sua utilização na área farmacêutica e alimentícia (GAGLIARDI et al., 2021). Motivo pelo qual, a zeína foi escolhida nesta pesquisa como matriz polimérica na produção de NPs.

2.4.1 Nanopartículas baseadas em zeína

A zeína é uma proteína encontrada no endosperma do milho, a qual pertence ao grupo das prolaminas. Essa macromolécula apresenta ponto isoelétrico neutro ($pI \sim 6,8$) e pode ser dividida em quatro componentes de acordo com sua solubilidade e peso molecular: α -zeína (19 e 22 kDa), β -zeína (14 kDa), γ -zeína (16 e 27 kDa) e δ -zeína (10 kDa) (BOUMAN et al., 2016; WANG et al., 2023). Dentre elas, podemos destacar a α -zeína que constitui mais de 70% do total de zeína, sendo considerada mais abundante (LIU et al., 2019). A quantidade de aminoácidos apolares que fazem parte da constituição da molécula de zeína influencia na solubilidade em água, dessa forma a proteína apresenta propriedades hidrofóbicas. No entanto, dissolve-se a partir da adição de álcoois, glicóis ou a exposição de condições alcalinas extremas (KESHANIDOKHT et al., 2022).

A zeína destaca-se na síntese de NPs devido às suas propriedades singulares, como reprodutibilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e a capacidade de fixar medicamentos e ligantes tanto hidrofóbicos quanto hidrofílicos em sua superfície, superando outras nanopartículas à base de proteínas. As características da zeína possibilitaram o encapsulamento de diversos bioativos, como abamectina, ciprofloxacino, limonina, nomilina, luteína, insulina, quercetina, glibenclamida, DNA, óleos essenciais, enzimas e polifenóis, em nanopartículas de zeína para administração oral (CAMPOS et al., 2023).

A hidrofobicidade e a solubilidade da zeína são os principais fatores que permitem a fácil criação de nanopartículas de zeína (NPZ). Além disso, a zeína se destaca por sintetizar nanopartículas de maneira natural, sendo um polímero anfifílico, não imunogênico, de fácil obtenção e baixo custo, pois, ela é reconhecida pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América como um excipiente seguro (GRAS) para produtos farmacêuticos orais (CAMPOS et al., 2023).

No desenvolvimento de nanomateriais é fundamental considerar a disponibilidade do material, o baixo custo, o perfil de segurança para uso humano e suas propriedades físico-químicas. Nesse sentido, as NPZ têm demonstrado qualidades desejáveis, incluindo a capacidade de controlar a liberação de fármacos e compostos bioativos, melhorar a absorção e apresentar baixa toxicidade em comparação com formulações sintéticas (CAMPOS et al., 2023).

A síntese e caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulados desenvolvidos neste trabalho (NPZ, NPZ-OC e NPZ-Eug) já foram publicadas pelo nosso grupo de pesquisa (VELOZ, 2022; VELOZ et al., 2024). As NPs foram otimizadas e apresentaram tamanhos adequados para sistemas nanoparticulados (NPZ = 113 nm, NPZ-Eug = 229 nm e NPZ-OC = 279 nm), baixo índice de polidispersão ($PDI < 0,26$) e potencial zeta (-30 mV), indicando excelente estabilidade coloidal (VELOZ et al., 2024). Esses resultados promissores motivaram a continuidade do estudo desses nanomateriais pelo nosso grupo de pesquisa.

2.5 Estabilidade Coloidal de Sistemas Nanoparticulados

A estabilidade de nanoformulações é um aspecto fundamental para garantir sua eficácia e segurança ao longo do tempo. Ela pode ser classificada em três principais categorias: estabilidade química, que envolve a degradação química das NPs; estabilidade farmacêutica de longo prazo, que refere-se às alterações na qualidade do princípio ativo ao longo do tempo devido à ação de fatores ambientais; e estabilidade física ou coloidal, relacionada à capacidade das partículas em permanecerem dispersas sem agregação. Embora a estabilidade farmacêutica e a estabilidade química tenham sido amplamente estudada, com diversos mecanismos de degradação identificados dependendo do tamanho das nanopartículas e da reatividade dos polímeros, a estabilidade coloidal ainda é uma área de pesquisa insuficientemente explorada (LAZZARI et al., 2012).

A estabilidade de uma nanoformulação é crucial para garantir seu prazo de validade durante o armazenamento e manuseio permitindo que o produto mantenha as mesmas características de quando foi fabricado (MARINI, 2014). Vários fatores podem influenciar essa estabilidade, como o método de produção, os materiais utilizados na síntese e as condições ambientais, incluindo transporte, tempo, temperatura, vibração, umidade, luz e processos de oxirredução. Essas alterações

podem ser de origem extrínseca, relacionadas a fatores externos, ou intrínseca, determinadas pela escolha dos componentes e matrizes na formulação (ANVISA, 2004).

Para avaliar a estabilidade, são utilizados parâmetros que incluem propriedades organolépticas, como cor e odor, e propriedades físico-químicas, como pH, viscosidade, densidade e turbidez. Os testes de estabilidade são divididos em duas categorias principais: testes acelerados e de longa duração. Nos testes acelerados, as condições são ajustadas para aumentar a velocidade de degradação química e prever o prazo de validade do produto nas condições normais de armazenamento. Já os testes de longa duração avaliam o comportamento do produto sob condições normais de armazenamento, validando os resultados obtidos nos testes acelerados (ANVISA, 2004).

Todos os produtos, sejam eles para aplicações industriais, agrícolas ou farmacêuticas, devem passar por rigorosos testes de estabilidade antes de serem liberados para o mercado. Esses testes garantem que o produto mantenha suas características e eficácia durante todo o seu prazo de validade, assegurando que continue a cumprir sua função ao longo do tempo (AROUCHE, 2020).

Partículas em nanoescala podem apresentar baixa estabilidade termodinâmica, o que as torna propensas à aglomeração ao longo do tempo. Além disso, as propriedades físico-químicas de nanomateriais são altamente dependentes de fatores como tamanho, morfologia e estado da superfície, sendo necessário realizar técnicas de caracterização essenciais para prever mudanças nessas propriedades e otimizar sua estabilidade (LOZA; EPPLÉ; MASKOS, 2019), pois sua estabilidade pode influenciar em sua sedimentação, dissolução, transporte e liberação (CHEN et al., 2024).

Vale salientar que vários parâmetros influenciam a produção de sistemas nanoparticulados estáveis, incluindo as propriedades físico-químicas da formulação, a composição da matriz, a distribuição do tamanho das partículas e o uso de surfactantes. Dentre esses fatores, destaca-se a escolha de um surfactante apropriado (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

Os surfactantes promovem a estabilização das nanopartículas por meio da redução da tensão interfacial. Como também, conseguem exercer uma barreira física que impede a floculação e coalescência dos nanomateriais (SILVA, 2019). Nesse sentido, o álcool polivinílico (PVA) tem sido escolhido como surfactante para produção

de NPs por meio do método de nanoprecipitação ou emulsão para encapsular compostos metálicos (RIVERA-HERNANDEZ et al., 2021).

Com o aumento no desenvolvimento de bioinseticidas sustentáveis, um grupo de pesquisa desenvolveu nanoformulações usando a zeína como matriz polimérica para carregar OC e Eug. As nanopartículas de zeína (NPZ) carregadas com OC apresentaram PDI de $0,20 \pm 0,01$ e potencial zeta de 19 ± 2 mV. No entanto, para as NPZ carregadas com eugenol, os autores relaram um PDI de $0,21 \pm 0,02$ e potencial zeta de $2,6 \pm 0,2$ mV. Apesar do baixo valor do potencial zeta, as formulações obtidas permaneceram estáveis por 60 dias. Além disso, evidenciaram uma atividade inseticida significativamente maior para a praga *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), se comparado com os seus respectivos compostos orgânicos livres (OC e Eug) (SARAIVA, 2021).

2.6 Sistemas de liberação controlada

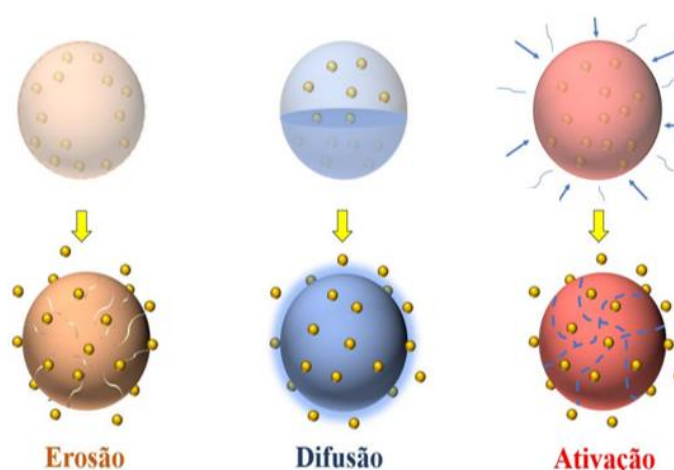
Como já mencionado anteriormente, as NPs podem promover o encapsulamento de uma substância ativa e proporcionar um sistema de sua liberação controlada. O processo de liberação ocorre por meio da transferência de um agente ativo ou por estímulos físico-químicos, como por exemplo a degradação da matriz polimérica (MACHADO, 2022). A principal vantagem do sistema de liberação controlada é manter a concentração constante da substância ativa em um determinado período de tempo. Este deve apresentar rápido alcance da concentração do composto ativo durante a aplicação, inibindo fatores ambientais (COSTA, 2020).

O perfil cinético da liberação do princípio ativo pode ser avaliada usando diferentes métodos, como o de fluxo contínuo e membrana de diálise. O método de membrana de dialise permite que o princípio ativo seja separado fisicamente da matriz polimérica utilizando uma membrana de diálise, permitindo a coleta do composto em intervalos regulares. Para isso, as nanopartículas são inseridas em um saco de diálise, o qual é selado e colocado em um recipiente maior contendo o meio de liberação o qual é mantido sob agitação contínua. Neste método, o composto é liberado da formulação e se difunde por meio da membrana de diálise para o compartimento externo, onde é posteriormente quantificado (D'SOUZA, 2014).

As NPs podem liberar as substâncias ativas que estão incorporadas por meio de mecanismos como, difusão, erosão ou ativação. A difusão acontece quando a

substância ativa é transferida pela matriz polimérica para o ambiente. No mecanismo de erosão, a matriz polimérica é degradada liberando o composto para o ambiente, neste caso, a matriz polimérica precisa ser biodegradável no meio reacional estudado. O mecanismo de ativação ocorre quando há uma quebra das cadeias poliméricas interrompendo suas ligações intermoleculares liberando o composto ativo (Figura 3) (SILVA, 2019; WEISANY, 2022).

Figura 3 - Mecanismos de liberação controlada



Fonte: Costa (2020)

O mecanismo de liberação do princípio ativo pode ser estudados partindo de modelos matemáticos, os quais descrevem o comportamento cinético de sua liberação do sistema nanoparticulado, tais como: Cinética de ordem zero; Cinética de primeira ordem; Hixcon-Crowell; Higuchi; Korsmeyer–Peppas; e Weibull (COSTA, 2020).

No modelo cinético de ordem zero (Eq. 1) a liberação do princípio ativo ocorre independentemente da sua concentração, ou seja, descreve uma liberação constante do princípio ativo por meio de sua matriz (BHASARKAR; BAL, 2018).

$$Q_t = kt + Q_0 \quad (1)$$

onde Q_t é a quantidade do princípio ativo dissolvido no tempo t , Q_0 é a quantidade inicial do princípio ativo na solução (na maioria das vezes, $Q_0=0$) e k é a constante de liberação de ordem zero (COSTA; LOBO, 2001).

Na cinética de liberação de primeira ordem (Eq. 2), presume-se que a velocidade de liberação do princípio ativo é proporcional a sua quantidade, o que

resulta em uma diminuição da concentração da droga liberada por unidade de tempo (WENG; DURAND; DESOBRY, 2023).

$$\ln(1 - f_t) = -kt \quad (2)$$

onde f_t é a fração do princípio ativo liberado no tempo t , k é a constante de liberação do princípio ativo (COSTA; LOBO, 2001).

O modelo de Hixson-Crowell (Eq. 3) é aplicado para descrever o perfil de liberação considerando a redução da superfície das partículas do fármaco durante a sua dissolução (BHASARKAR; BAL, 2018).

$$(1 - f_t)^{1/3} = -kt + 1 \quad (3)$$

onde, f_t representa a fração dissolvida do fármaco no tempo t e k é uma constante de liberação. Assim, se as condições de equilíbrio não forem alcançadas e se a forma farmacêutica diminuir proporcionalmente ao longo do tempo, o gráfico da raiz cúbica da fração não-liberada do medicamento *versus* o tempo será linear. Nesse modelo, presume-se que a taxa de liberação é limitada pela dissolução das partículas da droga, não pela difusão por meio da matriz polimérica (COSTA; LOBO, 2001).

O modelo de Higuchi (Eq. 4) descreve a liberação de um princípio ativo como um processo de difusão regido pela lei de Fick, o qual, apresenta uma relação de raiz quadrada em função do tempo (WENG; DURAND; DESOBRY, 2023). Este modelo matemático é representado pela equação 4.

$$f_t = k_H t^{1/2} \quad (4)$$

onde k_H é a constante de dissolução de Higuchi e f_t a fração do composto ativo liberado. Esse modelo é aplicável para descrever a dissolução de medicamentos em várias formas farmacêuticas de liberação modificada, como certos sistemas transdérmicos e comprimidos de matriz contendo fármacos hidrossolúveis (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

O modelo de Korsmeyer-Peppas (Eq. 5) foi proposto em 1983 e é utilizado para analisar a liberação de formas farmacêuticas poliméricas quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando são combinados dois tipos de mecanismo (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). Ele é representado pela equação 5.

$$f_t = K t^n \quad (5)$$

onde, f_t é a fração da amostra liberada no tempo t , k é a constante de difusão; n é o expoente de liberação que caracteriza o mecanismo de liberação (KORSMEYER et

al., 1983). A partir do valor de n é possível identificar o mecanismo de liberação conforme o Quadro 1.

Quadro 1- Interpretação do valor de n no mecanismo de liberação

Expoente de liberação (n)	Mecanismo de difusão do agente ativo	Descrição
$n = 0,43$	Difusão Fickiano ou Caso I	Quando o tempo de difusão é significativamente mais lento que o tempo de relaxação da cadeia polimérica.
$N = 0,89$	Intumescimento do polímero ou Caso II	Quando o tempo de difusão é significativamente mais rápido do que o tempo de relaxação das cadeias, ambos ocorrem simultaneamente.
$0,43 < n < 0,89$	Difusão anômala (não Fickiano) tanto de difusão e relaxamento (erosão)	Isso ocorre quando os tempos de difusão e relaxação das cadeias poliméricas são semelhantes.

Fonte: Silva (2019)

Em 1951 foi desenvolvido por Weibull um modelo matemático empírico (Eq. 6) para explicar o processo de dissolução ou difusão. Essa equação possui aplicação em diversos tipos de curvas de liberação. Quando usada em dissolução ou difusão de do princípio ativo de diferentes formulações, essa equação expressa a fração acumulada do princípio ativo, em solução no tempo (COSTA; LOBO, 2001).

$$f_t = 1 - e[-(t-k)^\beta / \alpha] \quad (6)$$

onde, o parâmetro α , indica a escala de tempo da liberação. O parâmetro k é a constante cinética da liberação da amostra, o parâmetro α , indica a forma que descreve a curva de liberação, f_t é a fração da amostra liberada no tempo t , O parâmetro β , indica a forma da curva: sendo $b = 1$ (caso 1) será uma exponencial; $b > 1$ (caso 2) será uma sigmoide; $b < 1$ (caso 3) será uma parabólica, com uma inclinação inicial mais elevada e depois consistente com uma exponencial (COSTA; LOBO, 2001).

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção e caracterização do óleo essencial de cravo-da-índia

Os botões florais secos de *Syzygium aromaticum* foram adquiridos em feiras livres localizados na região de Valença (BA, Brasil) (13° 22' 50" S e 39° 4' 56" W) em novembro de 2022. O óleo de cravo-da-índia (OC) foi obtido por hidrodestilação com adaptador Clevenger no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais e Síntese Orgânica da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), utilizando os botões florais inteiros (60,22 g), conforme procedimento já reportado na literatura por nosso grupo de pesquisa (VELOZ et al., 2024).

A composição química do OC foi avaliada por meio da cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (CG-DIC), usando o cromatógrafo a gás QP 2010 (Shimadzu), equipado com coluna capilar de sílica fundida VF5-ms (30m X 0,25mm) com fase estacionária 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano (0,25µm de espessura de filme), tendo hélio 6.0 como gás arraste e fluxo de 1,2 mL/min (10 psi). As temperaturas do injetor e detector foram de 250°C e 280°C, respectivamente. Foi injetado 0,1 µL de solução de óleo de cravo em CHCl₃ a 50 ppm no modo split 1:10. A temperatura da coluna teve início a 130 °C, mantida nessa temperatura por 3 min, acrescida de 6 °C/min até 250 °C e mantida nessa temperatura por 5 min, perfazendo o tempo total de 28 min. A quantificação dos componentes foi obtida por integração eletrônica dos picos detectados no DIC por normatização.

Também foi feita uma análise em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) QP 2010SE (Shimadzu), com analisador triplo quadrupolo, a coluna e as condições de temperaturas foram idênticas às usadas na análise CG-DIC. O modo de operação foi de impacto elétrico de 70 eV a uma velocidade de varredura de 1/segundo dentro de uma faixa de 50 a 600 Da. A temperatura da fonte de íons foi de 200° e da interface de 250°. A identificação dos componentes dos óleos foi realizada pela análise dos padrões de fragmentação observado nos espectros de massas, bem como através da comparação dos seus índices de retenção com os compostos conhecidos, obtidos por injeção de uma mistura de padrões contendo uma série homóloga de alcanos C8 – C26 (sigma – USA), e dados da literatura (ADAMS, 2007).

O teor de eugenol (Eug) no OC foi determinado utilizando a técnica de

espectroscopia de absorção eletrônica molecular na região do UV-Vis, utilizando uma curva de padronização externa preparada previamente em etanol 85% (v/v) com uma faixa de trabalho de 15-57 $\mu\text{g/mL}$ ($y = 0,017x + 0,0265$). Para isso, a amostra de OC foi diluída por um fator de 200x e a absorbância foi registrada na região de 200-600 nm.

3.2 Síntese e caracterização morfológica das NPs

Nanopartículas de zeína vazias (NPZ), nanopartículas de zeína incorporadas com eugenol (NPZ-Eug) e com óleo essencial de cravo-da-índia (NPZ-OC) foram preparadas por meio do método de nanoprecipitação (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012), utilizando o procedimento já estabelecido no grupo de pesquisa (VELOZ et al., 2024). Foi preparada uma solução de zeína 0,3% (m/v) em etanol 85% (v/v), a qual ficou sob agitação magnética (~ 8 h) à temperatura ambiente em agitador magnético (IKA®-Werke RT 10 power). Logo após, a solução foi aquecida por 15 min (75 °C) e na sequência filtrada utilizando filtros de seringa Millex® (0,45 μm) para a remoção de eventual resíduo particulado presente na solução. Posteriormente, 1 mL da solução de zeína foi misturado à 9 mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) 0,6% (m/v) e a suspensão ficou sob forte agitação magnética por 2 h em temperatura ambiente. Após este período, as NPZ obtidas foram transferidas para tubos Falcon® e ajustadas para um volume final de 10 mL. Para a produção das nanopartículas de zeína incorporadas com eugenol (NPZ-Eug) e óleo essencial de cravo-da-índia (NPZ-OC) foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima, no entanto, na fase orgânica foi adicionado aproximadamente 0,015g dos respectivos óleos (VELOZ et al., 2024).

A morfologia das NPs foi analisada usando um microscópio eletrônico de transmissão (MET), realizado no equipamento Morgani 268D (FEI Company) na tensão de aceleração de 100 kV. Para isso, amostras de NPZ e NPZ-EUG foram diluídas em água deionizada por um fator de 10x e 5x, respectivamente. Em seguida, foi adicionado, cuidadosamente, 2 μL de cada suspensão coloidal sob um grid de cobre (400 mesh) revestidas com um filme fino de carbono Formvar. As amostras foram colocadas dentro de uma placa de Petri contendo papel filtro e mantidas no dessecador para a evaporação do solvente por um período de 24 horas em temperatura ambiente (MENEZES, 2019).

3.3 Estabilidade coloidal das nanopartículas

A estabilidade das NPs foi avaliada utilizando três ensaios: estabilidade explanatória; estabilidade acelerada; estabilidade normal (também conhecida como tempo de prateleira) (ANVISA, 2004).

3.3.1 Estabilidade explanatória

Alíquotas (2 mL) das amostras (NPZ, NPZ-Eug, NPZ-OC) foram submetidas a centrifugação com velocidades de 5.000, 10.000 e 15.000 rpm por 90 min. Após esse tempo, foi avaliado a integridade da suspensão coloidal por meio do odor, cor, uso do Efeito Tyndall e a formação de sedimentação das NPs.

3.3.2 Estabilidade Normal

Amostras de cada suspensão coloidal (NPZ, NPZ-Eug, NPZ-OC) foram preparadas e divididas em duas porções de 30 mL cada. Uma delas foi mantida no refrigerador (10 °C) e outra porção permaneceu em temperatura ambiente (25 °C). Os parâmetros físico-químicos (pH e turbidez) e a eficiência de encapsulamento (%EE) foram medidos em intervalos de sete dias por um período de 42 dias.

A eficiência de encapsulamento (%EE) foi calculada a partir da $[Eug]_{amostra}$ e $[Eug]_{inicial}$ (Eq. 7), onde $[Eug]_{inicial}$ corresponde a concentração de eugenol (NPZ-Eug) ou OC (NPZ-OC) inicialmente pesada e $[Eug]_{(amostra)}$ corresponde a concentração lida da amostra. A concentração de eugenol de cada amostra foi quantificada por espectrofotometria de absorção molecular ($\lambda = 280 \text{ nm}$) utilizando uma curva de padronização externa ($y = 0,0155x + 0,0442$).

$$\%EE = \left(\frac{[Eug]_{(amostra)}}{[Eug]_{(inicial)}} \right) \times 100 \quad (7)$$

3.3.3 Estabilidade acelerada

Amostras de cada suspensão coloidal (NPZ, NPZ-Eug, NPZ-OC) foram preparadas e divididas em duas porções de 20 mL cada. Uma delas foi mantida no refrigerador (10 °C) e identificada como controle, enquanto que a outra porção foi submetida a ciclos alternados de temperatura, mantendo-se os frascos no refrigerador a 10 °C por 24 horas (resfriamento) e em temperatura ambiente (25 °C) por 24 horas (aquecimento). Ambas as porções foram avaliadas por um período de 42 dias, sendo monitorado semanalmente o valor de pH (pHmetro PHS3B2, BEL) e a turbidez das amostras (turbidímetro AP2000, PoliControl).

3.4 Estudo de liberação

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado a 25°C em solução tampão fosfato-borato-citrato (PBC) (1mmol/L) em pH 3,0 e 7,4. Aliquotas (5 mL) das NPZ-Eug e NPZ-OC foram transferidas para uma membrana de diálise SnakeSkin™, com diâmetro de 34 mm e tamanho de poros de 3,5 KDa, cortadas com aproximadamente 15 cm de comprimento. A membrana permaneceu submersa em água destilada, previamente, por 24h antes de inserir a amostra. Após fechada as extremidades, as membranas contendo as amostras de NPZ- Eug e NPZ-OC foram imersas em 45 mL do tampão PBS e o sistema ficou sob agitação contínua (400 rpm) durante 220 min. Em intervalos regulares (20 min) 3 mL foram coletados do sistema e substituídos por igual volume de solução PBS com a finalidade de manter a condição *sink* do sistema. O estudo foi realizado em triplicata genuínas. O eugenol (Eug) presente em cada amostra coletada foi quantificado por espectrofotometria de absorção molecular na faixa ($\lambda = 280$ nm) (WU et al., 2023), utilizando uma curva de padronização externa preparada nas mesmas condições da amostra e com faixa de trabalho de 10 – 120 $\mu\text{g/mL}$.

A cinética de liberação do princípio ativo (Eug) foi avaliada utilizando seis modelos matemáticos, Ordem zero (Eq. 1), primeira ordem (Eq. 2), Hixson-Crowell (Eq. 3), Higuchi (Eq. 4), Korsmeyer–Peppas (Eq. 5), Weibull (Eq. 6). Os dados experimentais foram tratados para se ajustar a uma equação linear ou não-linear, a depender do modelo matemático, utilizando o software OriginPro 2017.

Além de quantificar o percentual de Eug liberado, foi necessário calcular o percentual de Eug presente na NPZ-Eug e na NPZ-OC antes de serem adicionadas ao tubo de diálise para determinar a quantidade máxima que o princípio ativo poderia ser liberado (VELOZ et al., 2023). Para tanto, foi adicionado 0,5 mL da suspensão em um tubo Falcon e em seguida adicionou-se 3,5 mL de tampão fosfato-borato-citrato (PBC) (pH 7,4 ou pH 3,0). Na sequência, a solução ficou incubada por aproximadamente 3 h. Para garantir a completa difusão do Eug neste período de 3h, a suspensão de NPs foi homogeneizada em Vortex em períodos intercalados de 30 min. Por fim, as NPs foram ultracentrifugadas utilizando filtros Amicon®, e o Eug total liberado foi quantificado por espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-Visível, conforme procedimento também descrito anteriormente.

3.5 Ensaios de bioatividade

3.5.1 Criação de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae)

Os insetos da espécie *Sitophilus zeamais*, doados pela Universidade Federal do Sul da Bahia (UFSB), foram criados em recipientes de vidro com capacidade para 1 L e cobertos com plástico filme perfurado. Os grãos de milho utilizados na criação dos insetos não foram tratados quimicamente e estavam livres de contaminação de outras espécies de insetos (PIMENTEL et al., 2023).

3.5.2 Avaliação de toxicidade de contato direto e indireto

Para a avaliação por contato indireto alíquotas (600 uL) dos tratamentos (NPZ, NPZ-OC, NPZ-Eug, OC e Eug), controles negativos (PVA/EtOH e água) e controle positivo (deltametrina) foram pipetados em uma folha de papel filtro com diâmetro de 8 cm, e introduzidos numa placa Petri (poliestireno natural (PS)), com 8,5 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura e com abertura de 6,5 cm de diâmetro na tampa coberta com tecido tipo *voil* branco para possibilitar a circulação de ar. Após 6 min (tempo para a evaporação do solvente do papel), dez adultos de *Sitophilus zeamais*, não sexados, foram adicionados às placas contendo os tratamentos. A concentração de OC e Eug nas amostras de NPZ-OC e NPZ-Eug era de 1,5 mg/mL (ou 1,36 uL/mL), e a dose de OC e Eug aplicada no ensaio foi equivalente a 0,018 mg/cm².

Para a avaliação por contato direto, alíquotas de 600 uL dos tratamentos (NPZ, NPZ-OC, NPZ-Eug, OC e Eug, com a mesma dose descrita acima), controles negativos (PVA/EtOH e água) e controle positivo (deltametrina) foram pipetados diretamente em dez adultos de *Sitophilus zeamais*, não sexados que foram previamente resfriados. Esses adultos estavam sob um papel filtro com diâmetro de 8 cm, introduzido em uma placa de Petri (poliestireno natural (PS)), 8,5 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura e com a tampa cortada com diâmetro de 6,5 cm e tampada com tecido *voil* branco para possibilitar a circulação de ar.

As placas de petri foram armazenadas em sala de criação (23-27 °C e umidade relativa de 68-82%) no Laboratório de Controle Biológico e Semioquímicos (LaCoBSe) da UESC em ambos ensaios. A mortalidade foi avaliada após 24 h, 48 h e 72 h e os insetos que não apresentaram movimento foram considerados mortos. Todos os tratamentos e controles foram replicados cinco vezes (RODRIGUEZ et al., 2022).

3.5.3 Avaliação do efeito repelente

Os testes de repelência foram realizados em arenas compostas por três recipientes plásticos de 350 mL conectados simetricamente por dois tubos cilíndricos de plástico (10 cm de comprimento e 7 cm de diâmetro). No recipiente central foram liberados 20 adultos não-sexados de *Sitophilus zeamais*. Em um dos recipientes conectados ao recipiente central foram colocados 50 g de milho tratados uniformemente com 500 uL da amostra (NPZ-OC, NPZ-Eug, NPZ, OC, Eug ou PVA+ Etanol) com concentração inicial de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ($1,36 \text{ uL mL}^{-1}$) para OC e Eug respectivamente, o qual corresponde a uma dose de 15 mg/kg ($13,6 \text{ uL/kg}$) e no outro recipiente foram colocados 50 g de grãos de milho com 500 uL de água destilada (controle). As arenas foram armazenadas em sala de criação (23-27 °C e umidade relativa de 68-82%) no LaCoBSe na UESC. Foram realizados sete repetições com cada amostra e o efeito de repelência foi avaliado a partir da contagem do número de insetos em cada recipiente após 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h (ARAÚJO et al., 2019; RIBEIRO et al., 2020).

3.5.4 Desenvolvimento populacional de *Sitophilus zeamais* em grãos de milho tratados

Os tratamentos (NPZ, NPZ-OC, NPZ-Eug, OC e Eug) e controles (PVA/EtOH, inseticida e água) foram utilizadas para avaliação do desenvolvimento e mortalidade de adultos da espécie *Sitophilus zeamais*. Para isso, foram utilizados potes de plástico de 250 mL (9 cm de diâmetro e 6 cm de altura) contendo em cada um, 100 g de grãos de milho e 1 mL dos tratamentos e controle. A mistura dos grãos de milho com os tratamentos e controles foi realizada mecanicamente dentro de cada pote de plástico por 30 segundos, garantindo a distribuição uniforme da alíquota sobre os grãos. Em cada recipiente, foram adicionados dez insetos adultos não-sexados, com cinco repetições para cada condição experimental. Os grãos infestados artificialmente foram armazenados por 63 dias em sala de criação (temperatura de 23-27 °C e umidade relativa de 68-82%) no LaCoBSe da UESC. A concentração de OC e Eug nas amostras de NPZ-OC e NPZ-Eug era de $1,5 \text{ mg/mL}$ (ou $1,36 \text{ uL/mL}$), e a dose de OC e Eug aplicada no ensaio foi equivalente a $0,018 \text{ mg/cm}^2$.

O crescimento populacional dos insetos e a mortalidade foram avaliados a cada 7 dias, registrando-se o número de indivíduos vivos e mortos ao longo de 49 dias. Ao final desse período, foi registrado o número de adultos emergidos após a infestação, calculado pela diferença entre o número total de gorgulhos do milho e o número inicial

utilizado na infestação artificial. A mortalidade final, em porcentagem, foi calculada pela razão entre o número de gorgulhos mortos e o total de gorgulhos da população, multiplicada por 100.

Em 63 dias após a infestação, foram realizadas as seguintes avaliações: (a) percentual de grãos danificados, calculado com base na diferença de peso entre grãos com e sem danos causados pelo gorgulho do milho; (b) perda de peso dos grãos, obtida pela pesagem dos grãos antes e após a exposição aos gorgulhos; (c) teor de água dos grãos, determinado pesando-se 20 g de grãos de milho antes e após o teste. Para essa última análise, foram usadas duas repetições de cada tratamento (NPZ, NPZ-OC, NPZ-Eug, OC e Eug), além dos controles negativo (PVA/EtOH e água) e positivo (inseticida). Os grãos foram colocados em estufa a 105 °C por 24 horas (MARQUES et al., 2021).

3.5.5 Análise estatística

Os dados dos ensaios de bioatividade foram analisados inicialmente por meio do teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade de distribuição dos dados. Como os ensaios de toxicidade de contato direta e indireta, mortalidade e crescimento da população de *Sitophilus zeamais*) não apresentaram distribuição normal, foi aplicado análises não-paramétricas, sendo eles, o teste de Kruskal-Wallis e de Dunn ao nível de 1% de significância utilizando o software estatístico R e os resultados foram expressos em medianas.

Os dados de danos nos grãos e teor de água dos grãos apresentaram distribuição normal, sendo submetidos à análise de variância utilizando-se o software estatístico SISVAR. Para o teste de repelência, os dados foram transformados por $\sqrt{(x+1)}$ e submetidos a uma análise de variância em seguida. Quando foram identificadas diferenças significativas ao nível de 5% de significância pelo teste F, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. No caso dos dados de danos nos grãos e teor de água dos grãos também foi utilizada a análise de variância, e quando as diferenças foram significativas ao nível de 5% pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

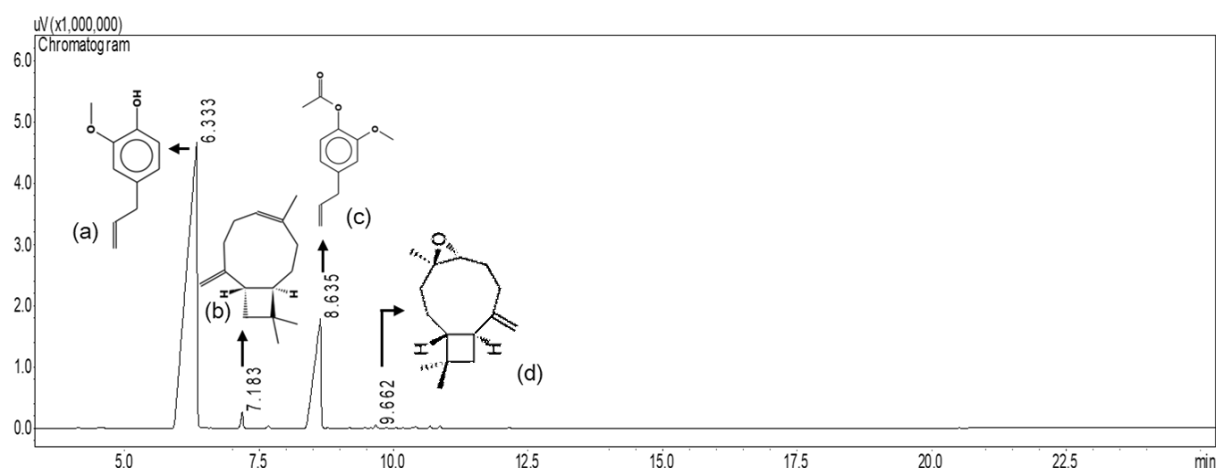
4.1 Obtenção e caracterização do óleo essencial de cravo-da-índia

A extração do OC dos botões florais secos da *Syzygium aromaticum* foi realizada por hidrodestilação com o adaptador de Clevenger por um período de 300 min, obtendo um rendimento de 10,3% (m/m) de OC. Esse baixo rendimento já era esperado, uma vez que é reportado na literatura valores entre 1-17% (m/m) para um período de extração entre 98 e 240 min utilizando a mesma técnica de extração (ALIMI et al., 2023; KATEKAR; RAO; SARDESHPANDE, 2023; RADÜNZ, 2019; TUNÇ; KOCA, 2019).

A variação no rendimento relatada na literatura está relacionada ao tamanho das partículas dos botões florais de cravo-da-índia utilizadas na extração uma vez que o rendimento tende a aumentar com a redução do tamanho das partículas. Isso ocorre devido à maior quantidade de óleo liberada à medida que as células dos botões são rompidas durante a moagem, um processo que não foi realizado neste estudo. Entretanto, quando são utilizados botões florais secos inteiros na extração, é possível obter um teor maior de eugenol (GUAN et al., 2007).

A partir do cromatograma (CG-DIC) (Figura 4) é possível visualizar quatro picos, sendo que os dois mais intensos são atribuídos ao eugenol (pico a) e acetato de eugenila (pico c).

Figura 4- Cromatograma (CG-DIC) dos componentes químicos presentes no óleo essencial do cravo-da-índia extraído da *S. aromaticum*: eugenol (a), β -cariofileno (b), acetato de eugenila (c), óxido de β -cariofileno (d)



O acetato de eugenila (pico c) é um éster aromático derivado do eugenol, sendo

o eugenol (4-alil-2-metoxifenol) (pico a) um composto fenólico que pertence à classe dos fenilpropanóides. Já o β -cariofileno (pico b) é um composto sesquiterpênico bicíclico (SANTOLIN, 2019; GENGATHARAN; RAHIM, 2023), que naturalmente é encontrado em conjunto com seu isômero de anel aberto, o α -humuleno e com seu produto de oxidação, o óxido de β -cariofileno (pico d) (Figura 4) (PRADI, 2021). Esses compostos orgânicos são os principais responsáveis por proporcionar as propriedades biológicas, tais como efeito repelente e inseticida (SINGH; PULIKKAL, 2022; JINDAL; KUMAR, 2022).

Os compostos identificados por CG-EM na composição da amostra de OC foram confirmados por meio de comparações dos seus espectros de massas com aqueles presentes na base de dados fornecidos pelo equipamento (NIST 11) e foram apresentados conforme tabela 1 com seus respectivos tempos de retenção.

Tabela 1- Compostos químicos identificados no óleo essencial de cravo-da-índia

Composto	M.M (g/mol)	CG-DIC		CG-EM		UV-VIS
		T.R (min)	%Área	T.R (min)	%Área	Teor (%)
Eugenol	164	6,33	79,32	6,04	72,85	78,60
β -cariofileno	204	7,18	0,92	7,19	1,14	-
α -humuleno	204	-	-	7,81	0,14	-
Acetato de eugenila	206	8,63	19,57	9,02	25,70	-
Óxido de β -cariofileno	220	9,66	0,17	10,29	0,17	-

T.R-Tempo de retenção; M.M- Massa molar; CG-DIC- Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama; CG-EM- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

O eugenol presente no OC também foi quantificado por espectroscopia eletrônica UV-Vis ($\lambda = 280$ nm). A partir da curva de calibração do padrão eugenol ($y=0,017x+0,0265$) foi possível quantificar o eugenol (Eug) na amostra, obtendo uma concentração de 5.700 ug/mL. Essa concentração de Eug corresponde a um teor de 78,6% (v/v) do OC. Este resultado está bem próximo ao resultado obtido na análise no CG-DIC, a qual foi determinado a partir da área do pico do eugenol no cromatograma (Tabela 1).

Radünz (2019) utilizou a mesma técnica de hidrodestilação para extrair o OC e identificou três compostos terpênicos: eugenol (56,06%), cariofileno (39,63%) e α -cariofileno (4,31%). Outro grupo de pesquisa identificou sete componentes, que juntos compreendem 100% do OC, sendo eles: eugenol (97,66%); acetileugenol (0,97%); cariofileno (0,69%); isoeugenol (0,32%); óxido de cariofileno (0,13%); timol (0,11%); e

α -humuleno (0,09%) (ALIMI et al., 2023). Em outros estudos, os componentes químicos foram relatados com diferentes concentrações: eugenol (52,53%), cariofileno (37,25%), humuleno (4,11%), acetato de eugenila (4,05%) e copaeno (2,05%) (ASCENÇÃO; FILHO, 2013; GOMES et al., 2018).

A variação significativa na concentração dos compostos químicos identificados neste estudo (Tabela 1) em comparação com os valores encontrados na literatura pode estar relacionada a mudanças sazonais (CAMPELO et al., 2021). O teor de Eug pode variar de acordo com a fase de colheita: durante a fase de brotação inicial, o teor é de 72%, aumentando para 82% durante a fase de frutificação plena (GENGATHARAN; RAHIM, 2023). Outro fator a ser considerado é a escolha da coluna utilizada na análise por CG-EM, que pode influenciar os resultados da separação dos constituintes presentes no OC (ALIMI et al., 2023).

4.2 Síntese e caracterização morfológica das NPZ

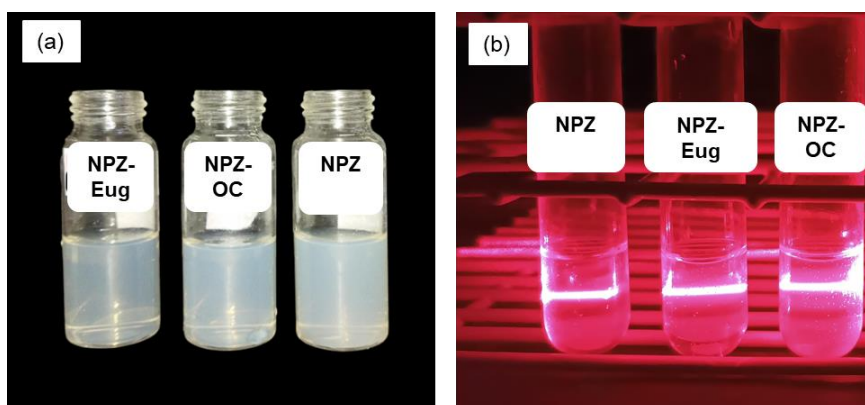
Os sistemas nanoparticulados foram reproduzido por meio do método de nanoprecipitação previamente desenvolvido e caracterizado pelo nosso grupo de pesquisa (VELOZ et al., 2024). Por meio do método da nanoprecipitação, as NPZ são formadas durante um rápido processo de difusão do etanol (fase orgânica) na fase aquosa. Esse processo leva a um aumento da polaridade do ambiente em torno da zeína, uma proteína rica em aminoácidos hidrofóbicos. Com a alteração na polaridade, ocorre a agregação espontânea das moléculas de zeína, resultando na formação das nanopartículas (YAN et al., 2022). Essas partículas são consideradas dispersões coloidais com tamanho na faixa de 1 a 1000 nm e capazes de carregar princípios ativos por meio de sua matriz polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; SILVA, 2018).

A formação das NPZ é facilmente confirmada por meio da alteração de tonalidade da solução, mudando de translúcida para uma cor opalescente com reflexo azulado e aspecto leitoso, característico de suspensões coloidais (Figura 5a) conforme descrito na literatura (LIANG et al., 2014; DURANGO, 2017; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; VELOZ et al., 2023; ZHANG et al., 2007).

Uma técnica, bastante simples para identificar a formação de um sistema coloidal é fazer uso do efeito Tyndall, o qual consiste em projetar um feixe de laser sobre a amostra e observar o trajetória do feixe luminoso evidenciado pela refração da luz o que permiti distinguir uma suspensão coloidal de uma solução ideal (LIMA,

2014; XAVIER, 2019). Sendo assim, na Figura 5b podemos confirmar qualitativamente que as amostras aqui obtidas apresentaram natureza nanoparticulada.

Figura 5 - Sistemas nanoparticulados: (a) Amostras recém preparadas; (b) Efeito Tyndall nas nanoparticulas



NPZ-Eug- Nanoparticulas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanoparticulas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia; NPZ- nanoparticulas de zeína.

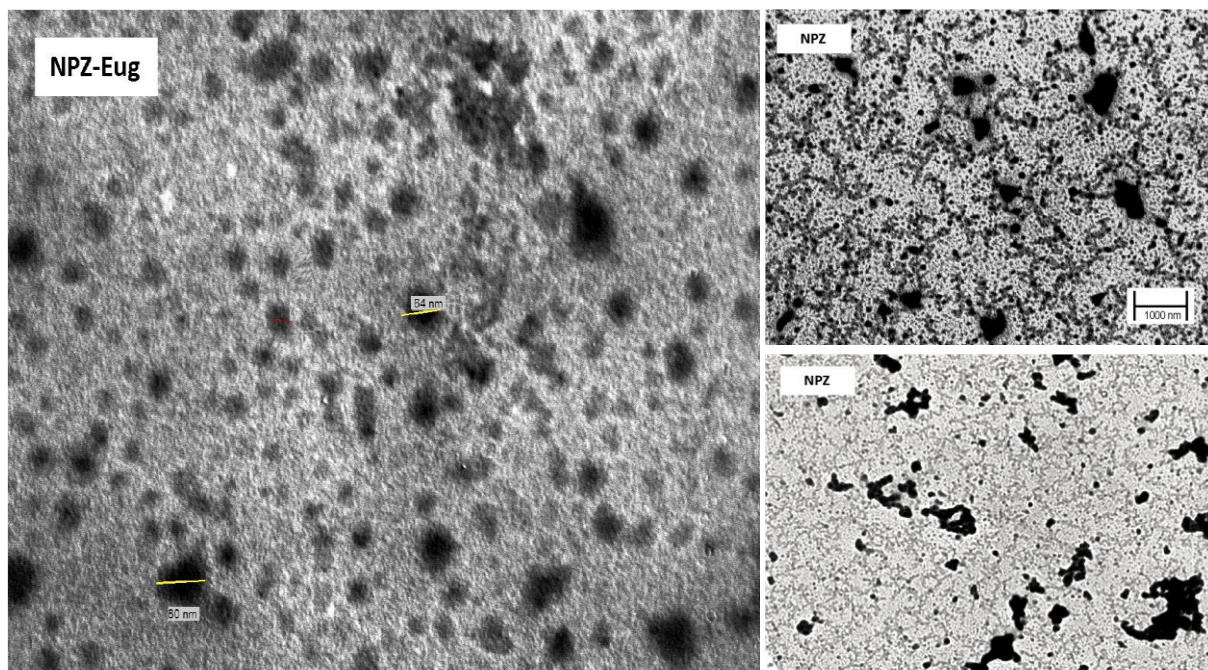
Até o presente momento, a caracterização morfológica desses sistemas não havia sido reportada. Diante disso, a realização deste estudo tornou-se essencial para preencher essa lacuna e fornecer uma análise morfológica das nanopartículas, contribuindo assim para um melhor entendimento de suas propriedades e aplicações.

A caracterização do sistema nanoparticulado é um procedimento necessário, pois garante que o material seja produzido conforme desejado. Dentre as técnicas instrumentais tradicionais como Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), podemos destacar também o Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Espalhamento Eletroforético de Luz (ELS) (SHARMA et al., 2022).

O MET é uma das técnicas mais empregadas na caracterização de nanopartículas, proporcionando informações visuais sobre a morfologia das partículas, arranjo dos sistemas particulados, tamanho e dispersão (FREITAS, 2016; SHARMA et al., 2020).

O MET foi empregado para analisar a morfologia, tamanho e dispersão das NPZ, NPZ-Eug e NPZ-OC. As NPs apresentaram formato esférico irregular com diâmetro inferior a 100 nm (Figura 6) e com alguns pontos de aglomeração das NPs. Vale ressaltar que nanopartículas esféricas tendem a oferecer um caminho de difusão mais longo, o que pode favorecer a liberação controlada do princípio ativo incorporado (MUKURUMBIRA, 2024).

Figura 6- Imagem TEM das nanopartículas de zeína (NPZ) e nanopartículas de zeína incorporadas com eugenol (NPZ-Eug)



MET- Microscopia eletrônica de transmissão.

O diâmetro médio das nanopartículas obtido neste estudo está em conformidade com os valores reportados na literatura (CHEN; ZHONG, 2014; HERDIANA, 2022; KASAAI, 2018; LIU et al., 2020; YAO et al., 2024), reforçando a consistência dos resultados. Entretanto, o tamanho das partículas observadas nessas imagens de microscopia foi consideravelmente menor se comparado com o diâmetro médio de 284 nm obtidos pela técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), dados reportados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (VELOZ et al., 2024). Essa divergência nos resultados ocorre porque, na técnica de DLS o tamanho das NPs determinado corresponde ao diâmetro hidrodinâmico das NPs. Já nas imagens de microscopia, as NPs passam por um processo de desidratação prévio, o que resulta na redução de seu tamanho (CHEN; ZHONG, 2014; WANG et al., 2023; YAO et al, 2024; ZHONG; JIN, 2009).

4.3 Estabilidade coloidal das nanopartículas

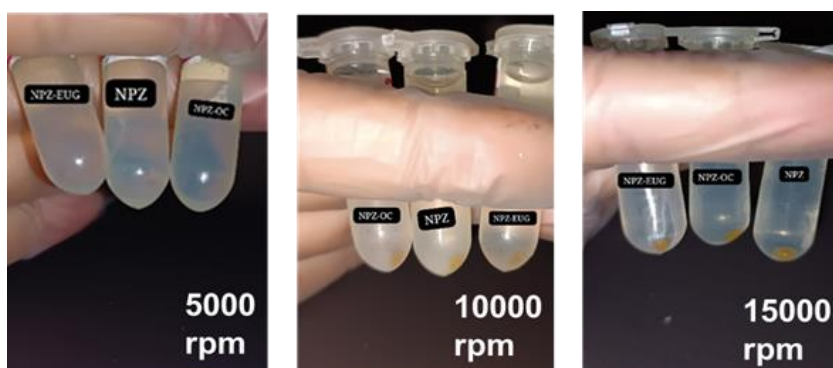
Para aplicações comerciais, é importante que as formulações produzidas mantenham sua estabilidade ao longo de toda a vida útil do produto. Por isso, é fundamental avaliar a sua estabilidade a longo prazo sob condições ambientais simuladas (BA et al., 2020). Dessa forma, os sistemas nanoparticulados aqui

produzidos (NPZ-OC, NPZ - Eug e NPZ) foram submetidos a diferentes condições e fatores ambientais simuladas por meio de testes de estabilidade explanatória, acelerada e normal. As nanoformulações que não apresentaram sinais de instabilidade nesses testes foram consideradas estáveis do ponto de vista termodinâmico (SHARMA et al., 2020). Vale ressaltar que não foi possível estimar um prazo de validade para os sistemas nanoparticulados, pois as análises foram realizadas somente por um período de 42 dias e não até o surgimento de coalescência ou quebra da suspensão coloidal.

4.3.1 Estabilidade explanatória

Após a centrifugação, dispersões de nanopartículas podem apresentar fenômenos instáveis, como sedimentação, floculação ou emulsificação (ZHANG et al., 2023). Isso ocorre porque a centrifugação simula o aumento da força gravitacional, o que, por sua vez, eleva a mobilidade das nanopartículas e acelera possíveis instabilidades (ANVISA, 2004). Dessa forma, este estudo permite avaliar a velocidade mínima de centrifugação necessária para que ocorra a sedimentação de partículas. Após a centrifugação, os sistemas nanoparticulados apresentaram sedimentação com coloração alaranjada (Figura 7) apenas com as velocidades de 10.000 rpm e 15.000 rpm ao serem centrifugadas durante 90 min. O material sedimentado pode estar associado a partículas de maior diâmetro, que são mais suscetíveis às forças centrípetas.

Figura 7- Sedimentação da zeína nas nanopartículas após 90 min de centrifugação

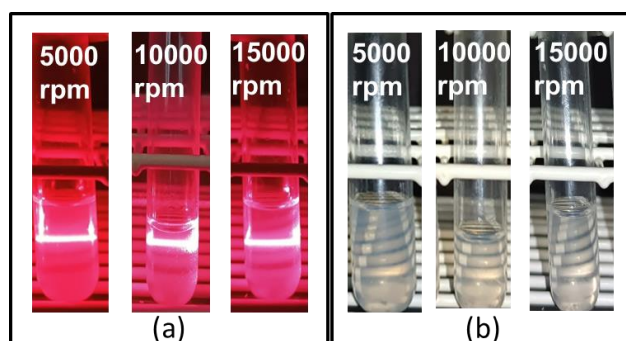


NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia; NPZ- nanopartículas de zeína.

No entanto, mesmo com a sedimentação em 10.000 e 15.000 rpm, as suspensões mantiveram-se com o mesmo cheiro e cor opalescente, porém com um

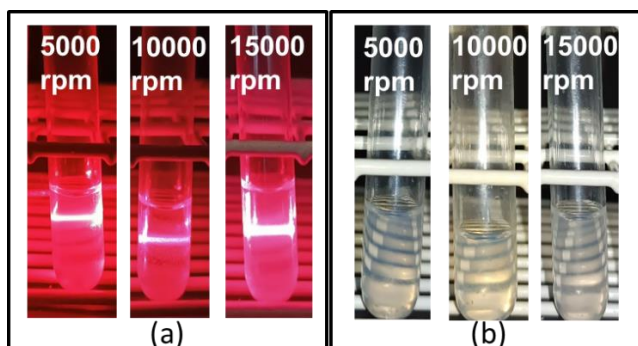
aspecto visual mais límpido se comparadas às amostras antes de serem centrifugadas. Além disso, não houve coalescência da suspensão coloidal em nenhuma das três velocidades estudadas e o efeito Tyndal confirmou a existência de um material nanoparticulado em suspensão para as três amostras (5.000, 10.000 e 15.000 rpm) (Figuras 8, 9 e 10) (PENG et al., 2023). Assim, podemos confirmar que os sistemas nanoparticulados estudados mantiveram sua integridade sem apresentar sedimentação em velocidades de até 5.000 rpm. Contudo, em velocidades acima de 10.000 rpm, observou-se a sedimentação de partículas maiores, enquanto as partículas menores continuaram dispersas, preservando a integridade do sistema coloidal.

Figura 8 - Amostras de NPZ centrifugadas durante 90 min: (a) suspensão na presença do laser para evidenciar o efeito Tyndal; (b) suspensão sem laser



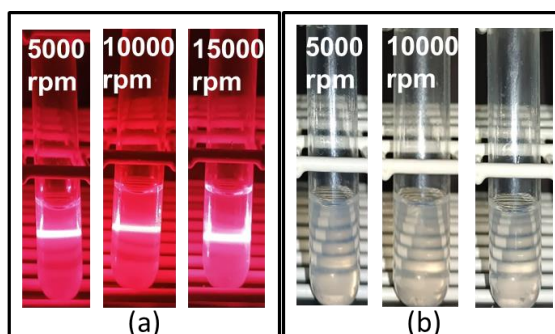
NPZ- nanoparticulas de zeína.

Figura 9 - Amostras de NPZ-Eug centrifugadas durante 90 min: (a) suspensão na presença de laser para evidenciar o efeito Tyndal; (b) suspensão sem laser



NPZ-Eug- Nanoparticulas de zeína incorporadas em eugenol.

Figura 10 - Amostras de NPZ-OC centrifugadas durante 90 min: (a) suspensão na presença de laser para evidenciar o efeito Tyndal; (b) suspensão sem laser



NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia.

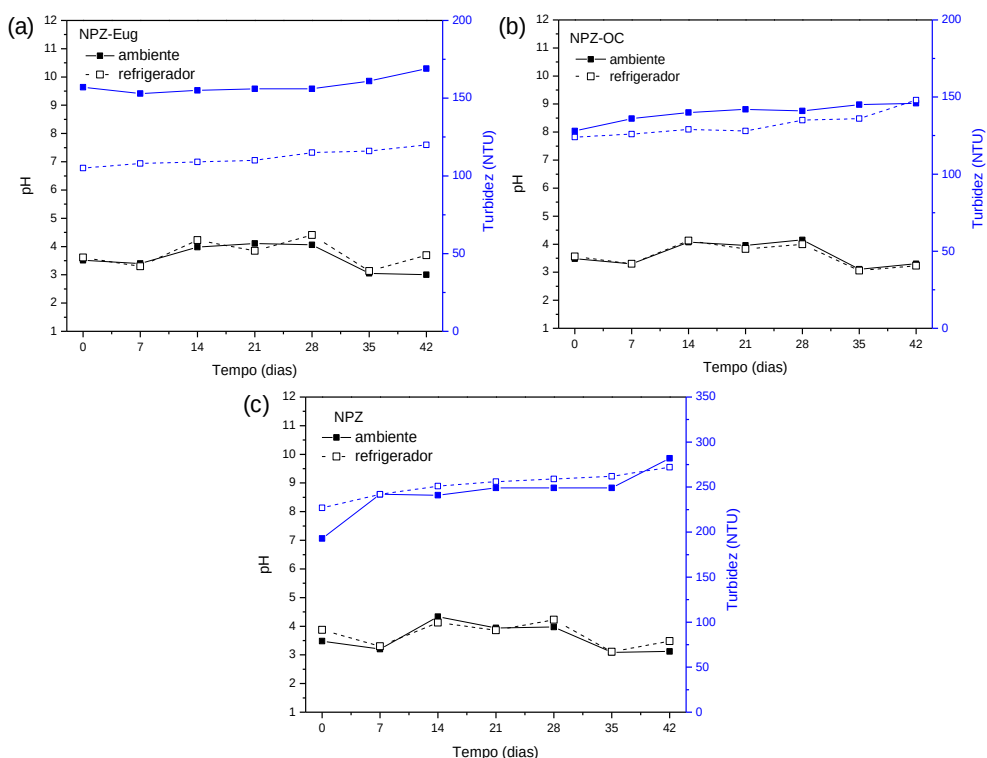
4.3.2 Estabilidade Normal

Este estudo permitiu avaliar a estabilidade da suspensão coloidal tanto em temperatura ambiente (25 °C) quanto refrigerada (10 °C) por um período de 42 dias, analisando parâmetros como odor, turbidez e pH (AROUCHE, 2020). Durante o período de avaliação, os sistemas nanoparticulados mantiveram-se estáveis, sem alteração de odor, formação de precipitados ou separação de fases visíveis. Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores, como o de nanopartículas de zeína-trealolípídeo encapsuladas com carvacrol, que se mantiveram estáveis por 21 dias em temperaturas de 4 a 25°C (ZHANG et al., 2023) e o estudo realizado por nosso grupo de pesquisa com esses mesmo sistemas nanoparticulados (VELOZ et al., 2024). Esses dados reforçam a robustez dos sistemas nanoparticulados frente a variações de armazenamento.

Além de observar algum tipo de mudança no odor e a formação de precipitados, foi realizado o monitoramento do pH e turbidez ao longo do período de armazenamento (42 dias). O monitoramento do pH é um parâmetro físico-químico importante para avaliar a estabilidade de sistemas coloidais, pois variações nesse parâmetro podem sinalizar fenômenos que comprometem a qualidade do produto final. Além disso, alterações no pH podem estar associadas à liberação de ativos encapsulados nas nanopartículas, indicando também a desestabilização da formulação (SILVA, 2019). Por sua vez, a turbidez reflete o grau de agregação das macromoléculas na suspensão, ou seja, quanto mais turvo maior o estado de agregação das partículas no sistema (PENG et al., 2023).

Nos sistemas estudados, observou-se um pequeno aumento no pH, de 3,4 para 4,3, nos primeiros 14 dias (Figura 11). Entre os dias 14 e 28, os sistemas contendo NPZ-OC e NPZ-Eug (em ambos os tipos de armazenamento) permaneceram com o pH praticamente estável. Após o 28º dia, verificou-se uma pequena diminuição do pH, de 4,4 para 3,3, nos amostras de NPZ-OC e NPZ-Eug (Figura 11a e 11b). Já para as NPZ (em ambos os tipos de armazenamento), essa diminuição foi observada a partir do 14º dia (Figura 11c). No entanto, de maneira geral, o pH dos sistemas estudados apresentou-se estável, com variações mínimas, ao longo dos 42 dias de armazenamento, independentemente da temperatura.

Figura 11 - Avaliação do pH e turbidez das nanopartículas ao longo de 42 dias em testes de estabilidade normal: (a) NPZ- Eug; (b) NPZ-OC; (c) NPZ



NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia; NPZ- nanopartículas de zeína.

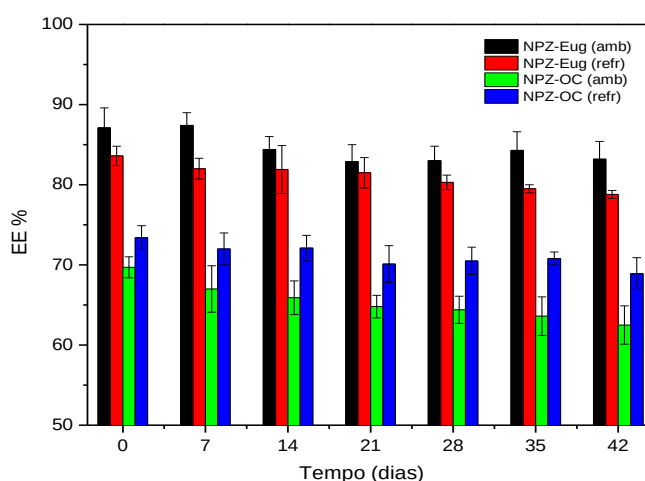
Nos sistemas contendo NPZ-OC e NPZ-Eug, armazenados tanto a 10 °C no refrigerador quanto em temperatura ambiente, observou-se um leve aumento da turbidez durante o monitoramento, o que foi considerado aceitável e não indicou instabilidade das nanopartículas (Figuras 11a e 11b). Em contraste, nos sistemas contendo NPZ (em ambos os tipos de armazenamento), houve um aumento significativo da turbidez (Figura 11c), sugerindo uma tendência à instabilidade, uma vez que a turbidez foi maior do que nos sistemas NPZ-Eug e NPZ-OC. Assim,

podemos concluir que as NPZ tendem a se tornarem instáveis mais rapidamente do que as NPZ- EUG e NPZ- OC, resultado já reportado na literatura (LUIS et al., 2020; VELOZ et al., 2024), pois, as nanopartículas encapsuladas apresentam um maior número de interações entre a substância ativa, matriz polimérica e surfactante, o que pode resultar em partículas menores, distribuições mais homogêneas e um equilíbrio de cargas mais favorável à estabilidade (VELOZ, 2022). Vale ressaltar que para confirmar se houve um aumento das partículas a partir de sua agregação é necessário a realização de análises quantitativas do tamanho das partículas e polidispersão, as quais não foram realizadas nesse trabalho (SHARMA et al., 2020).

Ao analisar a eficiência de encapsulamento (EE%) observou-se que, no tempo zero, o sistema contendo NPZ-Eug armazenado em temperatura ambiente (amb) apresentou uma EE% maior (87%) se comparada a amostra armazenada em refrigerador (refr) (83%). Valores de %EE superiores a 70% são considerados eficientes para sistemas de encapsulamento de princípios ativos (SILVA, 2019). Após 42 dias de monitoramento, houve uma diminuição nos valores de %EE (Figura 12).

A EE% do Eug presente no OC no tempo zero foi de 69% para os sistemas contendo NPZ-OC armazenados em temperatura ambiente (amb) e 73% para aqueles armazenados no refrigerador (refr). Ao final da avaliação, ambos os sistemas apresentaram uma diminuição nas taxas de EE%, com NPZ-OC (amb) reduzido para 62% e NPZ-OC (refr) para 68% (Figura 12).

Figura 12 - Eficiência de encapsulamento (EE%) das nanopartículas armazenadas em temperatura ambiente (amb) a 25 °C e em refrigerador (refr) a 10 ° C



NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia.

Dessa forma, a EE% dos sistemas estudados diminuiu lentamente com o passar do tempo o que já era esperado, pois, o princípio ativo incorporado na matriz polimerica estava sendo liberado gradativamente. Resultado semelhante foi encontrado para nanopartículas de zeína encapsuladas com óleo de nim (PASCOLI et al., 2020) e com geraniol e *R* –citronelal (OLIVEIRA et al., 2018).

Altos índices de eficiência de encapsulamento de compostos botânicos e seus constituintes são fundamentais para a aplicações no campo, pois garantem que a maioria dos compostos esteja protegida pela matriz, prevenindo a degradação prematura (MONTEIRO et al., 2021). No presente estudo, as formulações NPZ-Eug (amb) e NPZ-Eug (refr) demonstraram alta eficiência de encapsulamento (acima de 70%) ao longo de 42 dias, sugerindo uma forte interação entre os compostos apolares do princípio ativo e a região hidrofóbica da zeína (VELOZ et al., 2024). Por outro lado, o sistema contendo NPZ-OC (refr) apresentou uma eficiência de encapsulamento inicial de 73%, porém ao final do período de monitoramento, essa taxa foi reduzida para 68%. Já o sistema contendo NPZ-OC (amb) apresentou desde o início uma taxa abaixo do considerado eficiente (69%).

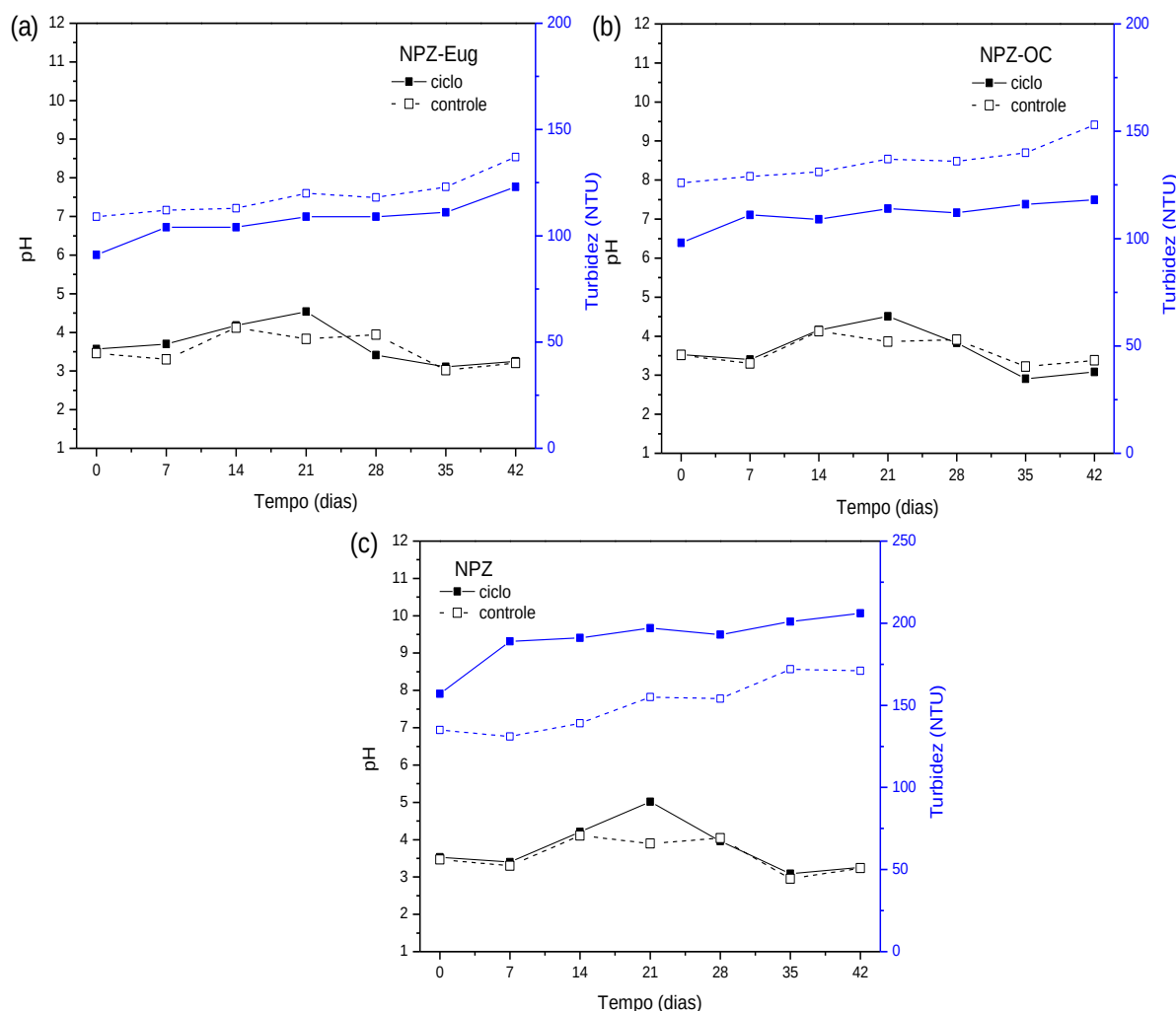
4.3.3 Estabilidade acelerada

Este estudo permitiu submeter as amostras de NPs a ciclos alternados de resfriamento e “aquecimento” por um período de 42 dias, avaliando a influência dessas condições extremas sobre a estabilidade coloidal. A estabilidade foi monitorada ao longo do tempo por meio de análises de odor, turbidez e pH (AROUCHE, 2020).

O estudo foi conduzido com dois conjuntos de cada sistema contendo NPZ, NPZ-OC e NPZ-Eug. Os sistemas armazenados no refrigerador a 10 °C foram designados como "controle", enquanto os sistemas submetidos a ciclos de variação de temperatura, alternando entre 10 °C e 25 °C a cada 24 horas, foram denominados "ciclo". É importante destacar que os sistemas nanoparticulados analisadas neste estudo não estavam em meio tamponado, o que pode proporcionar a ocorrência de variações no pH. Durante o período de avaliação (42 dias), as suspensões coloidais não apresentaram alterações perceptíveis de odor, formação de precipitados ou separação de fases visível. No entanto, foram observadas pequenas modificações nos parâmetros físico-químicos (pH e turbidez).

Ao longo do período de monitoramento, as amostras controles (NPZ-Eug, NPZ-OC e NPZ) e as amostras submetidas aos ciclos alternados de temperatura (NPZ-Eug e NPZ-OC) não apresentaram variações significativas de pH, mantendo-se na faixa de 3,0 a 4,5 (Figura 13), sendo assim considerados estáveis.

Figura 13 - Avaliação do pH e turbidez das nanopartículas ao longo de 42 dias em testes de estabilidade acelerada: (a) NPZ- Eug; (b) NPZ-OC; (c) NPZ



NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia; NPZ- nanopartículas de zeína.

É importante destacar que o pH da amostra que foi submetida a ciclos alternados de temperatura (NPZ) apresentou um aumento de 3,5 para 5,0 (Figura 13c) em 21 dias, indicando instabilidade no sistema, uma vez que se aproximou do ponto isoelétrico da zeína (pH 6,2). Sabe-se que nanopartículas à base de zeína tendem a perder sua estabilidade em pHs entre 5-7, faixa próxima ao ponto isoelétrico da zeína (SILVA, 2019; YUAN et al., 2022). Esse fenômeno pode estar relacionado à degradação da matriz polimérica, que ocorre devido modificações na estrutura

química, como o relaxamento da cadeia polimérica, a quebra das unidades monoméricas e a cisão aleatória de ligações ao longo da cadeia (SILVA, 2019).

Ao avaliar a turbidez dos sistemas nanoparticulados, foi possível identificar que os controles e as amostras submetidas aos ciclos alternados de temperatura (NPZ-OC e NPZ-Eug) (Figura 13a e 13b) apresentaram um comportamento similar com um leve aumento da turbidez demonstrando que ao longo do tempo, as nanopartículas foram se agregando lentamente mas que isso não interferiu em sua estabilidade durante 42 dias, resultado esse que corrobora com a seção 4.3.2, pois sistemas nanoparticulados com partículas pequenas e bem distribuídas possuem boa estabilidade (SHARMA et al., 2020). Em contrapartida, o sistema contendo NPZ (controle) apresentou um aumento significativo da turbidez a partir do sétimo dia e o sistema com NPZ (ciclo) exibiu esse comportamento antes desse período, indicando sinais de instabilidade (Figura 13c).

Ao avaliar os modos de armazenamento nos testes de estabilidade acelerada (seção 4.3.3) e estabilidade normal (seção 4.3.2), verificou-se que as nanopartículas apresentam maior estabilidade quando armazenadas a 10 °C. Além disso, foi possível confirmar que as NPZ-Eug e NPZ-OC tendem a ser mais estáveis do que a NPZ. Essa estabilidade foi atribuída a um maior número de interações entre a substância ativa, a matriz polimérica e o surfactante, resultando em partículas menores, distribuições mais homogêneas e um equilíbrio de cargas mais favorável à estabilidade (VELOZ, 2022).

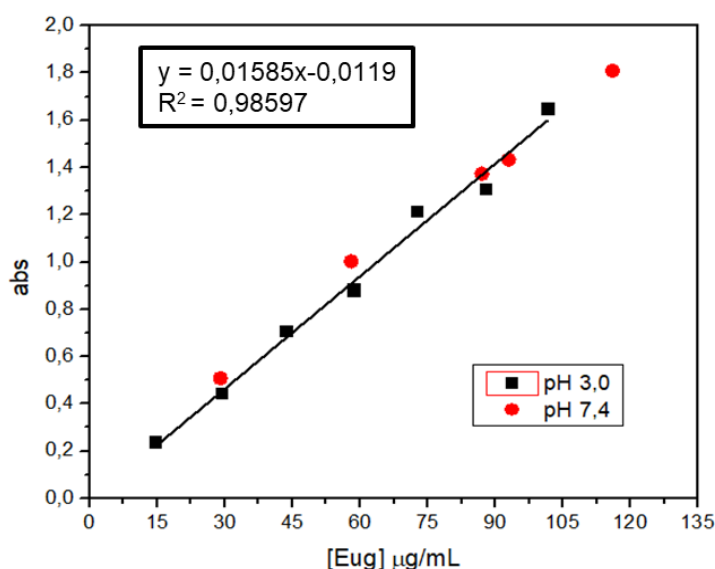
4. 4 Estudo de liberação

Sistemas nanoparticulados podem ser utilizados para promover a liberação de substâncias ativas de forma controlada ou sustentada permitindo uma entrega mais eficiente do princípio ativo nos locais específicos de ação. Diferentes fatores podem influenciar na liberação controlada do princípio ativo a partir das NPs, como a degradação da matriz da polimérica, afinidade entre o ativo e o polímero escolhido, condições do ensaio de liberação e o método de preparação das NPs (FREITAS, 2015). Esses fatores são cruciais para garantir a estabilidade e eficácia do sistema de liberação ao longo do tempo.

Para avaliar a liberação do eugenol pela matriz polimérica (zeína), foi necessário preparar, previamente, uma curva de padronização externa para fazer a

quantificação do eugenol liberado das amostras de NPZ-Eug e NPZ-OC. A curva de padronização (Figura 14) foi preparada para determinar a concentração total do ativo incorporado a matriz polimérica e também para avaliar o perfil cinético de liberação do eugenol com o passar do tempo.

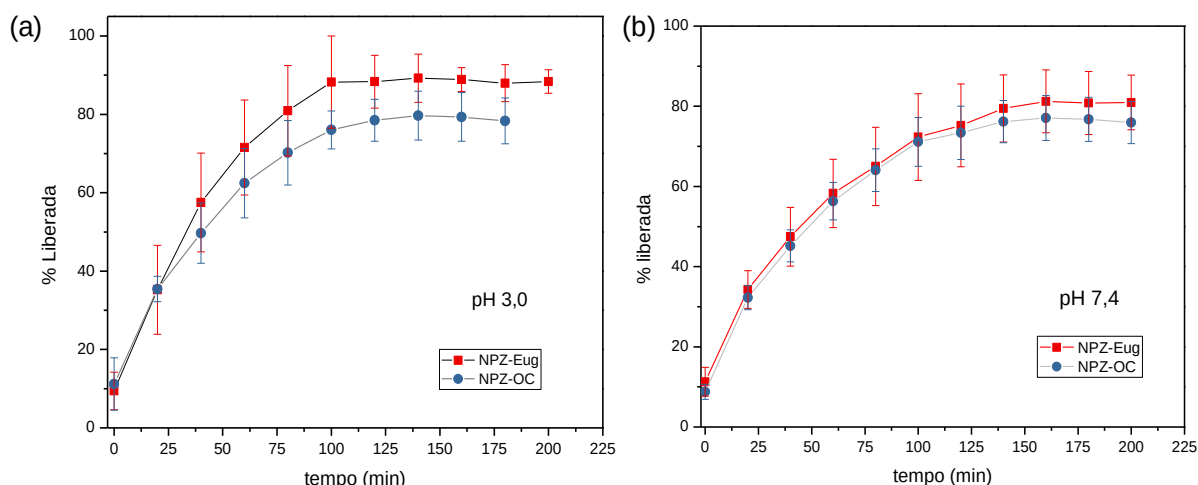
Figura 14 - Curva de padronização do eugenol (Eug) em pH 3,0 comparadas a amostras de eugenol preparadas em pH 7,4



Na Figura 14 é apresentada a equação da reta da curva de padronização do Eug preparado em pH 3,0. Além disso, foram incluídas algumas amostras de eugenol preparadas em diferentes concentrações em pH 7,4 no mesmo gráfico. Considerando que os pontos de pH 7,4 estão próximos à reta dos pontos de pH 3,0, podemos utilizar uma única equação da reta para quantificar o Eug nas amostras de NPZ-Eug e NPZ-OC sob ambas as condições de tamponadas. A linearidade da curva de padronização pôde ser confirmada através do coeficiente de determinação ($R^2 > 0,98$) (RAPOSO, 2016).

A concentração total do Eug das amostras de NPZ-Eug e NPZ-OC, assim como a quantidade de Eug liberada em função do tempo, foi determinada utilizando a curva de padronização apresentada acima ($y = 0,01585x - 0,0119$) e os dados foram expressos em % de liberação, conforme apresentado na curva cinética de liberação (Figura 15).

Figura 15 - Perfil de Liberação para as NPZ-Eug e NPZ-OC: (a) em tampão PBC pH 3,0; (b) em tampão PBC pH 7,4



NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia.

A liberação do princípio ativo presente nas NPZ-Eug e NPZ-OC foram analisadas em tampão PBC (pH=3,0 e 7,4) sob agitação contínua (400 rpm) e determinados a partir da curva de padronização. No período de 80 min, foi possível observar um aumento significativo da concentração do Eug presente nas NPZ-Eug e NPZ-OC no sistema de liberação *in vitro*. Entre 100 a 200 min o Eug presente nas NPs manteve-se com uma concentração contínua, ou seja, com pouca variação na % liberada. A maior taxa de liberação no sistema com pH 3,0 ocorreu em 140 min com ~89% em NPZ-Eug e ~79% em NPZ-OC (Figura 15a). Para o sistema com pH 7,4 a maior taxa de liberação foi obtida em 160 min com ~81% e 180 min com ~76% para NPZ-Eug e NPZ-OC, respectivamente (Figura 15b).

Diferente resultado foi encontrado na literatura para o extrato vegetal de *Mimosa pudica* incorporado em nanopartículas compostas de zeína e pectina, a qual foram submetidas a testes de liberação *in vitro* com diferentes pHs resultando em uma liberação prolongada em um período de 25 horas (THANKAPPAN et al., 2020). Esses resultados indicam que as NPs formadas por dois polímeros podem promover uma liberação prolongada, ou seja, em um período de tempo maior do que em nanopartículas constituídas por uma única matriz polimérica (YAN et al., 2022).

Os nanocarreadores podem liberar substâncias incorporadas em respostas a estímulos ambientais (pH, luz, temperatura) (SCOTT-FORDSMAND; FRACETO; AMORIM, 2022). Os nanocarreadores que respondem a alterações do pH no meio

circundante funcionam com base na presença de grupos funcionais ionizáveis na estrutura do carreador, como pirimidinas, carboxilatos, aminas, fosfatos e sulfonatos. Dependendo do pKa do carreador ou da molécula química, esses grupos funcionais adquirem cargas positivas ou negativas em determinados valores de pH, promovendo interações eletrostáticas que afetam o comportamento do sistema (CAMARA et al., 2019).

As matrizes poliméricas que apresentam esse mecanismo possuem em sua estrutura grupos ácidos ($^{-}\text{COOH}$) e básicos ($^{-}\text{NH}_2$), que incham em pH básico e ácido, respectivamente. Em resposta a mudanças no pH do meio circundante, o tamanho dos carreadores pode ser alterado devido ao inchaço ou encolhimento das macromoléculas (CAMARA et al., 2019).

A zeína, matriz polimérica utilizada na produção das nanopartículas (NPs), pode liberar o princípio ativo em resposta ao pH. Isso ocorre por ser uma prolamina anfifílica, rica em aminoácidos apolares com grupos doadores e receptores de elétrons, especialmente triptofano, prolina, fenilalanina e leucina (LIU et al., 2024).

A zeína consiste predominantemente em α -zeína, que tem um ponto isoelétrico de pI 6,2 (BOUMAN et al., 2016). Portanto, para as amostras de NPZ preparadas em meio ácido (pH 3,0) os grupos amino e carboxila na zeína estão protonados nessas condições, levando a uma carga de superfície positiva. Em contrapartida, esses mesmos grupos estão desprotonados sob condições neutras (pH 7,4), levando a uma carga de superfície negativa (MARIANO et al., 2024). A protonação ou desprotonação da zeína não interferiram no perfil cinético de liberação do Eug, pois, o Eug foi liberado em até 200 min de forma imediata e uniforme independente das condições do sistema (pH 3,0 e pH 7,4) (CAMARA et al., 2019).

Os dados obtidos a partir da curva de liberação do eugenol foram ajustados com diferentes modelos matemáticos de liberação: Ordem zero; Primeira ordem; Hixson-Crowell; Higuchi; Korsmeyer–Peppas; Weibull, respectivamente, representados no Tabela 2 junto com os parâmetros cinéticos obtidos e coeficiente de determinação das equações (R^2). Quanto mais próximo o valor de 1,0 (R^2) melhor é o ajuste dos dados experimentais com a equação matemática (WU et al., 2024). Apesar do modelo cinético de primeira ordem e Korsmeyer–Peppas apresentarem valores de $R^2 > 0,90$, o modelo matemático que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o da equação de Weibull ($R^2 > 0,97$).

Tabela 2 - Parâmetros de modelos matemáticos conforme ajuste do dados experimentais

Equações / Parâmetros		NPZ-Eug (pH 3,0)	NPZ-Eug (pH 7,4)	NPZ-OC (pH 3,0)	NPZ-OC (pH 7,4)
1	R ²	0,66	0,80	0,75	0,75
	K	0,33 ± 0,07	0,31 ± 0,05	0,33 ± 0,06	0,30 ± 0,05
2	R ²	0,93	0,96	0,94	0,95
	K	0,0143 ± 0,0011	0,0103 ± 0,0006	0,0111 ± 0,0008	0,0093 ± 0,0007
3	R ²	0,96	0,98	0,98	0,84
	K	0,0034 ± 0,0003	0,0027 ± 0,0002	0,0029 ± 0,0003	0,0017 ± 0,0002
4	R ²	0,82	0,90	0,86	0,89
	K	0,075 ± 0,003	0,066 ± 0,002	0,069 ± 0,003	0,063 ± 0,002
5	R ²	0,91	0,95	0,93	0,95
	K	0,193 ± 0,052	0,138 ± 0,028	0,156 ± 0,04	0,138 ± 0,03
	n	0,30 ± 0,06	0,35 ± 0,04	0,33 ± 0,05	0,34 ± 0,05
6	R ²	0,97	0,99	0,98	0,98
	K	5,59 ± 3,22	3,11 ± 1,37	2,22 ± 1,76	1,58 ± 1,32
	α	14,61 ± 4,54	18,59 ± 3,86	14,83 ± 4,97	15,37 ± 4,10
	β	0,51 ± 0,13	0,67 ± 0,04	0,63 ± 0,07	0,61 ± 0,05

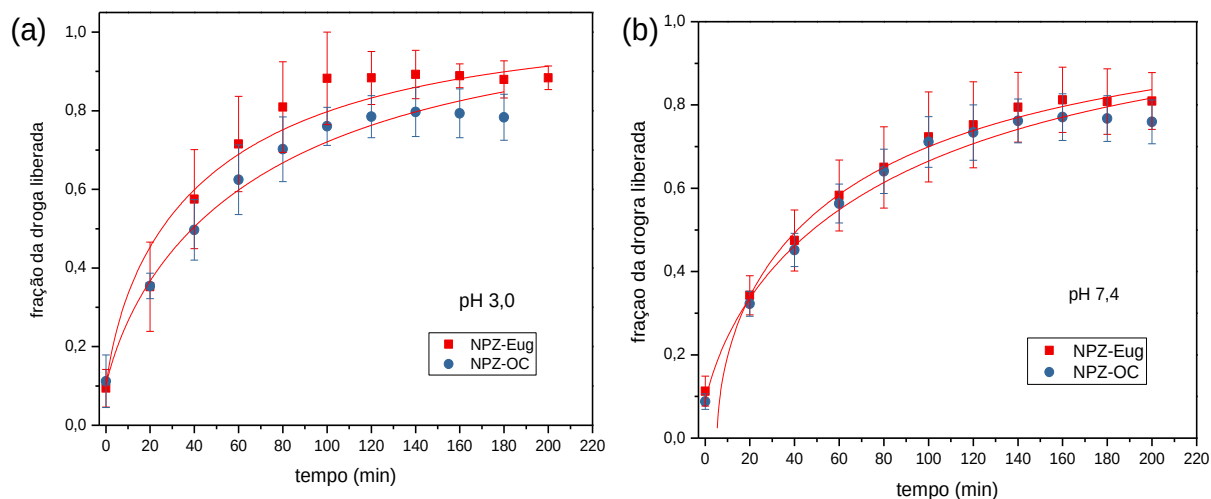
R²- coeficiente de determinação; α- representa a escala de tempo da liberação; k- constante cinética da liberação da amostra; β- descreve a forma da curva de liberação; n- expoente de liberação que caracteriza o mecanismo de liberação; NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia.

Neste modelo, o parâmetro α representa a escala de tempo da liberação, o parâmetro k é a constante cinética da liberação da amostra, o parâmetro β descreve a forma da curva de liberação: quando β = 1 (caso 1), a curva é uma exponencial; quando β > 1 (caso 2), a curva é uma sigmóide; quando β < 1 (caso 3), a curva é uma parábola, com uma inclinação inicial mais elevada e depois consistente com uma exponencial (COSTA; LOBO, 2001). Conforme o parâmetro β, esta curva de liberação descreve a trajetória dos pontos de forma parabólica, informando um aumento da fração do princípio ativo liberado em função do tempo até a fração liberada cair em função do tempo.

Esse comportamento da curva de liberação ocorre devido à difusão das camadas mais superficiais das nanopartículas, além de qualquer substância adsorvida na superfície externa. Após essa fase inicial, em que uma fração do princípio ativo é rapidamente liberada, a liberação passa a depender da difusão dos compostos ativos incorporados mais profundamente na zeína. Nesse estágio, a taxa de liberação tende a diminuir ao longo do tempo, pois os compostos localizados no núcleo das nanopartículas precisam percorrer distâncias maiores, o que aumenta o tempo

necessário para sua liberação (OLIVEIRA et al., 2019). É importante destacar que a diminuição da fração de liberação nos tempos finais do experimento não foi considerada na construção da curva cinética (Figura 16).

Figura 16 - Curva de liberação dos princípios ativos conforme Weibull (a) Sistema de diálise em tampão PBC pH 3,0; (b) Sistema de diálise em tampão PBC pH 7,4



NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia.

O modelo de Weibull tem sido aplicado para analisar dados de liberação em sistemas de ação imediata e prolongada (BARZEGAR-JALALI et al., 2008) e para explicar o processo de difusão do princípio ativo em diferentes carregadores (COSTA; LOBO, 2001), adequando-se ao perfil de liberação imediata apresentado neste estudo. Além disso, o mecanismo de liberação ocorrido em ambos os sistemas (pH 3,0 e pH 7,4) pode ser teorizada como uma difusão do Eug sob a matriz polimérica (zeína) permitindo que o ativo alcance o ambiente externo (OLIVEIRA et al., 2019).

4. 5 Ensaios de bioatividade

Os óleos essenciais possuem diversos mecanismos de ação, especialmente quando sua atividade é atribuída a uma mistura complexa de compostos. Esses compostos podem ser tóxicos ou repelentes aos organismos-alvo, resultando em alterações no desenvolvimento, como esterilidade, redução no crescimento e comportamento alterado (OLIVEIRA et al., 2014). Por este motivo, nesta seção foram avaliados o efeito inseticida, repelente e o desenvolvimento populacional de *Sitophilus*

zeamais em grãos de milho tratados com as amostras de OC, Eug, NPZ, NPZ-OC e NPZ-Eug.

4.5.1 Avaliação de toxicidade de contato direto e indireto

O efeito inseticida foi avaliado por meio de duas formas de aplicação: contato direto e contato indireto. Nas aplicações de contato direto, as amostras de tratamento e os controles (positivo e negativo) foram aplicados diretamente sobre os insetos. No contato indireto, as amostras foram aplicadas sobre a superfície onde os insetos seriam posteriormente adicionados (CARVALHO et al., 2017).

As avaliações de mortalidade foram realizadas em 24, 48 e 72 horas, utilizando cinco réplicas, cada uma contendo dez insetos adultos não-sexados. Após realizar os testes foi possível determinar que a dose administrada (0,018 mg/cm² ou 0,0164 uL/cm²) não apresentou efeito inseticida sobre os *sitophilus*, visto que os insetos permaneceram vivos durante todo o monitoramento. Essa hipótese foi validada por meio do teste de Kruskal Wallis e Dunn apresentadas na tabela 3.

Tabela 3- Mediana do número de indivíduos (*Sitophilus zeamais*) mortos após 24, 48 e 72 horas da aplicação direta e indireta de diferentes compostos químicos

Tratamentos e controles	Aplicação direta			Aplicação indireta		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
NPZ-Eug	0 a	1 a	1 a	1 a	1 a	1 a
NPZ-OC	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
NPZ	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
OC livre	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Eug livre	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
PVA+ETANOL	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Água	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Tratamentos e controles	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B	0 B
Inseticida	8 A	10 A	10 A	1 A	6 A	6 A

Medianas seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 1% de significância. Medianas seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ao nível de 1% de significância. NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia; NPZ- nanopartículas de zeína; OC – óleo essencial de cravo-da-índia; Eug- Eugenol.

Os tratamentos (NPZ-Eug, NPZ-OC, NPZ, OC e Eug) foram comparados com os controles negativos (água e PVA+Etanol) empregado o teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 1% de significância (Tabela 3). Esse método estatístico não-paramétrico foi escolhido para analisar as diferenças entre os grupos independentes em uma única

variável contínua, visto que o teste de Shapiro-Wilk indicou que os dados não seguiam uma distribuição normal (OSTERTAGOVA; OSTERTAG; KOVÁČ, 2014). Em seguida, os mesmos tratamentos e os controles negativos foram comparados com o inseticida padrão (deltametrina), utilizando o teste de Dunn, também ao nível de 1% de significância (Tabela 3).

A aplicação do teste de Kruskal-Wallis indicou que os princípios ativos, tanto na forma livre (OC e Eug) ou incorporados à zeína (NPZ-OC e NPZ-Eug) não apresentaram efeito tóxico na dose administrada ($0,018 \text{ mg/cm}^2$ ou $0,0164 \text{ uL/cm}^2$) uma vez que não houve diferença significativa em relação aos controles negativos (água e PVA+ ETANOL) no combate ao *Sitophilus zeamais* (Tabela 3). É importante ressaltar que não foi possível aumentar a dose ou a concentração inicial utilizada nos ensaios, pois o volume aplicado não poderia ser ampliado sem comprometer a troca gasosa dos insetos, já que poderia obstruir os espiráculos com excesso de líquido. Além disso, as NPs foram preparadas com a quantidade máxima de óleo de cravo ou eugenol, previamente estabelecido no procedimento de otimização das NPs (VELOZ et al., 2024).

Estudos anteriores demonstraram eficácia na toxicidade de contato contra *Sitophilus* utilizando o mesmo princípio ativo. Correa et al. (2015) relataram eficácia com uma dose superior a estudada aqui de OC ($2,1 \text{ uL/cm}^2$), enquanto Plata-Rueda et al. (2018) obtiveram sucesso com uma concentração de Eug ($5,7 \text{ uL/mL}$), bem maior que a concentração em que as NPs foram preparadas nesta pesquisa ($1,36 \text{ uL/mL}$). Utilizando a aplicação tópica, método diferente ao desenvolvido neste trabalho, pesquisadores observaram que com doses de Eug superiores a $47,6 \text{ ug/mg}$ por inseto apresentaram toxicidade contra o *Sitophilus zeamais* (HUANG et al., 2002).

Ao aplicar o teste de Dunn para comparar os tratamentos (NPZ-Eug, NPZ-OC, NPZ, OC e Eug) e controles negativos (PVA+Etanol e água) com o inseticida (controle positivo), foi observada uma diferença significativa, indicando que o inseticida matou mais insetos do que os tratamentos testados (Tabela 3). Essa análise reforça a eficácia do inseticida convencional em comparação aos tratamentos alternativos estudados, que não demonstraram toxicidade relevante nas condições testadas. Além disso, o controle positivo desempenhou um papel fundamental na validação do ensaio, assegurando que o método utilizado foi sensível o suficiente para detectar efeitos tóxicos quando presentes, o que reforça a confiabilidade dos resultados obtidos.

4.5.2 Avaliação do efeito repelente

O teste de repelência foi realizado para avaliar o efeito dos tratamentos (NPZ-Eug, NPZ-OC, NPZ, OC e Eug) sobre o comportamento do *Sitophilus zeamais* em intervalos de 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Neste ensaio, os insetos tiveram a possibilidade de migrar entre duas arenas, uma com grãos de milho tratados com NPZ-Eug, NPZ-OC, NPZ, OC, Eug (tratamentos) e a segunda com grãos de milho tratados com a água (controle negativo). Por meio desse experimento podemos determinar se os tratamentos possuem a capacidade de repelir os insetos, ou seja, se eles evitam ou demonstram preferência pelos grãos tratados com os tratamentos em comparação aos grãos tratados com o controle.

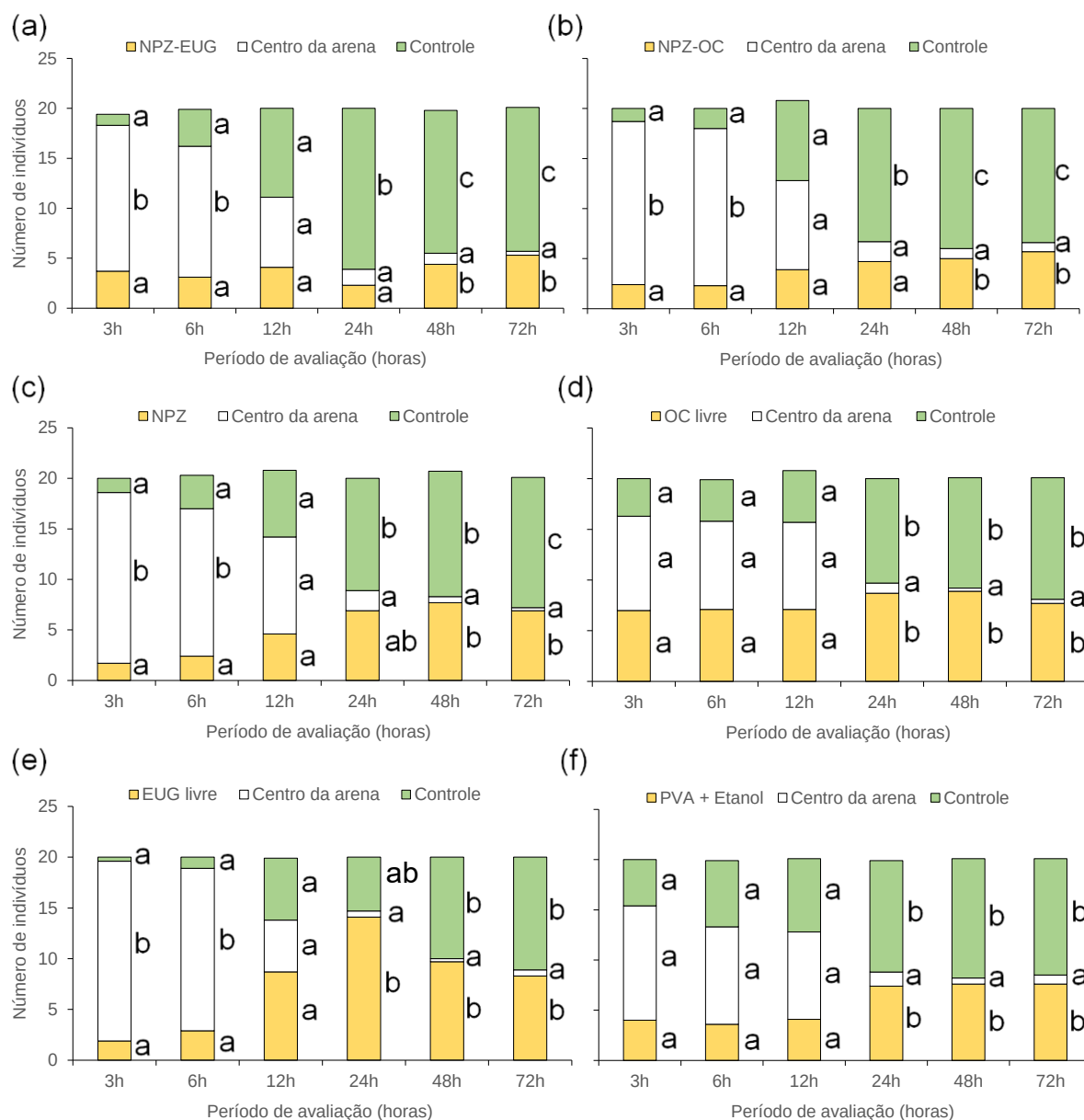
A repelência é uma característica crucial no controle de pragas em produtos armazenados, pois quanto maior o efeito repelente, menor será a infestação. Isso resulta na redução ou supressão da oviposição, levando a um menor número de insetos emergidos, o que, por sua vez, diminui os danos às sementes e preserva sua qualidade fisiológica (PORTOLAN, 2020).

De acordo com a figura 17, até as primeiras 6 horas, a maioria dos insetos permaneceu concentrada no centro da arena. A partir de 12 horas, os insetos começaram a se movimentar, porém, não houve diferenças significativas entre o controle e os tratamentos. No entanto, a partir de 24 horas, foi possível identificar uma diferença significativa entre o controle e os tratamentos, especialmente para NPZ-OC e NPZ-Eug, demonstrando que, conforme o tempo passava, os insetos tenderam a evitar as áreas tratadas, indicando o efeito repelente desses tratamentos. Vale ressaltar que os tratamentos que apresentaram diferenças estatísticas significativas (APÊNDICE A), foram utilizados para o teste de Tukey com um nível de 5% de significância, e os dados foram destransformados para apresentação dos resultados (Figura 17).

As amostras de OC e Eug livres não apresentaram efeito repelente na dose estudada (15 mg/kg ou 13,6 uL/kg.). Este comportamento pode estar relacionado com sua alta volatilidade (SINGH; PULIKKAL, 2022) pois o OC e Eug apresentam baixa estabilidade na presença de luz, calor, ar e umidade (AFFONSO et al., 2012). O efeito repelente desses ativos na dose administrada e nas condições que foram realizados o experimento (23-27 °C e umidade relativa de 68-82%) só foi possível ser identificado com as amostras de NPZ-OC e NPZ-Eug. A zeína pode ter atribuído novas

características aos ativos, protegendo-os da degradação, servindo como uma veículo para administração controlada e por fim, aumentando sua biodisponibilidade e bioatividade (ADEYEMI et al., 2023).

Figura 17 - Resultados médios de preferência de *Sitophilus zeamais* L. após 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas da aplicação diferentes compostos químicos em arenas com chance de escolha (a) NPZ-Eug; (b) NPZ-OC; (c) NPZ; (d) OC (e) Eug; (f) PVA+ ETANOL



Médias seguidas pela mesma letra em cada período de avaliação não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As médias foram destransformadas para apresentação dos resultados. NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia; NPZ- nanopartículas de zeína; OC – óleo essencial de cravo-da-índia; Eug- Eugenol.

Dessa forma, os insetos apresentaram uma resposta comportamental migrando para o recipiente mais distante (controle) do ambiente tóxico (NPZ-OC e NPZ-Eug) assim que a presença do ativo era detectada (Figura 17) provocando uma reação de repelência ao se encontrarem em condições desfavoráveis (RODRIGUES et al., 2019). Portanto, à medida que o OC e o Eug foram liberados das nanopartículas de zeína, eram inalados pelos insetos por meio de seus espiráculos e transportados pelas traqueias e traqueóis para diferentes tecidos, alcançando assim seu local de ação (PLATA-RUEDA et al., 2018).

As nanopartículas de zeína também aumentaram a toxicidade do OC e Eug após serem encapsulados contra *Drosophila melanogaster* (Diptera:Drosophilidae) (SARAIVA et al., 2021). Como também, aumentaram a toxicidade de misturas dos compostos geraniol, eugenol e cinamaldeído contra a *Chrysodeixis includi* (Lepidoptera: Noctuidae) mostrando que o nanoencapsulamento pode melhorar a eficácia do princípio ativo (OLIVEIRA et al., 2019), pois partículas em nanoescala apresentam propriedades inovadoras que as distinguem de seus materiais em grande escala (LOZA; EPPLE; MASKOS, 2019).

Curiosamente, a NPZ apresentou uma diferença significativa entre o tratamento e o controle após 72 horas (Figura 17). Esse comportamento não era esperado, considerando que a zeína é uma prolamina extraída do grão de milho (LIU et al., 2019), que é o alimento do inseto estudado (*Sitophilus zeamais*). Além disso, a zeína não é considerada tóxica e é classificada como um dos polímeros naturais mais seguros pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos (YU et al., 2020), possuindo aplicações aprovadas nas áreas farmacêutica e alimentícia (GAGLIARDI et al., 2021). Portanto, até o momento, não foram encontrados indícios na literatura que indiquem que a zeína possa apresentar algum efeito repelente sobre o *Sitophilus zeamais*.

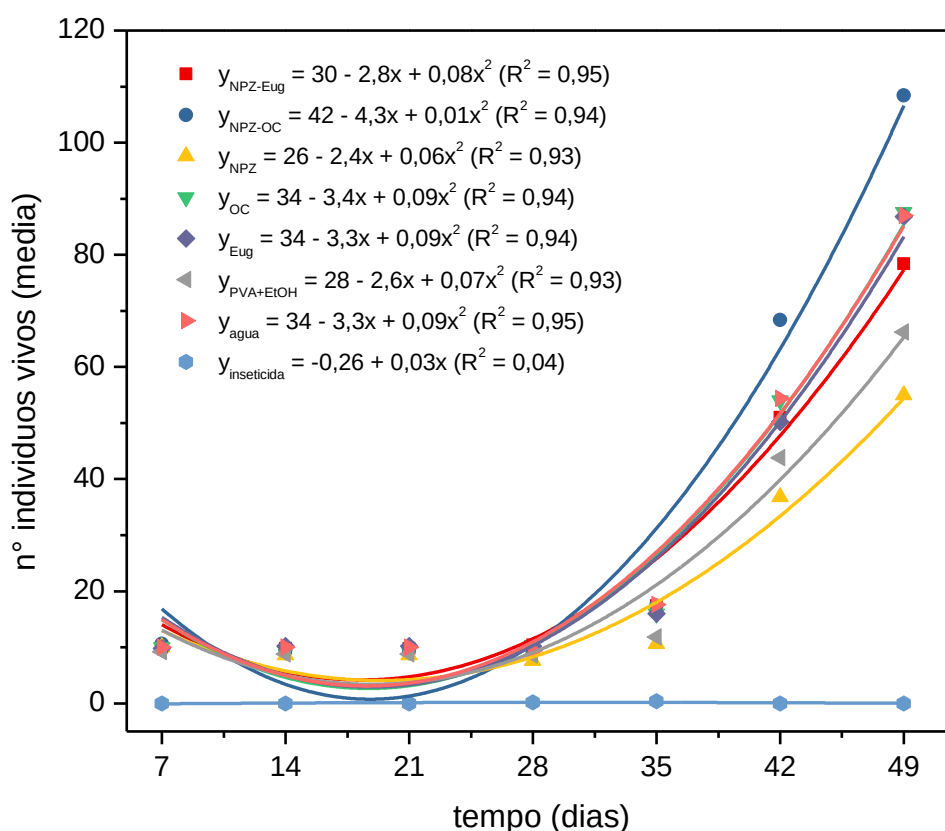
4.5.3 Desenvolvimento populacional de *Sitophilus zeamais* em grãos de milho tratados

O ensaio de desenvolvimento populacional visou avaliar a eficácia dos tratamentos (NPZ-Eug, NPZ-OC, NPZ, OC e Eug) no controle do crescimento populacional de *Sitophilus zeamais* ao longo do tempo. Esse ensaio foi utilizado para medir o impacto de um tratamento no controle da reprodução, sobrevivência da

população de insetos e a verificação dos danos causados aos grãos durante o armazenamento.

A avaliação do desenvolvimento populacional dos insetos com grãos de milho tratados foi conduzida ao longo de 49 dias. Nos primeiros 21 dias, o crescimento populacional manteve-se estável, pois os insetos ainda estavam se adaptando ao novo ambiente. Após esse período, observou-se um aumento do número de insetos, apresentando um crescimento populacional com um comportamento de equação quadrática. Na Figura 18 é possível observar a equação matemática que descreve esse crescimento, com valores de $R^2 > 93$ para todos os tratamentos e controles (negativos e positivo).

Figura 18 - Crescimento populacional de *Sitophilus zeamais* L. ao longo do período de armazenamento (até 49 dias) de grãos de milho tratados com diferentes compostos químicos



NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia; NPZ- nanopartículas de zeína; OC – óleo essencial de cravo-da-índia; Eug- Eugenol.

Os testes de Kruskal-Wallis indicaram que os princípios ativos, tanto incorporados à zeína quanto em sua forma livre, não apresentaram efeito na redução da população de *Sitophilus zeamais* na dose testada (15 mg/kg ou 13,6 uL/kg), pois

não houve diferença significativa em relação aos grupos de insetos tratados com os controles negativos (água e PVA+ ETANOL). A partir do teste de Dunn, concluiu-se que apenas o inseticida comercial (controle positivo) foi eficaz na redução populacional dos insetos (Tabela 4).

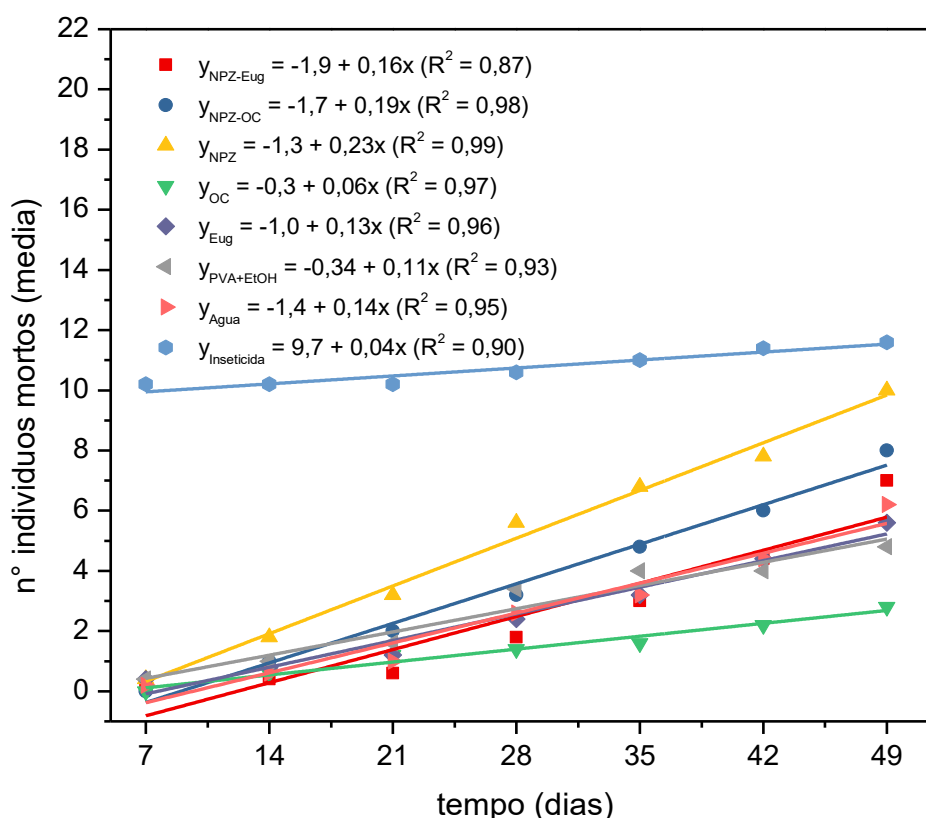
Tabela 4 - Medianas do crescimento populacional de *Sitophilus zeamais* L. ao longo do período de armazenamento (até 49 dias) de grãos de milho tratados com diferentes compostos químicos

Tratamentos e controles	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	42 dias	49 dias
NPZ-EUG	10 a	10 a	10 a	11 a	12 a	38 a	65 a
NPZ-OC	10 a	10 a	10 a	10 a	20 a	78 a	122 a
NPZ	10 a	8 a	8 a	8 a	10 a	42 a	65 a
OC livre	10 a	10 a	10 a	11 a	15 a	55 a	99 a
EUG livre	10 a	10 a	10 a	11 a	16 a	53 a	88 a
PVA+Etanol	10 a	9 a	9 a	8 a	14 a	39 a	73 a
Água	10 a	10 a	10 a	10 a	16 a	59 a	94 a
Tratamentos e controles	10 B	10 B	10 B	10 B	14 B	49 B	78 B
Inseticida	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A

Medianas seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula, separadamente, nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn, respectivamente, ao nível de 1% de significância. NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia; NPZ- nanopartículas de zeína; OC – óleo essencial de cravo-da-índia; Eug- Eugenol.

Ao avaliar a mortalidade dos insetos em contato com o milho tratado durante 49 dias, foi possível identificar um leve aumento na mortalidade dos insetos, esse aumento foi inferior ao crescimento populacional e por isso não pode ser atribuído a qualquer efeito tóxico do tratamento. Esse comportamento é observado na figura 19 por meio de uma equação matemática com função linear, com valores de $R^2 > 89$ para todos os tratamentos e controles (negativos e positivo). É importante ressaltar que a contagem dos insetos foi realizada de maneira cumulativa, ou seja, os dados foram registrados semanalmente, somando-se as mortes já ocorridas. Por essa razão, a curva do inseticida na Figura 19 não apresenta uma queda ao longo dos 49 dias, uma vez que os insetos morreram em menos de 24 horas após a aplicação do inseticida.

Figura 19 - Mortalidade acumulada de *Sitophilus zeamais* L. ao longo do período de armazenamento (até 49 dias) de grãos de milho tratados com diferentes compostos químicos



NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia; NPZ- nanopartículas de zeína; OC – óleo essencial de cravo-da-índia; Eug- Eugenol.

Os testes de Kruskal-Wallis indicaram que os princípios ativos, tanto aqueles incorporados à zeína quanto em sua forma livre, não apresentaram efeito tóxico na dose testada (15 mg/kg ou 13,6 uL/kg), uma vez que não houve diferença significativa em relação aos grãos de milho tratados com os controles negativos (água e PVA+ETANOL). Complementando essa análise, o teste de Dunn indicou que apenas o inseticida demonstrou eficácia significativa na mortalidade dos insetos (Tabela 5). Em doses maiores de OC (500 uL/kg), estudos anteriores mostraram que populações de *Sitophilus zeamais* exibiram uma aversão significativa de resíduos de óleo de cravo ou canela (CORREA et al., 2015).

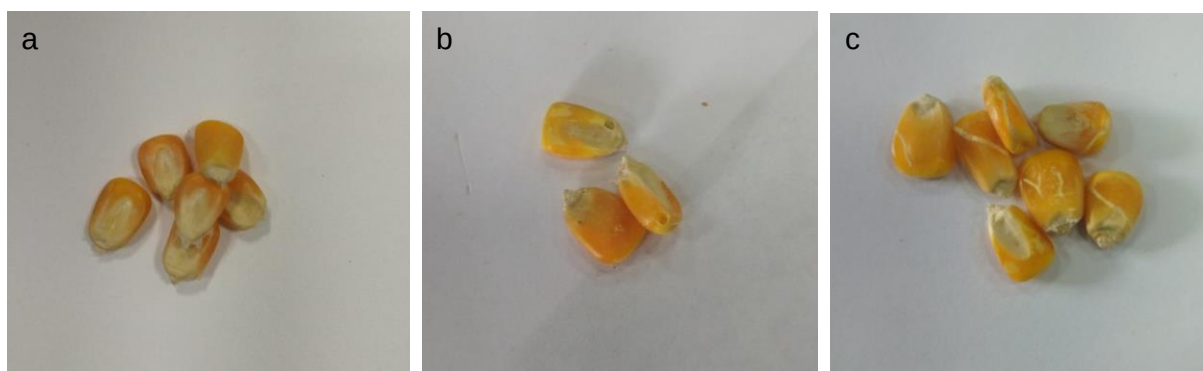
Tabela 5 - Medianas da mortalidade acumulada de *Sitophilus zeamais* L. ao longo do período de armazenamento (até 49 dias) de grãos de milho tratados com diferentes compostos químicos

Tratamentos e controles	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	42 dias	49 dias
NPZ-EUG	0 a	0 a	0 a	1 a	3 a	4 a	8 a
NPZ-OC	0 a	1 a	2 a	4 a	5 a	6 a	8 a
NPZ	0 a	2 a	3 a	6 a	6 a	6 a	10 a
OC livre	0 a	0 a	0 a	0 a	1 a	3 a	3 a
EUG livre	0 a	0 a	0 a	2 a	5 a	6 a	7 a
PVA+Etanol	0 a	0 a	0 a	3 a	4 a	4 a	4 a
Água	0 a	0 a	0 a	2 a	3 a	4 a	6 a
Tratamentos e controles negativos	0 B	0 B	0 B	3 B	4 B	4 B	6 B
Inseticida	10 A	10 A	10 A	11 A	11 A	11 A	12

Medianas seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula, separadamente, nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn, respectivamente, ao nível de 1% de significância. NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia; NPZ- nanopartículas de zeína; OC – óleo essencial de cravo-da-índia; Eug- Eugenol.

Além de avaliar o desenvolvimento populacional e a mortalidade cumulativa das populações de *sitophilus zemaais* no milho tratado, também foram analisados os danos aos grãos e o teor de umidade durante 63 dias. Após o ensaio, foram encontrados grãos saudáveis (sem sinais de dano), perfurados (com orifício redondo que se estende para o interior) e com galerias (com minas de larva visíveis, sem orifício de saída) (Figura 20).

Figura 20 - Grãos de milho de milho após 63 dias: (a) grãos saudáveis; (b) grãos perfurados; (c) grãos com galeria



Os grãos de milho tratados com NPZ-Eug, NPZ-OC, NPZ, OC, Eug, PVA+ETANOL e água sofreram mais danos em comparação aos tratados com inseticida, sugerindo que os tratamentos (NPZ-Eug, NPZ-OC, NPZ, OC e Eug), na dose testada (15 mg/kg ou 13,6 uL/kg), não inibiram a alimentação dos insetos. Isso

resultou em uma maior perda de grãos e aumento da população, como demonstrado na Figura 18. A análise de variância pelo teste F revelou diferenças significativas entre os grãos danificados e os intactos (APÊNDICE B). O teste de Scott-Knott (Tabela 6) confirmou que essas diferenças significativas ocorreram entre os tratamentos testados e o inseticida (controle positivo).

Tabela 6 - Resultados médios de grãos de milho danificados e sem danos mecânicos causados por *Sitophilus zeamais* L. e teor de água dos grãos aos 63 dias de armazenamento após tratamento diferentes compostos químicos

Tratamentos e controles	Grãos danificados (g)	Grãos sem danos (g)	Teor de água (%)
NPZ-Eug	57,36 b	37,74 b	13,24 a
NPZ-OC	63,06 b	30,67 b	13,17 a
NPZ	47,98 b	49,86 b	12,58 a
OC livre	59,59 b	35,14 b	13,33 a
Eug livre	61,61 b	32,66 b	12,81 a
PVA+ETANOL	47,10 b	48,82 b	13,16 a
ÁGUA	53,03 b	45,25 b	13,04 a
INSETICIDA	1,54 a	99,91 a	12,06 a

Médias de massa de grãos e teor de água seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott e pelo teste de F, respectivamente, ao nível de 5% de significância. NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia; NPZ- nanopartículas de zeína; OC – óleo essencial de cravo-da-índia; Eug- Eugenol.

De acordo com a tabela 6, o teor de água em ambos os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si. Apesar disso, o milho tratado com inseticida apresentou um menor teor de água (12,1%) em comparação aos demais tratamentos, isso pode ser explicado pela redução na população de gorgulhos vivos no milho, o que resulta em uma menor liberação de água devido à atividade respiratória dos insetos (MARQUES et al., 2021).

Apesar do aumento da população de *Sitophilus zeamais*, os tratamentos (NPZ-Eug, NPZ-OC, NPZ, OC e Eug) e controles negativos (PVA+ETANOL e água) mantiveram o teor de água dentro do limite ideal para o milho em grãos, variando entre 12% e 13% (BRITO, 2020), conforme mostrado na tabela 6. Esse resultado pode ser atribuído às condições de armazenamento e ao ambiente em que os experimentos foram realizados. As amostras de milho foram guardadas em uma sala fechada, equipada com um desumidificador que controlava a umidade do espaço. Além disso, cada recipiente tinha furos que facilitavam a circulação de ar, permitindo a respiração adequada dos insetos e contribuindo para a manutenção da umidade dos grãos.

5. CONCLUSÃO

A extração do óleo essencial de cravo a partir dos botões florais secos da *Syzygium aromaticum* resultou em um rendimento de 10,31% (m/m), alinhado com resultados previamente reportados na literatura. Os compostos químicos que constituem o óleo de cravo foram identificados qualitativamente, destacando-se o eugenol e o acetato de eugenila como seus principais componentes. A variação na composição química do óleo entre diferentes estudos presente na literatura foram atribuídas a fatores sazonais. Além disso, o eugenol foi quantificado por espectrometria UV-Vis o qual, corroborou com os resultados obtidos por CG-DIC, reforçando a precisão da análise.

Os sistemas nanoparticulados foram produzidos com sucesso utilizando a técnica de nanoprecipitação, resultando em suspensões coloidais estáveis. A confirmação da formação das nanopartículas foi feita através de mudança de cor e pelo efeito Tyndall, enquanto a morfologia e tamanho foram determinados por TEM, a qual foi confirmado a formação de partículas esféricas irregulares com tamanho inferior a 100 nm.

Ao avaliar a estabilidade das nanopartículas estudadas, foi possível identificar que elas suportam à centrifugação de até 5.000 rpm sem evidências de precipitados ou perda da estabilidade coloidal. No entanto, em velocidades de 10.000 ou 15.000 rpm, partículas de maiores diâmetros foram sedimentadas, deixando a suspensão coloidal levemente mais límpida, mas sem perder a sua identidade.

Além disso, as nanopartículas apresentaram maior estabilidade quando armazenadas sob refrigeração (10 °C), em comparação às que foram mantidas a temperatura ambiente ou submetidas a ciclos alternados de temperatura. Vale ressaltar que, independentemente do tipo de armazenamento, as NPZ-Eug e NPZ-OC demonstraram ser mais estáveis do que as NPZ. Além do mais, os sistemas contendo NPZ-Eug em ambos os tipos de armazenamento apresentaram alta eficiência de encapsulamento, superior a 70%, ao longo de 42 dias. Esses resultados indicam uma forte interação entre os compostos apolares do princípio ativo e a parte hidrofóbica da zeína.

A liberação do Eug presente nas NPZ-Eug e NPZ-OC em ambos os sistemas tamponados (pH= 3,0 e 7,4) ocorreu durante o tempo de 220 min. Esses resultados indicam que, embora a carga de superfície das NPZ varie em função do pH, essa

alteração não afeta significativamente o perfil de liberação do eugenol, sugerindo que a interação do composto ativo com a zeína é suficientemente estável para garantir uma liberação uniforme e imediata em ambas as condições. O ajuste dos dados experimentais com modelos cinéticos de liberação mostrou que o modelo de Weibull apresentou o melhor coeficiente de correlação ($R^2 > 0,97$), indicando que o mecanismo de liberação do eugenol ocorre predominantemente por difusão sob a matriz polimérica para o meio externo.

Embora as doses utilizadas dos princípios ativos livres (OC e Eug) e suas formas incorporadas a zeína (NPZ-OC e NPZ-Eug) não tenham demonstrado efeito tóxico significativo contra *Sitophilus zeamais* nos ensaios de toxicidade de contato direto e indireto, o nanoencapsulamento em partículas de zeína mostrou-se eficaz em potencializar o efeito repelente. A partir de 24 horas de exposição, a NPZ-OC e NPZ-Eug com doses de 15 mg/kg (13,6 μ L/kg) para OC e Eug, apresentaram um efeito repelente consistente. Esse comportamento foi atribuído a maior estabilidade e liberação controlada proporcionadas pelo encapsulamento molecular, que preservou as propriedades repelentes dos princípios ativos e aumentou sua bioatividade ao longo do tempo.

A própria zeína, surpreendentemente, apresentou um leve efeito repelente nas 72 horas, um resultado inesperado, especialmente considerando que ela é um componente alimentar do *Sitophilus zeamais*. Não foram encontradas evidências na literatura de que a zeína apresente ação repelente para essa espécie de inseto, o que sugere a necessidade de estudos adicionais para entender melhor esse comportamento observado.

Na avaliação do desenvolvimento populacional e danos aos grãos tratados, foi confirmado que apenas o inseticida comercial teve eficácia na redução significativa da população e proteção dos grãos. Embora o encapsulamento tenha melhorado o desempenho dos compostos no aspecto repelente, não foi suficiente para impedir a proliferação dos insetos ao longo de 49 dias de armazenamento. Esse resultado reforça a ideia de que concentrações superiores às aquelas utilizadas no presente estudo, conforme sugerido por outras pesquisas, podem ser necessárias para alcançar uma toxicidade de contato efetiva.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Illinois: Allured publishing corporation Carol Stream, IL, 2007. v. 456.
- ADEYEMI, S. B. et al. Polymeric nanoparticles for enhanced delivery and improved bioactivity of essential oils. **Heliyon**, China, v. 9, n. 6, jun. 2023.
- AFFONSO, R. S. et al. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 2, p. 146-161, mai. 2012.
- AHMED, D. M. et al. The larvicidal effect of neemazal T/S, clove oil and ginger oil on tomato leafminer, *Tuta absoluta* compared to coragen. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Egito, v. 29, n. 3, p. 1447-1455, mar. 2022.
- ALIMI, D. et al. Toxicity, repellency, and anti-cholinesterase activities of bioactive molecules from clove buds *Syzygium aromaticum* L. as an ecological alternative in the search for control *Hyalomma scupense* (Acari: Ixodidae). **Heliton**, Turquia, v. 9, n. 8, ago. 2023.
- ARAÚJO, A. et al. Toxicidade e repelência de óleos essenciais no manejo de *Sitophilus zeamais*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Brasil, v. 23, p. 372-377, mai. 2019.
- AROUCHE, J. de S. **Desenvolvimento de uma formulação com potencial biocida baseada no encapsulamento do óleo essencial de *Piper callosum*: avaliação da estabilidade a 25° C e 35° C utilizando diferentes conservantes**. 2020. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência e engenharia de materiais) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2020.
- ASCENÇÃO, V. L.; FILHO, V. E. M. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Caderno de Pesquisa**, Brasil, v. 20, n. especial, jul. 2013.
- BA, C. et al. Effects of environmental stresses on physiochemical stability of β -carotene in zein-carboxymethyl chitosan-tea polyphenols ternary delivery system. **Food Chemistry**, China, v. 311, p. 125878 - 125886, mai. 2020.
- BALIYARSINGH, B.; PRADHAN, C. K. Prospects of plant-derived metallic nanopesticides against storage pests-A review. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 14, p. 100687 - 100697, dez. 2023.
- BAO-LIANG, T. et al. Insecticidal potential of clove essential oil and its constituents on *Cacopsylla chinensis* (Hemiptera: Psyllidae) in laboratory and field. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 957-961, june 2015.
- BARZEGAR-JALALI, M. et al. Kinetic analysis of drug release from nanoparticles. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, Irã, v. 11, n. 1, p. 167-177, abr. 2008.

BEZERRA, T. P. W. et al. A nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de fármacos: revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, Brasil, v. 11, n. 14, p. e99111436115- e99111436126, out. 2022.

BHASARKAR, J.; BAL, D. Kinetic investigation of a controlled drug delivery system based on alginate scaffold with embedded. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**. p. 1-8, jun. 2018.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004.

Brito, W. R. A. de. **Qualidade de grãos de milho acondicionados em diferentes embalagens**. 2020. 40f. Monografia (Bacharelado em Agronomia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Campus Petrolina Zona Rural, Petrolina, 2020.

BOUMAN, J. et al. Controlled release from zein matrices: interplay of drug hydrophobicity and pH. **Pharmaceutical research**, Holanda, v. 33, p. 673-685, nov. 2016.

CAMARA, M. C. et al. Development of stimuli-responsive nano-based pesticides: emerging opportunities for agriculture. **Journal of nanobiotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1-19, set. 2019.

CAMPELO, M. da S. et al. Clove essential oil encapsulated on nanocarrier based on polysaccharide: A strategy for the treatment of vaginal candidiasis. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Brasil, v. 610, p. 125732, dez. 2021.

CAMPOS, L. A. de A. et al. Zein nanoparticles for drug delivery: Preparation methods and biological applications. **International Journal of Pharmaceutics**, Brasil, v. 635, p. 122754, mar. 2023.

CARVALHO, J. R. et al, **Análise de probit aplicada a bioensaios com insetos**. Colatina: IFES, 2017. 102p.

CARTAXO, P. H. de A. **Óleos essenciais no controle de Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae)**. 2020. 35f. Monografia (graduação em engenharia agrônoma) - Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba, 2020.

CHAUDHARI, A. K. et al. Essential oils and their bioactive compounds as eco-friendly novel green pesticides for management of storage insect pests: Prospects and retrospects. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 18918-18940, fev. 2021.

CHEN, H.; ZHONG, Q. Processes improving the dispersibility of spray-dried zein nanoparticles using sodium caseinate. **Food Hydrocolloids**, Estados Unidos, v. 35, p. 358-366, mar. 2014.

CHEN, K. et al. The colloidal stability of molybdenum disulfide nanosheets in different natural surface waters: Combined effects of water chemistry and light irradiation. **Water Research**, China, p. 121973, set. 2024.

CORREA, Y. D. C. G. et al. Locomotory and physiological responses induced by clove and cinnamon essential oils in the maize weevil *Sitophilus zeamais*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 125, p. 31-37, nov. 2015.

COSTA, I. C. **Nanopartículas poliméricas preenchidas com óleo essencial de *Piper nigrum*: caracterização química e morfológica**. 2020. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Amazonas, 2020.

COSTA, P.; LOBO, J. M.I S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European journal of pharmaceutical sciences**, Portugal, v. 2, p. 123-133, mai. 2001.

D'SOUZA, S. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. **Advances in Pharmaceutics**, v. 2014, p. 1-12, nov. 2014.

DURANGO, L. G. D. **Desenvolvimento de um composto inseticida-fertilizante microencapsulado para promover o aumento de produtividade agrícola**. 2017.119f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2017.

EL ARROUD, F. Z. et al. Dielectric heating for controlling field and storage insect pests in host plants and food products with varying moisture content. **Heliyon**, v. 10, n. 12, p. e32765 - e32792, jun. 2024.

EL GOHARY, E. G. et al. Insecticidal activity and biochemical study of the clove oil (*Syzygium aromaticum*) nano-formulation on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, Egito, v. 25, n. 1, p. 227-239, jan. 2021.

FREITAS, D. Z. **Nanopartículas de zeína e quitosana contendo óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. quimiotipos eugenol e geraniol**. 2016, 157f, Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

FREITAS, G. M. **Desenvolvimento, caracterização físico-química, estudo da liberação in vitro e avaliação da fotoestabilidade de nanopartículas contendo dapsona e óleo de arroz bruto**. 2015, 75 F. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pampa, Uruguai, 2015

GAGLIARDI, A. et al. Zein-vs PLGA-based nanoparticles containing rutin: A comparative investigation. **Materials Science and Engineering: C**, Itália, v. 118, p. 111538-111547, jan. 2021.

GENGATHARAN, A.; RAHIM, M. H. A. The Application of Cloves as a Potential Functional Component in Active Food Packaging Material and Model Food System: A Mini-review. **Applied Food Research**, Malásia, p. 100283, jun. 2023.

GOMEZ-GAETE, C. Nanopartículas poliméricas: tecnología y aplicaciones farmacéuticas. **Rev. Farmacol.** Chile, v. 7, n. 2, p. 7-16, mai. 2014.

GOMES, P. R. B. et al. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, Colombia, v. 47, n. 1, p. 37-52, abr. 2018.

GUAN, W. et al. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**, China, v. 101, n. 4, p. 1558-1564, 2007.

GUO, H. et al. Continuous flow modulates zein nanoprecipitation solvent environment to obtain colloidal particles with high curcumin loading. **Food Hydrocolloids**, China, v. 134, p. 108089 - 108100, jan. 2023.

HERDIANA, Y. et al. Scale-up Polymeric-based Nanoparticles Drug Delivery Systems: Development and Challenges. **OpenNano**, Indonesia, v. 7, p. 100048-100065, ago. 2022.

HUANG, Y. et al. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch.(Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 38, n. 5, p. 403-412, jul. 2002.

ISLAM, M. A. et al. Chronic effects of organic pesticides on the aquatic environment and human health: A review. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, Malásia, v. 18, p. 100740 - 100758, dez. 2022.

JINDAL, A; KUMAR, A. Physical characterization of Clove Oil based Self Nano-Emulsifying Formulations of Cefpodoxime Proxetil: Assessment of Dissolution rate, Antioxidant & Antibacterial activity. **OpenNano**, Índia, v. 8, p. 100087-100090, dez. 2022.

KASAAI, M. R. Zein and zein-based nano-materials for food and nutrition applications: A review. **Trends in Food Science & Technology**, Irã, v. 79, p. 184-197, set. 2018.

KATEKAR, V. P.; RAO, A. B.; SARDESHPANDE, V. R. A hydrodistillation-based essential oils extraction: A quest for the most effective and cleaner technology. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, Índia, v. 36, p. 101270, dez. 2023.

KESHANIDOKHT, S. et al. Zein-stabilized emulsions by ethanol addition; stability and microstructure. **Food Hydrocolloids**, Dinamarca, v. 133, p. 107973-107983, dez. 2022.

KHAN, H. A. A. et al. Control efficacy of isolates of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* against three destructive insect pests of stored grain. **Journal of Stored Products Research**, v. 108, p. 102357- 102365, set. 2024.

KONGA, M.; GOEDEN, R. D. The host-plant range of *lema trilineata daturaphila* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Annals of the Entomological Society of America**, [S. N.], v. 63, n. 4, p- 1175-1180, jul. 1970.

LAZZARI, S. et al. Colloidal stability of polymeric nanoparticles in biological fluids. **Journal of nanoparticle research**, v. 14, p. 1-10, 2012.

LEDO, C. M. et al. Matrizes poliméricas para encapsulação de bioinseticidas. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, Pernambuco, v. 26, n. 2, p. 1-8, mar. 2021.

LIANG, R. et al. Surfactant-free biodegradable polymeric nanoparticles generated from self-organized precipitation route: Cellular uptake and cytotoxicity. **European polymer journal**, China, v. 57, p. 187-201, ago. 2014.

LI, D. et al. Tremella polysaccharides-coated zein nanoparticles for enhancing stability and bioaccessibility of curcumin. **Current research in food science**, China, v. 5, p. 611-618, mar. 2022.

LIMA, L. S. Coloide. **Revista de Ciência Elementar**, Brasil, v. 2, n. 4, dez. 2014.

LI, M.; YU, M. Development of a nanoparticle delivery system based on zein/polysaccharide complexes. **Journal of Food Science**, China, v. 85, n. 12, p. 4108-4117, nov. 2020.

LIU, J. et al. Preparation, characterization, stability, and controlled release of chitosan-coated zein/shellac nanoparticles for the delivery of quercetin. **Food Chemistry**, China, p. 138634, jun. 2024.

LIU, Q. et al. Fabrication of curcumin-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate/sodium alginate: Curcumin solubility, thermal properties, rheology, and stability. **Process Biochemistry**, China, v. 94, p. 30-38, jul. 2020.

LIU, Z. et al. Physicochemical characterization of a zein prepared using a novel aqueous extraction technology and tensile properties of the zein film. **Industrial Crops and Products**, China, v. 130, p. 57-62, dez. 2019.

LORINI, I. et al. **Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2015. 86p.

LOZA, K.; EPPLE, M.; MASKOS, M. Stability of nanoparticle dispersions and particle agglomeration. **Biological Responses to Nanoscale Particles: Molecular and Cellular Aspects and Methodological Approaches**, Alemanha, p. 85-100, abr. 2019.

LUIS, A.I.S. et al. Zein Nanoparticles Impregnated with Eugenol and Garlic Essential Oils for Treating Fish Pathogens. **ACS Omega**, v. 5, n. 25, p. 15557–15566, jun. 2020.

MACHADO, T. O. et al. Biopolymer-based nanocarriers for sustained release of agrochemicals: A review on materials and social science perspectives for a sustainable future of agri-and horticulture. **Advances in colloid and interface science**, Brasil, v. 303, p. 102645-102669, mai. 2022.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Brasil, v. 38, n.4, p. 375-399, out. 2002.

MARIANO, A. et al. Encapsulation of orange-derived hesperetin in zein/pectin nanoparticles: Fabrication, characterization, stability, and bioaccessibility. **Food Hydrocolloids**, v. 153, p. 110024-110035, ago. 2024.

MARINI, V. G. **Nanopartículas de zeína: preparação, caracterização e desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de terpinen-4-ol**. 2014. 143f. Tese (Doutorado em química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MARQUES, S. C. et al. Vegetable powders for the control of *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae) in stored maize grains. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 44, p. 184-192, jul. 2021.

MELO, R. L. F. et al. As nanopartículas como ferramentas biológicas: uma revisão exploratória Nanoparticles as biological tools: an exploratory review Las nanopartículas como herramientas biológicas: una revisión exploratoria. **Research, Society and Development**, Brasil, v. 9, n. 7, p. e363974155- e363974174, mai. 2020.

MNG'ONG'O, M. Assessment of maize and beans storage insect pest in major grain markets, Morogoro-Tanzania. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 30, n. 1, p. 103491-103491, jan. 2023.

MONTEIRO, R. A. et al. Zein based-nanoparticles loaded botanical pesticides in pest control: An enzyme stimuli-responsive approach aiming sustainable agriculture. **Journal of Hazardous Materials**, Brasil v. 417, p. 126004 - 126015, set. 2021.

MUKURUMBIRA, A. R. et al. Preparation, physicochemical characterisation and assessment of liquid and vapour phase antimicrobial activity of essential oil loaded lipid nanoparticles. **LWT**, Austrália, v. 191, p. 115624, jan. 2024.

MUPPALANENI, S.; OMIDIAN, H. Polyvinyl alcohol in medicine and pharmacy: a perspective. **J. Dev. Drugs**, Estados Unidos, v. 2, n. 3, p. 1-5, nov. 2013.

MURTALA, N. et al. Uma revisão dos métodos, classificações, aplicações e caracterização de síntese de nanopartículas. **Nanotecnologia Ambiental, Monitoramento e Gestão**, Malásia, p. 100900, dez. 2023.

NEME, K. et al. Application of nanotechnology in agriculture, postharvest loss reduction and food processing: Food security implication and challenges. **Heliyon**, Etiópia, v. 7, n. 12, p. e085339- e085341, dez. 2021.

OLIVEIRA, J. L. et al. Association of zein nanoparticles with botanical compounds for effective pest control systems. **Pest management science**, v. 75, n. 7, p. 1855-1865, 2019.

- OLIVEIRA, G. da S. et al. Clove essential oil in the sanitation of fertile eggs. **Poultry science**, Brasil, v. 99, n. 11, p. 5509-5516, nov. 2020.
- OLIVEIRA, J. L. de et al. Zein nanoparticles as eco-friendly carrier systems for botanical repellents aiming sustainable agriculture. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 6, p. 1330-1340, jan. 2018.
- OLIVEIRA, J. L. D. et al. Aplicação da nanotecnologia para encapsulamento de inseticidas botânicos para agricultura sustentável: perspectivas e promessas. **Biotechnology advances**, Brasil, v. 32, n. 8, p. 1550-1561, dez. 2014.
- OSTERTAGOVA, E.; OSTERTAG, O.; KOVÁČ, J. Metodologia e aplicação do teste de Kruskal-Wallis. **Mecânica e materiais aplicados**, v. 611, p. 115-120, ago. 2014.
- PANDEY, V. K. et al. Bioactive properties of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil nanoemulsion: A comprehensive review. **Heliyon**, Índia, v. 10, ed.1, p. e22437–e22453, jan. 2024.
- PASCOLI, M. et al. The potential of nanobiopesticide based on zein nanoparticles and neem oil for enhanced control of agricultural pests. **Journal of Pest Science**, Brasil, v. 93, p. 793-806, jan. 2020.
- PENG, D. et al. Interfacial arrangement of tunable gliadin nanoparticles via electrostatic assembly with pectin: Enhancement of foaming property. **Food Hydrocolloids**, China, v. 143, p. 108852 - 108861, out. 2023.
- PESCHIUTTA, M. L. et al. Fumigant toxicity of essential oils against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae): a systematic review and meta-analysis. **Journal of Pest Science**, Argentina, v. 95, p. 1037–1056, dez. 2022.
- PIMENTEL, C. S. de L. et al. Insecticidal potential of essential oil from inflorescences of *Etlingera elatior* and its major constituents against *Sitophilus zeamais*. **Industrial Crops and Products**, v. 203, p. 117154 - 117164, nov. 2023.
- PLATA-RUEDA, A. et al. Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic effects and behavior repellency response on granary weevil, *Sitophilus granarius*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 156, p. 263-270, jul. 2018.
- PORTOLAN, I. B. Tratamentos alternativos e peliculização de sementes de milho para controle de *Sitophilus zeamais*. 2020. 82f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável), Laranjeiras do Sul, 2020.
- PRADI, L. **Construção de uma biblioteca química e estudo de propriedades físico-químicas de derivados do composto natural β -cariofileno**. 2021. 80f. Monografia (Bacharel em Farmácia), Florianópolis, 2021.
- PROENÇA, P. L. de F. et al. Curcumin and carvacrol co-loaded zein nanoparticles: Comprehensive preparation and assessment of biological activities in pest control. **Plant Nano Biology**, v. 8, p. 100067- 100078, mai. 2024.

RADÜNZ, M. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. **Food chemistry**, Estados Unidos, v. 276, p. 180-186, mar. 2019.

RAPOSO, F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Espanha, v. 77, p. 167-185, mar. 2016.

RIBEIRO, I. A. T. de A. et al. Chemical characterization and insecticidal effect against *Sitophilus zeamais* (maize weevil) of essential oil from *Croton rudolphianus* leaves. **Crop protection**, v. 129, p. 105043 - 105050, mar. 2020.

RIVERA-HERNANDEZ, G. et al. Polyvinyl alcohol based-drug delivery systems for cancer treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, Mexico, v. 600, p.120478-120489, mai. 2021.

RODRIGUES, A. C. et al. Atividade repelente e inseticida do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC sobre *Sitophilus zeamais* Mots, 1855. **Perspectiva**, v. 43, n.161, p. 123-130, mar. 2019.

RODRÍGUEZ, A. et al. Phenolic compounds as controllers of *Sitophilus zeamais*: A look at the structure-activity relationship. **Journal of Stored Products Research**, v. 99, p. 102038 - 102046, dez. 2022.

SANTOLIN, L. **Síntese enzimática do acetato de eugenila a partir do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)**. 2019. 81f. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2019.

SARAIVA, N. R. et al. Clove oil-loaded zein nanoparticles as potential bioinsecticide agent with low toxicity. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, Brasil, v. 24, p. 100554- 100570, dez. 2021.

SCOTT-FORDSMAND, J. J.; FRACETO, L. F.; AMORIM, M. J. B. Nano-pesticides: the lunch-box principle—deadly goodies (semio-chemical functionalised nanoparticles that deliver pesticide only to target species). **Journal of Nanobiotechnology**, Brasil, v. 20, n. 1, p. 1-9, jan. 2022.

SCHAFFAZICK, S., et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**, v. 26, p. 726-737, nov. 2003.

SHARMA, A. et al. Eugenol. In: **Nutraceuticals and Health Care**. [S.l.] Academic Press, 2022. p. 177-198.

SHARMA, M. et al. Physico-chemical characterization of ultrasound assisted clove oil-loaded nanoemulsion: As enhanced antimicrobial potential. **Biotechnology Reports**, Estados Unidos, v. 34, p. e00720- e00727, jun. 2022.

SHARMA, P. et al. Green nanoparticle formation toward wound healing, and its application in drug delivery approaches. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, Índia, p. 100088-100099, dez. 2022.

SHARMA, S. et al. Phyto-nanoemulsion: An emerging nano-insecticidal formulation. **Environmental nanotechnology, monitoring & management**, Índia, v. 14, p. 100331-100348, dez. 2020.

SILVA, E. dos S. **Nanopartículas poliméricas biodegradáveis de poli (ácido láctico-co-glicólico) funcionalizadas para incorporação de peçonha de Bothrops jararaca**. 2018. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2018.

SILVA, J. M. S. **Encapsulamento do óleo essencial da Lippia alba em nanopartículas de poli-e-caprolactona (PCL) para avaliação da estabilidade e atividade larvica contra o Aedes aegypti**. 2019. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

SINGH, I. R.; PULIKKAL, A. K. Preparation, stability and biological activity of essential oil-based nano emulsions: A comprehensive review. **OpenNano**, Índia, v. 8, p. 100066-10086, dez. 2022.

SONI, M. et al. Nanoencapsulation strategies for improving nutritional functionality, safety and delivery of plant-based foods: Recent updates and future opportunities. **Plant Nano Biology**, Índia, v. 1, p. 100004- 100015, jun. 2022.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, Brasil, v. 22, p. 101-106, out. 2012.

TABATABAEI, Parvin Razavi et al. Biochemical characterization of digestive proteases and carbohydrases of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller)(Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Irã, v. 14, n. 2, p. 187-194, jun. 2011.

TADINI, M. C. et al. Method validation and nanoparticle characterization assays for an innovative amphotericin B formulation to reach increased stability and safety in infectious diseases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Brasil, v. 145, p. 576–585, out. 2017.

THANKAPPAN, D. A. et al. Plant-mediated biosynthesis of zein–pectin nanoparticle: Preparation, characterization and in vitro drug release study. Índia, **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 2, p. 1785-1791, mar. 2020.

TUNÇ, M. T.; KOCA, I. Ohmic heating assisted hydrodistillation of clove essential oil. **Industrial Crops and Products**, Turquia, v. 141, p. 111763 - 111771, dez. 2019.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 7, p. 3671, mar. 2021.

VELOZ, V. A. **Nanopartículas proteicas de zeína carregadas com eugenol e óleo essencial do cravo-da-índia: preparo, otimização e caracterização**. 2022. 89f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2022.

VELOZ, V. A. et al. Nanopartículas de zeína/PVA incorporadas com eugenol e óleo essencial do cravo-da-índia: Otimização da síntese e validação analítica para quantificação do eugenol. **Química Nova**, Brasil, v. 47, n. 5, p. 1-9, -2024.

VENDL, T. et al. New approach for evaluating the repellent activity of essential oils against storage pests using a miniaturized model of stored-commodity packaging and a wooden transport pallet. **Industrial Crops and Products**, v. 172, p. 114024 - 114032, nov. 2021.

VERMA, V.; RYAN, K. M.; PADRELA, L. Production and isolation of Pharmaceutical drug nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, Irlanda, v. 603, p. 120708-120730, jun. 2021.

VIEGAS, C.; SECK, F.; FONTE, P. An insight on lipid nanoparticles for therapeutic proteins delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Portugal, v. 77, p. 103839-103841, nov. 2022.

WANG, Yi et al. Colloidal nanoparticles prepared from zein and casein: interactions, characterizations and emerging food applications. **Food Science and Human Wellness**, China, v. 12, n. 2, p. 337-350, mar. 2023.

WEISANY, W. et al. Targeted delivery and controlled released of essential oils using nanoencapsulation: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, Irã, v. 303, p. 102655-102668, mai. 2022.

WENG, J.; DURAND, A.; DESOBRY, S. Chitosan-Based Particulate Carriers: Structure, Production and Corresponding Controlled Release. **Pharmaceutics**, França, v. 15, n. 5, p. 1455, mai. 2023.

WU, H. et al. Incorporation of cellulose nanocrystals to improve the physicochemical and bioactive properties of pectin-konjac glucomannan composite films containing clove essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, China, p. 129469, mar. 2024.

YAN, X.; BERNARD, J.; GANACHAUD, F. Nanoprecipitation as a simple and straightforward process to create complex polymeric colloidal morphologies. **Advances in Colloid and Interface Science**, China, v. 294, p. 102474-102491, ago. 2021.

YAN, X. et al. Zein-based nano-delivery systems for encapsulation and protection of hydrophobic bioactives: A review. **Frontiers in Nutrition**, China, v. 9, p. 999373, set. 2022.

YAO, W. et al. Continuous synthesis of monodisperse polymer nanoparticles: New insights into the effects of experimental variables under controlled mixing conditions. **Chemical Engineering Science**, China p. 119846, abr. 2024.

YUAN, Y. et al. Surface coating of zein nanoparticles to improve the application of bioactive compounds: A review. **Trends in Food Science & Technology**, China, v. 120, p. 1-15, fev. 2022.

YU, X. et al. Zein nanoparticles as nontoxic delivery system for maytansine in the treatment of non-small cell lung cancer. **Drug delivery**, China, v. 27, n. 1, p. 100-109, dez. 2020.

XAVIER, K. B. S. **Eletrostática em sistemas coloidais carregados**. 2019. 65f. monografia (Graduação em Física) - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Acarapé, 2019.

ZHANG, J. et al. Entrapment of carvacrol in zein-trehalolipid nanoparticles via pH-driven method and antisolvent co-precipitation: Influence of loading approaches on formation, stability, and release. **Lwt**, v. 183, p. 114916- 114927, jun. 2023.

ZHANG, Y. et al. Facile preparation of pH-responsive gelatin-based core–shell polymeric nanoparticles at high concentrations via template polymerization. **Polymer**, China, v. 48, n. 19, p. 5639-5645, set. 2007.

ZHANG, Z. et al. Fabrication and characterization of polydopamine-mediated zein-based nanoparticle for delivery of bioactive molecules. **Food Chemistry**, China, p. 139477, abr. 2024.

ZHONG, Q.; JIN, M. Zein nanoparticles produced by liquid–liquid dispersion. **Food Hydrocolloids**, Estados Unidos, v. 23, n. 8, p. 2380-2387, dez. 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela 7 - Resumo da análise de variância dos dados de preferência de *Sitophilus zeamais* L. após 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas da aplicação diferentes compostos químicos em arenas com chance de escolha

FV	GL	Quadrados médios					
		NPZ EUG					
		3h	6h	12h	24h	48h	72h
Blocos	6	0,048	0,023	0,038	0,097	0,037	0,024
Tratamentos	2	11,680**	7,279**	1,448 ^{ns}	14,678**	11,168**	13,276**
Resíduo	12	0,346	0,684	0,898	0,587	0,280	0,186
FV	GL	NPZ OC					
		3h	6h	12h	24h	48h	72h
		3h	6h	12h	24h	48h	72h
Blocos	6	0,081	0,031	0,024	0,025	0,048	0,029
Tratamentos	2	15,353**	13,128**	1,853 ^{ns}	8,135**	11,008**	10,697**
Resíduo	12	0,385	0,260	0,549	0,515	0,461	0,336
FV	GL	NPZ					
		3h	6h	12h	24h	48h	72h
		3h	6h	12h	24h	48h	72h
Blocos	6	0,057	0,110	0,032	0,079	0,104	0,059
Tratamentos	2	16,585**	9,822**	1,313 ^{ns}	5,864**	10,673**	11,781**
Resíduo	12	0,158	0,309	0,517	0,707	0,347	0,470
FV	GL	OC Livre					
		3h	6h	12h	24h	48h	72h
		3h	6h	12h	24h	48h	72h
Blocos	6	0,122	0,117	0,130	0,082	0,023	0,025
Tratamentos	2	2,187 ^{ns}	1,327 ^{ns}	0,699 ^{ns}	7,079*	10,047**	10,144**
Resíduo	12	1,025	1,175	1,350	1,089	0,862	0,778
FV	GL	EUG Livre					
		3h	6h	12h	24h	48h	72h
		3h	6h	12h	24h	48h	72h
Blocos	6	0,080	0,088	0,019	0,047	0,011	0,012
Tratamentos	2	20,361**	14,778**	0,583 ^{ns}	11,603**	10,423**	9,651**
Resíduo	12	0,218	0,337	1,401	1,227	0,498	0,391
FV	GL	PVA + Etanol					
		3h	6h	12h	24h	48h	72h
		3h	6h	12h	24h	48h	72h
Blocos	6	0,053	0,014	0,017	0,106	0,078	0,089
Tratamentos	2	3,739 ^{ns}	2,806 ^{ns}	1,564 ^{ns}	7,154**	10,082**	8,990**
Resíduo	12	0,990	1,127	1,084	0,677	0,556	0,624

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade. Dados transformados para raiz quadrada de (x + 1).

*Significativo ao nível de 5% de significância; **Significativo ao nível de 1% de significância; ^{ns}Não significativo. NPZ-Eug- Nanopartículas de zeína incorporadas em eugenol; NPZ- OC- Nanopartículas de zeína incorporadas em óleo essencial de cravo-da-índia; NPZ- nanopartículas de zeína; OC – óleo essencial de cravo-da-índia; Eug- Eugenol.

APÊNDICE B

Tabela 8 - Resumo da análise de variância dos dados de grãos de milho danificados e sem danos mecânicos causados por *Sitophilus zeamais* L. e teor de água dos grãos aos 63 dias de armazenamento após tratamento diferentes compostos químicos

FV	GL	Quadrados médios		
		Grãos danificados	Grãos sem danos	Teor de água
Tratamentos	7	2008,721**	2507,729**	0,907 ^{ns}
Resíduo	32	375,154	526,135	0,641

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns}Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.