



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAIENE LISBOA ROCHA

**Desenvolvimento de Nanogéis à Base de Bioativos Naturais como Abordagem Inovadora
para o Controle e Tratamento de Doenças Tropicais Negligenciadas e Avaliação
Toxicológica em Modelo Zebrafish (*Danio rerio*)**

SÃO LUÍS – MA

2025

RAIENE LISBOA ROCHA

**Desenvolvimento de Nanogéis à Base de Bioativos Naturais como Abordagem Inovadora
para o Controle e Tratamento de Doenças Tropicais Negligenciadas e Avaliação
Toxicológica em Modelo Zebrafish (*Danio rerio*)**

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

Orientador: Profº Dr. Renato Sonchini Gonçalves

SÃO LUÍS – MA

2025

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

Lisboa Rocha, Raiene.

Desenvolvimento de Nanogéis à Base de Bioativos Naturais como Abordagem Inovadora para o Controle e Tratamento de Doenças Tropicais Negligenciadas e Avaliação Toxicológica em Modelo Zebrafish Danio rerio / Raiene Lisboa Rocha. - 2025.

98 f.

Orientador(a): Renato Sonchini Gonçalves.

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

1. Desenvolvimento de Nanogéis. 2. Óleo Essencial de Duguetia Stelechantha. 3. Aedes Aegypti. 4. Leishmaniose. 5. Zebrafish (danio Rerio). I. Sonchini Gonçalves, Renato. II. Título.

RAIENE LISBOA ROCHA

**Desenvolvimento de Nanogéis à Base de Bioativos Naturais como Abordagem Inovadora
para o Controle e Tratamento de Doenças Tropicais Negligenciadas e Avaliação
Toxicológica em Modelo Zebrafish (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da Universidade
Federal do Maranhão como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Química.

Apresentada em: 16/07/2025

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Renato Sonchini Gonçalves
(Orientador-PPGQuim/UFMA)

Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra
DEQUI/UFMA

Profª. Drª. Carla Janaina Rebouças Marques do Rosário
DCVET/UEMA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por concretizar esse trabalho e a minha família por todo apoio e suporte. Agradeço ao meu orientador, Professor Renato Sonchini Gonçalves, pela oportunidade que foi me orientar nessa jornada, com paciência, inspiração e dedicação. Tive a honra de tê-lo como um professor humanizado e um excelente profissional.

Também agradeço aos professores/alunos que contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho. Ao Professor Emmanoel Vilaça Costa e sua aluna Melissa Pires, pela caracterização química do óleo essencial; à Professora Luciana Magalhães Rebêlo Alencar e seu aluno Erick Rafael, pela parceria na caracterização por AFM; ao Professor Roberto Batista de Lima pela caracterização do FTIR; ao Professor Gustavo Braga, pelas demais caracterizações do meu estudo; aos colaboradores Daniele Lera-Nonose, Arthur Laureano e Maria Lonardoni (DAB/UEM), pelas análises *in vitro* em promastigotas de *Leishmania*.

Agradeço em especial, a professora Clenilma Marques Brandão que me acolheu em seu laboratório para a realização do teste biológico de atividade larvicida, compartilhando comigo seus ensinamentos e experiência; ao professor Thiago Lopes Rocha, pela parceria nos testes com zebrafish e pelo acolhimento em seu laboratório em Goiânia, onde fui gentilmente recebida por ele e seus alunos Geovana Lima, Lorrany Pereira, Felipe Cirqueira, Jaqueline Cardoso e Sarah Araújo. Sou especialmente grata à Lorrany, que me acompanhou durante os experimentos, e a todos pelos aprendizados e valiosas trocas de experiências.

Agradeço também a Marcos Bispo, pela disposição e ajuda em coletar a planta deste estudo. Aos meus amigos da graduação que estiveram ao meu lado durante essa trajetória, onde tive o privilégio de compartilhar o mesmo laboratório e linha de pesquisa com eles (Amanda Miranda, Estela Mesquita e Victor Antônio). Agradeço às minhas companheiras de pesquisa, alunas do meu orientador (Camila Silva, Thaíssa Gabrielle e Laís Silva), por toda ajuda e disposição e todos os demais do grupo e do LQPN, como Júlia Xavier, Antônia Fernanda, Brendha Araújo, Samuel Buna e todos os demais pela amizade e parceria.

Agradeço ao programa de pós-graduação (PPGQuim) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Ao Procad, por ter possibilitado minha viagem para a realização dos testes em Goiânia, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e a CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), como a leishmaniose tegumentar americana (LTA), continuam sendo um desafio à saúde pública devido à toxicidade dos tratamentos disponíveis. As arboviroses, também classificadas como DTNs, são transmitidas pelo *Aedes aegypti*, cujo controle com inseticidas convencionais acarreta impactos ambientais significativos em razão de sua elevada toxicidade. Diante disso, cresce o interesse por alternativas mais seguras, como formulações à base de bioativos naturais. Nesse estudo, foi desenvolvido nanogéis semissólidos contendo óleo essencial de *Duguetia stelechantha* (OEDs), utilizando os copolímeros F127, 974P e água como único solvente visando uma abordagem *ecofriendly*. O OE da *D. stelechantha* foi extraído por hidrodestilação e caracterizado por CG-EM, com identificação predominante de sabineno (41,44%), terpin-4-ol (17,61%) e *p*-cimeno (3,70%), confirmados por RMN de ^1H e ^{13}C . Diferentes concentrações de OEDs foram testadas nas formulações, sendo a mais estável, aquela com 1% de óleo (nGF2002Ds), posteriormente combinada com concentrações crescentes de curcumina (CUR), sendo 0,02% de CUR (nGF2002DsC) a mais adequada. A análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) revelou alterações vibracionais das ligações O—H, C—H e C=O da matriz polimérica do nanogel base, indicando interações com os bioativos (OEDs e OEDs/Curcumina). As análises por espalhamento dinâmico de luz (DLS) demonstraram que a presença dos compostos promove maior estabilidade coloidal, evidenciada pela redução do diâmetro hidrodinâmico (Dh) e pelo aumento do coeficiente de difusão (Dif). A análise reológica confirmou o aumento da viscosidade, elasticidade e organização estrutural da matriz contendo os bioativos. Além disso, a análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) indicou estabilidade térmica do nanogel nGF2002Ds, enquanto as análises morfológicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM) revelaram morfologia homogênea e maior rigidez superficial após a incorporação do óleo. Diante dessa encapsulação bem sucedida dos bioativos, o nanogel nGF2002Ds apresentou forte efeito larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*, com CL_{50} de 97,7 $\mu\text{g/mL}$ e CL_{90} de 177,7 $\mu\text{g/mL}$ em 24 horas. Na avaliação toxicológica com zebrafish (*Danio rerio*), o nanogel nGF2002Ds demonstrou toxicidade dose-dependente, com aumento das alterações teratogênicas conforme o aumento da concentração do óleo. Em ensaio *in vitro* contra a *Leishmania amazonense*, o nanogel atingiu 100% de mortalidade em 24 horas, superando a atividade do OEDs puro (96,5%). Os resultados destacam o potencial dos nanogéis como abordagem nanotecnológica sustentável para superar as limitações de bioativos naturais no controle e tratamento das DTN.

Palavras chaves: Desenvolvimento de nanogéis; Óleo essencial de *Duguetia stelechantha*; *Aedes aegypti*; Leishmaniose; Zebrafish (*Danio rerio*).

ABSTRACT

Neglected Tropical Diseases (NTDs), such as American cutaneous leishmaniasis (ACL), remain a public health challenge due to the toxicity of available treatments. Arboviruses, also classified as NTDs, are transmitted by *Aedes aegypti*, whose control using conventional insecticides leads to significant environmental impacts due to their high toxicity. In this context, there is growing interest in safer alternatives, such as formulations based on natural bioactive compounds. In this study, semisolid nanogels containing essential oil of *Duguetia stelechantha* (EOs) were developed, using the copolymers F127, 974P, and water as the sole solvent, aiming at an *eco-friendly* approach. The EO from *D. stelechantha* was extracted by hydrodistillation and characterized by GC-MS, identifying sabinene (41.44%), terpinen-4-ol (17.61%), and *p*-cymene (3.70%) as major constituents, confirmed by ¹H and ¹³C NMR. Different concentrations of EOs were tested in the formulations, with the most stable being that with 1% oil (nGF2002Ds), which was subsequently combined with increasing concentrations of curcumin (CUR), with 0.02% CUR (nGF2002DsC) being the most suitable. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy revealed vibrational changes in the O—H, C—H, and C=O bonds of the nanogel polymeric matrix, indicating interactions with the bioactives (EOs and EOs/Curcumin). Dynamic light scattering (DLS) analysis showed that the presence of these compounds promoted greater colloidal stability, evidenced by the reduction in hydrodynamic diameter (Dh) and the increase in the diffusion coefficient (Dif). Rheological analysis confirmed the increase in viscosity, elasticity, and structural organization of the matrix containing the bioactives. Additionally, differential scanning calorimetry (DSC) indicated thermal stability of the nGF2002Ds nanogel, while morphological analyses using scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) revealed homogeneous morphology and increased surface rigidity after oil incorporation. Due to the successful encapsulation of the bioactives, the nGF2002Ds nanogel exhibited strong larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae, with an LC₅₀ of 97.7 µg/mL and LC₉₀ of 177.7 µg/mL within 24 hours. In the toxicological evaluation using zebrafish (*Danio rerio*), the nGF2002Ds nanogel demonstrated dose-dependent toxicity, with an increase in teratogenic alterations as the oil concentration increased. In an *in vitro* assay against *Leishmania amazonensis*, the nanogel achieved 100% mortality within 24 hours, surpassing the activity of pure EOs (96.5%). These results highlight the potential of nanogels as a sustainable nanotechnological approach to overcome the limitations of natural bioactives in the control and treatment of NTDs.

Keywords: Nanogel development; *Duguetia stelechantha* essential oil; *Aedes aegypti*; Leishmaniasis; Zebrafish (*Danio rerio*).

Integração da Pesquisa aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

A pesquisa apresentada na dissertação “Desenvolvimento de Nanogéis à Base de Bioativos Naturais como Abordagem Inovadora para o Controle e Tratamento de Doenças Tropicais Negligenciadas e Avaliação Toxicológica em Modelo Zebrafish (*Danio rerio*)” está alinhada aos ODS da ONU, especialmente ao ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura) e ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis). O ODS 3 é atendido pela proposta de tratamentos mais seguros e eficazes para a leishmaniose e arboviroses transmitidas pelo *Aedes aegypti*, por meio de nanogéis com óleo essencial de *Duguetia stelechantha* e curcumina. O ODS 9 envolve o uso de nanotecnologia e engenharia de materiais no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados semissólidos (nanogéis). Já o ODS 12 é contemplado por uma abordagem *ecofriendly*, utilizando água como único solvente e copolímeros biocompatíveis (Pluronic F127 e Carbopol 974P), além da valorização de recursos naturais oriundos da biodiversidade maranhense. Já os testes toxicológicos com zebrafish (*Danio rerio*) reforçam o compromisso com a bioética e os princípios dos 3Rs (Redução, Substituição e Refinamento). A pesquisa, portanto, integra inovação científica e responsabilidade ambiental em favor da saúde e sustentabilidade globais.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DTNs - Doenças Tropicais Negligenciadas
LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana
COPs - Compostos organoclorados
CFs - Compostos organofosforados
OEDs - Óleo Essencial de *Duguetia stelechantha*
CUR - Curcumina
nGF2002Ds - Nanogel formulado com 1% de OEDs
nGF2002DsC - nanogel nGF2002Ds + 0,02% de curcumina
F127 - Copolímero Pluronic® F127
974P - Polímero Carbopol® 974P
FTIR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
DLS - Espalhamento Dinâmico de luz
Dh - Diâmetro Hidrodinâmico
Dif - Coeficiente de Difusão
DSC - Calorimetria Diferencial Exploratória
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
AFM - Microscopia de Força Atômica
RMN ¹H / ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono
CG/EM - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CL₅₀ / CL₉₀ - Concentração Letal para 50% e 90%
TFD - Terapia Fotodinâmica
CMC - Concentração Micelar Crítica
TMC - Temperatura Micelar Crítica
PEO / PPO - Poli(óxido de etileno) / Poli(óxido de propileno)
OMS - Organização Mundial da Saúde
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
3Rs - Princípios de Substituição, Redução e Refinamento em pesquisa animal
OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
ZELT - Ensaio de Toxicidade Embrionária-Larval com Zebrafish
hpe - Horas pós exposição

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Duguetia</i> com propriedades biológicas.....	20
Tabela 2 - Análise de CG-EM e CG-FID do OEDs: Índice de retenção (IR), Fórmula molecular (F.M) e porcentagem relativa (%).....	39
Tabela 3 - Deslocamento químico e multiplicidade de RMN de ¹ H e ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) do OE de <i>D. stelechantha</i>	42
Tabela 4 - Diferentes composições (% m/m) do OEDs e água incorporada na base nGF2002 para alcançar F1-F8.....	44
Tabela 5 - Combinação de diferentes composições (% m/m) de CUR e OEDs, com base na formulação nGF2002 para alcançar F1-F4.....	45
Tabela 6 - Medidas de DLS em função da temperatura para os nanogéis nGF2002, nGF2002Ds e nGF2002DsC. As medidas foram realizadas em quintuplicata, e os resultados estão expressos como média ± SD.....	51
Tabela 7 - Eficácia larvicida do nanogel nGF2002Ds contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas, expressa em % de mortalidade (média ± desvio padrão), com n = 10.....	70
Tabela 8 - Atividade sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> do nGF2002Ds e do OEDs puro após 24 horas de interação entre os compostos e os parasitas.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Duguetia stelechantha</i> , uma espécie do gênero <i>Duguetia</i> encontrada no Maranhão (esquerda) e representações das estruturas químicas dos principais constituintes do OE extraído de suas folhas (direita).....	20
Figura 2 - Imagem de <i>Curcuma longa</i> (esquerda), rizomas e extrato de cúrcuma (direita) e estrutura química da molécula de curcumina (abaixo).....	20
Figura 3 - Representação estrutural da organização de micelas em solução (esquerda) e estrutura química do plurônico tribloco A-B-A (direita).....	22
Figura 4 - Processo de extração do OE das folhas de <i>D. Stelechantha</i>	26
Figura 5 - Ilustração esquemática da preparação da formulação nGF2002Ds com uso exclusivo de água como solvente nas etapas experimentais.....	29
Figura 6 - Ilustração esquemática da preparação da formulação nGF2002DsC com uso exclusivo de água como solvente nas etapas experimentais.....	30
Figura 7 - Organização das microplacas durante o ensaio ZELT.....	34
Figura 8 - Cromatograma obtido por CG-EM e CG-FID do OEDs, com tempo de retenção entre 10,0 a 50,0 min e os principais majoritários encontrados.....	38
Figura 9 - Espectros de FTIR ($4000-500\text{ cm}^{-1}$) das amostras: A) OEDs; B) F127; C) Espectro do 974P ($4000-2500^{-1}$); D) Espectro do 974P ($2500-690\text{ cm}^{-1}$).....	47
Figura 10 - Espectros de FTIR ($4000-500\text{ cm}^{-1}$) das amostras: (A) nGF2002, (B) nGF2002Ds e (C) nGF2002DsC. (D) Representação da organização nanoestruturada do material nGF2002DsC.....	48
Figura 11 - Gráfico do coeficiente de Dif ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) em função da T (K): (A) nGF2002, (B) nGF2002Ds e (C) nGF2002DsC.....	51
Figura 12 - Curvas de DSC das amostras nGF2002 e nGF2002Ds.....	53
Figura 13 - Micrografias de MEV do nanogel nGF2002Ds obtidas após liofilização, em ampliações de (A) 1000 $\times$, (B) 500 $\times$ e (C) 250 $\times$. As fissuras e a morfologia heterogênea indicam reorganização da matriz polimérica em resposta ao OE de <i>D. stelechantha</i> durante a secagem.....	54
Figura 14 - Mapas topográficos de AFM do nanogel nGF2002. (A) Setas verdes indicam estruturas esféricas formadas por micelas de F127, com uma altura média de $108,74 \pm 19,41$	

nm ($n = 19$) e setas amarelas indicam regiões planas com uma altura média de $5,92 \pm 3,00$ nm ($n = 15$). (B) e (C) Micrografias 3D expandidas mostrando em detalhes as estruturas esféricas. (D) e (E) Estruturas cúbicas formadas por processos de agregados micelares de F127..... 56

Figura 15 - Mapas de módulo de Young (A) e (B), e forças de adesão (C) e (D) adquiridos para os diferentes domínios observados para o nGF2002.....58

Figura 16 - Mapas topográficos de AFM do nanogel nGF2002Ds. Setas vermelhas indicam estruturas planas de maior espessura, formadas pela presença do OEDs na superfície da matriz nGF2002, com altura média de $11,09 \pm 1,47$ nm ($n = 20$). Setas verdes indicam os domínios esféricos relacionados com as estruturas micelares de F127 com valores médio de altura de $5,41 \pm 2,21$ nm ($n = 15$) e diâmetro médio de $86,01 \pm 15,97$ nm ($n = 15$).....59

Figura 17 - Mapas de módulo de Young adquiridos para o nanogel nGF2002Ds. Os domínios planos superiores, contendo a maior concentração de OEDs mostram valores intermediários de módulo de Young. As regiões mais claras dos mapas correspondem aos domínios de maior rigidez, constituídos pela blenda dos polímeros F127/974P. Setas verdes e vermelhas indicam os domínios micelares vazios (menores valores de módulo) e carregados com OEDs (valores intermediários de módulo), respectivamente..... 60

Figura 18 - Mapas de força de adesão adquiridos para o nanogel nGF2002Ds. As regiões de maior predominância de OEDs mostram valores intermediários de força de adesão em decorrência da característica hidrofóbica dos constituintes químicos. Os maiores valores de força de adesão estão associados aos domínios poliméricos F127/974P devido a predominância de ligações de hidrogênio. Setas verdes e vermelhas indicam os domínios micelares vazios (maiores valores de adesão) e carregados com OEDs (valores intermediários de adesão), respectivamente.....61

Figura 19 - Propriedades reológicas das formulações nGF2002, nGF2002Ds, nGF2002C e nGF2002DsC. (A) Módulos viscoelásticos G' (linha contínua) e G'' (linha tracejada) em função da frequência (f), indicando maior estruturação das formulações com OEDs e curcumina. (B) Viscosidade complexa (η^*) em função da taxa de cisalhamento (γ), evidenciando o comportamento pseudoplástico das amostras, com afinamento mais acentuado nas formulações com ativos bioativos..... 62

Figura 20 - Mortalidade (%) de embriões de zebrafish (*Danio rerio*) expostos ao nanogel nGF2002Ds em diferentes concentrações (C1, C2 e C3), controles negativo (CN), positivo (CP) e ao nanogel base sem OEDs (P). A) Mortalidade acumulada ao longo de 144 hpe e B)

Mortalidade final registrada em 144 hpe. Os dados indicam diferenças significativas entre os grupos (letras diferentes, $p < 0,05$).....	63
Figura 21 - Taxa de eclosão (%) de embriões de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) expostos ao nanogel nGF2002Ds (C1, C2, C3), ao controle negativo (CN), grupo positivo (CP) e ao nanogel base sem OEDs (P). A) Eclosão acumulada até 144 hpe; B) Eclosão final em 144 hpe.....	64
Figura 22 - Avaliação de neurotoxicidade e cardiotoxicidade em embriões de zebrafish (<i>Danio rerio</i>). (A) Movimentos espontâneos em 24 hpe nos grupos CN, CP, C1 e P e (B) Frequência cardíaca em 48 hpe nos grupos CN, CP, P, C1, C2 e C3.....	65
Figura 23 - Alterações morfológicas em embriões e larvas de zebrafish após 48 e 144 hpe, com destaque para edema pericárdico (EP), edema de saco vitelino (ESV) e coágulos observados nos grupos C1 e P, em comparação ao controle negativo (CN: meio E3).....	67
Figura 24 - Alterações teratogênicas em larvas de zebrafish após 144 hpe aos tratamentos CN, CP, C1, C2 e C3. Parâmetros avaliados: edema pericárdico, edema de saco vitelino, lordose, alterações na cabeça, olho pequeno, ausência ocular, alterações na cauda e coágulo sanguíneo.	68
Figura 25 - Concentração letal 50 (CL50) e 90 (CL90) contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> em 24h tratadas com nGF2002Ds: CL50 $97,7 \pm 6,4 \mu\text{g/mL}$ e CL90 $177,7 \pm 18,3 \mu\text{g/mL}$ com R^2 Aj 0,9992.....	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Aplicação da nanotecnologia nos tratamentos da LTA.....	17
2.2 Nanogéis como Ferramenta Inovadora no Combate ao <i>Aedes aegypti</i>	18
2.3 Gênero <i>Duguetia</i>	19
2.4 Curcumina na Terapia Combinada.....	21
2.5 Plurônico Micelar F127.....	23
2.6 Polímero Carbopol 974P.....	24
2.7 Avaliação Toxicológica de nanogéis com o modelo Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	25
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. METODOLOGIA.....	26
4.1 Materiais.....	26
4.2 Coleta e Identificação do Material Vegetal.....	27
4.3 Extração do óleo essencial de <i>Duguetia stelechantha</i> (OEDs) e Rendimento.....	27
4.4 Caracterização Química do OE de <i>Duguetia stelechantha</i> (OEDs).....	28
4.4.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chama (CG-FID).....	28
4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	29
4.5 Desenvolvimento das Formulações com OE de <i>Duguetia stelechantha</i> (OEDs).....	29
4.6 Desenvolvimento das Formulações com OEDs/Curcumina.....	30
4.7 Estabilidade das Formulações.....	31
4.8 Caracterização Espectroscópica.....	32
4.8.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	32
4.8.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	32
4.8.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	32
4.9 Caracterização morfológica.....	33
4.9.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	33
4.9.2 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	33
4.10 Caracterização Reológica.....	34
4.11 Ensaio de Toxicidade com o zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	34
4.11.1 Declaração Ética e Criação de Peixes-Zebra.....	34
4.11.2 Delineamento Experimental.....	35
4.11.3 Avaliação Multibiomarcador.....	36
4.12 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade larvicida contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	36
4.13 Ensaio <i>in vitro</i> Contra Promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	37
4.13.1 Manutenção dos Parasitas.....	37
4.13.2 Delineamento Experimental do Ensaio de Viabilidade em Promastigotas.....	37

4.14 Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 Obtenção e Rendimento do OEDs.....	39
5.2 Análise do OEDs por CG-EM e CG-FID.....	39
5.3 Análise do OEDs por RMN.....	42
5.4 Desenvolvimento de Formulações.....	44
5.4.1 Desenvolvimento de formulações com OEDs/curcumina.....	45
5.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	46
5.6 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	50
5.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	53
5.8 Caracterização morfológica.....	55
5.8.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	55
5.8.2 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	56
5.9 Reologia.....	62
5.10 Avaliação de Toxicidade em Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	64
5.10.1 Mortalidade e taxa de eclosão.....	64
5.10.2 Neurotoxicidade e cardiotoxicidade.....	66
5.10.3 Alterações Morfológicas.....	67
5.11 Ensaios <i>in vitro</i> Contra Larvas de <i>Aedes aegypti</i>	69
5.12 Ensaios <i>in vitro</i> Contra Promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	72
6 CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICE A - Formulações desenvolvidas com OE e OE/Curcumina.....	86
APÊNDICE B - Análise de RMN do OE de <i>D. stelechanta</i>	87
APÊNDICE C - Análise por MEV/EDS da superfície do nanogel nGF2002Ds.....	96

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) compreendem um grupo de infecções que afetam desproporcionalmente populações em situação de vulnerabilidade socioeconômica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (VALENZUELA; AKSOY, 2018). Mais de 1 bilhão de pessoas estão expostas a essas doenças, entre as quais se destacam a leishmaniose, a doença de Chagas e as arboviroses como a dengue (NUNES et al., 2021). Essas enfermidades compartilham fatores estruturais, como deficiência de saneamento básico, modo transmissão vetorial e impacto socioeconômico significativo nas comunidades afetadas (DOS SANTOS, 2023).

A leishmaniose, por exemplo, representa uma das DTNs mais preocupantes, sendo responsável por cerca de 1,3 milhões de casos anuais e até 30.000 mortes no mundo (OLIVEIRA et al., 2022). No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA), uma zoonose transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, possui maior incidência nas regiões Norte e Nordeste, com 95,73% dos casos notificados (MELO et al., 2020). A alta expansão dessa enfermidade é impulsionada por fatores socioambientais, como desmatamento, migração desordenada e maior contato humano com áreas florestais (AUGUSTO et al., 2019).

No Maranhão, a principal espécie que predomina é *Leishmania amazonensis*, que provoca lesões cutâneas (localizadas e disseminadas) e mucocutânea de difícil cicatrização (DOURADO et al., 2024; TORRES-GUERRERO et al., 2017). O tratamento da LTA ainda representa um desafio, principalmente pelas limitações dos medicamentos disponíveis, como o antimoniato de meglumina e a anfotericina B, que apresentam elevada toxicidade, alto custo e resistência parasitária (SUNDAR; SINGH, 2018; PINHEIRO; DE SOUZA, 2022). O antimoniato, embora recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como tratamento de primeira linha, pode causar efeitos adversos como mialgia, náuseas, vômitos, cefaleia, anorexia e, em casos graves, insuficiência renal, pancreatite e falência hepática (MOREIRA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2009).

Já a anfotericina B, devido à sua afinidade pelo colesterol das membranas celulares humanas, está associada à nefrotoxicidade, um efeito adverso dose-dependente, podendo levar a distúrbios hidroeletrólíticos e insuficiência renal aguda (LARABI, 2003; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Além disso, os custos anuais com antimoniato de meglumina e anfotericina B chegam a US\$100.607,68 e US\$769.341,17,

respectivamente, o que evidencia o impacto não apenas clínico, mas também econômico no tratamento (CARVALHO et al., 2021).

Outras DTNs de relevância crescente são as arboviroses transmitidas pelo *Aedes aegypti*, como dengue, zika e chikungunya, cujos surtos frequentes sobrecarregam os sistemas de saúde e geram altos custos sociais e econômicos, especialmente em estados como o Maranhão, onde a dengue apresenta alta incidência e mortalidade (FERREIRA et al., 2018; CUPERTINO et al., 2025). O controle do *A. aegypti* enfrenta desafios, como resistência de inseticidas sintéticos e a capacidade de adaptação do vetor em ambientes urbanos, agravada pela precariedade do saneamento básico (TATHYANA BENETIS PIAU et al., 2022).

Inseticidas como organoclorados (OCPs), organofosforados (OPs), carbamatos e piretróides, embora eficazes, apresentam alta toxicidade para organismos não alvo e riscos ambientais (MOYES et al., 2017). O uso prolongado desses compostos tem contribuído para o surgimento de populações resistentes e representa uma ameaça à saúde humana e ao equilíbrio ecológico (LEEMANS et al., 2019; CHRUSTEK et al., 2018).

Diante disso, o uso de produtos naturais é uma alternativa promissora e inovadora para o controle e tratamento das DTNs (FAUSTINO et al., 2020). O Maranhão abriga uma rica biodiversidade de plantas aromáticas produtoras de óleos essenciais (OEs), como as espécies do gênero *Duguetia*. Esses compostos são amplamente reconhecidos por suas propriedades terapêuticas, incluindo atividades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e citotóxica e por serem menos tóxicos e mais biodegradáveis que agentes sintéticos convencionais (DINCHEVA; BADJAKOV; GALUNSKA, 2023; FAUSTINO et al., 2020).

Outro composto de destaque é a curcumina, com efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antimicrobianos, antitumorais, antidiabéticos e neuroprotetores (RAHAMAN et al., 2020). No entanto, tanto os OEs quanto a curcumina apresentam limitações, como baixa solubilidade e estabilidade, que dificultam sua aplicação. Para superar essas barreiras, estratégias nanotecnológicas como a encapsulação em nanocarreadores têm sido exploradas (GUIDOTTI-TAKEUCHI et al., 2022).

Ainda assim, é essencial avaliar a segurança toxicológica dessas formulações. Nesse contexto, o modelo experimental com zebrafish (*Danio rerio*) é amplamente utilizado na triagem toxicológica de compostos naturais e sintéticos, devido ao seu rápido desenvolvimento embrionário, baixo custo de manutenção, transparência dos embriões e alta homologia genética com humanos (cerca de 70%) (GUILLÉN et al., 2022).

Esse modelo também favorece a aplicação dos princípios dos 3Rs (redução, substituição e refinamento), sendo amplamente utilizado na investigação de efeitos teratogênicos, neurotóxicos, cardiotoxicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos (BAUER et al., 2021; HAKAN ÇELEBI et al., 2023). Dessa forma, o desenvolvimento de nanogéis à base de bioativos naturais, como o óleo essencial de *Duguetia stelechantha* (OEDs) e OEDs/curcumina, apresenta uma abordagem integrada e inovadora para o enfrentamento das DTNs, aliando eficácia terapêutica, segurança e sustentabilidade ambiental.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aplicação da nanotecnologia nos tratamentos da LTA

A LTA apresenta desafios significativos em seus tratamentos, devido à toxicidade dos fármacos convencionais, à crescente resistência parasitária e à baixa adesão dos pacientes às terapias prolongadas (WHO, 2023). Nesse contexto, os sistemas nanoestruturados têm sido amplamente investigados por sua capacidade de melhorar a entrega de medicamentos, reduzir a toxicidade e aumentar a eficácia terapêutica. As nanopartículas por exemplo, possuem propriedades desejáveis, atuando como sistemas de administração eficazes, uma vez que encapsulam o fármaco contra a degradação e direcionando-o de forma mais eficiente às células infectadas (macrófagos), onde os parasitas se replicam (HASSAN et al., 2022).

A incorporação de antimoniais pentavalentes em nanopartículas poliméricas demonstra potencial para reduzir a dose necessária e minimizar efeitos adversos. Um exemplo são as formulações lipídicas da anfotericina B que apresentam um amplo espectro de atividade contra fungos patogênicos, com uma taxa de sucesso significativamente maior e toxicidade reduzida em comparação com suas formas convencionais (NEGRI et al., 2014). Além da anfotericina B lipossomal, outros fármacos, como a miltefosina e derivados de quinolina, têm sido encapsulados em lipossomas com o objetivo de melhorar sua solubilidade em meios biológicos, prolongar sua circulação no organismo e aumentar o direcionamento aos macrófagos infectados (FELIPE FRANCISCO TUON et al., 2022).

Outra classe versátil são as nanopartículas poliméricas, amplamente empregadas devido à sua biocompatibilidade e baixa toxicidade. Sistemas formulados com polímeros biodegradáveis, como o PLGA (poli(ácido láctico-co-glicólico)), têm sido utilizados para encapsular fármacos com atividade antileishmania, promovendo liberação controlada, mantendo concentrações terapêuticas prolongada e diminuindo a frequência de doses, o que pode melhorar a adesão ao tratamento (LU et al., 2023; KATEBI et al., 2024). No entanto, a

nanotecnologia vai além da otimização de fármacos existentes, sendo também empregada no desenvolvimento de formulações para novas moléculas com potencial leishmanicida, muitas vezes com baixa solubilidade e biodisponibilidade (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017).

Nesse contexto, uma estratégia complementar é a prospecção de compostos bioativos extraídos de plantas medicinais, como proposto neste estudo. Produtos naturais têm demonstrado atividade significativa frente à *Leishmania*, devido à presença de metabólitos secundários com diversidade farmacológica, encontrados em diferentes partes das plantas, como raízes, frutos, folhas, caules e sementes (GUTIÉRREZ-REBOLLEDO; DRIER-JONAS; JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017; RODRIGUES et al., 2023).

2.2 Nanogéis como Ferramenta Inovadora no Combate ao *Aedes aegypti*

A crescente preocupação com as doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*, como dengue, zika, chikungunya, tem impulsionado a busca por novas estratégias de controle vetorial. As estratégias convencionais, como o uso de inseticidas têm demonstrado limitações, devido à resistência dos mosquitos e aos impactos ambientais (CUPERTINO et al., 2025).

Nesse cenário, a nanotecnologia emerge como uma área promissora, com destaque para a aplicação de nanogéis como uma solução inovadora e potencialmente mais eficaz e sustentável. Os nanogéis são materiais poliméricos com estrutura tridimensional, geralmente hidrofílicos, que podem encapsular e liberar de forma controlada diversas substâncias. Sua escala nanométrica confere propriedades únicas, como alta área superficial, capacidade de penetração em barreiras biológicas e estabilidade aprimorada (BOSE et al., 2021).

No combate ao *Aedes aegypti*, o interesse nos nanogéis reside na sua capacidade de atuar como sistemas de entrega para larvicidas, repelentes, ou até mesmo agentes de controle biológico, otimizando a ação dessas substâncias e minimizando efeitos adversos. Nanogéis têm sido explorados como sistemas eficazes para encapsular compostos naturais, permitindo a liberação controlada do ativo no ambiente aquático onde se desenvolvem as larvas de *Aedes aegypti* (MARQUES et al., 2024; RIDA ZAINAB et al., 2024).

Estudos indicam que nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial de *Stylosanthes guianensis* apresentaram significativa atividade larvicida contra o vetor, evidenciando seu potencial no controle biológico (TACIANO PERES FERREIRA et al., 2019). De forma semelhante, nanocompósitos à base de alginato de sódio e quitosana foram utilizados como carreadores de cinamaldeído, composto hidrofóbico extraído da canela, demonstrando eficácia larvicida comparável à do temefós comercial (WONG et al., 2020).

Além disso, nanogéis formulados com OE de citronela, mostraram-se eficazes na repelência de mosquitos, promovendo ação prolongada e maior aceitação por parte dos usuários (AGUS SUBAGIYO et al., 2024). Essas estratégias de encapsulamento protegem os compostos bioativos da degradação ambiental e favorecem sua interação com as larvas, aumentando a mortalidade do vetor. Trata-se, portanto, de uma abordagem promissora para o controle prolongado de mosquitos, com baixo risco para organismos não-alvo (MAYILSAM Y et al., 2025).

2.3 Gênero *Duguetia*

O gênero *Duguetia* (família Annonaceae) é composto por cerca de 100 espécies, das quais 67 estão registradas no Brasil, sendo 29 endêmicas (SANTOS et al., 2022). As espécies desse gênero ocorrem em diversos ecossistemas tropicais da América Latina, com maior diversidade registrada na região Amazônica, seguida pela Mata Atlântica (BAZANTE; PAUL; REGINA, 2023). No Nordeste brasileiro, estão presentes em vários estados, incluindo o Maranhão, e adaptadas a diferentes condições ecológicas, como em florestas de terra firme, ambientes não inundáveis e com elevada diversidade vegetal (LOBÃO, 2024; VICENTINI, 2024).

As espécies de *Duguetia* possuem relevância etnofarmacológica, sendo tradicionalmente utilizadas por comunidades locais para tratar distúrbios gastrointestinais, reumatismos, doenças de pele, disfunções renais e febres (SOUSA et al., 2004; DA SILVA ALMEIDA et al., 2010). Ainda que os estudos farmacológicos sistematizados sejam limitados, diferentes pesquisas vêm destacando suas propriedades medicinais com base na composição dos OEs, ricos em terpenos, como monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados (MAFFEI; GERTSCH; APPENDINO, 2011).

A diversidade química desses óleo confere ao gênero uma ampla gama de bioatividades, como propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva e citotóxica (VIEIRA et al., 2016; DA SILVA ALMEIDA et al., 2010). Por exemplo, o OE de *Duguetia furfuracea* demonstrou atividade antifúngica contra cepas de *Candida*, além de atividades antioxidantes e anti-inflamatórias relevantes (PINHO et al., 2016; DO SANTOS et al., 2018). Já *Duguetia lanceolata* apresentou efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios em modelos murinos, atribuídos à presença de compostos como o espatulenol (SOUSA et al., 2004)(VIEIRA et al., 2016).

Essa mesma espécie também demonstrou efeitos inseticidas frente à *Spodoptera frugiperda*, evidenciando seu potencial para o controle vetorial por meio de repelentes naturais (ROSETTI et al., 2023). Outras espécies do gênero também se destacam: *D. gardneriana* apresentou ação antimicrobiana e citotóxica (DA SILVA ALMEIDA et al., 2010); *D. chrysocarpa*, atividade antinociceptiva (ALMEIDA et al., 2012); *D. pycnastera*, potencial anticancerígeno (COSTA et al., 2022); e *D. echinophora*, ação citotóxica (CASCAES et al., 2022). Esses dados estão resumidos na Tabela 1.

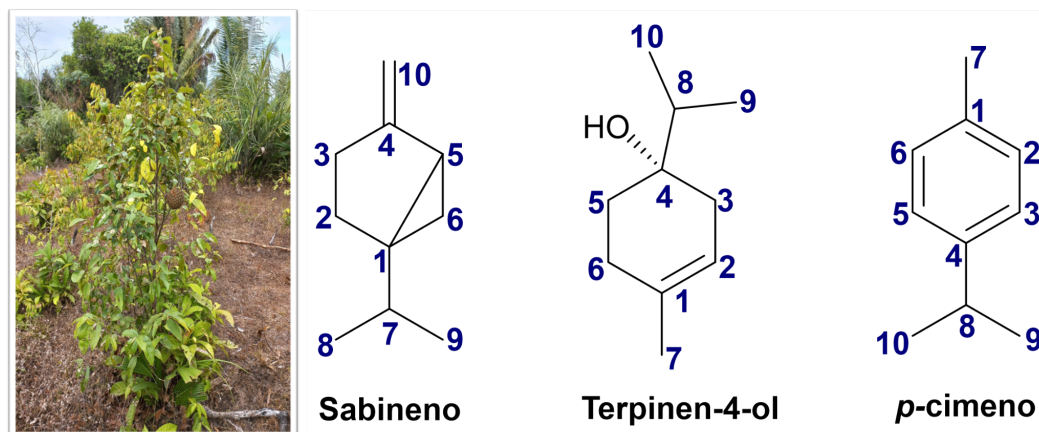
Tabela 1 - Espécies de *Duguetia* com propriedades biológicas.

ESPÉCIE	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>D. gardneriana</i>	Antimicrobiana e citotóxica	Da Silva Almeida et al. (2010)
<i>D. lanceolata</i>	Antimicrobiana, citotóxica e inseticida	Sousa et al. (2012); Rosetti et al. (2023)
<i>D. chrysocarpa</i>	Antinociceptiva	Almeida et al. (2012)
<i>D. pycnastera</i>	Anticancerígena	Costa et al. (2022)
<i>D. furfuracea</i>	Anti-inflamatória, antinociceptiva e antifúngica	Saldanha et al. (2021); Pinho et al. (2016)
<i>D. echinophora</i>	Citotóxica	Cascaes et al. (2022)

D. (Duguetia)

Esses resultados apontam o gênero *Duguetia* como uma importante fonte de metabólitos bioativos, com destaque para os óleos essenciais como principais responsáveis pelas atividades observadas. Nesse contexto, destaca-se *Duguetia stelechantha*, uma espécie ainda pouco estudada, conhecida popularmente como “amejun”, “ata do mato” e “ata brava”, cuja composição rica em terpenos torna seu OE o foco central deste estudo (Figura 1).

Figura 1 - *Duguetia stelechantha*, uma espécie do gênero *Duguetia* encontrada no Maranhão (esquerda) e representações das estruturas químicas dos principais constituintes do OE extraído de suas folhas (direita).

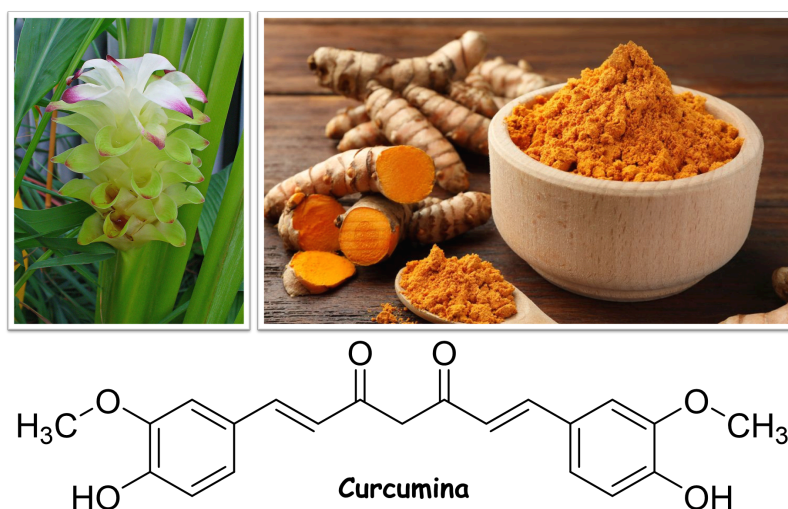


Fonte: Autora (2025).

2.4 Curcumina na Terapia Combinada

A cúrcuma é uma planta da família do gengibre (*Zingiberaceae*), originária da Índia e apresenta um grande valor medicinal, como cicatrização de feridas e distúrbios dermatológicos (KOTHA; LUTHRIA, 2019). A curcumina (CUR) é o principal polifenol encontrado no rizoma da *Curcuma longa* (açafrão-da-terra) e em outras espécies (*Curcuma* spp.) (Figura 2).

Figura 2 - Imagem de *Curcuma longa* (esquerda), rizomas e extrato de cúrcuma (direita) e estrutura química da molécula de curcumina (abaixo).



Fonte: Autora (2025).

A curcumina apresenta fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_6$, peso molecular de 368,39 g/mol e momento dipolar de 10,77 D no estado fundamental. É um polifenol constituído por dois grupos fenólicos (O-metoxi) aromáticos, uma porção β -dicarbonila e uma cadeia de sete carbonos contendo frações enona, o que favorece sua redistribuição eletrônica e ressonância de elétrons π , fundamentais para suas propriedades fotofísicas e fototerapêuticas (XU et al., 2018). Dessa forma, a curcumina destaca-se como fotossensibilizador natural, absorvendo luz na faixa de 300 a 500 nm, sendo potencialmente aplicável na terapia fotodinâmica (TFD) (AGNIESZKA WOLNICKA-GLUBISZ; WISNIEWSKA-BECKER, 2023).

Apesar do amplo potencial terapêutico conferido por sua estrutura com grupos fenólicos e sistema β -dicetônico conjugado, que lhe garantem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e fotossensibilizadoras (XU et al., 2018), a curcumina apresenta baixa solubilidade em água, rápida metabolização e instabilidade em meio básico, o que limita sua biodisponibilidade e eficácia clínica (PRIYADARSINI, 2009; AMAROLI et al., 2024). Ela é solúvel em solventes polares como DMSO, metanol, etanol e acetonitrila, mas pouco em água, e sofre rápida degradação e hidrólise em pH alcalino (PRIYADARSINI, 2009).

Para superar essas limitações, estratégias como a formulação em nanoescala têm sido amplamente estudadas, já que sistemas nanotecnológicos favorecem a proteção dos ativos contra degradação, além de aumentar sua solubilidade e biodisponibilidade (GUIDOTTI-TAKEUCHI et al., 2022). Nesse contexto, a terapia combinada surge como abordagem promissora para potencializar os efeitos da curcumina. Por exemplo, sua associação com quimioterápicos como paclitaxel aumenta a atividade antitumoral e reduz resistência celular, principalmente em câncer de mama e pulmão (RAHAMAN et al., 2020). Combinações com radioterapia também demonstraram efeitos cardioprotetores e maior resposta tumoral (PRIYADARSINI, 2014).

Além disso, a curcumina exerce ação imunomoduladora, atuando sobre linfócitos T, células NK e macrófagos, e sua combinação com imunoterápicos, como anti-PD-1 e anti-CTLA-4, tem potencial para superar mecanismos de resistência e melhorar a eficácia clínica (PAUL; SA, 2021). Do mesmo modo, ela influencia o microambiente tumoral, favorecendo a infiltração de células imunes e ampliando a resposta antitumoral (GALINARI et al., 2022).

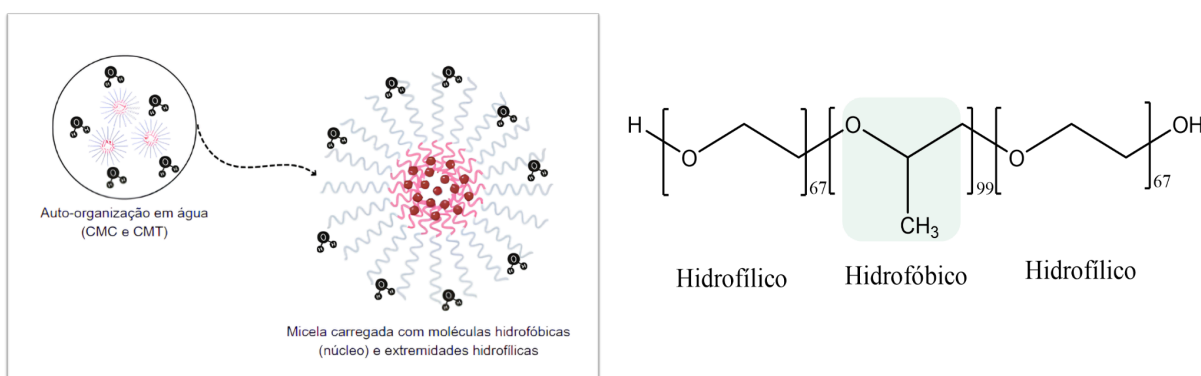
Diante disso, este trabalho propõe a aplicação inovadora da curcumina como fotossensibilizador em sistemas nanoestruturados, como nanogéis contendo óleo essencial de *Duguetia stelechantha* (OEDs), visando o desenvolvimento de uma terapia combinada eficaz

contra a LTA. A estratégia busca potencializar a ação leishmanicida pela sinergia entre os efeitos citotóxicos do óleo essencial e a fotocitotoxicidade da curcumina ativada por luz, ao mesmo tempo em que busca superar suas limitações farmacocinéticas, por meio da encapsulação em sistemas poliméricos inteligentes à base de F127 e 974P.

2.5 Plurônico Micelar F127

Os pluronic® são copolímeros tribloco do tipo A-B-A compostos por unidades de poli(óxido de etileno) (PEO) e poli(óxido de propileno) (PPO), formando cadeias do tipo PEO-PPO-PEO (KHALIQ et al., 2023). Essas estruturas apresentam comportamento anfifílico, permitindo sua auto-organização espontânea em micelas em meio aquoso acima da concentração micelar crítica (CMC) e da temperatura micelar crítica (TMC) (DI SPIRITO et al., 2024). A porção hidrofóbica (PPO) forma o núcleo micelar, capaz de incorporar compostos pouco solúveis em água, enquanto as extremidades hidrofílicas (PEO) estabilizam a micela em solução (YU et al., 2021). A Figura 3 ilustra essa formação micelar e destaca a estrutura química do copolímero com segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos.

Figura 3 - Representação estrutural da organização de micelas em solução (esquerda) e estrutura química do plurônico tribloco A-B-A (direita).



Fonte: Autora (2025).

Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades termossensíveis, o Pluronic® F127 é amplamente utilizado no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, especialmente para aplicações tópicas e injetáveis (REY-RICO; CUCCHIARINI, 2018). Em baixas temperaturas, o F127 apresenta comportamento líquido, mas, ao atingir a temperatura de transição sol-gel, sofre transição para o estado gel, o que favorece sua aplicação em sistemas de liberação sustentada de fármacos (SHAARANI; HAMID; MOHD KAUS, 2017).

Esse comportamento é explorado em formulações avançadas, como no desenvolvimento da SP1049C, composta por micelas mistas de Pluronic® F127 e L61 carregando doxorubicina, voltadas ao tratamento de adenocarcinomas multirresistentes. Estudos clínicos de fase II demonstraram eficácia com perfil de segurança satisfatório (FEITOSA et al., 2019; CACACCIO et al., 2020).

Outro exemplo clínico é o Mediclore®, um gel cirúrgico baseado em Pluronic® (F38/F120), utilizado em procedimentos oncológicos, atualmente avaliado em ensaios clínicos de fase III para prevenção de aderências pós-operatórias (PARK et al., 2022). Além disso, o Pluronic® F127, sob o nome comercial LeGoo®, é aprovado pela FDA para oclusão temporária de vasos sanguíneos em procedimentos cirúrgicos, destacando-se por sua reversibilidade térmica e segurança clínica (KRETZ et al., 2012).

Em nanomedicina, seu uso como nanocarreador tem sido amplamente explorado, especialmente pela capacidade de encapsular compostos bioativos, modular sua liberação e favorecer o direcionamento ao local de ação, com destaque para aplicações em terapias tópicas, oncológicas e antimicrobianas (DHILIP KUMAR; ABRAHAMSE, 2021). Dessa forma, os sistemas baseados em Pluronic® F127 representam uma plataforma versátil e validada para o desenvolvimento de nanoformulações com incorporação de bioativos naturais, como a desenvolvida neste trabalho.

2.6 Polímero Carbopol 974P

Carbopol®, também conhecido como carbômero, é um polímero sintético amplamente utilizado na indústria farmacêutica há mais de cinco décadas devido à sua versatilidade como agente gelificante e estabilizante (LUBRIZOL CORPORATION, 2022). Sua principal característica é a capacidade de formar géis em resposta ao aumento do pH, processo no qual ocorre a ionização dos grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$ para $-\text{COO}^-$), gerando repulsão eletrostática entre as cadeias e promovendo a expansão da matriz polimérica com o aumento da viscosidade (AGUILAR-LÓPEZ; VILLAFUERTE-ROBLES, 2016).

Esse comportamento responsivo ao ambiente torna o carbopol um polímero inteligente, indicado para sistemas de liberação controlada, especialmente em formulações tópicas, oftálmicas e cosméticas (SUHAIL; WU; MINHAS, 2020). Dentre suas variantes, destaca-se o Carbopol® 974P, conhecido por sua biocompatibilidade, estabilidade, capacidade de retenção de água e por conferir boa consistência e liberação prolongada de fármacos (MAHMOOD et al., 2023; NGUYEN; CHIEN; CUONG, 2023).

Apesar da eficácia farmacotécnica, versões mais antigas, como 934 NF e 940 NF, foram sintetizadas com benzeno, um solvente cancerígeno que limitou suas aplicações (LUBRIZOL CORPORATION, 2022). Atualmente, formulações mais seguras utilizam carbômeros sintetizados com solventes menos tóxicos, como o acetato de etila, conforme indicado pela Farmacopeia Europeia. Dentro deste grupo, destacam-se os tipos 974P NF, 971P NF e 71G NF, que aliam desempenho tecnológico à segurança para uso humano (YOUNES et al., 2021; SARFRAZ et al., 2022).

2.7 Avaliação Toxicológica de nanogéis com o modelo Zebrafish (*Danio rerio*)

Com o avanço de nanogéis em diversas aplicações, como terapias e diagnósticos, torna-se essencial avaliar rigorosamente sua toxicidade, a fim de garantir segurança, viabilidade clínica e ambiental (PATRA et al., 2018). Apesar de sua natureza polimérica apresentarem baixa toxicidade em comparação a outras nanopartículas, suas propriedades únicas, como tamanho, carga superficial, composição e capacidade de inchaço, influenciam diretamente suas interações biológicas e perfis toxicológicos (ANOOJ et al., 2021).

Nesse contexto, o modelo Zebrafish (*Danio rerio*) tem emergido como ferramenta valiosa para investigação toxicológica de nanomateriais. Estudos com zebrafish, envolvendo exposições a nanopartículas de prata (AgNPs) causaram malformações, estresse oxidativo e alterações genéticas; nanopartículas de óxidos de zinco (ZnO) e cobre (CuO) provocaram atraso na eclosão e aumento da mortalidade; e óxidos de ferro fluorescentes (Fe₃O₄) induziram cardiotoxicidade (CHINMAYA MUTALIK et al., 2024; JIA et al., 2019).

Esses efeitos variam conforme as características das partículas e fatores ambientais que influenciam sua biodisponibilidade. Além disso, a modificação superficial dos nanomateriais é determinante na toxicidade. Polímeros como polietilenoglicol (PEG) e álcool polivinílico (PVA), frequentemente utilizados para melhorar biocompatibilidade, também podem causar toxicidade significativa em embriões de zebrafish, incluindo malformações e aumento da mortalidade (ZICARELLI et al., 2024).

Estudos com OEs utilizando zebrafish também revelaram efeitos adversos dose-dependentes, como malformações embrionárias, alterações comportamentais e toxicidade cardíaca, mesmo em concentrações consideradas seguras (WANG et al., 2023). Similarmente, derivados de celulose funcionalizados, isolados e combinados com curcumina, mostraram perfis toxicológicos variados; o triacetato de celulose (CTA) aumentou a frequência cardíaca, enquanto a curcumina em altas concentrações reduziu a sobrevivência

embrionária (SILVA et al., 2025). Esses achados ressaltam a importância de avaliar a toxicidade das formulações como um todo, incluindo recobrimentos poliméricos e bioativos naturais, que, apesar de sua origem, podem apresentar efeitos tóxicos relevantes. Neste estudo, foram avaliados nanogéis com diferentes concentrações de OEDs para caracterizar uma concentração segura.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver nanogéis *ecofriendly* contendo OEDs e sua combinação com curcumina, utilizando os copolímeros F127 e 974P na formulação de sistemas semissólidos nanoestruturados, visando avaliar seu potencial como estratégia sustentável, eficaz e de baixo custo para o controle e tratamento de DTNs.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a extração do OEDs coletado no Município de São Bento, MA;
- Caracterizar o OEDs por RMN de ^1H e ^{13}C e CG/EM;
- Desenvolver formulações semissólidas utilizando sistemas *drug-delivery* com F127, 974P e água (%m/m), para encapsular o OE de *D. stelechantha* (OEDs);
- Avaliar a estabilidade das formulações desenvolvidas para selecionar nGF2002Ds;
- Combinar a formulação nGF2002Ds com curcumina para obtenção do nGF2002DsC;
- Caracterizar as formulações nGF2002Ds e nGF2002DsC por FTIR, DLS e reologia;
- Caracterizar a formulação com OEDs por DSC, MEV e AFM;
- Avaliar *in vitro* a atividade da formulação nGF2002Ds contra larvas de *Aedes aegypti*;
- Avaliar a toxicidade da formulação nGF2002Ds no modelo zebrafish (*Danio rerio*);
- Avaliar *in vitro* a atividade leishmanicida das formulações nGF2002Ds e nGF2002DsC frente à *Leishmania* (L.)

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

Foram utilizados copolímero tribloco Pluronic® F127 (poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno), MM=12.600 g/mol; (OE)₉₉(PO)₆₇(EO)₉₉), água ultrapura, sulfato de sódio anidro, clorofórmio deuterado (CDCl₃) e mistura padrão de alcanos, todos adquiridos da Merck (Rahway, NJ, EUA). A curcumina

($\geq 80\%$, obtida de *Curcuma longa*) também foi adquirida da Merck. O polímero Carbopol® 974P NF foi fornecido pela IMCD Brasil (São Paulo, SP, Brasil).

4.2 Coleta e Identificação do Material Vegetal

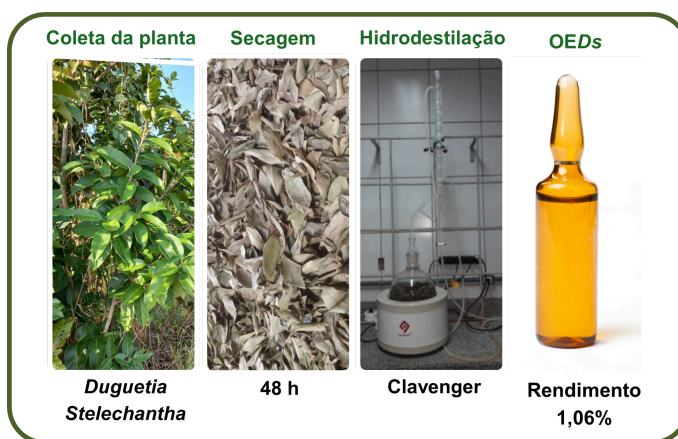
Folhas da espécie *Duguetia stelechantha* foram coletadas em setembro de 2023 na região da Baixada Maranhense (São Bento, MA, Brasil), em área de terra firme, nas coordenadas 02°43'56.8"S; 044°51'27.9"W. A coleta seguiu os critérios estabelecidos para a proteção da biodiversidade (registro AA3D4EE). Sua identificação botânica está catalogada no Herbário Rosa Mochel (São Luís, MA, Brasil), sob número de registro (SLUI 005612).

As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), onde foi determinado o rendimento do óleo. Além disso, o teor de umidade foi quantificado por infravermelho, utilizando um analisador de umidade modelo IV 2500 (GEHK). Para essa análise, foram usados 2 g do material vegetal seco, submetido a 115 °C por 30 minutos, com taxa de secagem ajustada para 0,01%/min.

4.3 Extração do óleo essencial de *Duguetia stelechantha* (OEDs) e Rendimento

O OE de *Duguetia stelechantha* foi obtido pelo método de hidrodestilação, que se destaca pela simplicidade operacional e baixo custo, pois utiliza apenas água e vapor para extrair compostos bioativos (FAGBEMI; AINA; OLAJUYIGBE, 2021). O processo foi realizado com o aparelho Clevenger, acoplado a um balão de fundo redondo aquecido por manta elétrica, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Processo de extração do OE das folhas de *D. Stelechantha*.



Fonte: Autora (2025).

Inicialmente, folhas de *Duguetia stelechantha* (300g) foram secas em temperatura ambiente por 48 horas e transferidas para o balão de fundo redondo, ao qual foram adicionados 2,5 L de água destilada. A extração foi conduzida por 2,5 horas após o início do refluxo. Após esse período, o óleo obtido foi recolhido e centrifugado a 3500 rpm por 10 min a 25 °C. Sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) foi adicionado para eliminar qualquer vestígio de água e as amostras foram armazenadas em ampolas de vidro âmbar sob refrigeração a 4 °C.

A densidade do óleo foi determinada com um picnômetro de 1,0 mL previamente seco e tarado. Amostras do OE de *D. stelechantha* foram pesado em triplicata a 25 °C, e a densidade foi calculada com base na razão entre a massa (mOE) e o volume do óleo (VOE), conforme a equação 1. A densidade obtida foi de 0,879 g/mL, valor próximo ao reportado por Barata et al. (2023), de 0,869 g/mL. A densidade experimental foi utilizada como parâmetro para o cálculo do rendimento do OEDs, expresso em porcentagem, conforme apresentado na equação 2.

$$\rho_{OE} = \frac{m_{OE}}{VOE} \quad \text{equação 1}$$

$$Rendimento = \frac{V_{oe} \times \rho_{oe}}{M_{amostra} - (M_{amostra} \times \%Umidade)} \times 100 \quad \text{equação 2}$$

Onde,

VOE = Volume do óleo essencial extraído;

ρ_{OE} = Densidade do óleo essencial;

$m_{amostra}$ = Massa da amostra vegetal seca;

%Umidade = Umidade da amostra vegetal seca.

4.4 Caracterização Química do OE de *Duguetia stelechantha* (OEDs)

4.4.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chama (CG-FID)

A CG-EM foi empregada para identificar e quantificar os constituintes do OEDs, em um aparelho CGEM/QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com coluna capilar ZB-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). A quantificação relativa foi realizada por CG-FID, em um equipamento QP5050A (Shimadzu), com coluna DB-5MS, sob as mesmas condições cromatográficas de análise por CG-EM. O programa de temperatura da coluna foi iniciado em 40 °C até 280°C, com aumentos graduais de 2 °C/min.

As temperaturas do injetor e do detector de íons foram de 250 °C e 280 °C, respectivamente. O hélio foi empregado como gás de arraste, com fluxo constante de 1,0 mL/min. Amostras de 10 mg/mL, diluídas em diclorometano (CH₂Cl₂), foram injetadas com uma razão de 1:50, conforme estudos anteriores (NASCIMENTO et al., 2017). A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros de massa e dos índices de retenção (IR) com dados disponíveis na literatura, e os IRs calculados com base na co-injeção de uma série homóloga de *n*-alcanos (C₈–C₁₈) (BIZZO et al., 2020).

4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise de RMN foi empregada para a caracterização estrutural dos compostos presentes no OEDs. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram adquiridos em um espectrômetro (BRUKER AVANCE III HD), operando a 11,75 Teslas, com frequências de 500,13 para RMN de ¹H e 125,76 MHz para ¹³C. Os deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm, foram referenciados ao tetrametilsilano (TMS). As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl₃) e os sinais obtidos foi indicada por: s (singlete), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), t (triplete), dt (duplo triplete) e m (multiplete), com as constantes de acoplamento (J) registradas em Hertz (Hz).

4.5 Desenvolvimento das Formulações com OE de *Duguetia stelechantha* (OEDs)

As formulações foram preparadas conforme descrito por Marques et al. (2024) e Campos et al. (2025). Plurônico F127 (20% m/m) foi adicionado gradualmente à água destilada resfriada (5–10 °C) sob agitação moderada. Em seguida, o polímero 974P (0,2% m/m) foi incorporado lentamente, mantendo-se a agitação até completa homogeneização. O OE de *D. stelechantha* foi adicionado gota a gota, sob agitação contínua por 30 min. A formulação final foi mantida sob refrigeração (5 °C) por 12 horas e, após os testes de estabilidade acelerada, a amostra selecionada para as análises seguintes foi denominada nGF2002Ds (Figura 5).

Figura 5 - Ilustração esquemática da preparação da formulação nGF2002Ds com uso exclusivo de água como solvente nas etapas experimentais.



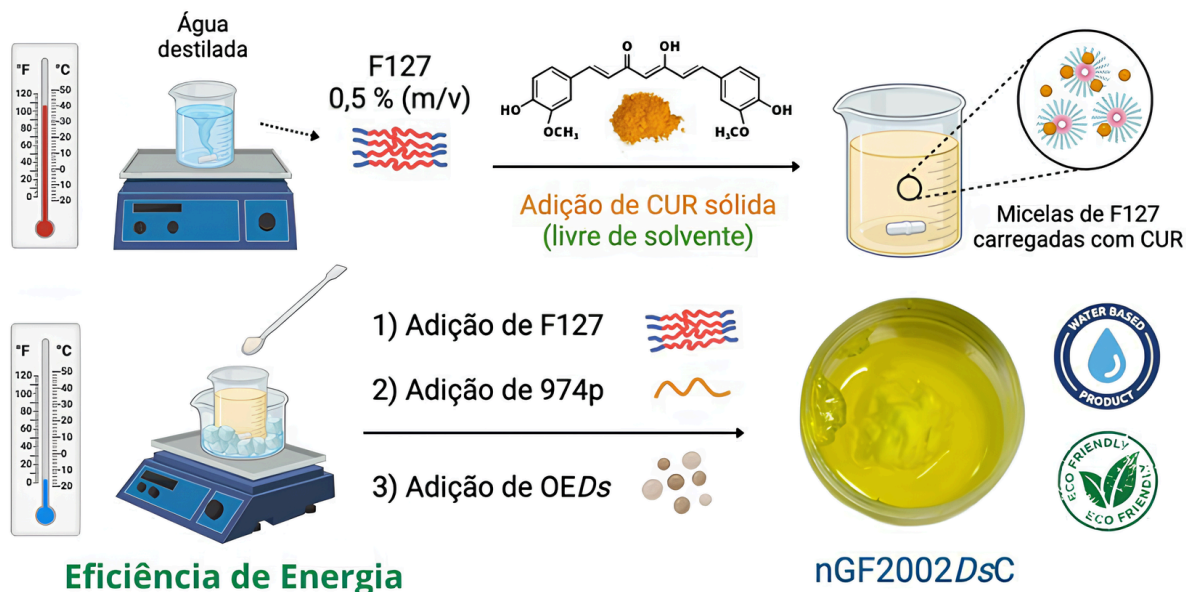
Fonte: Autora (2025).

4.6 Desenvolvimento das Formulações com OEDs/Curcumina

Inicialmente, 0,5% (m/v) do Plurônico F127, foi dissolvido em água destilada aquecida a 60 °C para solubilizar a curcumina (CUR) em duas concentrações diferentes (0,02% e 0,04% m/v). Após resfriamento, o restante do copolímero F127 foi adicionado gradualmente, sob agitação constante, em água destilada refrigerada (5–10 °C), até atingir a concentração total utilizada numa formulação (20% m/v).

Em seguida, o polímero 974P (0,2% m/m) foi incorporado lentamente ao sistema. O OEDs foi então adicionado gota a gota sob agitação contínua por 30 min. As formulações foram armazenadas sob refrigeração (5 °C) por 12 horas e, após testes de estabilidade acelerada, a mais estável foi selecionada e identificada como nGF2002DsC (Figura 6).

Figura 6 - Ilustração esquemática da preparação da formulação nGF2002DsC com uso exclusivo de água como solvente nas etapas experimentais.



Fonte: Autora (2025).

4.7 Estabilidade das Formulações

Para avaliar a influência da temperatura na estabilidade física das formulações, foram realizados testes de estabilidade acelerada, conforme diretrizes do Guia de Estabilidade de Cosméticos da ANVISA e da Farmacopeia dos EUA (DA COSTA et al., 2024). Alíquotas de 1 mL da formulação foram submetidas à centrifugação de 3000 rpm por 30 min a 25 °C. Durante o período experimental, as amostras foram expostas a 7 ciclos térmicos alternados de 24 horas a 25 °C (temperatura ambiente) e 24 horas a 5 °C (refrigeração controlada), totalizando 14 dias. As características organolépticas, incluindo aspecto, cor e odor, foram monitoradas diariamente ao longo do estudo.

Posteriormente, foi realizada uma avaliação em longo prazo sob refrigeração (5 °C) por 180 dias para confirmar a preservação dessas características, indicando a adequação da formulação ao armazenamento em condições controladas. Esse protocolo foi aplicado tanto à formulação contendo o OEDs quanto à formulação combinada com OEDs/curcumina, permitindo a comparação de estabilidade sob as mesmas condições experimentais.

4.8 Caracterização Espectroscópica

4.8.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Para elucidar os principais grupos funcionais dos materiais analisados, empregou-se espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em um espectrômetro Shimadzu FTIR Tracer-100 (Shimadzu). As amostras sólidas (F127, 974P, nGF2002, nGF2002Ds e nGF2002DsC) foram liofilizadas e pastilhadas com brometo de potássio (KBr), enquanto o OEDs foi analisado por FTIR-ATR. Os espectros foram registrados no Infravermelho Médio (MIR), em uma faixa espectral de 400-4.000 cm^{-1} sob apodização (Happ-Genzel), resolução espectral de 8 cm^{-1} e temperatura ambiente com 50 varrimentos.

4.8.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi empregada para determinar o tamanho das partículas e o índice de polidispersidade (PDI) das amostras nGF2002, nGF2002Ds e nGF2002DsC, utilizando o LitesizerTM 500 (Anton Paar GmbH) (Módulo BM 10). Os diâmetros hidrodinâmicos (D_h) foram determinada em água ultrapura, nas temperaturas de 25, 32, 37 e 45 °C (298, 305, 310 e 318 K), por meio de um laser semiconductor de 40 mW com comprimento de onda de 658 e uma cubeta de quartzo de 3,0 mL, sendo todas as medições executadas em triplicata (média $\pm$ DP). Os valores do coeficiente de difusão (Dif) foram obtidos com base nos valores de D_h , a partir da equação de Stoke-Einstein, que descreve o movimento browniano das partículas esféricas em solução, conforme a equação 3:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \pi \eta R_H} \quad (3)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann ($1,3806503 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), T a temperatura absoluta (K) e η a viscosidade do meio (Pas^{-1}) e R_H o raio hidrodinâmico.

4.8.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para monitorar os eventos térmicos das amostras nGF2002 e nGF2002Ds, como fusão, cristalização e degradação, foram realizadas análises por calorimetria exploratória diferencial (DSC), utilizando um equipamento DSC-60H (Shimadzu, Japão). Amostras de 10 mg cada, foram pesadas em recipientes de alumínio e submetidas a uma atmosfera de nitrogênio ($100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). As curvas térmicas foram obtidas com taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, no intervalo de temperatura de 30 a 60 °C.

4.9 Caracterização morfológica

4.9.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para verificar a morfologia da formulação nGF2002Ds, foi utilizado a microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um equipamento Hitachi TM 3030 (Hitachi High-Technologies Corporation, Japão). A amostra foi previamente congelada em nitrogênio líquido (−196 °C) e liofilizada por 24 horas em um liofilizador Thermo Micro Modulyo (Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, EUA).

Posteriormente, foi revestida com uma fina camada metálica utilizando um BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater (Balzers, Liechtenstein). A formulação foi ainda analisada por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) acoplada ao sistema MEV. As imagens foram obtidas com ampliações de 250×, 500× e 1000×.

4.9.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A caracterização nanoestrutural e nanomecânica das amostras nGF2002 e nGF2002Ds foi realizada por microscopia de força atômica (AFM), utilizando um microscópio Multimode 8 (Bruker, Santa Barbara, CA, EUA), operando no modo PeakForce Quantitative Nanomechanics (PeakForce QNM). As análises utilizaram sondas cônicas, modelo XYZ (Bruker), com constante elástica nominal de 0,4 N/m e raio de curvatura de 2 nm.

As imagens foram adquiridas com resolução de 256×256 pontos e frequência de varredura de 0,5 Hz. O cantilever foi operado a 1 kHz abaixo de sua frequência de ressonância, permitindo a aquisição de curvas de força–deslocamento a cada ciclo de oscilação. Simultaneamente, as propriedades mecânicas locais, incluindo o módulo de Young e a força de adesão, foram mapeadas e o módulo de Young foi calculado a partir das curvas força–deslocamento com base no modelo de Derjaguin–Muller–Toporov (DMT), utilizando a equação 4:

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

em que F é a força aplicada, E é o módulo de Young, ν é o coeficiente de Poisson, R é o raio da ponta da sonda e δ é a profundidade de indentação. A força de adesão foi determinada a partir do valor mínimo de força registrada durante o ciclo de retração da sonda.

4.10 Caracterização Reológica

Para avaliar o comportamento mecânico das formulações (nGF2002, nGF2002C, nGF2002Ds e nGF2002DsC), foram realizadas análises reológicas em um reômetro oscilatório Malvern Kinexus, utilizando geometria placa-placa para os ensaios oscilatórios e cone-placa para as curvas de fluxo. Os dados foram adquiridos por meio do software rSpace® e os ajustes de modelos e análises estatísticas conduzidos no GraphPad Prism®.

Para os ensaios de variação de temperatura, foram monitorados o módulo de armazenamento (G'), o módulo de perda (G'') e a viscosidade aparente (η) no intervalo de 0 a 50 °C, a uma frequência constante de 1 Hz e tensão de cisalhamento de 1 Pa. Na variação de frequência, G' e G'' foram registrados entre 0,1 e 10 Hz, à temperatura de 32,5 °C, sendo os dados ajustados ao modelo da lei de potência (Equação 5):

$$G' = S \cdot f^m \quad (5)$$

em que S representa a força do gel e m o expoente de potência, parâmetros que indicam a intensidade das interações na rede polimérica frente à deformação oscilatória.

Adicionalmente, foram realizadas curvas de fluxo para avaliar a estabilidade mecânica e a espalhabilidade das formulações. As amostras foram submetidas a taxas de cisalhamento variando de 0,1 a 100 s⁻¹, a 32,5 °C. A partir dos dados de estresse de cisalhamento (σ) e viscosidade (η), foram calculados os parâmetros de consistência (K) e índice de fluxo (n) por meio do ajuste à equação da lei da potência (Equação 6):

$$\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (6)$$

4.11 Ensaio de Toxicidade com o zebrafish (*Danio rerio*)

4.11.1 Declaração Ética e Criação de Peixes-Zebra

Os procedimentos experimentais foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Ecotoxicologia (Labae), localizado no Centro Multiusuário de Produção e Experimentação Animal do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (CMPEA/IPTSP/UFG), e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA/UFG) sob o protocolo nº (073/22).

Peixes adultos de *Danio rerio* foram mantidos em um sistema de aquário de recirculação sob condições ambientais controladas (27,5 ± 1 °C; pH 7,0 ± 0,5; fotoperíodo de 14 horas/luz e 10 horas/escuro). Os indivíduos reprodutores foram alimentados quatro vezes ao dia, alternando entre ração comercial para peixes ornamentais (Poytara®) e náuplios vivos

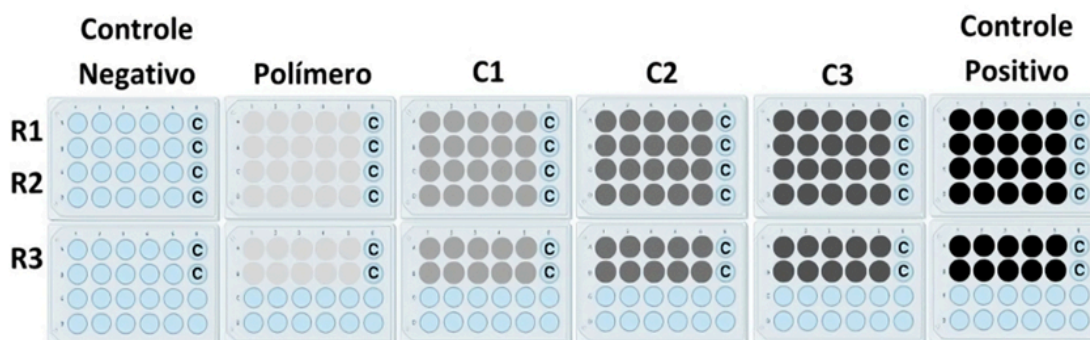
de *Artemia salina* (Artemiidae). Todo o manejo dos animais seguiu as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os padrões internacionais para o cuidado e uso de animais em pesquisa.

4.11.2 Delineamento Experimental

Para determinar concentrações seguras do nanogel nGF2002Ds, foi realizado o teste de toxicidade embrionário-larval de peixe-zebra (ZELT) conforme o protocolo nº 236 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (OCDE, 2013). Os embriões foram obtidos a partir de adultos de *D. rerio* (2 machos e 1 fêmea) mantidos em tanques de reprodução em declive (TECNIPLAST). Embriões viáveis, com aproximadamente 2 horas pós-fertilização (hpe) (n = 216), foram selecionados de acordo com estudos anteriores e colocados em placas de 24 poços (um embrião por poço; 10 embriões por réplica), contendo 2 mL de meio E3 (solução de teste) (KIMMEL et al., 1995; VALADARES et al., 2023).

Todas as soluções de testes foram preparadas em meio embrionário E3 (14,6 g NaCl, 0,65 g KCl, 2,2 g CaCl₂ e 4,05 g MgSO₄). O delineamento experimental consistiu nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL do nanogel nGF2002Ds (C1, C2 e C3, respectivamente); nanogel base nGF2002 sem OEDs a 20.000 µg/mL (P); Controle negativo (CN): E3 e Controle positivo (CP): E3 + 4 mg/mL de dicloroanilina. O ensaio ZELT foi conduzido durante 144 horas de exposição (hpe), em triplicata, sob condições estáticas, com temperatura controlada (27 ± 1 °C) e fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro, utilizando uma incubadora com controle de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) (SOLAB SL-224/120, Brasil). A organização do teste é ilustrada na Figura 7 a seguir.

Figura 7 - Organização das microplacas durante o ensaio ZELT.



Fonte: Autora (2025).

4.11.3 Avaliação Multibiomarcador

Durante o período de exposição de 144 horas, os embriões e larvas de zebrafish foram avaliados diariamente quanto à viabilidade e teratogenicidade. Embriões que apresentaram coagulação e ausência de batimentos cardíacos foram considerados mortos (OCDE, 2013). Para a avaliação da teratogenicidade embriolarval, foram observados parâmetros como malformações estruturais, atraso no desenvolvimento somítico, falha na separação do broto caudal do saco vitelínico e presença de edemas (KIMMEL et al., 1995; OCDE, 2013; LAMMER et al., 2009).

A neurotoxicidade foi avaliada em embriões de peixe-zebra, em 24 horas (hpe) pela contagem da frequência de contrações espontâneas (movimentos por minuto) em um intervalo de 60 s, usando um estereomicroscópio (Stemi 508®) e um contador manual (KRZYKWA et al., 2018). Em 48 horas (hpe), a cardiotoxicidade foi avaliada pela contagem dos batimentos cardíacos em embriões durante um período de 60 s, também utilizando um estereomicroscópio (Stemi 508®) e contador manual, para determinar a frequência cardíaca (batimentos por minuto) (BABIC et al., 2017).

A taxa de eclosão foi monitorada ao longo de 144 horas (hpe), considerando as larvas que emergiram do córion como eclodidas. Após esse intervalo, as larvas foram eutanasiadas com uma overdose de triclaína a 0,032% e fixadas durante a noite com paraformaldeído a 4%. Posteriormente, foram lavadas com solução de PBS 0,2 M, pH 7,2, e armazenadas em etanol a 70% em 4 °C. Cada larva foi fotografada usando um estereomicroscópio Stemi 508® acoplado a uma câmera ZEISS®, com software Zen 2.6 (edição Blue).

4.12 Avaliação *in vitro* da atividade larvívora contra larvas de *Aedes aegypti*

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Análises Microbiológicas (LaMICRO) do Instituto Federal do Maranhão (IFMA), campus São Luís/Monte Castelo. Ovos de *Aedes aegypti* foram fornecidos pela Biofábrica MOSCAMED (Juazeiro, BA), enquanto os larvívora comerciais temefós e Bti foram cedidos pela vigilância sanitária de São Luís (MA). A criação e o manejo das larvas seguiram protocolos adaptados das diretrizes da OMS (2005), com manutenção segundo metodologia adaptada de Carvalho et al. (2014).

Larvas do terceiro ínstar foram transferidas para copos de poliestireno contendo 20 mL das soluções teste. Todas as soluções foram preparadas com água mineral, utilizada no preparo das soluções de estoque (8,05 g e 5 g), que resultou nas concentrações de 50, 150, 250, 350 e 500 µg/mL do nanogel nGF2002Ds.

Para cada concentração, foram realizadas cinco repetições com 10 larvas por copo, totalizando 25 unidades experimentais e 250 larvas expostas. O controle negativo utilizou o nanogel nGF2002 sem OEDs, nas mesmas concentrações e condições, enquanto o controle positivo foi composto por temefós e Bti a 100 µg/mL, com cinco repetições e 100 larvas para cada larvicida. Além disso, a água mineral foi empregada como grupo controle durante as fases de eclosão e desenvolvimento larval.

4.13 Ensaio *in vitro* Contra Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

4.13.1 Manutenção dos Parasitas

Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LLa), cepa PH8, foram cultivadas em meio de cultura 199 (Gibco®, NY, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (Gibco®, Nova York, NY, EUA) e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina), a 27 ± 2 °C, com repiques regulares. Para a experimentação, a cultura foi ampliada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado e incubada por 4 dias, até o pico de crescimento celular, a 27 ± 2 °C.

4.13.2 Delineamento Experimental do Ensaio de Viabilidade em Promastigotas

A cultura de promastigotas de *Leishmania* (LLa) foi semeada em placas de 96 poços contendo meio RPMI 1640, de modo que a concentração final do inóculo fosse de 2×10^7 *Leishmania*/mL. As amostras testadas (OEDs e nGF2002Ds) foram diluídas em meio RPMI 1640. O OEDs foi preparado em concentrações de 477,5 µg/mL a 14,9 µg/mL, enquanto o nGF2002Ds foi testado de 0,125% a 0,004%.

Em seguida, as placas foram incubadas a 27 ± 2 °C por 24 horas. A viabilidade das promastigotas foi avaliada pelo método colorimétrico XTT (Sigma-Aldrich®), utilizando uma solução composta por 20% XTT, 20% PMS e 60% de salina 0,9%. As placas foram incubadas por 4 horas a 27 ± 2 °C em atmosfera com 5% de CO₂.

Após incubação, foi realizada a leitura por espectrofotometria em 450 e 620nm. A porcentagem de morte celular foi determinada por comparação com células não tratadas, utilizando uma regressão logarítmica da curva controle feita apenas com *Leishmania* e meio de cultura, iniciando com uma concentração de 2×10^7 *Leishmania*/mL até alcançar a concentração de $6,25 \times 10^5$ *Leishmania*/mL, enquanto o controle positivo foi empregado a anfotericina B.

4.14 Análise estatística

Para o ensaio com zebrafish, a normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro–Wilk, enquanto a homogeneidade das variâncias foi avaliada por meio do teste de Spearman. Os dados de mortalidade e taxa de eclosão foram analisados utilizando ANOVA de dois fatores, seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. Além disso, os dados de taxa de mortalidade, taxa de eclosão em 144 hpe, neurotoxicidade e cardiotoxicidade foram analisados utilizando o teste de Kruskal–Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Um nível de significância de 0,05 foi adotado para todos os testes.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software o RStudio (versão 3.5.2) e as representações gráficas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Já para a avaliação do potencial larvicida, as análises estatísticas da determinação das concentrações letais 50 e 90 (CL50 e CL90) e o coeficiente de determinação ajustado (R^2 Adj) foram determinados, utilizando o software Origin Pro (versão 8.5), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Já as análises estatística dos dados quantitativos dos ensaios *in vitro* contra *Leishmania*, foram realizados pelo Software Microsoft® Excel 365.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), como a leishmaniose tegumentar americana (LTA) e as arboviroses transmitidas pelo *Aedes aegypti*, permanecem como desafios em regiões tropicais, como o Maranhão. Diante das limitações dos tratamentos convencionais para a leishmaniose e da elevada toxicidade dos inseticidas utilizados no combate ao mosquito, este estudo desenvolveu nanogéis termorresponsivos com óleo essencial de *Duguetia stelechantha* (OEDs), originando a formulação nGF2002Ds. Para potencializar sua ação, essa formulação foi combinada à curcumina, resultando no nanogel nGF2002DsC. Ambas as formulações (nGF2002Ds e nGF2002DsC) foram caracterizadas por FTIR e DLS e submetidas à avaliação da atividade leishmanicida *in vitro*. No entanto, os resultados da formulação nGF2002DsC contra *Leishmania amazonensis*, ainda estão em fases de análise e serão divulgados em breve na forma de artigos. Além disso, a formulação nGF2002Ds também foi caracterizada por DSC, MEV e AFM, testada frente a larvas de *A. aegypti* e submetida à avaliação toxicológica em zebrafish (*Danio rerio*). A proposta representou uma abordagem inovadora e sustentável baseada em compostos naturais encontrados na biodiversidade maranhense.

5.1 Obtenção e Rendimento do OEDs

O OE de *Duguetia stelechantha* foi obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e o rendimento foi calculado conforme os parâmetros estabelecidos para óleos voláteis (Equação 1). A partir de 300 g de folhas secas, com umidade média de 10,34% (determinada em triplicata), foram obtidos 3,3 mL de óleo, correspondendo a um rendimento de 1,07%. Esse resultado pode variar em função de fatores sazonais, como temperatura, umidade e precipitação, além de condições geográficas e ambientais, que influenciam diretamente na composição química e na atividade biológica de OEs, como relatado em diferentes espécies do gênero *Duguetia* (DA SILVA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2022).

5.2 Análise do OEDs por CG-EM e CG-FID

A análise por CG-EM e CG-FID permitiu a identificação e quantificação dos componentes voláteis presentes no OE da *Duguetia stelechantha* (Figura 8 e Tabela 2), respectivamente.

Figura 8 - Cromatograma obtido por CG-EM e CG-FID do OEDs, com tempo de retenção entre 10,0 a 50,0 min e os principais majoritários encontrados.

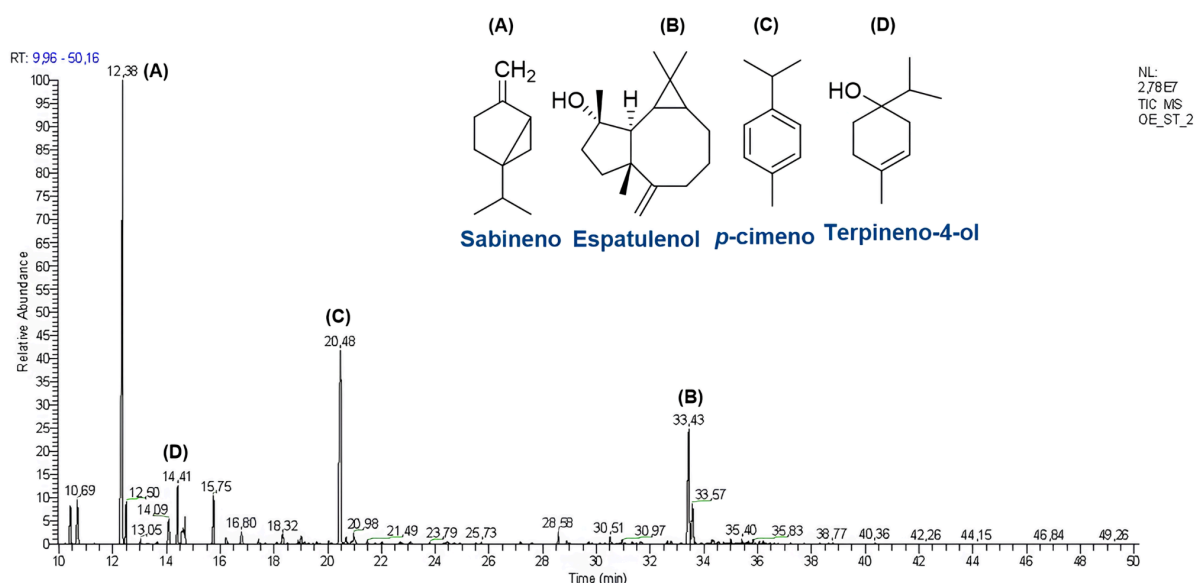


Tabela 2 - Análise de CG-EM e CG-FID do OEDs: Índice de retenção (IR), Fórmula molecular (F.M) e porcentagem relativa (%).

Número	Compostos	F.M.	IR	Ir ^a	IR ^b	%
--------	-----------	------	----	-----------------	-----------------	---

Monoterpenos						
1	α -tujeno	$C_{10}H_{16}$	10,43	922	924	2,25
2	α -pineno	$C_{10}H_{16}$	10,69	929	932	2,27
3	Sabineno	$C_{10}H_{16}$	12,38	971	969	41,44
4	β -pineno	$C_{10}H_{16}$	12,50	974	974	2,30
5	Mirceno	$C_{10}H_{16}$	13,05	987	988	0,31
6	α -felandreno	$C_{10}H_{16}$	13,67	1003	1002	0,08
7	α -terpineno	$C_{10}H_{16}$	14,09	1013	1014	1,63
8	<i>p</i> -cimeno	$C_{10}H_{14}$	14,41	1022	1020	3,70
9	Limoneno	$C_{10}H_{16}$	14,59	1026	1024	0,83
10	β -felandreno	$C_{10}H_{16}$	14,63	1027	1025	0,51
12	γ -terpineno	$C_{10}H_{16}$	15,75	1055	1054	3,08
14	Terpinoleno	$C_{10}H_{16}$	16,80	1082	1086	0,73
Monoterpenos Oxigenados						
11	1,8-cineol	$C_{10}H_{18}O$	14,70	1029	1026	1,44
13	Hidrato de sabineno <cis->	$C_{10}H_{18}O$	16,23	1068	1065	0,38
15	Hidrato de sabineno <trans->	$C_{10}H_{18}O$	17,43	1098	1098	0,30
16	Fenchol <endo->	$C_{10}H_{18}O$	18,11	1116	1114	0,10
17	Ment-2-en-1-ol <cis-p->	$C_{10}H_{18}O$	18,32	1122	1118	0,70
18	Sabinol <trans-> (trans para OH vs. IPP)	$C_{10}H_{16}O$	18,91	1137	1137	0,23
19	Ment-2-en-1-ol <trans-p->	$C_{10}H_{16}O$	19,01	1140	1136	0,47
20	Sabina cetona	$C_9H_{14}O$	19,59	1156	1154	0,16
21	Terpinen-4-ol	$C_9H_{18}O$	20,48	1179	1174	17,61
22	Criptômero	$C_9H_{14}O$	20,68	1185	1183	0,57
23	Mirtenol	$C_{10}H_{16}O$	20,89	1190	1194	0,19
24	α -terpineol	$C_{10}H_{16}O$	20,98	1193	1186	0,97
25	trans-piperitol	$C_{10}H_{18}O$	21,49	1207	1207	0,25
26	trans-Ascaridol glicol	$C_{10}H_{18}O$	23,79	1272	1266	0,11
Sesquiterpenos						
27	α -copaeno	$C_{15}H_{24}$	27,17	1373	1374	0,11
28	(E)-cariofileno	$C_{15}H_{24}$	28,58	1416	1417	0,82
29	γ -elemeno	$C_{15}H_{24}$	28,90	1426	1434	0,22
30	α -humuleno	$C_{15}H_{24}$	29,72	1452	1452	0,11
31	Germacreno D	$C_{15}H_{24}$	30,51	1478	1480	0,45
32	Biciclogermacreno	$C_{15}H_{24}$	30,97	1492	1500	0,19
33	β -bisaboleno	$C_{15}H_{24}$	31,35	1505	1505	0,11
34	δ -amorfenol	$C_{15}H_{24}$	31,65	1515	1511	0,12
Sesquiterpenos Oxigenados						
35	Espatulanol	$C_{15}H_{24}O$	33,43	1575	1577	9,21
36	Óxido de cariofileno	$C_{15}H_{24}O$	33,57	1579	1582	2,90
37	Humuleno epóxido II	$C_{15}H_{24}O$	34,35	1606	1608	0,26
38	Eudesma-4,7-dien-1 β -ol (impuro)	$C_{15}H_{24}O$	36,64	1688	1687	0,06
Monoterpenos						59,13
Monoterpenos Oxigenados						23,48
Sesquiterpenos						2,13
Sesquiterpenos Oxigenados						12,43

Total	97,17
Outros	2,83

^aIR: índice de retenção calculado; ^bIR: índice de retenção da literatura Adams (2007).

A análise permitiu identificar 38 constituintes no óleo essencial de *Duguetia stelechantha* (OEDs), com predominância de monoterpenos (82,61%) e sesquiterpenos (14,56%). Os principais compostos identificados foram sabineno (41,44%), terpinen-4-ol (17,61%), espatulenol (9,21%) e *p*-cimeno (3,70%), perfil terpênico típico do gênero *Duguetia* (DOS SANTOS et al., 2022). Esses dados corroboram estudos anteriores com *D. stelechantha*, que também relataram altos teores de α -pineno (20,2%), β -pineno (46,17%) e espatulenol (6,68%) (BARATA et al., 2023).

A comparação da composição química do OE deste estudo com a de outras espécies do gênero evidencia semelhanças nos metabólitos secundários, embora com variações nas proporções. Por exemplo, em *D. furfuracea*, os principais constituintes foram β -felandreno (42,2%), sabineno (17,3%–25,1%), terpinen-4-ol (16,2%–21,6%), *p*-cimeno (5,6%–8,3%), mirceno (6,8%) e α -felandreno (4,6%) (VALTER et al., 2008).

Já no óleo das partes aéreas de *D. quitarensis*, foi revelado predominância de 4-heptanol (33,8%), α -tujeno (18,4%), (E)-cariofileno (14,4%), germacreno D (6,3%) e α -copaeno (5,3%) (BAY et al., 2019). Dentre esses compostos, apenas α -tujeno (2,25%), (E)-cariofileno (0,82%) e germacreno D (0,45%) foram detectados em *D. stelechantha*, embora em menores concentrações.

Em *D. echinophora*, β -felandreno (39,12%) e sabineno (17,08%) se destacaram, reforçando a recorrência desses compostos no gênero. Por outro lado, *D. riparia* apresentou predominância de sesquiterpenos oxigenados, como espatulenol (22,22%) e óxido de cariofileno (12,21%), o que reforça a diversidade química entre as espécies (MORAES CASCAES et al., 2021). Neste trabalho, espatulenol (9,21%) e óxido de cariofileno (2,90%) também estiveram presentes, porém com menor representatividade.

Adicionalmente, elevada concentração de β -felandreno (45,7%) foi identificado no OE da casca de *D. trunciflora* (MAIA et al., 2006). Além disso, estudos anteriores verificaram variações nos componentes majoritários β -Pineno (46,17%) e α -Pineno (20,2%) para a *D. stelechantha* (BARATA et al., 2023), em contraste com os dados obtidos nesta pesquisa. Isso ressalta a importância de estudos sazonais para essa espécie, considerando os resultados obtidos neste trabalho em comparação com pesquisas anteriores.

Essa variação na identificação e composição química dos óleos em diferentes proporções é relacionada a fatores ambientais, como clima, umidade e época de colheita, que influenciam diretamente o metabolismo secundário das plantas (QIAN et al., 2024). Sendo assim, a diversidade química observada entre espécies do gênero *Duguetia* reforça sua relevância farmacológica, uma vez que a presença de diferentes metabólitos pode conferir propriedades terapêuticas distintas.

5.3 Análise do OEDs por RMN

Para confirmar a ocorrência da composição química do OEDs, previamente identificados por CG-EM e CG-FID, foram realizadas análises de RMN de ^1H e ^{13}C . Os espectros revelaram deslocamentos químicos na faixa de 0,5 e 10 ppm, e as constantes de acoplamento auxiliaram na confirmação estrutural das moléculas do sabineno, terpinen-4-ol e *p*-cimeno, cujas estruturas estão ilustradas na Imagem 1. Os dados completos de deslocamento químico estão apresentados na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3 - Deslocamento químico e multiplicidade de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) do OE de *D. stelechantha*.

	Posição	δ ^1H	$\delta^{13}\text{C}$
Sabineno	1	-	37,6 (C1)
	2	1,72–1,78 (2H, m, H-2)	27,5 (C2)
	3	2,00–2,21 (2H, m, H-3)	28,9 (C3)
	4	-	154,4 (C4)
	5	1,62 (1H, m, H-5)	30,1 (C5)
	6	0,68–0,69 (2H, d, H-6)	16,0 (C6)
	7	1,52 (1H, m, H-7)	32,6 (C7)
	8	0,98 (3H, d, H-8)	19,8 (C8)
	9	0,92 (3H, d, H-9)	20,1 (C9)
	10	4,65–4,83 (2H, s, H-10)	101,5 (C10)
Terpinen-4-ol	1	-	69,6 (C1)
	2	5,71 (1H, t, H-2)	132,1 (C2)
	3	1,2–1,8 (2H, d H-3)	27,1 (C3)
	4	-	71,9 (C4)
	5	1,2–1,8 (2H, t, H-5)	27,1 (C5)
	6	1,2–1,8 (2H, t, H-6)	34,9 (C6)
	7	1,28 (3H, s, H-7)	29,1 (C7)
	8	1,54 (1H, m, H-8)	37,3 (C8)
	9	0,95 (3H, d, H-9)	16,5 (C9)
	10	0,89 (3H, d, H-10)	17,6 (C10)
	1	-	137,2 (C1)
	2	7,41 (1H, d, H-2)	129,2 (C2)

<i>p</i> -cimeno	3	7,23 (1H, d, H-3)	125,4 (C3)
	4	-	141,6 (C4)
	5	7,23 (1H, d, H-5)	125,4 (C5)
	6	7,41 (1H, d, H-6)	129,2 (C6)
	7	2,39 (3H, s, H-7)	21,0 (C7)
	8	1,63 (1H, m, H-8)	26,1 (C8)
	9	0,95 (3H, d, H-9)	22,2 (C9)
	10	0,84 (3H, d, H-10)	21,6 (C10)

No espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do sabineno, observou-se um padrão característico que auxilia na identificação dos hidrogênios presentes na molécula. Os dois hidrogênios ligados ao carbono 10 aparecem como um singlete em δ 4,65-4,83 ppm, indicando a ausência de acoplamento com hidrogênios vizinhos. Essa informação é coerente com a estrutura do sabineno, na qual o carbono 10 está ligado a dois hidrogênios e não possui hidrogênio adjacente, corroborando a caracterização do composto por Wang et al. (2011). Adicionalmente, os hidrogênios metílicos (8- CH_3 e 9- CH_3) exibem dubletos em δ 0,98 e 0,92 ppm, respectivamente. Essa multiplicidade sugere o acoplamento desses grupos metílicos com hidrogênio vicinal, ou seja, hidrogênio localizado no carbono adjacente.

Já no espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do terpinen-4-ol, percebeu-se um tripleto em δ 5,71 ppm, associado ao hidrogênio ligado ao carbono 2. Essa multiplicidade indica que esse hidrogênio está acoplado a dois hidrogênios vizinhos, o que é consistente com a estrutura do terpinen-4-ol, onde o carbono 2 é adjacente a um grupo metileno. Além disso, um singlete em δ 1,28 ppm corresponde aos três hidrogênios do grupo metílico ligado ao carbono 7. A ausência de acoplamento nesse sinal sugere que o carbono 7 não possui hidrogênio vizinho, o que está de acordo com a estrutura do terpinen-4-ol, onde o carbono 7 está ligado a um carbono terciário. Isso é consistente com as observações de (KIM et al., 2023).

No espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do *p*-cimeno, os hidrogênios ligados aos carbonos 2 e 6 (H-2 e H-6) geram um dubleto em δ 7,41 ppm. Essa multiplicidade indica o acoplamento desses hidrogênios com um único hidrogênio vizinho, o que é consistente com a estrutura do *p*-cimeno, onde os carbonos 2 e 6 estão adjacentes a um carbono com um único hidrogênio (carbonos 3 e 5, respectivamente). Similarmente, os hidrogênios ligados aos carbonos 3 e 5 (H-3 e H-5) apresentam um dubleto em δ 7,23 ppm, reforçando a estrutura de simetria do *p*-cimeno. Adicionalmente, o singlete em δ 2,39 ppm é atribuído aos três hidrogênios do grupo metílico ligado ao carbono 7 (7- CH_3), o que evidencia a ausência de

acoplamento nesse sinal, uma vez que o carbono 7 é diretamente associado ao anel aromático. Essas observações são corroboradas na literatura (YOU et al., 2015).

Complementando essa análise, os espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) apresentados na tabela 3, fornece informações sobre os ambientes químicos dos carbonos na amostra. Os espectros, na faixa de 0 a 200 ppm (Apêndice), revelaram sinais característicos de diferentes grupos funcionais. Para o sabineno, o sinal em δ 154,38 ppm (C4) indica a presença de um carbono olefínico (sp^2), consistente com a estrutura do sabineno. Os sinais em δ 27,46 ppm (C2) e 28,96 ppm (C3) correspondem a carbonos metilênicos, enquanto o sinal em δ 19,79 ppm (C8) é atribuído ao carbono metílico. No terpinen-4-ol, o sinal em δ 71,9 ppm (C4) é característico de um carbono ligado a um grupo hidroxila (álcool terciário), enquanto o sinal em δ 132,1 ppm (C2) indica a presença de um carbono olefínico. Já para o *p*-cimeno, os sinais em δ 129,2 ppm (C2 e C6) e 125,4 ppm (C3 e C5) são típicos de carbonos olefínicos em um anel aromático, enquanto o sinal em δ 21,0 ppm (C7) corresponde ao carbono metílico ligado ao anel.

5.4 Desenvolvimento de Formulações

A formulação base nGF2002 foi desenvolvida a partir de estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, que identificaram a proporção de 20:0,2% (m/m) entre os polímeros F127 e 974P para garantir o comportamento termorresponsivo desejado (MARQUES et al., 2024; DA COSTA et al., 2024). A partir dessa matriz, foram elaboradas formulações (F1–F8) contendo diferentes % (m/m) de OEDs (Tabela 4).

Tabela 4 - Diferentes composições (% m/m) do OEDs e água incorporada na base nGF2002 para alcançar F1-F8.

Código	Componentes				Estabilidade
	Água	F127	974P	OEDs	
F1	79,67	20	0,2	0,125	E ^a
F2	79,55	20	0,2	0,25	E ^a
F3	79,3	20	0,2	0,5	E ^a
F4	78,8	20	0,2	1	E ^a
F5	77,3	20	0,2	2,5	SP
F6	74,8	20	0,2	5	SP
F7	69,8	20	0,2	10	SP

F8	59,8	20	0,2	20	E ^b
----	------	----	-----	----	----------------

E: Estável
SP: Separação de fase
^aNanogel; ^bNanoemulsão

As formulações F1–F4 e F8 apresentaram boa homogeneidade e estabilidade física durante e após 24 horas. Já F5–F7 demonstraram instabilidade, como turbidez inicial e separação de fases progressiva, observada pela formação de uma camada oleosa superficial. Embora F8 tenha demonstrado estabilidade inicialmente, sua alta carga lipofílica comprometeu a incorporação homogênea do OEDs na fase aquosa, caracterizando uma formulação inadequada do tipo O/A.

Dessa forma, as formulações F1–F4 foram priorizadas para os testes de estabilidade acelerada, conforme diretrizes da ANVISA (BRASIL, 2024), com ciclos alternados de temperatura (5 °C e 25 °C) durante 14 dias. Não foram observadas alterações visuais, separação de fases ou mudanças nas características organolépticas, conforme demonstrado nas imagens apresentadas em anexo.

Isso reforça a robustez das formulações frente às variações térmicas e à exposição luminosa durante os 14 dias. Diante disso, a formulação F4, com maior teor de OEDs, foi selecionada para etapas seguintes e chamada ao longo desse estudo de nGF2002Ds.

5.4.1 Desenvolvimento de formulações com OEDs/curcumina

A partir da formulação previamente otimizada com OEDs (F4-nGF2002Ds), foram combinados diferentes % (m/m) de curcumina (CUR), com o objetivo de avaliar a compatibilidade e estabilidade físico-química da associação entre os dois ativos. Também foi combinada a formulação F8, com 20% (m/m) de OEDs, como alternativa de maior carga oleosa. As composições desenvolvidas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Combinação de diferentes composições (% m/m) de CUR e OEDs, com base na formulação nGF2002 para alcançar F1-F4.

Código	Componentes					Estabilidade
	Água	F127	974P	OEDs	CUR	
^a F1	78,78	20	0.2	1	0,02	E
^b F2	78,78	20	0.2	1	0,04	SP
^c F3	59,8	20	0.2	20	0,02	SP

^d F4	59,8	20	0.2	20	0,04	SP/I
-----------------	------	----	-----	----	------	------

E: Estável
 SP: Separação de fase
 I: Instabilidade
^aF1: nG2002Ds1C002
^bF2: nG2002Ds1C004
^cF3: nG2002Ds20C002
^dF4: nG2002Ds20C004

Inicialmente, a solubilização da curcumina foi avaliada em água destilada a 60 °C, nas concentrações de 0,02% e 0,04%, para verificar o limite de saturação da rede polimérica. A concentração de 0,02% foi melhor solubilizada, enquanto 0,04% apresentou baixa dispersão, indicando possível saturação do sistema. No entanto, como o procedimento foi conduzido somente após a solubilização desse ativo, essa etapa não impactou nas seguintes.

Além disso, as formulações desenvolvidas (F1–F4), cujas imagens estão apresentadas em anexo, foram caracterizadas como emulsões do tipo O/A, com dispersão da fase oleosa. Dessa forma, as amostras foram submetidas a sete ciclos térmicos, alternados de 5 °C e 25 °C, conforme protocolo adaptado de Da Costa et al. (2024) e normas da ANVISA (BRASIL, 2024). A formulação F1 (nGF2002Ds1C002) apresentou aparência homogênea ao longo de todo o ensaio, sem alterações visuais, indicando boa estabilidade física, e assim foi selecionada como a formulação de referência neste estudo, denominada nGF2002DsC.

Em contrapartida, F2 (nGF2002Ds1C004) exibiu separação de fases, F3 (nGF2002Ds20C002) apresentou coagulação, e F4 (nGF2002Ds20C004) revelou instabilidade com formação de gotículas oleosas. A avaliação em longo prazo (180 dias a 5 °C) confirmou a instabilidade das formulações F2–F4, reforçando a influência da concentração dos ativos na estabilidade do sistema.

5.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Inicialmente, a caracterização espectroscópica por FTIR foi realizada para os materiais puros utilizados na formulação dos nanogéis, incluindo o OEDs, o copolímero F127 e o polímero 974P. No espectro de FTIR do OEDs (Figura 9A), uma banda fina e intensa, entre 2954-2831 cm⁻¹, corresponde aos estiramentos simétricos e assimétricos das ligações C—H. A banda fina de baixa intensidade em 1639 cm⁻¹, está associada ao estiramento C=C, enquanto as bandas finas de média intensidade em 1458 e 1369 cm⁻¹, refletem os modos vibracionais de tesoura e balanço das ligações C—H, respectivamente. Já a banda intensa em

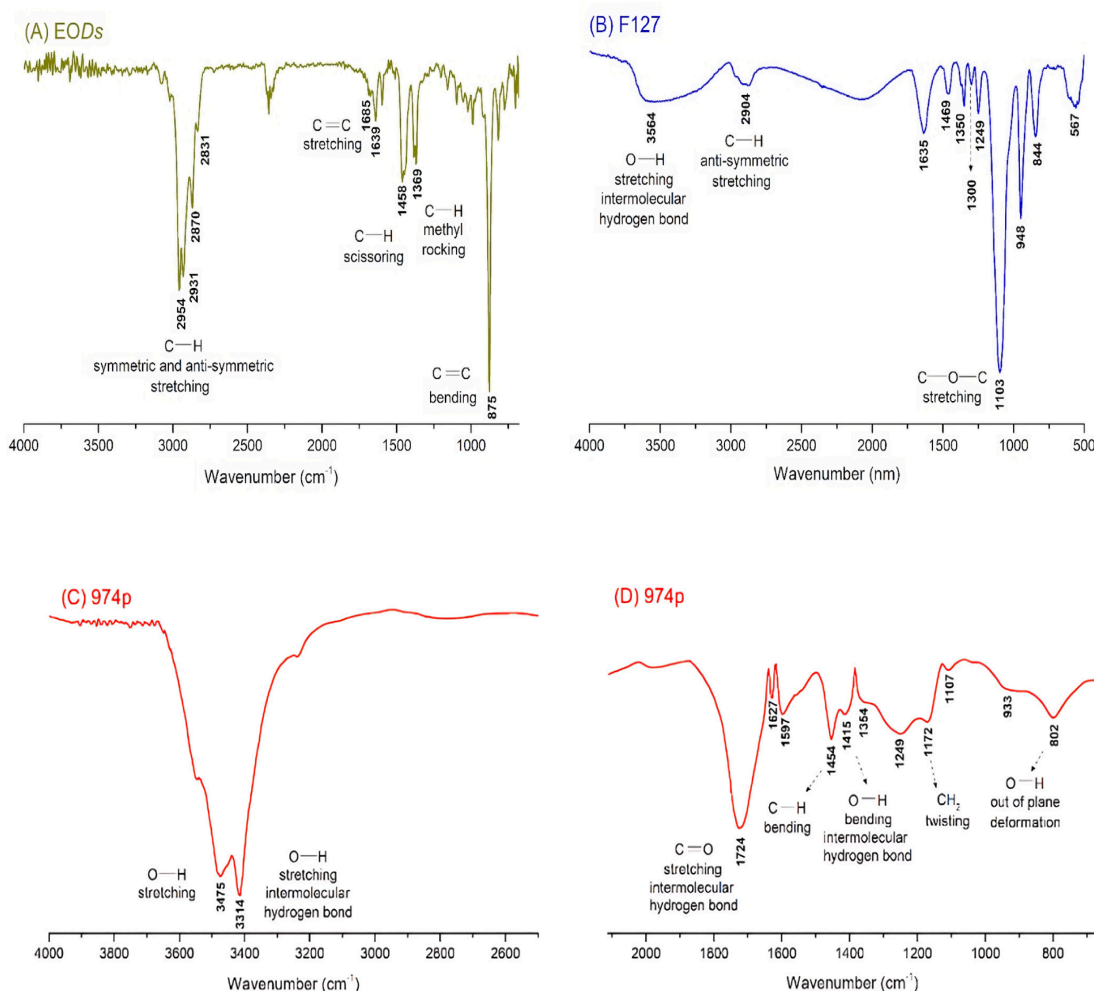
875 cm^{-1} indica o dobramento da ligação C=C, típico dos monoterpenos presentes na composição química do OEDs.

No espectro do copolímero F127 (Figura 9B) observou-se uma banda larga e de média intensidade em 3564 cm^{-1} , que está associada ao estiramento das ligações O—H dos blocos de óxido de polietileno (PEO). Essa banda também está associada ao estiramento das ligações O—H resultantes de interações de hidrogênio intermoleculares, favorecidas pela conformação alongada do copolímero, o que facilita a formação de interações O—H $\cdots$ O—H entre cadeias de PEO e O—H $\cdots$ O—C—C com os grupos éter do mesmo polímero.

Nos espectros de FTIR do polímero 974P, analisados nas faixas de 4000–2000 cm^{-1} e 2000–690 cm^{-1} (Figura 9C e 9D), são evidenciadas as principais bandas associadas às ligações O—H, C—H e C=O, essenciais para a caracterização dos grupos funcionais. Uma banda larga e intensa é observada entre 3475–3414 cm^{-1} , relacionada ao estiramento das ligações O—H dos grupos carboxílicos. O valor mais baixo, em 3414 cm^{-1} , é tipicamente associado à formação de dímeros de ácidos carboxílicos, estabilizados por ligações de hidrogênio. A banda intensa em 1724 cm^{-1} , referente ao estiramento da carbonila (C=O), sugere uma interação intermolecular forte do tipo O—H $\cdots$ O=C.

Esse comportamento está diretamente relacionado à polaridade do grupo carbonila, que atua como um sítio de aceitação de ligação de hidrogênio quando combinado com o copolímero F127. Dessa forma, as características estruturais tornam o 974P adequado para sistemas de *drug delivery*, especialmente para liberação controlada, devido à sua bioadesividade, elevada viscosidade, capacidade de encapsulamento e termorresponsividade, mesmo em baixas concentrações (m/m).

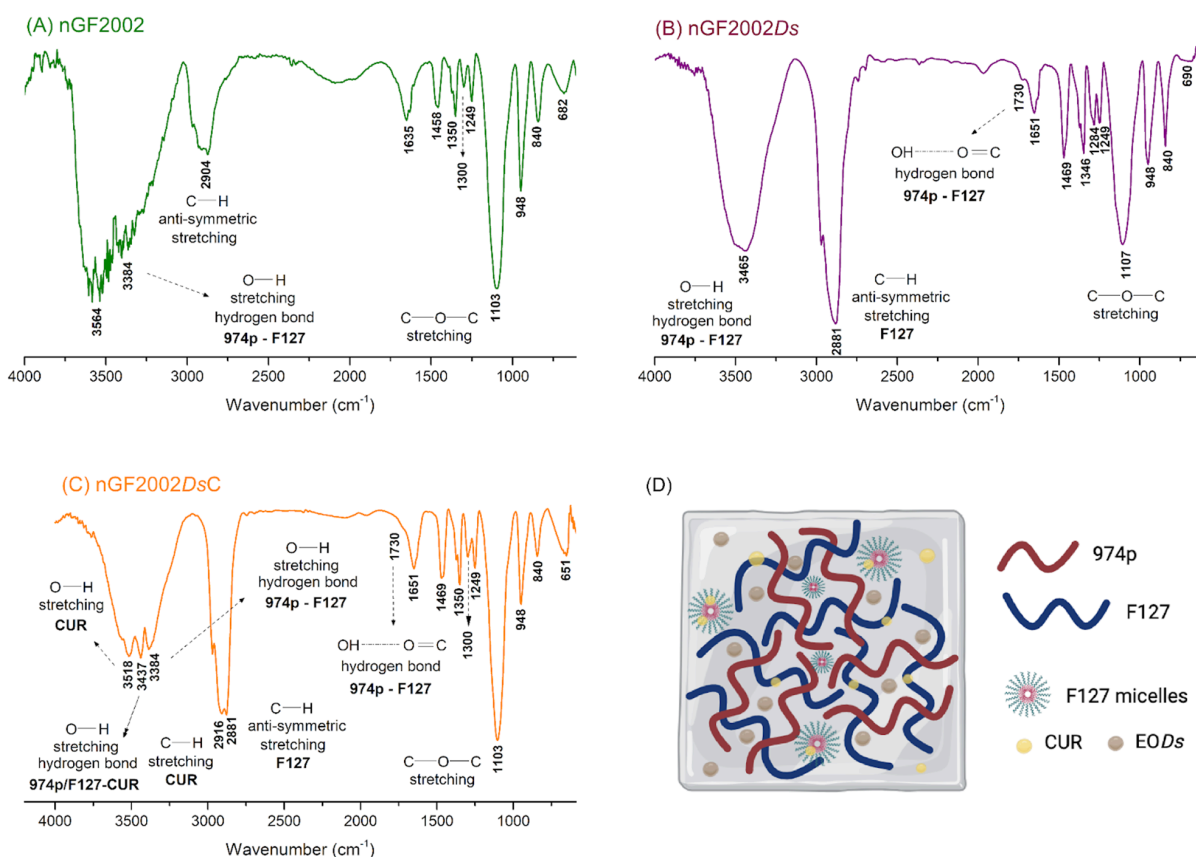
Figura 9 - Espectros de FTIR ($4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$) das amostras: A) OEDs; B) F127; C) Espectro do 974P ($4000\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$); D) Espectro do 974P ($2500\text{-}690\text{ cm}^{-1}$).



Fonte: Autora (2025).

A análise FTIR é amplamente utilizada como uma ferramenta eficaz para investigar o encapsulamento de ingredientes farmacêuticos ativos (APIs) em sistemas de *drug delivery* baseados em nanoplateformas poliméricas. As mudanças nas intensidades das bandas e nas vibrações nos espectros de FTIR fornecem informações importantes sobre a interação entre os componentes do sistema, como a miscibilidade e as interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas (VAN HAAREN; DE BOCK; KAZARIAN, 2023). Diante disso, a combinação da formulação nGF2002Ds com 0,02% (m/m) de CUR no desenvolvimento do nanogel nGF2002DsC, resultou em alterações significativas nas bandas de absorção da matriz polimérica do nanogel base (nGF2002), indicando modificações nas interações intermoleculares (Figura 10A).

Figura 10 - Espectros de FTIR ($4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$) das amostras: (A) nGF2002, (B) nGF2002Ds e (C) nGF2002DsC. (D) Representação da organização nanoestruturada do material nGF2002DsC.



Fonte: Autora (2025).

No espectro de FTIR do nanogel base nGF2002 (Figura 10A), uma banda em 3465 cm^{-1} é atribuída aos estiramento O—H dos grupos hidroxila presentes nas cadeias poliméricas de F127 e 974P. A banda em 2904 cm^{-1} corresponde ao estiramento C—H das cadeias alifáticas, enquanto a banda em 1730 cm^{-1} está associada ao estiramento C=O dos grupos ésteres. Com a incorporação de 1% (m/m) de OEDs na formulação nGF2002Ds (Figura 10B), a banda larga e intensa em 3465 cm^{-1} é deslocada para 3384 cm^{-1} ($\Delta\nu = 81\text{ cm}^{-1}$), caracterizando um deslocamento batocrômico.

Em espectroscopia de infravermelho, esse tipo de deslocamento indica redução na energia vibracional, frequentemente associada à formação de ligações de hidrogênio (ZHANG; ROUABHIA; MOULTON, 2017). Esse comportamento sugere uma diminuição na

energia necessária para o estiramento das ligações O—H, atribuída à interação entre os constituintes do óleo e a matriz polimérica, favorecendo sua acomodação nos poros e promovendo rearranjos nas interações cruzadas entre as cadeias de F127 e 974P.

Adicionalmente, a banda associada ao estiramento C—H foi deslocada de 2904 cm^{-1} para 2881 cm^{-1} ($\Delta\nu = 23\text{ cm}^{-1}$), o que reforça a hipótese de interações hidrofóbicas entre os compostos apolares do OEDs e as regiões hidrofóbicas das cadeias poliméricas. A banda de estiramento C=O também apresentou um leve deslocamento de 1730 cm^{-1} para 1724 cm^{-1} ($\Delta\nu = 6\text{ cm}^{-1}$), indicando alterações nas ligações de hidrogênio do tipo O—H $\cdots$ O=C dentro da matriz polimérica, em resposta à presença do OEDs.

No espectro da formulação nGF2002DsC (Figura 10C), contendo simultaneamente OEDs a 1% (m/m) e curcumina (CUR) a 0,02% (m/m), a banda de estiramento O—H encontra-se desdobrada em três sinais distintos, refletindo diferentes ambientes de interação molecular. A banda em 3384 cm^{-1} permanece associada às ligações de hidrogênio intermoleculares entre os copolímeros F127 e 974P. A banda em 3518 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento das ligações O—H livres da CUR enquanto a banda em 3437 cm^{-1} é associada às interações de hidrogênio formadas entre suas moléculas e a matriz polimérica F127/974P.

Além disso, a presença da banda em 3437 cm^{-1} sugere que a solubilização da CUR na matriz induz uma reorganização das interações intermoleculares, substituindo parcialmente as interações F127—974P por ligações mais fracas do tipo F127—CUR. Essa reorganização estrutural é evidenciada pelo deslocamento batocrômico observado ($\Delta\nu = 53\text{ cm}^{-1}$).

A incorporação da CUR à matriz nGF2002 também é confirmada pela presença de uma banda em 2916 cm^{-1} , correspondente ao estiramento das ligações C—H da estrutura molecular da curcumina. Esse resultado indica que as moléculas de CUR, devido à sua elevada hidrofobicidade, tendem a se associar preferencialmente às cadeias de PPO do F127 (Figura 10D).

5.6 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A caracterização por DLS analisou as flutuações na intensidade da luz espalhada pelo movimento browniano das partículas, fornecendo informações sobre o diâmetro hidrodinâmico (D_h) e o índice de polidispersidade (PDI) dos nanogéis em resposta às variações ambientais, como alterações de temperatura e pH (RODRIGUEZ-LOYA; LERMA; GARDEA-TORRESDEY, 2024).

As formulações nGF2002, nGF2002Ds e nGF2002DsC apresentaram comportamentos distintos frente às variações de temperatura, refletindo diferenças em sua estabilidade e resposta térmica. Quando a concentração do F127 ultrapassa a concentração micelar crítica (CMC), formam-se micelas espontaneamente, com o bloco hidrofóbico (PPO) encapsulando os compostos e o bloco hidrofílico (PEO) estabiliza o sistema (YU et al., 2021).

Esse processo é favorecido acima da temperatura de micelização crítica (TMC), que promove a autoagregação dos copolímeros (DI SPIRITO et al., 2024). Para a formulação base nGF2002, o aumento de temperatura de 25 °C para 32 °C evidenciou esse efeito, com formação de micelas menores e mais homogêneas. Essa transição resultou na redução do tamanho hidrodinâmico (Dh), de aproximadamente 661 nm para 124 nm e uma melhora no PDI, de 0,34 para 0,25 (Tabela 6).

Tabela 6 - Medidas de DLS em função da temperatura para os nanogéis nGF2002, nGF2002Ds e nGF2002DsC. As medidas foram realizadas em quintuplicata, e os resultados estão expressos como média $\pm$ SD.

Temperatura (°C)	Nanogel		
	nGF2002	nGF2002Ds	nGF2002DsC
	Dh (nm) / PDI		
25	661 $\pm$ 6 / 0,34	270 $\pm$ 73 / 0,29	199 $\pm$ 30 / 0,21
32	124 $\pm$ 5 / 0,24	293 $\pm$ 16 / 0,44	372 $\pm$ 7 / 0,45
37	17 $\pm$ 3 / 0,25	268 $\pm$ 31 / 0,42	364 $\pm$ 15 / 0,63
45	17 $\pm$ 9 / 0,26	208 $\pm$ 10 / 0,23	353 $\pm$ 11 / 0,20

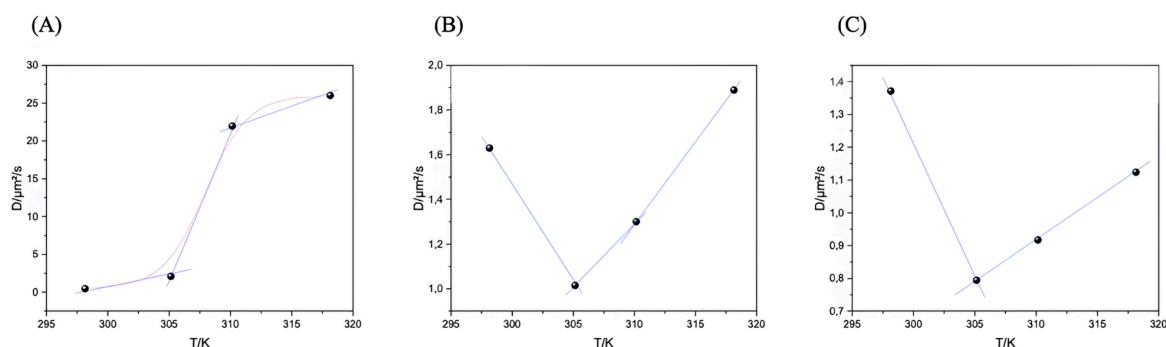
A capacidade do F127 de se auto-organizar em soluções diluídas, formando agregados micelares esféricos, é fundamental para o controle do tamanho das nanopartículas, aspecto crucial na otimização de sistemas de liberação controlada de fármacos (LUPU et al., 2023; XIAO et al., 2023). Essa resposta termorresponsiva demonstra a sensibilidade do sistema à temperatura, sendo compatível com aplicações em ambientes fisiológicos, onde a estabilidade do nanogel é essencial para garantir a eficácia terapêutica.

Desse modo, à medida que a temperatura aumenta para 37 °C e 45 °C, observa-se um incremento nos processos de difusão do nanogel nGF2002, resultando na manutenção de partículas com Dh em torno de 17 $\pm$ 3 nm e PDI de 0,25. Essa característica é particularmente

relevante para aplicações parenterais, considerando que a temperatura corporal média de 37 °C favorece a atuação eficiente do sistema nGF2002 nesses contextos.

Já para as amostras nGF2002Ds e nGF2002DsC, o aumento da temperatura não promoveu alterações significativas no tamanho das partículas em nenhuma das duas formulações, conforme evidenciado pelos valores de Dh (Tabela 6). Os tamanhos hidrodinâmicos observados variaram entre 208 ± 10 e 293 ± 16 nm para o nanogel com OEDs e entre 199 ± 30 e 372 ± 7 nm para o nanogel com OEDs/Curcumina, indicando boa estabilidade das formulações. Embora ainda exista uma pequena variação no tamanho das partículas, esta variação é suficiente para refletir no aumento dos coeficientes de D_{if} das partículas em ambos os sistemas (Figura 11).

Figura 11 - Gráfico do coeficiente de D_{if} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) em função da T (K): (A) nGF2002, (B) nGF2002Ds e (C) nGF2002DsC.



Fonte: Autora (2025).

O gráfico do coeficiente de difusão (D_{if}) em função da temperatura forneceu uma compreensão adicional do comportamento dos nanogéis. Para o nGF2002 (Figura 11A), observou-se um aumento do D_{if} com a elevação da temperatura, indicando maior mobilidade das partículas. Essa variação reflete na redução do Dh e da viscosidade do meio, sugerindo processos de desestabilização, como a transição de micelas para estruturas menores.

Entre 25 °C e 37 °C (298–310 K), há uma queda acentuada no D_{if} e no Dh que diminui para aproximadamente 17 nm, o que sugere um rearranjo estrutural mais compacto. Por outro lado, entre 37 °C e 45 °C (310–318 K), o aumento do D_{if} sugere nova reorganização, com formação de estruturas menores e menos viscosas, favorecendo a difusão.

Para o nGF2002Ds (Figura 11B), o comportamento do D_{if} apresentou uma forte dependência da temperatura, refletidas através dos valores de Dh e PDI. Entre 25 °C e 32 °C

(298–305 K), observou-se um aumento do Dh (270 ± 73 nm para 293 ± 16 nm) e do PDI (0,29 para 0,44), sugerindo inchaço da matriz micelar induzido pelo calor. Apesar disso, o aumento do Dif nesta faixa, não compromete a mobilidade das partículas, o que sugere maior fluidez do sistema (THÜMMER et al., 2023). De 32 °C a 37 °C (305–310 K), houve redução do Dh (268 ± 31 nm) com PDI estável ($\sim 0,42$), sugerindo reorganização parcial da estrutura, sem impacto expressivo na mobilidade. Entre 37 °C e 45 °C (310–318 K), a contração estrutural se intensificou (Dh = 208 ± 10 nm; PDI = 0,23), acompanhada por aumento do Dif, típico de sistemas termorresponsivos. Essa redução do tamanho favorece a difusão e potencializa a liberação controlada do óleo no sistema.

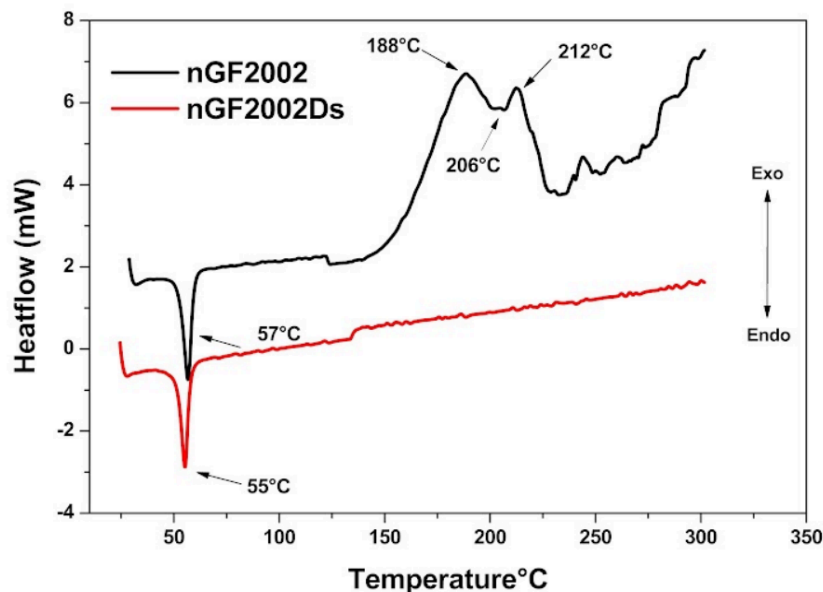
Já para o nGF2002DsC (Figura 11C), a presença da curcumina apresentou comportamento distinto. Entre 25 °C e 32 °C (298–305 K), o Dh aumentou significativamente (199 ± 30 nm para 372 ± 7 nm), com elevação do PDI (0,21 para 0,45), indicando inchaço e maior heterogeneidade, possivelmente devido à interação da curcumina com domínios hidrofóbicos da micela. Apesar do aumento de tamanho das partículas, o Dif também cresceu, sugerindo maior mobilidade devido a redução da viscosidade do meio (YUAN et al., 2021).

Entre 32 °C e 37 °C (305–310 K), o Dh manteve-se elevado (~ 364 nm), mas com PDI aumentado (0,63), indicando instabilidade. Ainda assim, o Dif permaneceu alto, refletindo estruturas grandes, porém dinâmicas. De 37 °C a 45 °C (310–318 K), observou-se uma redução do Dh (353 ± 11 nm) e queda expressiva no PDI (0,20), indicando reorganização estrutural que conferiu maior homogeneidade e estabilidade ao sistema. Nesse intervalo, o Dif estabilizou-se, diminuindo levemente. Isso reflete a formação de estruturas mais compactas, compatíveis com o comportamento termossensível esperado, o que favorece a modulação térmica da liberação da curcumina (JI et al., 2020).

5.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) forneceu informações detalhadas sobre o comportamento físico e químico das substâncias em função da temperatura e do tempo (LEYVA-PORRAS et al., 2020). Para as amostras nGF2002 e nGF2002Ds, foram observadas transições endotérmicas e exotérmicas distintas ao longo do aquecimento, conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12 - Curvas de DSC das amostras nGF2002 e nGF2002Ds.



Fonte: Autora (2025).

Ambas as formulações apresentaram picos endotérmicos em torno de 57 °C para nGF2002 e 55 °C para nGF2002Ds, atribuídos à fusão das regiões cristalinas da porção PEO do copolímero F127 presentes na matriz liofilizada. Embora em estado sólido, essas transições refletem características estruturais herdadas da organização micelar do sistema aquoso original. A leve redução no pico observado para o nGF2002Ds sugere que a presença do óleo promove maior mobilidade das cadeias poliméricas, favorecendo rearranjos térmicos da matriz, conforme discutido anteriormente no DLS. Isso diminui a energia necessária para reorganizar o óleo na estrutura das micelas (ZUBAIR et al., 2022).

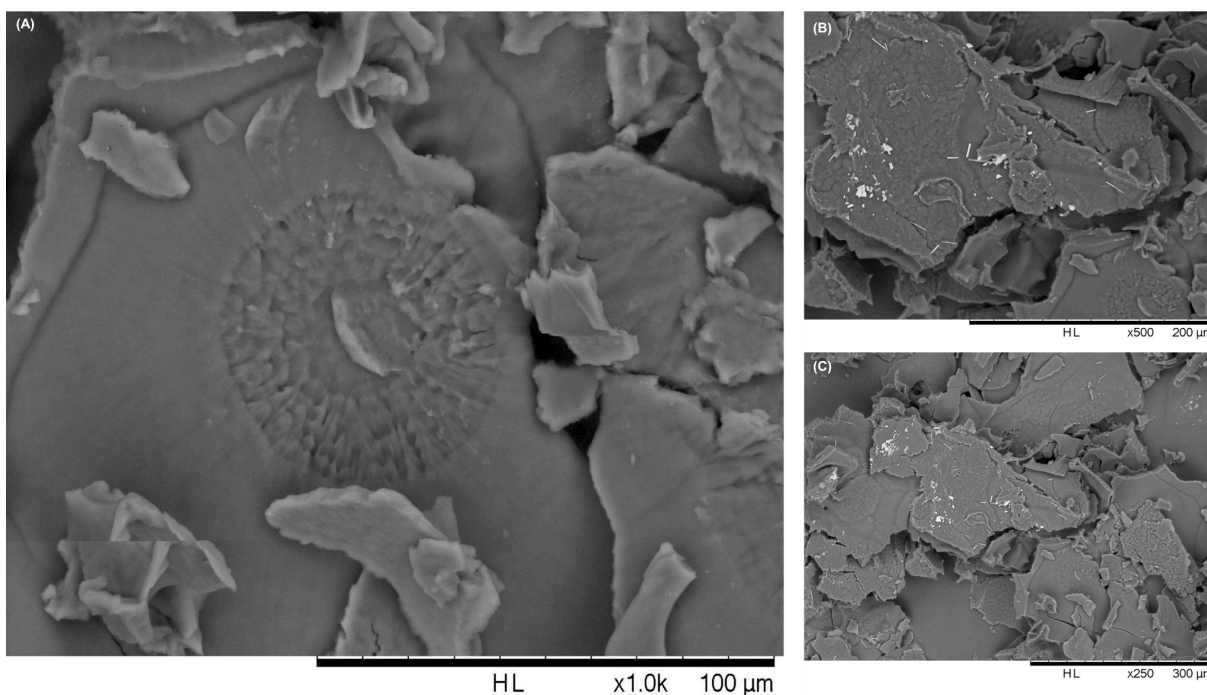
O nanogel base nGF2002 exibiu dois picos exotérmicos (188 °C e 212 °C) e uma transição endotérmica intermediária (~206 °C), sugerindo múltiplas etapas de reorganização térmica do copolímero (CICOLELLA et al., 2024). Já o nanogel nGF2002Ds não apresentou eventos exotérmicos definidos, mas exibiu uma elevação gradual da linha de base a partir de 100 °C, indicando cristalização lenta e difusa, característica de sistemas parcialmente amorfos (KOLEK et al., 2021). A ausência de picos de decomposição até 350 °C no nGF2002Ds indica maior estabilidade térmica, atribuída à modulação das interações intermoleculares promovidas pelo OEDs. Esse comportamento também foi observado no DLS, sugerindo uma estrutura menos ordenada, porém mais resistente a variações térmicas.

5.8 Caracterização morfológica

5.8.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma ferramenta essencial para revelar a morfologia de formulações nanoestruturadas, oferecendo informações valiosas sobre suas propriedades e possíveis aplicações (RAMEZANI et al., 2023). Neste estudo, ela foi empregada para investigar a morfologia do nGF2002Ds, revelando alterações significativas devido a adição de 1% de OEDs (Figura 13).

Figura 13 - Micrografias de MEV do nanogel nGF2002Ds obtidas após liofilização, em ampliações de (A) 1000×, (B) 500× e (C) 250×. As fissuras e a morfologia heterogênea indicam reorganização da matriz polimérica em resposta ao OE de *D. stelechantha* durante a secagem.



Fonte: Autora (2025).

As micrografias do nGF2002Ds mostraram regiões superficiais fragmentadas e irregulares, com uma estrutura rugosa na região central, característica que sugere um padrão de fratura radial (Figura 13A). Essa morfologia é atribuída às tensões geradas durante a liofilização, intensificadas pela presença do óleo (MOHAMMADY et al., 2020). Ao redor dessas regiões, foram observados aglomerados com bordas angulares e texturas variando de lisas a granulares, sugerindo reorganização desigual da matriz polimérica (WANG et al., 2021).

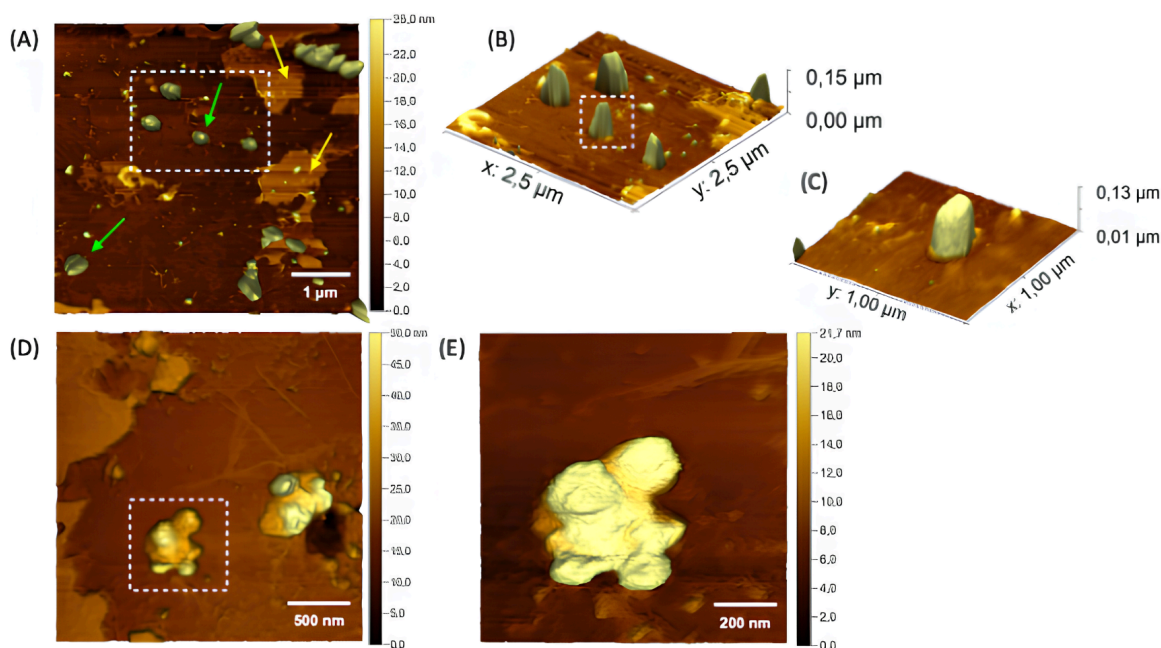
A visualização da fragmentação do material, evidencia a ocorrência de ruptura estrutural do nanogel, o que é observado em ampliações de visualizações menores e maiores respectivamente (Figura 13B e 13C). A incorporação do OE reduz a rigidez da matriz, promovendo interfaces frágeis e domínios separados (STOLERU; BREBU, 2021) (MARQUES et al., 2025). Esses achados são importantes para entender o comportamento do sistema frente à liberação e adesão em aplicações tópicas.

5.8.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A Microscopia de Força Atômica (AFM) foi empregada para caracterizar a morfologia das formulações nGF2002 e nGF2002Ds, fornecendo imagens de alta resolução capazes de revelar detalhes nanométricos relacionados ao tamanho, forma e propriedades de superfície das partículas. Essas informações são fundamentais para otimizar o desempenho e o design das formulações em aplicações farmacêuticas.

Para a formulação nGF2002, os mapas topográficos revelaram a presença de dois domínios distintos: regiões planas, indicadas por setas amarelas (Figura 14A), com altura média de 5,92 nm ($n = 15$), atribuídas às interações intermoleculares entre F127/974P e domínios esféricos, indicados por setas verdes (Figura 14B), com altura média de 108,74 nm ($n = 19$) e diâmetro de cerca de 279 nm, compatíveis com estruturas micelares formadas pelo F127.

Figura 14 - Mapas topográficos de AFM do nanogel nGF2002. (A) Setas verdes indicam estruturas esféricas formadas por micelas de F127, com uma altura média de $108,74 \pm 19,41$ nm ($n = 19$) e setas amarelas indicam regiões planas com uma altura média de $5,92 \pm 3,00$ nm ($n = 15$). (B) e (C) Micrografias 3D expandidas mostrando em detalhes as estruturas esféricas. (D) e (E) Estruturas cúbicas formadas por processos de agregados micelares de F127.



Fonte: Autora (2025).

Essas estruturas, fortalecidas por ligações de hidrogênio cruzadas, evidenciam uma rede polimérica robusta, que favorece a formação de micelas e garante alta estabilidade ao sistema, em conformidade com as propriedades esperadas de seus componentes individuais (LUPU et al., 2023). Além disso, a análise topográfica da formulação nGF2002 revelou um terceiro domínio de estrutura micelar cúbica, sugerindo a presença de uma fase polimórfica internamente distinta, associada a fases típicas de copolímeros em blocos anfifílicos (Figura 14D e 14E).

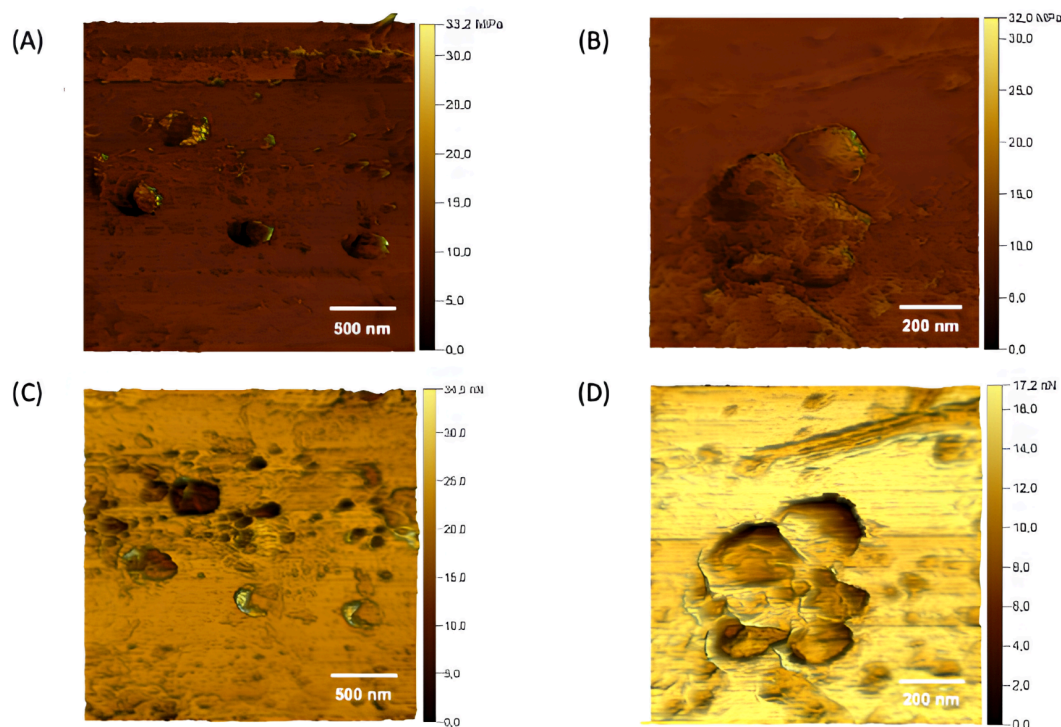
A coexistência de domínios com diferentes geometrias indica uma organização estrutural complexa, influenciada pelas interações entre as cadeias do polímero F127 e do 974P. Esse comportamento é consistente com estudos anteriores que demonstram que copolímeros em blocos anfifílicos apresentam comportamento polimórfico em concentrações superiores a 5% (m/m), com a formação de múltiplas fases em gel, incluindo estruturas

lamelares, hexagonais (normais e reversas), cúbicas contínuas e micelares (TATIN et al., 2015).

As análises de módulo de Young forneceram informações sobre as propriedades mecânicas do nGF2002, revelando que os domínios esféricos das estruturas micelares de F127 exibem menor rigidez, o que caracteriza uma maior fluidez, conforme indicado pelas regiões mais escuras no mapa (Figura 15A), enquanto os domínios planos formados por F127/974P, apresentaram maior rigidez, evidenciadas por regiões mais claras (Figura 15B). Essa heterogeneidade estrutural influencia diretamente a força de adesão da formulação, que é mediada por interações de Van der Waals, forças eletrostáticas, capilares e ligações químicas (FU et al., 2016).

As estruturas micelares formadas por F127 apresentaram valores reduzidos de força de adesão, atribuídos à baixa interação da ponta do AFM com estruturas internamente ocas (Figura 15C). Já os domínios de F127/974P demonstraram maior força de adesão, devido às ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas (Figura 15D). Esses dados indicam que as maiores forças de adesão ocorrem devido à interação intermolecular de ligação de hidrogênio entre os polímeros, enquanto as menores são atribuídas a interações dipolo-induzidas entre as cadeias hidrofóbicas de PPO e a sonda do AFM.

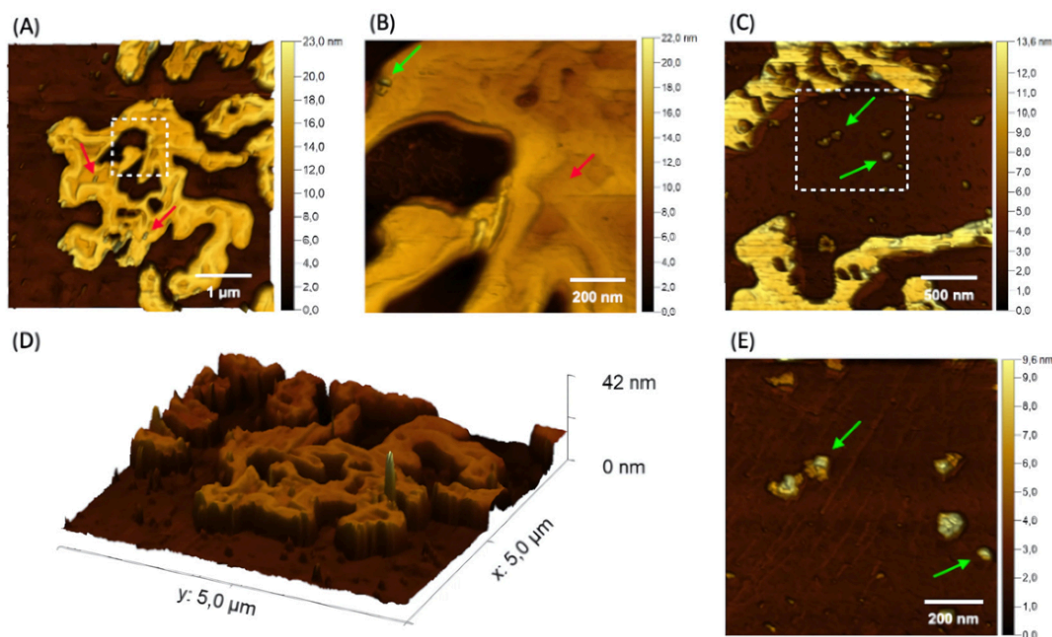
Figura 15 - Mapas de módulo de Young (A) e (B), e forças de adesão (C) e (D) adquiridos para os diferentes domínios observados para o nGF2002.



Fonte: Autora (2025).

Na formulação nGF2002Ds, a presença de 1% de OEDs modificou totalmente a morfologia do gel base nGF2002. Regiões mais claras, com altura de 11,09 nm ($n = 20$) foram atribuídas a incorporação de OEDs na superfície, conforme indicado por setas vermelhas (Figura 16A). Houve também uma redução na quantidade de domínios esféricos (altura média de 5,41 nm e diâmetro de 86 nm, ambos $n = 15$), sugerindo uma redistribuição das micelas dentro da matriz modificada, indicadas por setas verdes (Figura 16B). Esses achados indicam que os domínios formados por micelas de F127 coexistem tanto com OEDs quanto com a matriz F127/974P, formando regiões planas interconectadas por fortes ligações de hidrogênio, evidenciada pelas áreas mais escuras nos mapas topográficos (Figura 16C e 16E).

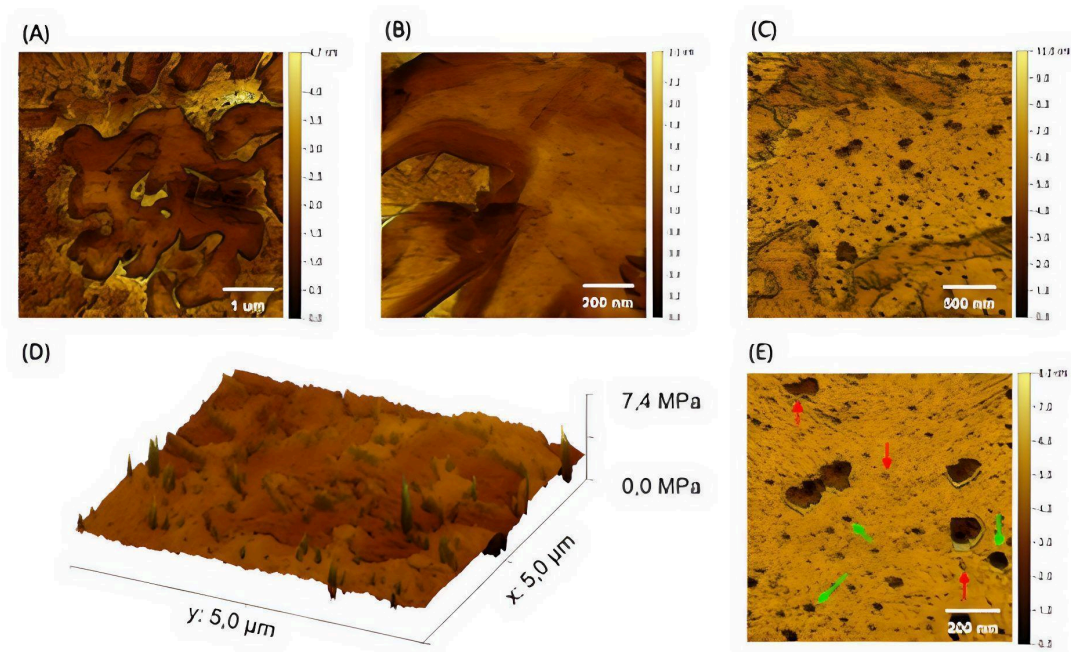
Figura 16 - Mapas topográficos de AFM do nanogel nGF2002Ds. Setas vermelhas indicam estruturas planas de maior espessura, formadas pela presença do OEDs na superfície da matriz nGF2002, com altura média de $11,09 \pm 1,47$ nm ($n = 20$). Setas verdes indicam os domínios esféricos relacionados com as estruturas micelares de F127 com valores médio de altura de $5,41 \pm 2,21$ nm ($n = 15$) e diâmetro médio de $86,01 \pm 15,97$ nm ($n = 15$).



Fonte: Autora (2025).

As análises do módulo de Young complementam essa observação ao revelar que as regiões ricas em OEDs apresentam rigidez intermediária, compatíveis com uma matriz mais hidratada e menos rígida, em consonância com o efeito emoliente esperado pelo OEDs (Figura 17A e 17B). Os valores médios e baixos desses domínios são devidos uma parcela de micelas de F127 vazias, indicada por setas verdes e outra parcela carregada com OEDs, indicada por setas vermelhas (Figura 17C e 17E).

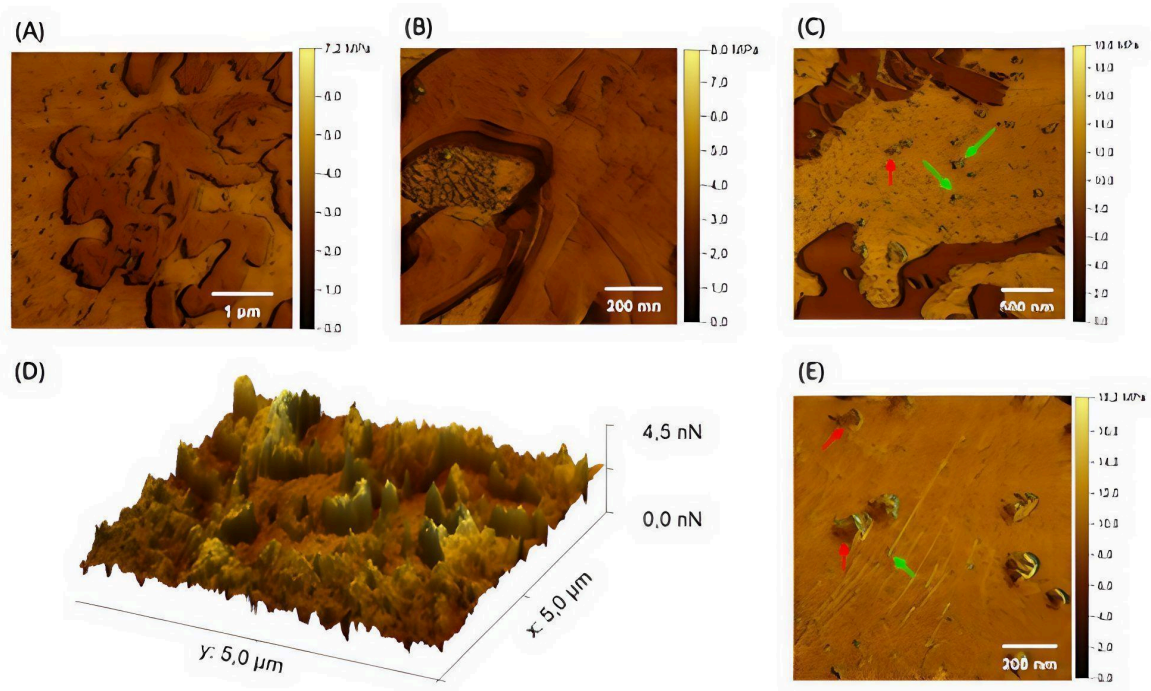
Figura 17 - Mapas de módulo de Young adquiridos para o nanogel nGF2002Ds. Os domínios planos superiores, contendo a maior concentração de OEDs mostram valores intermediários de módulo de Young. As regiões mais claras dos mapas correspondem aos domínios de maior rigidez, constituídos pela blenda dos polímeros F127/974P. Setas verdes e vermelhas indicam os domínios micelares vazios (menores valores de módulo) e carregados com OEDs (valores intermediários de módulo), respectivamente.



Fonte: Autora (2025).

Isso é corroborado com os mapas de forças de adesão que mostraram regiões com maior concentração de OEDs. Regiões com áreas mais escuras apresentaram menores valores de adesão em decorrência da fraca interação de Van der Waals (Figura 18A e 18B). Por outro lado, regiões com domínios micelares vazias indicadas por setas verdes, exibiram maior força de adesão, reforçando a heterogeneidade estrutural gerada pela presença do OEDs, enquanto regiões com domínios micelares carregados com OEDs indicadas por setas vermelhas, resultou em uma diminuição dessa força devido às suas características hidrofílicas do óleo e menor capacidade de formar ligações de hidrogênio com a ponta do AFM (Figura 18C e 18D). Essas variações morfológicas refletem a complexidade das interações entre as moléculas de OEDs e a mistura F127/974P, impactando diretamente as propriedades da formulação.

Figura 18 - Mapas de força de adesão adquiridos para o nanogel nGF2002Ds. As regiões de maior predominância de OEDs mostram valores intermediários de força de adesão em decorrência da característica hidrofóbica dos constituintes químicos. Os maiores valores de força de adesão estão associados aos domínios poliméricos F127/974P devido a predominância de ligações de hidrogênio. Setas verdes e vermelhas indicam os domínios micelares vazios (maiores valores de adesão) e carregados com OEDs (valores intermediários de adesão), respectivamente.



Fonte: Autora (2025).

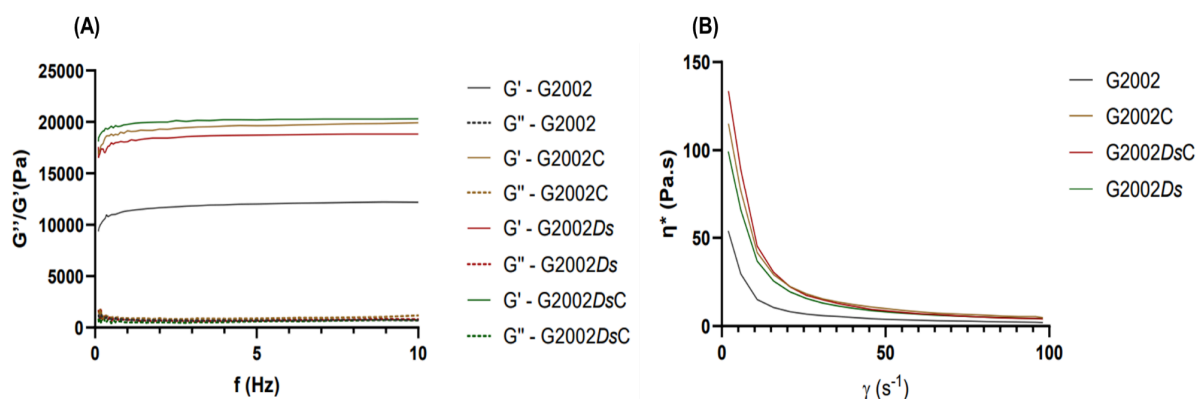
5.9 Reologia

As formulações nGF2002, nGF2002C, nGF2002Ds e nGF2002DsC apresentaram comportamento reológico típico de géis termossensíveis, com transição sol-gel evidenciada pela inversão dos módulos viscoelásticos (de $G'' > G'$ para $G' > G''$) ocorrendo entre 26,2 °C (nGF2002) e 19,1 °C (nGF2002DsC), com valor intermediário de 22,3 °C em nGF2002C e 22,1 °C no nGF2002Ds. A redução gradual da temperatura de transição com os compostos OEDs e OEDs/Curcumina, indicou maior interação entre os ativos e a matriz F127/974P, refletindo modificações na organização interna da rede polimérica (MARQUES et al., 2025).

A presença desses compostos também promoveu aumento expressivo na viscosidade a 32,5 °C, elevando os valores de 2151,5 Pa·s (nGF2002) para 2836,0 Pa·s (nGF2002C),

3313,5 Pa·s (nGF2002Ds) e 3980,0 Pa·s (nGF2002DsC). Além disso, observou-se maior elasticidade da rede, evidenciada pela redução progressiva da razão G''/G' (de 0,065 em nGF2002 para 0,034 em nGF2002C e de 0,026 em nGF2002Ds para 0,015 em nGF2002DsC), o que indicou formação de estruturas mais rígidas e coesas. Esses resultados revelam que a presença de OEDs e curcumina favorece interações mais intensas com a rede polimérica, resultando em formulações com maior coesão estrutural (Figura 19A e 19B).

Figura 19 - Propriedades reológicas das formulações nGF2002, nGF2002Ds, nGF2002C e nGF2002DsC. (A) Módulos viscoelásticos G' (linha contínua) e G'' (linha tracejada) em função da frequência (f), indicando maior estruturação das formulações com OEDs e curcumina. (B) Viscosidade complexa (η^*) em função da taxa de cisalhamento (γ), evidenciando o comportamento pseudoplástico das amostras, com afinamento mais acentuado nas formulações com ativos bioativos.



Fonte: Autora (2025).

A análise de varredura de frequência (Figura 19A) corrobora o perfil viscoelástico observado, evidenciando o predomínio do módulo elástico ($G' > G''$) em todas as formulações, o que indica a formação de uma rede tridimensional bem estruturada. O parâmetro S , que expressa a força do gel, aumentou consideravelmente com a adição dos ativos: de 10.533 Pa·s·m (nGF2002) para 20.281 Pa·s·m (nGF2002C), e 18.000 Pa·s·m (nGF2002Ds) para 19.620 Pa·s·m (nGF2002DsC). Simultaneamente, o índice m apresentou redução de 0,052 (nGF2002) para 0,021 (nGF2002DsC), indicando que o sistema se tornou menos dependente da frequência de oscilação e assumiu um comportamento viscoelástico mais sólido, característico de materiais com maior grau de organização supramolecular.

As curvas de fluxo (Figura 19B) confirmam o comportamento pseudoplástico de todas as formulações ($n < 1$). A consistência (K) aumentou de 115,7 Pa·s⁻ⁿ (nGF2002) para 234,3

$\text{Pa}\cdot\text{s}^{-n}$ (nGF2002C), $233 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-n}$ (nGF2002Ds) e $181,5 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-n}$ (nGF2002DsC), refletindo maior resistência ao escoamento em baixas taxas de cisalhamento. Apesar disso, a formulação nGF2002DsC apresentou o maior valor de n (0,16), refletindo um afinamento mais acentuado sob cisalhamento e possível reorganização estrutural em altas taxas de deformação.

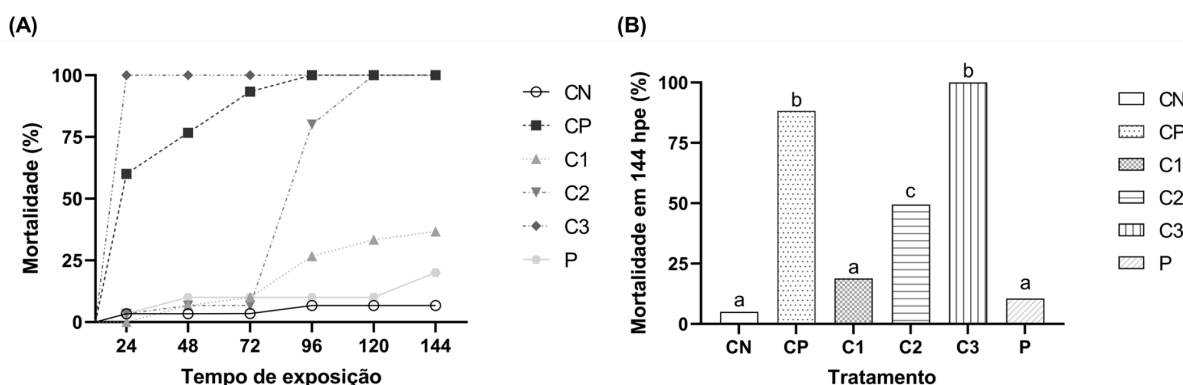
5.10 Avaliação de Toxicidade em Zebrafish (*Danio rerio*)

5.10.1 Mortalidade e taxa de eclosão

A toxicidade embrionário-larval no ensaio com *Danio rerio* (ZELT), variou de acordo com a concentração do OEDs testado no nanogel nGF2002Ds: C1 (50 $\mu\text{g/mL}$), C2 (100 $\mu\text{g/mL}$) e C3 (200 $\mu\text{g/mL}$). O nanogel base nGF2002 sem óleo, também foi analisado como grupo controle: P (20.000 $\mu\text{g/mL}$).

Após 24 horas de exposição (hpe), foi observada alta mortalidade nas larvas expostas à C3, atingindo 100%. Em C2, a mortalidade foi de 6,66% em 72 hpe, chegando a 100% em 144 hpe ($p < 0,05$). Em contraste, na C1, observou-se 26,66% de mortalidade em 96 hpe e 36,66% em 144 hpe, enquanto nos grupos controle em meio E3 (CN) e (P), as taxas foram menores, com 6,66% e 20%, respectivamente, até 144 hpe ($p > 0,05$). Esses dados evidenciam o efeito dose-dependente do OEDs no nanogel, com maior toxicidade em concentrações elevadas (Figura 20).

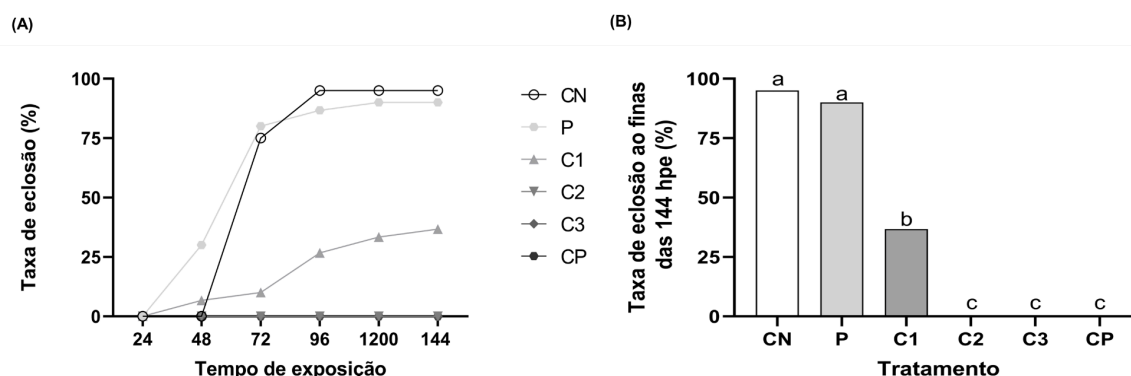
Figura 20 - Mortalidade (%) de embriões de zebrafish (*Danio rerio*) expostos ao nanogel nGF2002Ds em diferentes concentrações (C1, C2 e C3), controles negativo (CN), positivo (CP) e ao nanogel base sem OEDs (P). A) Mortalidade acumulada ao longo de 144 hpe e B) Mortalidade final registrada em 144 hpe. Os dados indicam diferenças significativas entre os grupos (letras diferentes, $p < 0,05$).



Fonte: Autora (2025).

A taxa de eclosão dos embriões expostos a essas concentrações também variou ao longo do tempo, com diferenças significativas entre as concentrações testadas a partir de 72 horas hpe (Figura 21).

Figura 21 - Taxa de eclosão (%) de embriões de zebrafish (*Danio rerio*) expostos ao nanogel nGF2002Ds (C1, C2, C3), ao controle negativo (CN), grupo positivo (CP) e ao nanogel base sem OEDs (P). A) Eclosão acumulada até 144 hpe; B) Eclosão final em 144 hpe.



Fonte: Autora (2025).

Os grupos CN e P apresentaram taxa de eclosão de 95.00% e 90.00% às 144 hpe. Já os embriões expostos à C1 apresentaram taxas de eclosão reduzida, de 36.67% às 144 hpe. Ao final do período (144 hpe), as larvas expostas à C2 e C3 apresentaram eclosão (0%). A redução na taxa de eclosão é um indicativo sensível de toxicidade embrionária em zebrafish, sugerindo que, mesmo sem mortalidade total, o desenvolvimento dos embriões foi comprometido, especialmente nas maiores concentrações do óleo.

Os resultados evidenciam um efeito dose-dependente do OEDs sobre a viabilidade embrionária, com toxicidade crescente conforme a concentração aumenta. Enquanto os grupos P e C1 apresentaram eclosão significativa, o aumento do óleo em C2 e C3 impediu o desenvolvimento embrionário. Esse padrão também é observado em nanomateriais, como as nanopartículas de sílica (SiNPs), cuja toxicidade aumenta com a dose e está associada a alterações na permeabilidade coriônica, comprometendo as barreiras embrionárias (VALADARES et al., 2023).

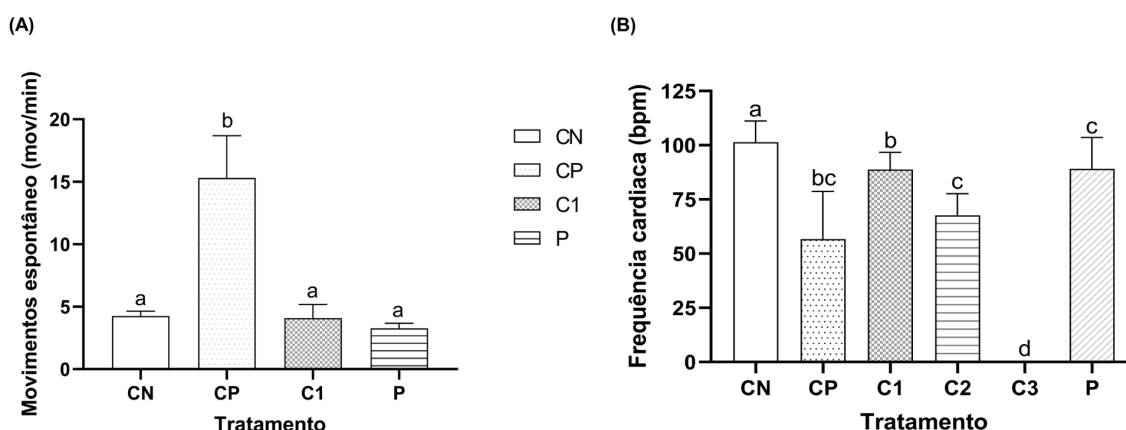
No presente estudo, o aumento de eclosão no grupo P reforça que os efeitos observados estão diretamente relacionados à exposição do óleo. Dessa forma, esses resultados

corroboram estudos que apontam compostos bioativos de óleos essenciais como citotóxicos em zebrafish, especialmente em estágio embrionário, ressaltando a importância de avaliação cuidadosa das concentrações para garantir seu uso seguro (WANG et al., 2023).

5.10.2 Neurotoxicidade e cardiotoxicidade

A exposição das larvas do zebrafish com o nanogel nGF2002Ds também foi realizada em relação aos movimentos espontâneos em 24 hpe e batimentos cardíacos realizada após 48 hpe (Figura 22A e 22B).

Figura 22 - Avaliação de neurotoxicidade e cardiotoxicidade em embriões de zebrafish (*Danio rerio*). (A) Movimentos espontâneos em 24 hpe nos grupos CN, CP, C1 e P e (B) Frequência cardíaca em 48 hpe nos grupos CN, CP, P, C1, C2 e C3.



Fonte: Autora (2025).

Após 24 horas de exposição (hpe), os embriões expostos ao tratamento C2 não apresentaram contrações espontâneas durante o período de avaliação. Em contraste, os embriões do grupo controle positivo (CP) exibiram uma frequência de contração espontânea (FCE) significativamente maior ($15,30 \pm 3,38$ movimentos/min) em comparação com o grupo CN, C1 e P ($4,2 \pm 0,38$; $4,10 \pm 1,08$; $3,28 \pm 0,39$, respectivamente) ($p < 0,05$, Figura 22A).

Quanto aos batimentos cardíacos analisados após 48 hpe, os embriões expostos aos grupos CN, CP, P, C1 e C2 apresentaram médias de $101,4 \pm 1,77$; $56,67 \pm 12,72$; $89,07 \pm 2,79$; $88,82 \pm 1,48$ e $67,68 \pm 1,89$ batimentos por minuto, respectivamente (Figura 22B). O grupo CP, reconhecido por sua alta toxicidade (VIEIRA et al., 2020), apresentou a maior redução da frequência cardíaca, evidenciando cardiodepressão, e confirmou seu papel como controle positivo para efeitos cardiotóxicos no desenvolvimento de zebrafish.

O grupo C2 (100 µg/mL) também apresentou redução acentuada na frequência cardíaca, indicando cardiotoxicidade do nanogel nGF2002Ds em concentrações mais altas do óleo. Além disso, foram observados sinais de neurotoxicidade grave (ausência de contrações) e cardiotoxicidade moderada, tornando C2 o grupo mais tóxico entre os grupos analisados. Em contraste, os tratamentos P e C1 (50 µg/mL) exibiram reduções discretas, ainda dentro de parâmetros fisiológicos.

No entanto, a tendência de queda em C1, ainda que discreta, reforça a necessidade de estudos adicionais para definir uma concentração segura do OE de *D. stelechantha* no nanogel. O grupo CN manteve a frequência cardíaca dentro da normalidade, como esperado. Dessa forma, esses resultados reforçam o comportamento dose-dependente da formulação, com impacto mais evidente sobre a função cardíaca em concentrações elevadas do óleo.

Estudos anteriores com óleos essenciais corroboram esses achados. Por exemplo, o óleo essencial de *Ocimum basilicum* provocou redução significativa da frequência cardíaca em embriões de zebrafish após 96 h de exposição, indicando cardiotoxicidade dependente da dose (CAPPARUCCI et al., 2022). De forma semelhante, o óleo de capim-limão apresentou efeitos neurotóxicos relevantes, sendo comparável, em alguns parâmetros, a modelos clássicos de toxicidade (DA SILVA et al., 2023). Esses achados reforçam que o aumento da concentração do OEDs no tratamento C2 podem atuar de forma combinada sobre os sistemas nervoso e cardiovascular, comprometendo o desenvolvimento embrionário normal.

5.10.3 Alterações Morfológicas

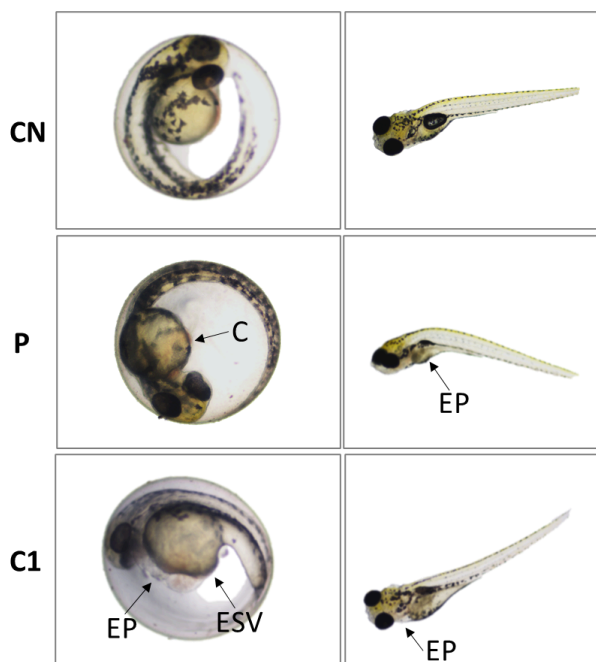
A partir das análises morfológicas, foram identificadas diversas alterações teratogênicas nos embriões e larvas ao longo das 144 horas pós-exposição (hpe). No grupo controle negativo (CN), não foram observadas malformações significativas, servindo como referência de normalidade.

O grupo tratado com o nanogel base sem OEDs (P – 20.000 µg/mL) apresentou alterações como edema de saco vitelino, ausência de olhos e deformações na cabeça, embora com menor frequência e intensidade que os grupos contendo óleo. Esses efeitos indicam uma toxicidade basal da matriz, provavelmente associada à alta concentração do copolímero F17 utilizada nesse estudo (20%), o que poderá ser ajustado em estudos futuros.

Nos embriões tratados com o nanogel nGF2002Ds, observou-se um padrão claro de toxicidade dose-dependente. O grupo C1 (50 µg/mL) apresentou aumento na incidência de

malformações, como lordose, alterações caudais e formação de coágulos, além de edemas em estruturas vitais. Esses efeitos estão ilustrados na Figura 23.

Figura 23 - Alterações morfológicas em embriões e larvas de zebrafish após 48 e 144 hpe, com destaque para edema pericárdico (EP), edema de saco vitelino (ESV) e coágulos observados nos grupos C1 e P, em comparação ao controle negativo (CN: meio E3).

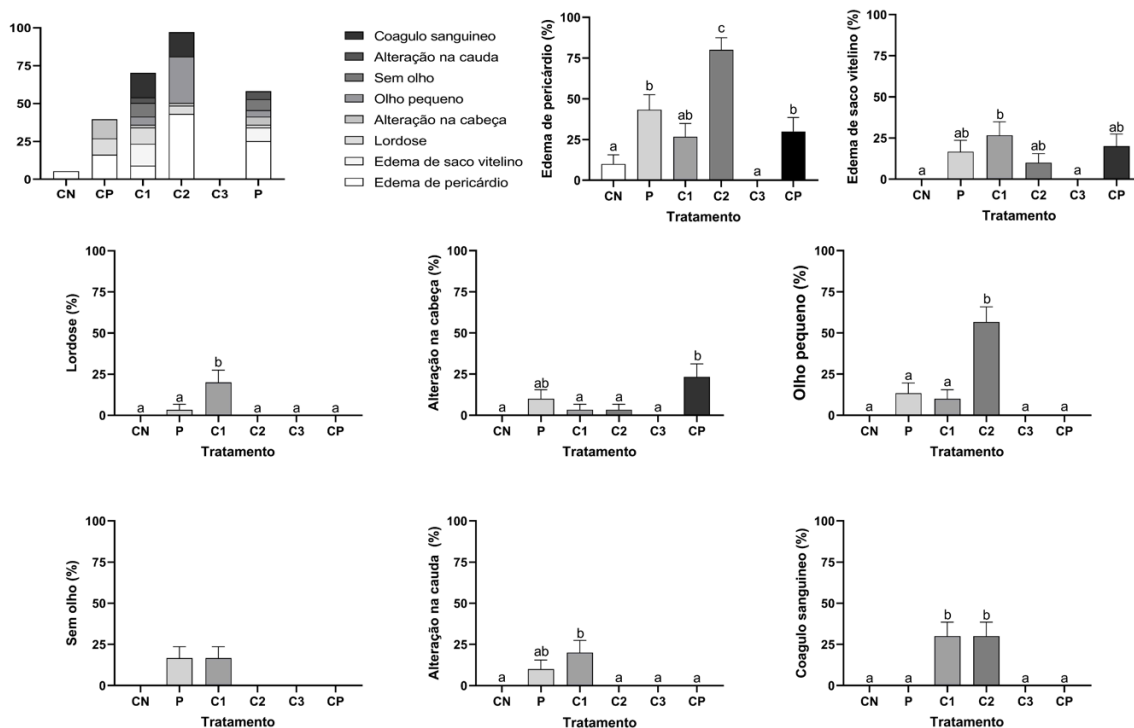


Fonte: Autora (2025).

O grupo C2 (100 µg/mL) exibiu alterações mais severas, como olhos pequenos, edema pericárdico acentuado e maior recorrência de coágulos, indicando maior comprometimento em órgãos sensíveis ao desenvolvimento. Essas manifestações são marcadores amplamente reconhecidos de toxicidade em embriões de *Danio rerio*, frequentemente associados a disfunções cardíacas e hepáticas, respectivamente, e têm sido constantemente relatados em estudos que utilizam este modelo para avaliação de teratogenicidade (ZHANG et al., 2014; WIEGAND et al., 2023).

Já no grupo C3 (200 µg/mL), devido à elevada concentração de óleo, a análise morfológica foi impossibilitada de observar. Esses resultados indicam que a presença do OEDs no nanogel induz alterações teratogênicas mais pronunciadas em relação à concentração do nanogel base (P), reforçando um efeito dose-dependente do óleo. Ainda que os grupos P e C1 tenham apresentado alterações em relação ao CN, os efeitos observados em C2 e C3 foram substancialmente mais intensos, conforme evidenciado na Figura 24.

Figura 24 - Alterações teratogênicas em larvas de zebrafish após 144 hpe aos tratamentos CN, CP, C1, C2 e C3. Parâmetros avaliados: edema pericárdico, edema de saco vitelino, lordose, alterações na cabeça, olho pequeno, ausência ocular, alterações na cauda e coágulo sanguíneo.



Fonte: Autora (2025).

A aplicabilidade do modelo *Danio rerio* na avaliação da toxicidade de sistemas nanoestruturados, reforça a importância da avaliação toxicológica de formulações contendo compostos bioativos com produtos naturais (YVONNE C.M. STAAL et al., 2018). Neste contexto, a combinação entre nanomateriais e ativos naturais pode potencializar os riscos de toxicidade, tornando essencial a avaliação da segurança desses sistemas.

5.11 Ensaios *in vitro* Contra Larvas de *Aedes aegypti*

O controle biológico de vetores como *Aedes aegypti* é uma estratégia essencial no enfrentamento das arboviroses. Neste contexto, avaliou-se a eficácia larvicida do nanogel contendo óleo essencial de *Duguetia stelechantha* (nGF2002Ds) após 24 horas de exposição, considerando concentrações entre 5 e 500 µg/mL (Tabela 7).

Tabela 7 - Eficácia larvicida do nanogel nGF2002Ds contra larvas de *Aedes aegypti* após 24 horas, expressa em % de mortalidade (média $\pm$ desvio padrão), com n = 10.

Entrada	Tratamento($\mu\text{g/mL}$)	Mortalidade (% $\pm$ DP)
	nGF2002Ds ^a	24 h
1	5	0,0 $\pm$ 0,0
2	50	7,0 $\pm$ 10,6
3	150	80,0 $\pm$ 20,0
4	250	89,0 $\pm$ 9,9
5	350	92,0 $\pm$ 11,3
6	500	95,0 $\pm$ 8,5
7	Água	0,0 $\pm$ 0,0
8	nGF2002 ^b	0,0 $\pm$ 0,0
9	Temefós ^c	100,0 $\pm$ 0,0
10	Bti ^c	100,0 $\pm$ 0,0

^aConcentração em OEDs

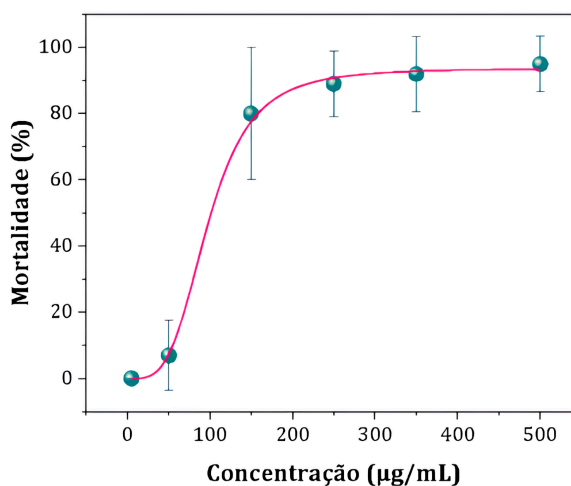
^bControle negativo testado a $1 \times 10^5 \mu\text{g/mL}$

^cControles positivos testados a $100 \mu\text{g/mL}$

Conforme demonstrado na Tabela 7, a formulação apresentou efeito larvicida dependente da dose. As concentrações de 5 e $50 \mu\text{g/mL}$ (entrada 1 e 2) exibiram baixa mortalidade ($<10\%$), enquanto a partir de $150 \mu\text{g/mL}$ (entrada 3), houve aumento expressivo, alcançando 80% a $150 \mu\text{g/mL}$, e até 95% a $500 \mu\text{g/mL}$. Os controles negativos (água e nGF2002 sem OEDs) não apresentaram mortalidade, confirmando que os efeitos são atribuídos exclusivamente à ação do OEDs. Já os controles positivos (Temefós e Bti) provocaram 100% de mortalidade, validando as condições experimentais.

Dessa forma, os dados demonstram que o nGF2002Ds apresenta uma redução significativa nas concentrações letais ao longo do tempo de exposição, com uma mortalidade acentuada nas primeiras 24 horas. A CL_{50} e CL_{90} estimadas nesse período foram de $97,7 \pm 6,4 \mu\text{g/mL}$ e $177,7 \pm 18,3 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, com R^2 ajustado de 0,9992, demonstrando excelente ajuste do modelo (Figura 25).

Figura 25 - Concentração letal 50 (CL₅₀) e 90 (CL₉₀) contra larvas de *Aedes aegypti* em 24h tratadas com nGF2002Ds: CL₅₀ 97,7 ± 6,4 µg/mL e CL₉₀ 177,7 ± 18,3 µg/mL com R²_{Aj} 0,9992.



Fonte: Autora (2025).

A ausência de variações após 48 horas reforça que a maior parte da mortalidade ocorreu nas primeiras 24 horas de exposição, sugerindo ação larvicida rápida da formulação. Esses resultados revelam o nanogel nGF2002Ds como uma alternativa inovadora e sustentável frente aos inseticidas comerciais, o que reforça o potencial dos OEs como agentes bioativos em formulações nanoestruturadas.

A incorporação do OE de *D. stelechantha* (OEDs) no nanogel base nGF2002, formulado com Plurônico F127, um copolímero de baixa CMC e reconhecida segurança pela FDA, favoreceu a estabilidade e o desempenho larvicida da formulação. Diferente de surfactantes como Tween-80, mais suscetíveis à degradação, o uso do copolímero contribuiu para preservar a composição bioativa, como o OEDs.

Diante disso, a eficácia observada está relacionada às vantagens da nanoescala, que incluem maior estabilidade, proteção contra degradação, liberação controlada e menor volatilização dos óleos essenciais (FAUSTINO et al., 2020). Estudos anteriores com OEs nanoencapsulados, como os de *Artemisia dracunculus*, *Eucalyptus globulus* e *Pectis brevipedunculata*, também demonstraram efeito larvicida significativo, embora com variações nos valores de CL₅₀ atribuídas à composição química e à natureza dos excipientes utilizados.

O nanogel com OE de *A. dracunculus* apresentou uma estabilidade aprimorada e liberação sustentada, com CL₅₀ de 6,6 µg/mL contra *Anopheles stephensi*, importante vetor da

malária (OSANLOO et al., 2022). De forma semelhante, o nanogel com OE de *Eucalyptus globulus* demonstrou eficácia contra o mesmo vetor, com CL_{50} de 32 $\mu\text{g/mL}$ (ALIPANAH et al., 2022). Em contraste, o nanogel com OE de *Pectis brevipedunculata* mostrou atividade larvívica contra o *Aedes aegypti*, um vetor de arbovirose mais resistente, com CL_{50} em 24 e 48 horas de 199,5 $\mu\text{g/mL}$ e 184,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (MARQUES et al., 2024). Nesse cenário, este estudo abre caminhos para futuras investigações, pois é a primeira aplicação do OE de *D. stelechantha* encapsulado em nanogel *ecofriendly* contra o mosquito *Aedes aegypti*.

5.12 Ensaios *in vitro* Contra Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

Leishmania amazonensis, principal espécie causadora da LTA no Maranhão, foi utilizada para avaliar a atividade leishmanicida do óleo essencial de *Duguetia stelechantha* (OEDs) e do nanogel nGF2002Ds após 24 horas de incubação (Tabela 8).

Tabela 8 - Atividade sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* do nGF2002Ds e do OEDs puro após 24 horas de interação entre os compostos e os parasitas.

Tratamento	Concentração em $\mu\text{g/mL}$	% de morte
NG1	757,5	100,0
OE1	477,5	96,5
AB1	1,95	96,5
NG2	378,8	87,5
OE2	238,8	80,0
AB2	0,97	96,5
NG3	189,4	0,0
OE3	119,5	0,0
AB3	0,48	94,0

NG1–NG3: nGF2002Ds com OEDs a 0,125%, 0,063% e 0,031% (757,5; 378,8; 189,4 $\mu\text{g/mL}$).

OE1–OE3: OEDs puro a 477,5; 238,8; 119,5 $\mu\text{g/mL}$.

AB1–AB3: Anfotericina B a 1,95; 0,97; 0,48 $\mu\text{g/mL}$ (controle positivo).

Nas concentrações mais elevadas (OE1: 477,5 $\mu\text{g/mL}$ e NG1:757,5 $\mu\text{g/mL}$), as taxas de mortalidade foram de 96,5% e 100%, respectivamente. Em concentrações intermediárias (OE2: 238,8 $\mu\text{g/mL}$ e NG2: 378,8 $\mu\text{g/mL}$), as taxas de mortalidade foram de 80% e 87,5% de morte parasitária. Já nas menores concentrações (OE3: 119,5 $\mu\text{g/mL}$ e NG3:189,4 $\mu\text{g/mL}$), ambos os tratamentos não apresentaram efeito leishmanicida. O controle positivo com anfotericina B (AB1: 1,95 $\mu\text{g/mL}$) confirmou a validade do ensaio ao promover 96,5% de mortalidade.

Esses resultados demonstram que a incorporação do OEDs ao nanogel potencializa sua atividade leishmanicida, reforçando seu uso promissor em formulações tópicas para o

tratamento da leishmaniose. Estudos anteriores com o OE de *D. stelechantha* demonstraram efeito antipromastigota contra *L. amazonensis*, com IC₅₀ de 138,3 µg/mL (BARATA et al., 2023). Outras espécies da família Annonaceae também apresentaram atividade significativa, como *Annona coriacea*, com IC₅₀ de 9,9 µg/mL (SIQUEIRA et al., 2011).

A literatura também reforça que sistemas nanocarreadores contribuem significativamente para o desempenho de bioativos naturais, atuando em diversos alvos celulares como a membrana plasmática, mitocôndrias e DNA, além de induzirem apoptose e reforçarem a resposta imune, com baixa toxicidade (ALANAZI; SAID, 2022). Corroborando esses achados, formulações semelhantes, como nanogéis contendo OE de *Pectis brevicutulata*, apresentaram mortalidade superior a 90% em 48 horas frente a *L. amazonensis* (MARQUES et al., 2025). Dessa forma, os dados obtidos neste estudo reforçam o alto potencial leishmanicida do nGF2002Ds e apontam sua aplicabilidade em formulações tópicas no tratamento da leishmaniose cutânea.

6 CONCLUSÃO

Como proposta sustentável para superar as limitações dos tratamentos convencionais da leishmaniose tegumentar americana (LTA) e do controle de *Aedes aegypti* (vetor responsável pela transmissão das arboviroses como a dengue, zika e chikungunya), este estudo desenvolveu um nanogel semissólido (nGF2002Ds) contendo óleo essencial de *Duguetia stelechantha* (OEDs), utilizando os copolímeros F127 e 974P em meio aquoso e caracterizando uma abordagem *ecofriendly*. O nGF2002Ds foi combinado com diferentes concentrações de curcumina, para otimizar a formulação nGF2002DsC.

A análise espectroscópica por FTIR revelou alterações vibracionais nas ligações da matriz polimérica, evidenciando interações entre os componentes (OEDs e OEDs/Curcumina). A análise por DLS demonstrou aumento da estabilidade coloidal nas formulações nGF2002Ds e nGF2002DsC, enquanto a reologia indicou melhora na viscosidade e organização estrutural com a presença dos bioativos. A análise DSC confirmou a estabilidade térmica da formulação nGF2002Ds, e as análises MEV e AFM mostraram morfologia homogênea e maior rigidez da rede polimérica em relação à formulação base nGF2002. Os resultados foram excelentes para as avaliações biológicas testadas.

O nanogel nGF2002Ds apresentou potente efeito larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*, com CL₅₀ = 97,7 µg/mL e CL₉₀ = 177,7 µg/mL em 24 horas e toxicidade dose-dependente em embriões de *Danio rerio*. Concentrações elevadas (C2 e C3) no teste

ZELT apresentaram maior mortalidade e menor eclosão, enquanto concentrações baixas e ausência do OEDs (C1 e P) tiveram menor toxicidade. O grupo C2 mostrou ausência de contrações espontâneas e redução da frequência cardíaca, indicando maior neuro e cardiotoxicidade. Alterações morfológicas foram mais evidentes em C1, mostrando que o óleo essencial no nanogel aumenta a teratogenicidade em relação ao nanogel base (P). Além disso, o nanogel nGF2002Ds demonstrou alta atividade leishmanicida, atingindo 100% de mortalidade de *Leishmania (L.) amazonensis*, superando o OEDs isolado.

Os resultados obtidos evidenciam a eficiente incorporação do nGF2002Ds como sistema carreador de compostos bioativos naturais, além de servir como base para a formulação nGF2002DsC, enriquecida com curcumina, o que consolida uma abordagem sustentável e inovadora para o controle e tratamento das DTNs.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass. *Carol Stream*, 4. ed. p.803. 2007.
- AGNIESZKA WOLNICKA-GLUBISZ; WISNIEWSKA-BECKER, A. Dual Action of Curcumin as an Anti- and Pro-Oxidant from a Biophysical Perspective. *Antioxidants*, v. 12, n. 9, p. 1725–1725, 2023.
- AGUILAR-LÓPEZ, Y. A.; VILLAFUERTE-ROBLES, L. Functional Performance of Chitosan/Carbopol 974P NF Matrices in Captopril Tablets. *Journal of Pharmaceutics*, v. 2016, p. 1–9, 2016.
- AGUS SUBAGIYO et al. The effectiveness of various citronella oil nanogel formulations as a repellent of *Aedes aegypti* mosquito. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, p. 101–105, 2024.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta Tropica*, v. 172, p. 86–90, 2017.
- ALANAZI, A. D.; SAID, M. B. Plant Bioactive Ingredients in Delivery Systems and Nanocarriers for the Treatment of Leishmaniasis: An Evidence-Based Review. *Iranian Journal of Parasitology*, 2022.
- ALIPANAH, H. et al. Nanoemulsion and Nanogel Containing *Eucalyptus globulus* Essential Oil; Larvicidal Activity and Antibacterial Properties. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 2022, p. 1–9, 2022.
- ALMEIDA, J. R. G. DA S. et al. Antinociceptive Activity of Ethanol Extract from *Duguetia chrysocarpa* Maas (Annonaceae). *The Scientific World Journal*, v. 2012, p. 1–6, 2012.
- AMAROLI, A. et al. The Bright Side of Curcumin: A Narrative Review of Its Therapeutic Potential in Cancer Management. *Cancers*, v. 16, n. 14, p. 2580–2580, 2024.
- ANOOJ, E. et al. Nanogels: An overview of properties, biomedical applications, future research trends and developments. *Journal of Molecular Structure*, v. 1239, p. 130446, 2021.
- AUGUSTO, J. et al. Socioenvironmental aspects of the Purus Region - Brazilian Amazon: Why relate them to the occurrence of American Tegumentary Leishmaniasis? *PLOS ONE*, v. 14, n. 2, p. e0211785–e0211785, 2019.
- BABIĆ et al. Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in zebrafish embryo using multiple endpoint testing. *Water Research*, v. 115, p. 9–21, 2017.
- BARATA LOPES, A. C. C. et al. Chemical composition and potential antileishmanial and cytotoxic activity of *Duguetia stelechantha* (Diels) R.E.Fr. essential oil. *Industrial Crops and Products*, v. 202, p. 116978, 2023.

BAUER, B.; MALLY, A.; LIEDTKE, D. Zebrafish Embryos and Larvae as Alternative Animal Models for Toxicity Testing. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 24, p. 13417, 2021.

BAY, M. et al. In Vitro Trypanocidal and Antibacterial Activities of Essential Oils from Four Species of the Family Annonaceae. *Chemistry & Biodiversity*, v. 16, n. 11, 2019.

BAZANTE, M. L.; PAUL; REGINA, M. *Duguetia leucotricha* (Annonaceae), a new species from the Atlantic Coastal Forest of Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 37, 2023.

BIZZO, H. et al. UM CONJUNTO DE PLANILHAS ELETRÔNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES DE ÓLEOS ESSENCIAIS. *Química Nova*, 2020.

BOSE, A. et al. Nanomicelles: Types, properties and applications in drug delivery. *IET Nanobiotechnology*, v. 15, n. 1, p. 19–27, 2021.

BRASIL. National Health Surveillance Agency. Cosmetic Product Stability Guide. 1st ed. Brasília: ANVISA, 2004. Accessed on: 27 September. 2024.

CACACCIO, J. et al. Pluronic F-127: An Efficient Delivery Vehicle for 3-(1'-hexyloxy)ethyl-3-devinylpyropheophorbide-a (HPPH or Photochlor). *Photochemistry and Photobiology*, v. 96, n. 3, p. 625–635, 2020.

CAMILA BARROS GALINARI et al. Photoactivity of hypericin: from natural product to antifungal application. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 49, n. 1, p. 38–56, 2022.

CARVALHO, D. O. et al. Mass Production of Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 83, p. e3579, 2014.

CARVALHO, J. DE P. et al. Estimating direct costs of the treatment for mucosal leishmaniasis in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 54, 2021.

CASCAES, M. M. et al. Phytochemical Profile, Antioxidant Potential and Toxicity Evaluation of the Essential Oils from *Duguetia* and *Xylopia* Species (Annonaceae) from the Brazilian Amazon. *Antioxidants*, v. 11, n. 9, p. 1709, 30 ago. 2022.

CAPPARUCCI, F. et al. Evaluation of Anaesthetic Effect of Commercial Basil *Ocimum basilicum* on Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Fishes*, v. 7, n. 6, p. 318, 3 nov. 2022.

CHINMAYA MUTALIK et al. Zebrafish Insights into Nanomaterial Toxicity: A Focused Exploration on Metallic, Metal Oxide, Semiconductor, and Mixed-Metal Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 3, p. 1926–1926, 2024.

CHRUSTEK, A. et al. Current Research on the Safety of Pyrethroids Used as Insecticides. *Medicina*, v. 54, n. 4, 2018.

CICOLELLA, A. et al. Crystallization Kinetics of Crystalline–Crystalline and Crystalline–Amorphous Block Copolymers of Linear Polyethylene and Isotactic Polypropylene. *Macromolecules*, 2024.

COSTA, E. V. et al. *Duguetia pycnastera* Sandwith (Annonaceae) Leaf Essential Oil Inhibits HepG2 Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Molecules*, v. 27, n. 17, p. 5664, 2022.

CUPERTINO, A. et al. Infectivity and Dissemination of Dengue Virus-1 in Different *Aedes aegypti* Populations Throughout Brazil. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 10, n. 4, p. 112–112, 2025.

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

DA SILVA ALMEIDA, J. R. G. et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Leaf Essential Oils of *Duguetia gardneriana* Mart. and *Duguetia moricandiana* Mart. (Annonaceae). *Journal of Essential Oil Research*, v. 22, n. 3, p. 275–278, 2010.

DA SILVA, E. et al. The Seasonal Variation of the Chemical Composition of Essential Oils from *Porcelia macrocarpa* R.E. Fries (Annonaceae) and Their Antimicrobial Activity. *Molecules*, v. 18, n. 11, p. 13574–13587, 2013.

DA SILVA, I. I. et al. Essential Oils Produce Developmental Toxicity in Zebrafish Embryos and Cause Behavior Changes in Zebrafish Larvae. *Biomedicines*, v. 11, n. 10, p. 2821, 18 out. 2023.

DE OLIVEIRA, A. L. L. et al. Severe adverse reactions to meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis: a report of 13 cases in the southwestern region of Brazil. *Tropical Doctor*, v. 39, n. 3, p. 180–182, 2009.

DHILIP KUMAR, S. S.; ABRAHAMSE, H. Biocompatible Nanocarriers for Enhanced Cancer Photodynamic Therapy Applications. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 11, p. 1933, 2021.

DINCHEVA, I.; BADJAKOV, I.; GALUNSKA, B. New Insights into the Research of Bioactive Compounds from Plant Origins with Nutraceutical and Pharmaceutical Potential. *Plants*, v. 12, n. 2, p. 258, 2023.

DOS SANTOS, A. L. S. Tropical Infectious Diseases of Global Significance: Insights and Perspectives. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n. 10, p. 462, 2023.

DOS SANTOS, A. C. et al. Essential Oils of *Duguetia* Species A. St. Hill (Annonaceae): Chemical Diversity and Pharmacological Potential. *Biomolecules*, v. 12, n. 5, p. 615–615, 21 abr. 2022.

DO SANTOS, R. C. et al. Antioxidant, anti-rheumatic and anti-inflammatory investigation of extract and dicentrinone from *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. f. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 211, p. 9–16, jan. 2018.

- DOURADO, D. et al. Curcumin-loaded nanostructured systems for treatment of leishmaniasis: a review. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, v. 15, p. 37–50, 2024.
- FAGBEMI, K. O.; AINA, D. A.; OLAJUYIGBE, O. O. Soxhlet Extraction versus Hydrodistillation Using the Clevenger Apparatus: A Comparative Study on the Extraction of a Volatile Compound from *Tamarindus indica* Seeds. *The Scientific World Journal*, v. 2021, p. e5961586, 2021.
- FAUSTINO, C. G. et al. Larvicide Activity on *Aedes aegypti* of Essential Oil Nanoemulsion from the *Protium heptaphyllum* Resin. *Molecules*, v. 25, n. 22, p. 5333, 2020.
- FEITOSA, V. A. et al. Polymeric micelles of pluronic F127 reduce hemolytic potential of amphiphilic drugs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 180, p. 177–185, 2019.
- FELIPE FRANCISCO TUON et al. Liposomal drug delivery systems for the treatment of leishmaniasis. *Parasitology Research*, v. 121, n. 11, p. 3073–3082, 2022.
- FERREIRA, A. C.; CHIARAVALLOTI NETO, F.; MONDINI, A. Dengue in Araraquara, state of São Paulo: epidemiology, climate and *Aedes aegypti* infestation. *Revista de Saúde Pública*, v. 52, p. 18, 2018.
- FU, Wei-En et al. Probed adhesion force of living lung cells with a tip-modified atomic force microscope. *Biointerphases*, v. 11, n. 4, 2016.
- GUIDOTTI-TAKEUCHI, M. et al. Essential Oil-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents in the Food Industry. *Microorganisms*, v. 10, n. 8, p. 1504, 2022.
- GUILLÉN, A. et al. Toxicity of Modified Magnetite-Based Nanocomposites Used for Wastewater Treatment and Evaluated on Zebrafish (*Danio rerio*) Model. *Nanomaterials*, v. 12, n. 3, p. 489, 2022.
- GUTIÉRREZ-REBOLLEDO, G. A.; DRIER-JONAS, S.; JIMÉNEZ-ARELLANES, M. A. Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: An update. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 10, n. 12, p. 1105–1110, 2017.
- HAKAN ÇELEBI et al. *Danio rerio*: A Sustainable Model for Monitoring Pollutants in Aquatic Environments. *Environmental Sciences Proceedings*, 2023.
- HASSAN, A. A. et al. Antileishmanial Activities of Medicinal Herbs and Phytochemicals *In Vitro* and *In Vivo*: An Update for the Years 2015 to 2021. *Molecules*, v. 27, n. 21, p. 7579, 2022.
- JAVED, S. et al. Essential Oils as Dermocosmetic Agents, Their Mechanism of Action and Nanolipidic Formulations for Maximized Skincare. *Cosmetics*, v. 11, n. 6, p. 210–210, 2024.
- JIA, H.-R. et al. Nanomaterials meet zebrafish: Toxicity evaluation and drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, v. 311–312, p. 301–318, 2019.

Jl, Y. et al. Controlled Release of Therapeutics from Thermoresponsive Nanogels: A Thermal Magnetic Resonance Feasibility Study. *Cancers*, v. 12, n. 6, p. 1380–1380, 2020.

KATEBI, A. et al. PLGA nanoparticle-delivered *Leishmania* antigen and TLR agonists as a therapeutic vaccine against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *International Immunopharmacology*, v. 138, p. 112538, 2024.

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

KIM, J.-H. et al. Production of Mono-Hydroxylated Derivatives of Terpinen-4-ol by Bacterial CYP102A1 Enzymes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 34, n. 3, p. 725–734, 2023.

KOLEK, Ł.; JASIURKOWSKA-DELAPORTE, M.; JUSZYŃSKA-GAŁĄZKA, E. Kinetics of non-isothermal cold crystallization in the antiferroelectric smectic phase of 3F5BFBiHex as seen by differential scanning calorimetry and broadband dielectric spectroscopy. *Journal of Molecular Liquids*, v. 323, p. 115040, 2021.

KOTHA, R. R.; LUTHRIA, D. L. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules*, v. 24, n. 16, p. 2930, 2019.

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

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 26, n. 4, p. 223–227, 2009.

LARABI, M. Study of the toxicity of a new lipid complex formulation of amphotericin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 53, n. 1, p. 81–88, 2003.

LEEMANS, M. et al. Pesticides With Potential Thyroid Hormone-Disrupting Effects: A Review of Recent Data. *Frontiers in Endocrinology*, v. 10, 2019.

LEYVA-PORRAS, C. et al. Application of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) in Food and Drug Industries. *Polymers*, v. 12, n. 1, p. 5, 2020.

LOBÃO, A. Q.; BAZANTE, M. L. *Duguetia* in Flora e Funga do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/consulta/ficha.html?idDadosListaBrasil=110296>. Acesso em: 18 out. 2024.

LU, Y. et al. Properties of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) and Progress of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)-Based Biodegradable Materials in Biomedical Research. *Pharmaceutics*, v. 16, n. 3, p. 454, 2023.

LUBRIZOL CORPORAÇÃO. Produtos poliméricos Carbopol®. Disponível em: <https://pt.lubrizol.com/Health/Pharmaceuticals/Excipients/Carbopol-Polymer-Products>. Acesso em: 20 out. 2024.

LUPU, A. et al. Self-Healing of Pluronic® F127 Hydrogels in the Presence of Various Polysaccharides. *Gels*, v. 9, n. 9, p. 719–719, 2023.

MAFFEI, M. E.; GERTSCH, J.; APPENDINO, G. Plant volatiles: Production, function and pharmacology. *Natural Product Reports*, v. 28, n. 8, p. 1359, 2011.

MAHMOOD, A. et al. Development and Evaluation of Sodium Alginate/Carbopol 934P-Co-Poly (Methacrylate) Hydrogels for Localized Drug Delivery. *Polymers*, v. 15, n. 2, p. 311, 2023.

MAIA et al. Essential Oil Composition from *Duguetia* Species (Annonaceae). *Journal of Essential Oil Research*, v. 18, n. 1, p. 60–63, 2006.

CAMPOS, Lara Maria Oliveira et al. Enhanced Nanogel Formulation Combining the Natural Photosensitizer Curcumin and *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae) Essential Oil for Synergistic Daylight Photodynamic Therapy in Leishmaniasis Treatment. *Pharmaceutics*, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 286, 21 fev. 2025.

MARQUES, E. M. et al. Development of an Eco-Friendly Nanogel Incorporating *Pectis brevipedunculata* Essential Oil as a Larvicidal Agent Against *Aedes aegypti*. *Pharmaceutics*, v. 16, n. 10, p. 1337, 2024.

MARQUES, E. M. et al. Nanotechnological Formulation Incorporating *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae) Essential Oil: An Eco-friendly Approach for Leishmanicidal and Anti-Inflammatory Therapy. *Polymers*, v. 17, n. 3, p. 379–379, 2025.

MAYILSAMY, M. et al. Nanofiber encapsulation of *Pseudomonas aeruginosa* for the sustained release of mosquito larvicides. *Scientific Reports*, v. 15, n. 1, 21 abr. 2025.

MELO, M. G. N. DE et al. Clinical and epidemiological profiles of patients with American cutaneous leishmaniasis from the states of Pernambuco and Amazonas, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2020.

MOHAMMADY, M.; MOHAMMADI, Y.; YOUSEFI, G. Freeze-Drying of Pharmaceutical and Nutraceutical Nanoparticles: The Effects of Formulation and Technique Parameters on Nanoparticles Characteristics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 109, n. 11, p. 3235–3247, 2020.

MORAIS, R. C. S. DE et al. Clinical-therapeutic follow-up of patients with American cutaneous leishmaniasis caused by different *Leishmania* spp. in Brazil. *Experimental Parasitology*, v. 240, p. 108338, 2022.

MOREIRA, V. R. et al. Meglumine Antimoniate (Glucantime) Causes Oxidative Stress-Derived DNA Damage in BALB/c Mice Infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 6, 2017.

- MOYES, C. L. et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 7, 2017.
- NASCIMENTO, D. et al. Repellency and Larvicidal Activity of Essential oils from *Xylopia laevigata*, *Xylopia frutescens*, *Lippia pedunculosa*, and Their Individual Compounds against *Aedes aegypti* Linnaeus. v. 46, n. 2, p. 223–230, 2017.
- NEGRI, M. et al. Early State Research on Antifungal Natural Products. *Molecules*, v. 19, n. 3, p. 2925–2956, 2014.
- NGUYEN, H. T.; CHIEN, T.; CUONG, D. X. Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview. *Gels*, v. 9, n. 7, p. 523–523, 2023.
- NUNES, T. A. DE L. et al. *Eugenia piauhiensis* Vellaff. essential oil and γ -elemene its major constituent exhibit antileishmanial activity, promoting cell membrane damage and in vitro immunomodulation. *Chemico-Biological Interactions*, v. 339, p. 109429, 2021.
- OLIVEIRA, C. V. B. et al. A Potential New Source of Therapeutic Agents for the Treatment of Mucocutaneous Leishmaniasis: The Essential Oil of *Rhaphiodon echinus*. *Molecules*, v. 27, n. 7, p. 2169, 2022.
- OSANLOO, M. et al. Nanoemulsion and nanogel containing *Artemisia dracuncululus* essential oil; larvicidal effect and antibacterial activity. *BMC Research Notes*, v. 15, n. 1, 2022.
- PARK, H.; OTTE, A.; PARK, K. Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond. *Journal of Controlled Release*, v. 342, p. 53–65, 2022.
- PATRA, J. K. et al. Nano Based Drug Delivery systems: Recent Developments and Future Prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 16, n. 1, 2018.
- PAUL, S.; SA, G. Curcumin as an Adjuvant to Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Oncology*, v. 11, 2021.
- PIAU, TATHYANA BENETIS et al. In the screening of alternative insecticides to control *Aedes aegypti* larvae, 2-methylanthraquinone showed no genotoxicity and low toxicity to zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics and Molecular Biology*, v. 45, n. 1, 2022.
- PINHEIRO, A. C.; DE SOUZA, M. V. N. Current leishmaniasis drug discovery. *RSC Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 9, p. 1029–1043, 2022.
- PINHO, F. V. S. DE A. et al. Phytochemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activity of *Duguetia furfuracea* A. St.-Hill. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, p. 1–9, 2016.
- PRIYADARSINI, K. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules*, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 2014.

PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*, v. 14, n. 6, p. 2004–2016, 2009.

QIAN, Q. et al. Chemical Composition Variation in Essential Oil and Their Correlation with Climate Factors in Chinese Prickly Ash Peels (*Zanthoxylum armatum* DC.) from Different Habitats. *Molecules*, v. 29, n. 6, p. 1343–1343, 2024.

RAMEZANI, M. et al. Surface Engineering of Metals: Techniques, Characterizations and Applications. *Metals*, v. 13, n. 7, p. 1299–1299, 2023.

REY-RICO, A.; CUCCHIARINI, M. PEO-PPO-PEO Tri-Block Copolymers for Gene Delivery Applications in Human Regenerative Medicine—An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 3, p. 775, 2018.

RIDA, ZAINAB et al. Prospects and challenges of nanopesticides in advancing pest management for sustainable agricultural and environmental service. *Environmental Research*, v. 261, p. 119722–119722, 2024.

RODRIGUES, A. C. J. et al. Exploring the leishmanicidal potential of terpenoids: a comprehensive review on mechanisms of cell death. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, 2023.

RODRIGUEZ-LOYA, J.; LERMA, M.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Dynamic Light Scattering and Its Application to Control Nanoparticle Aggregation in Colloidal Systems: A Review. *Micromachines*, v. 15, n. 1, p. 24, 2024.

ROSETTI, P. et al. *Duguetia lanceolata* A. St.-Hil. (Annonaceae) Essential Oil: Toxicity against *Spodoptera frugiperda*... *Agriculture*, v. 13, n. 2, p. 488–488, 2023.

SARFRAZ, M. et al. Carbopol Based Hydrogels for ITOPRIDE Hydrochloride Delivery; Synthesis, Characterization and Comparative Assessment with Various Monomers. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 13, n. 4, p. 295–295, 2022.

SALDANHA, A. A. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of a phenylpropanoid-enriched fraction of *Duguetia furfuracea*. *Inflammopharmacology*, v. 29, n. 2, p. 409–422, 6 abr. 2021.

SHAARANI, S.; HAMID, S.; MOHD KAUS, N. The Influence of pluronic F68 and F127 nanocarrier on physicochemical properties... *Pharmacognosy Research*, v. 9, n. 1, p. 12, 2017.

SILVA et al. Exploring cellulose-derived esters/curcumin materials: Synthesis, characterization, and biological assay in zebrafish model. *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 142007–142007, 2025.

SIQUEIRA, C. A. T. et al. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and *in vitro* antiprotozoal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, n. 1, 2011.

SOUSA, O. V. et al. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de cascas de *Duguetia lanceolata* St. Hil., Annonaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 14, p. 11–14, 1 jan. 2004.

SOUSA, O. V. et al. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oils from *Duguetia lanceolata* St. Hil. Barks. *Molecules*, v. 17, n. 9, p. 11056–11066, 2012.

STOLERU, E.; BREBU, M. Stabilization Techniques of Essential Oils by Incorporation into Biodegradable Polymeric Materials for Food Packaging. *Molecules*, v. 26, n. 20, p. 6307, 2021.

SUHAIL, M.; WU, P.-C.; MINHAS, M. U. Using Carbomer-Based Hydrogels for Control the Release Rate of Diclofenac Sodium: Preparation and *In Vitro* Evaluation. *Pharmaceuticals*, v. 13, n. 11, p. 399, 2020.

TACIANO PERES FERREIRA et al. Prolonged mosquitocidal activity of *Siparuna guianensis* essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 8, p. e0007624–e0007624, 2019.

TATINI, Duccio et al. Pluronic/gelatin composites for controlled release of actives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 135, p. 400–407, 2015.

THÜMMLER, J. F. et al. Thermoresponsive swelling of photoacoustic single-chain nanoparticles. *Chemical Communications*, v. 59, n. 76, p. 11373–11376, 2023.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, v. 6, p. 750, 2017.

VALADARES, L. et al. Embryotoxicity of silica nanoparticles in the drug delivery of domperidone in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, v. 258, p. 106454–106454, 2023.

VALENZUELA, J. G.; AKSOY, S. Impact of vector biology research on old and emerging neglected tropical diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 5, p. e0006365, 2018.

VALTER, J. L. et al. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 3, p. 373–378, 2008.

VAN HAAREN, C.; DE BOCK, M.; KAZARIAN, S. G. Advances in ATR-FTIR Spectroscopic Imaging for the Analysis of Tablet Dissolution and Drug Release. *Molecules*, v. 28, n. 12, p. 4705, 2023.

VICENTINI, A. As Florestas de Terra Firme. p. 145. Disponível em: <https://ecologia.ib.usp.br/guiaigapo/images/livro/RioNegro05.pdf>. Acesso em: 19 out. 2024.

VIEIRA, L. R. et al. Proteomics analysis of zebrafish larvae exposed to 3,4-dichloroaniline using the fish embryo acute toxicity test. *Environmental Toxicology*, v. 35, n. 8, p. 849–860, 14 mar. 2020.

VIEIRA, O. et al. In- vivo and vitro bioactivities of the essential oil of *Duguetia lanceolata* branches. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 10, n. 14, p. 298–310, 15 abr. 2016.

WANG, A.; MACNEIL, A.; MALONEY, S. Comparison and lessons learned from neglected tropical diseases and tuberculosis. *PLOS Global Public Health*, v. 1, n. 10, p. e0000027, 2021.

WANG, C. F. et al. Components and Insecticidal Activity against the Maize Weevils of *Zanthoxylum schinifolium* Fruits and Leaves. *Molecules*, v. 16, n. 4, p. 3077–3088, 2011.

WANG, L. et al. Zebrafish models for the evaluation of essential oils (EOs). *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, v. 15, n. 4, p. 156–178, 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Leishmaniasis*. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 05 jul. 2025.

WIEGAND, J. et al. Triphenyl phosphate-induced pericardial edema in zebrafish embryos is dependent on the ionic strength of exposure media. *Environment International*, v. 172, p. 107757, 1 fev. 2023.

XIAO, Baixue et al. Integrating osteoimmunology and nanoparticle-based drug delivery systems for enhanced fracture healing. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, p. 102727, 2023.

XIE, L. et al. Curcumin combined with photodynamic therapy, promising therapies for the treatment of cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 146, p. 112567, 2022.

XU, X.-Y. et al. Bioactivity, Health Benefits, and Related Molecular Mechanisms of Curcumin: Current Progress... *Nutrients*, v. 10, n. 10, p. 1553, 2018.

YOU, C. X. et al. Contact Toxicity and Repellency of the Main Components From the Essential Oil of *Clausena anisum-olens* Against Two Stored Product Insects. *Journal of Insect Science*, v. 15, n. 1, p. 87, 2015.

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

YU, J. et al. Polymeric Drug Delivery System Based on Pluronics for Cancer Treatment. *Molecules*, v. 26, n. 12, p. 3610, 2021.

YUAN, J. et al. Thermal resistance effect on anomalous diffusion of molecules under confinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 118, n. 21, 2021.

YVONNE C.M. STAAL et al. Head skeleton malformations in zebrafish (*Danio rerio*) to assess adverse effects of mixtures of compounds. *Archives of Toxicology*, v. 92, n. 12, p. 3549–3564, 4 out. 2018.

ZHANG, C. et al. Molecular and morphological changes in zebrafish following transient ethanol exposure during defined developmental stages. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 44, p. 70–80, 1 jul. 2014.

ZHANG, Z.; ROUABHIA, M.; MOULTON, S. E. (Ed.). *Conductive polymers: electrical interactions in cell biology and medicine*. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2017.

ZICARELLI, G. et al. Toxicity of water-soluble polymers polyethylene glycol and polyvinyl alcohol for fish and frog embryos. *The Science of The Total Environment*, v. 933, p. 173154–173154, 2024.

ZUBAIR, M. et al. Current Trends in the Utilization of Essential Oils for Polysaccharide- and Protein-Derived Food Packaging Materials. *Polymers*, v. 14, n. 6, p. 1146, 2022.

APÊNDICE A - Formulações desenvolvidas com OE e OE/Curcumina

Formulações contendo OE de *Duguetia stelechantha* em diferentes concentrações



0,125% 0,25% 0,5% 1%



Formulações de nGF2002Ds com diferentes concentrações de curcumina

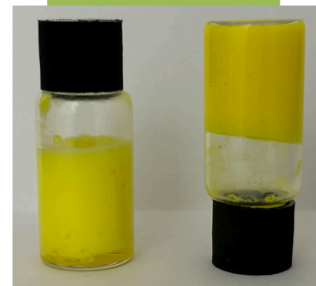
Contendo 1% de OE



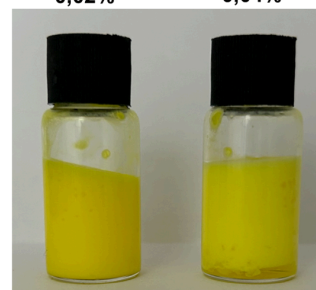
0,02% 0,04%



Contendo 20% de OE

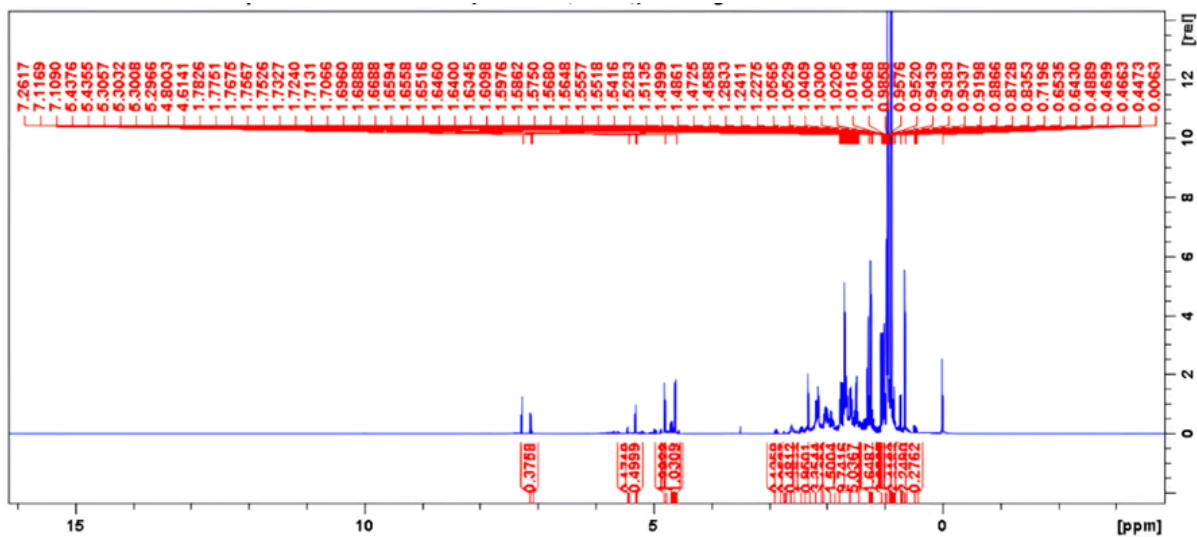


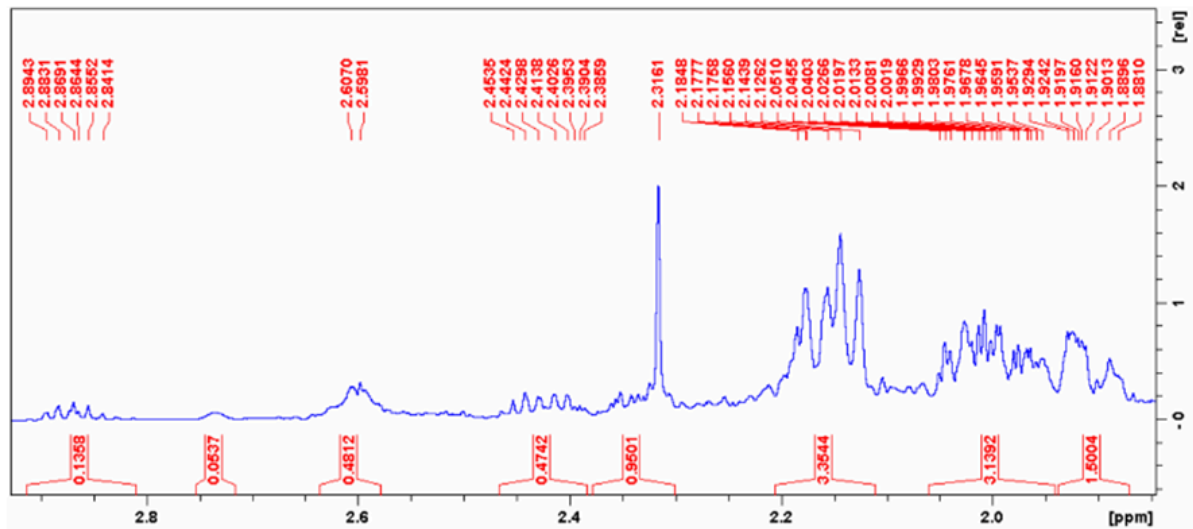
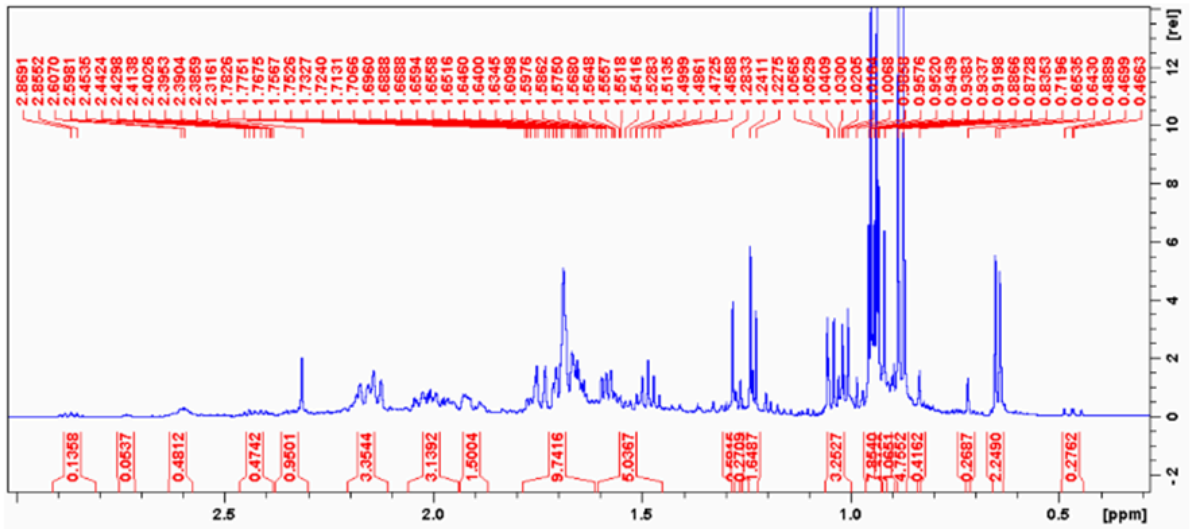
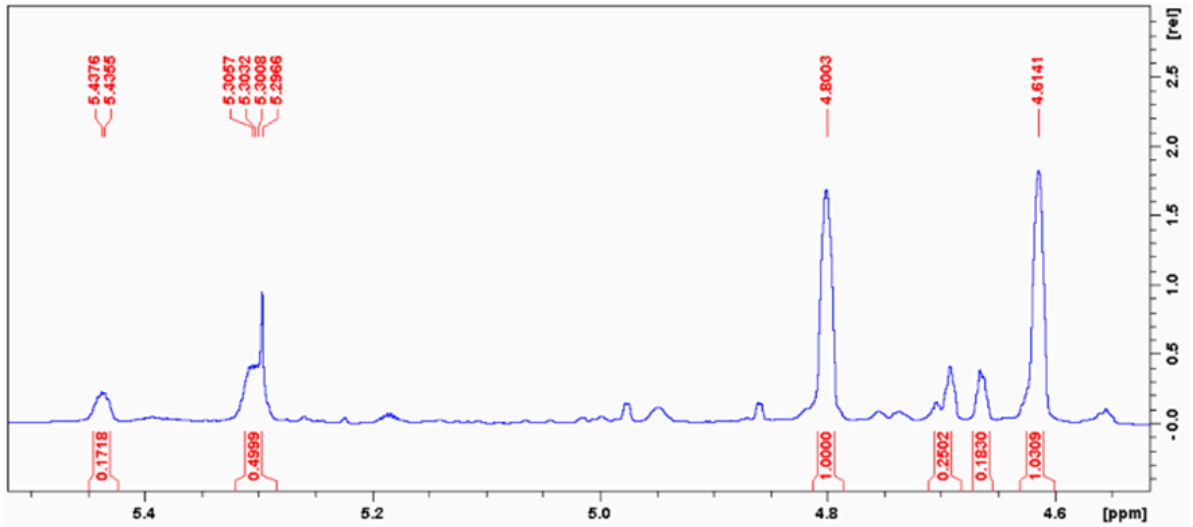
0,02% 0,04%

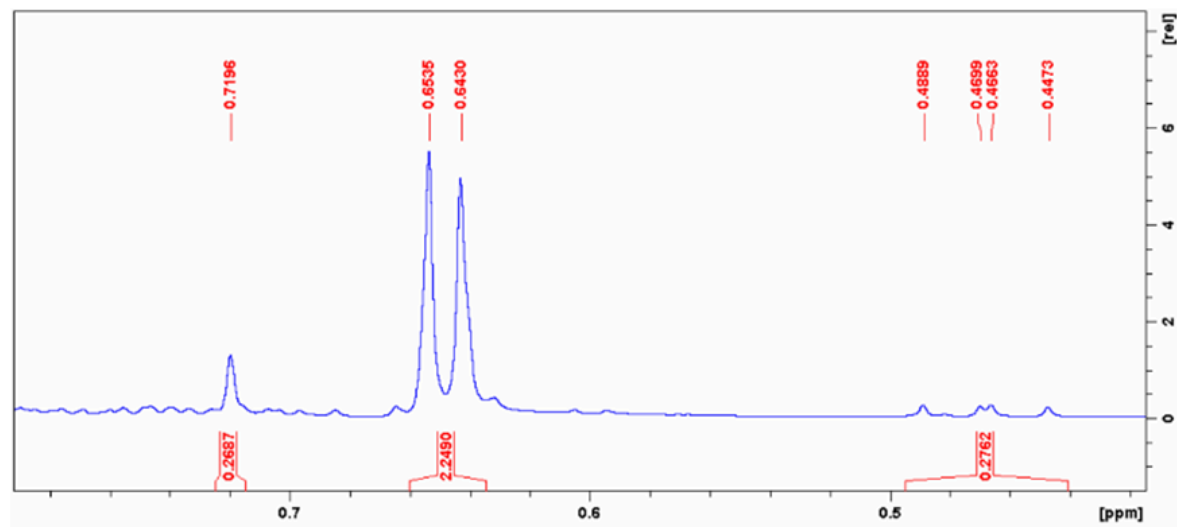
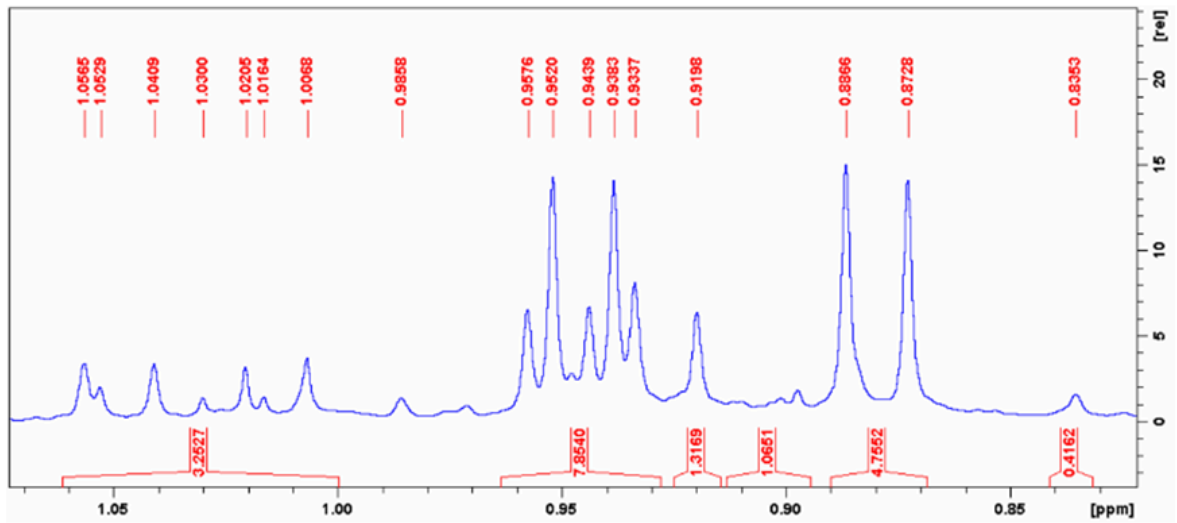
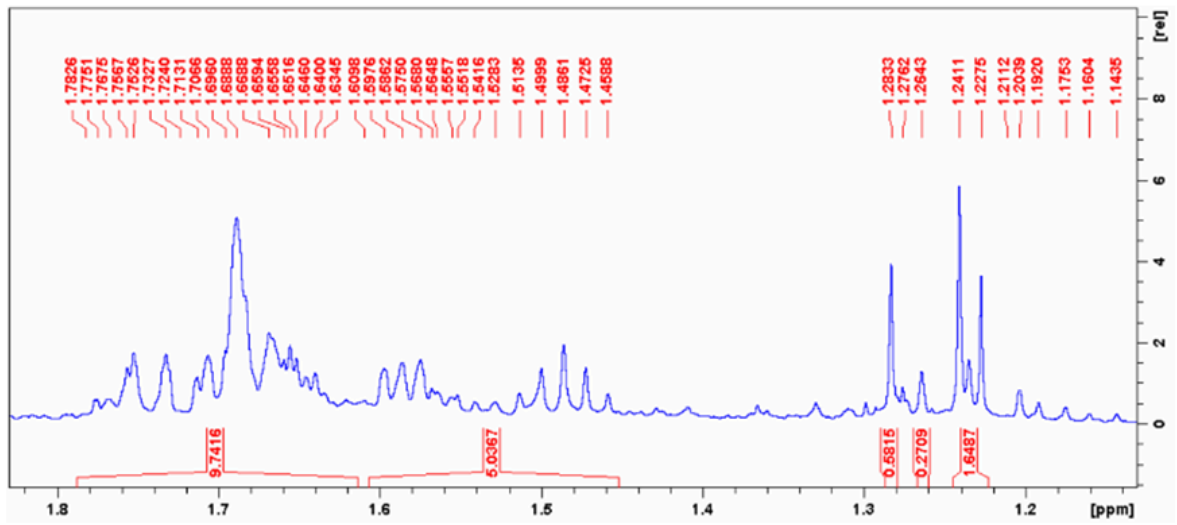


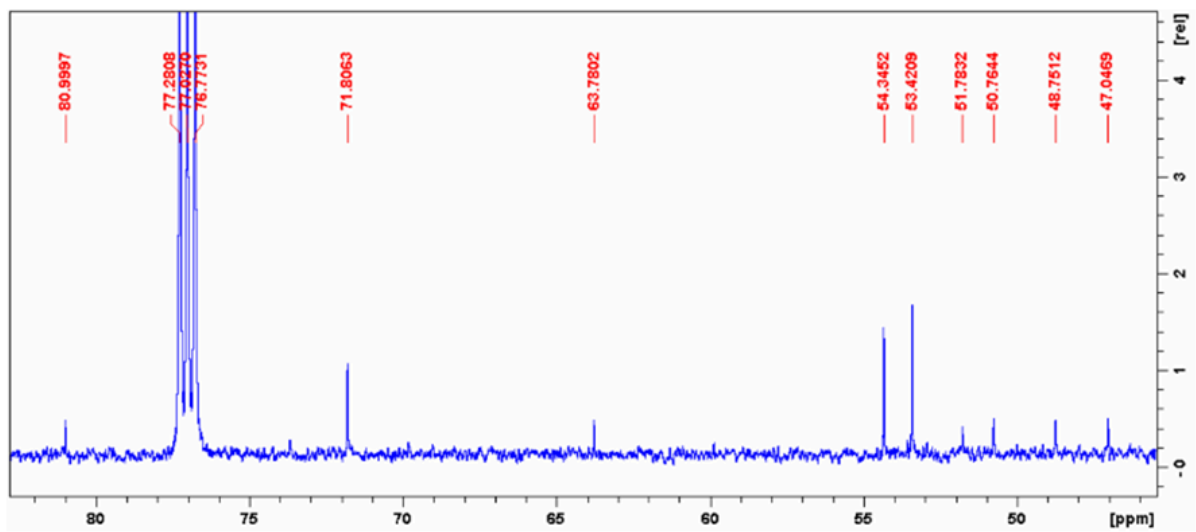
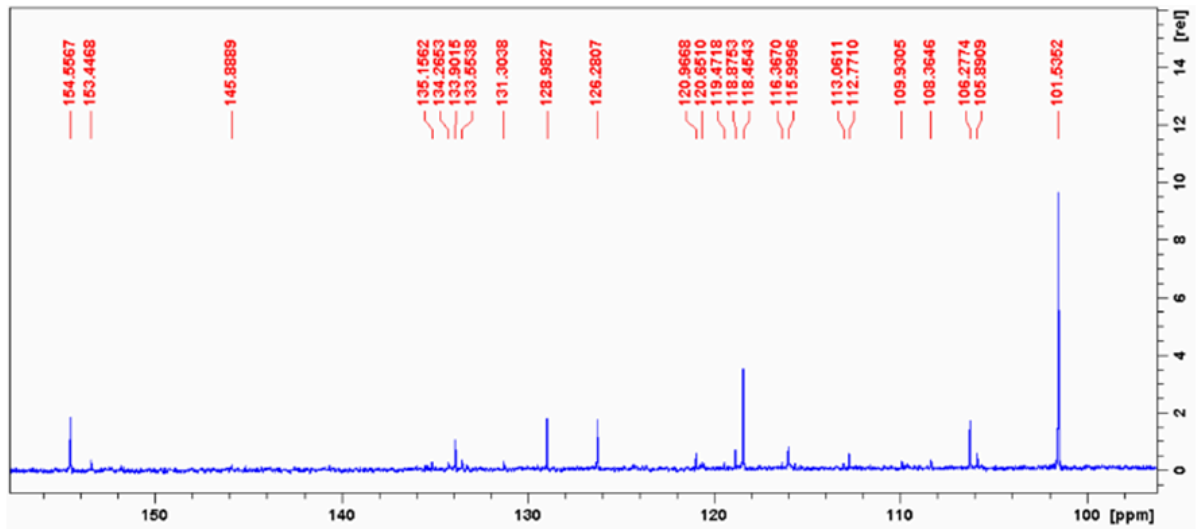
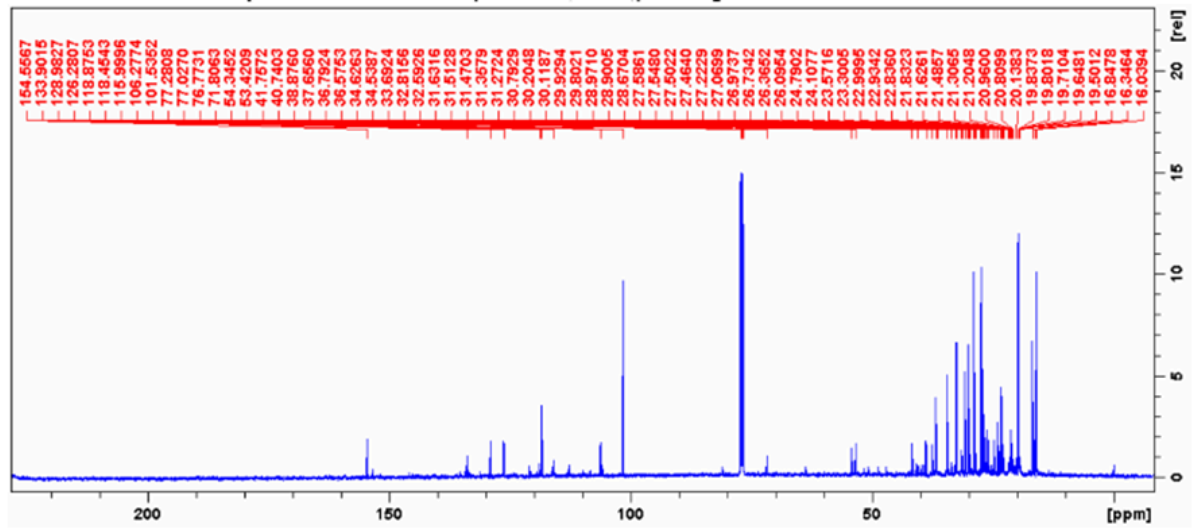
APÊNDICE B - Análise de RMN do OE de *D. stelechantha*

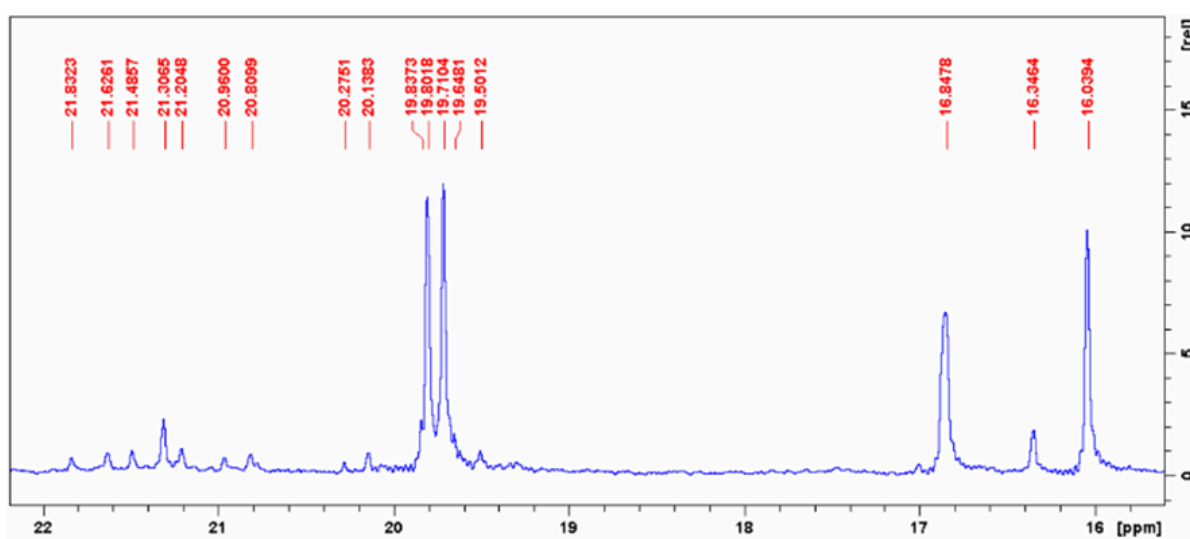
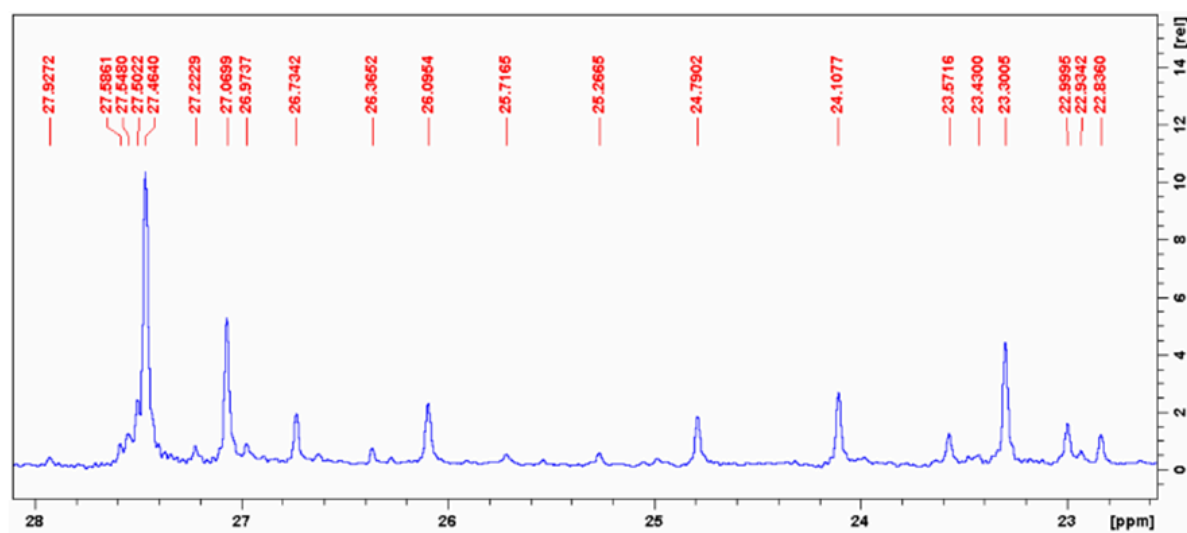
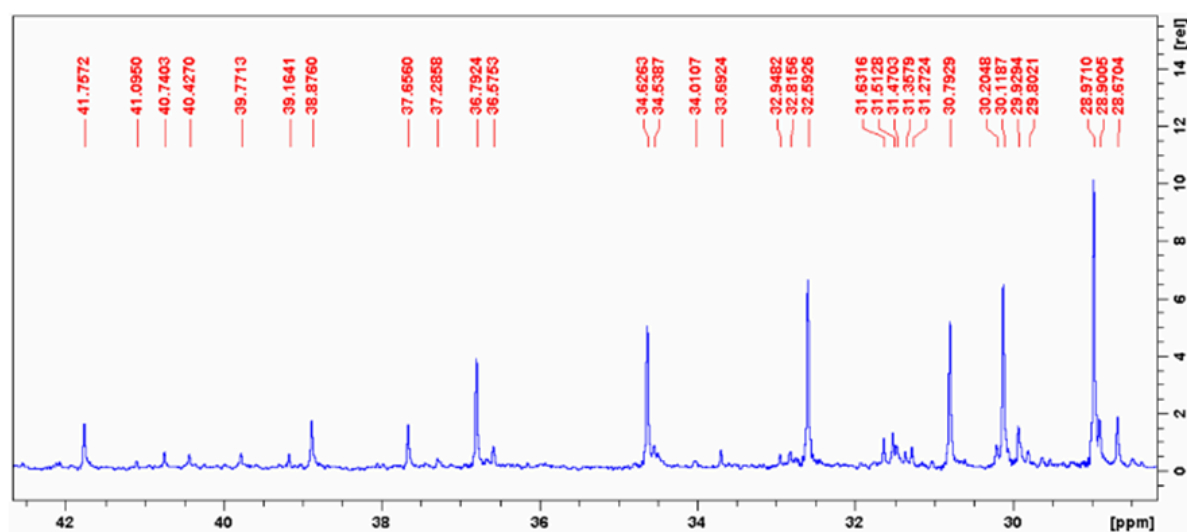
Espectros de RMN de ^1H do OEDs (500 MHz, CDCl_3)



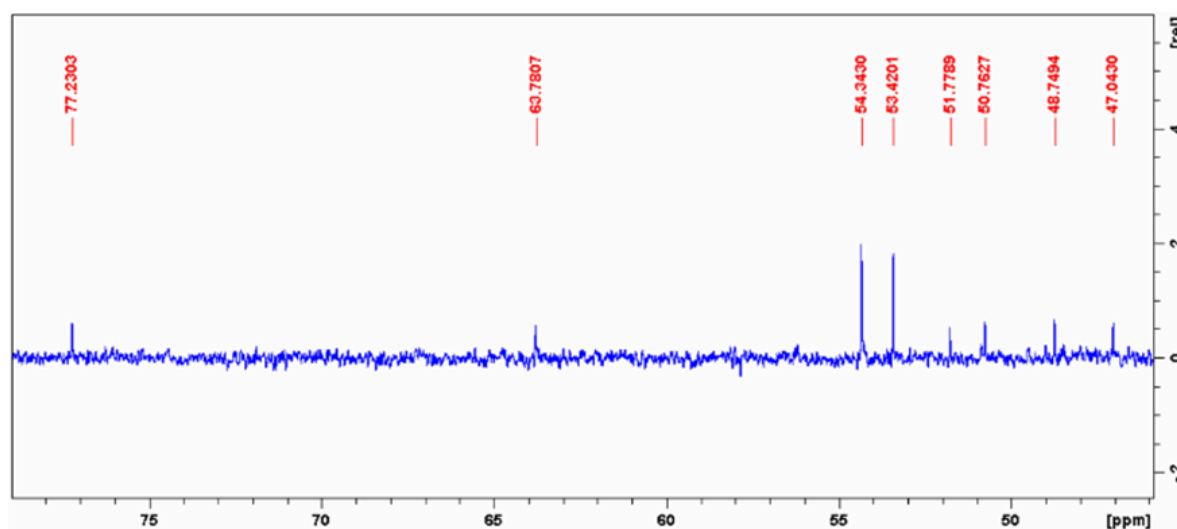
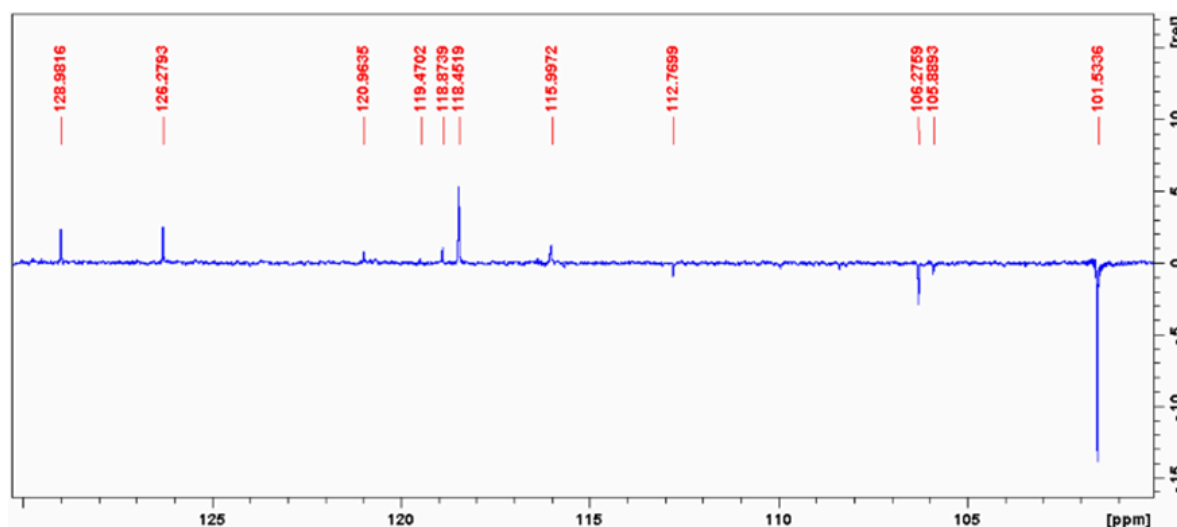
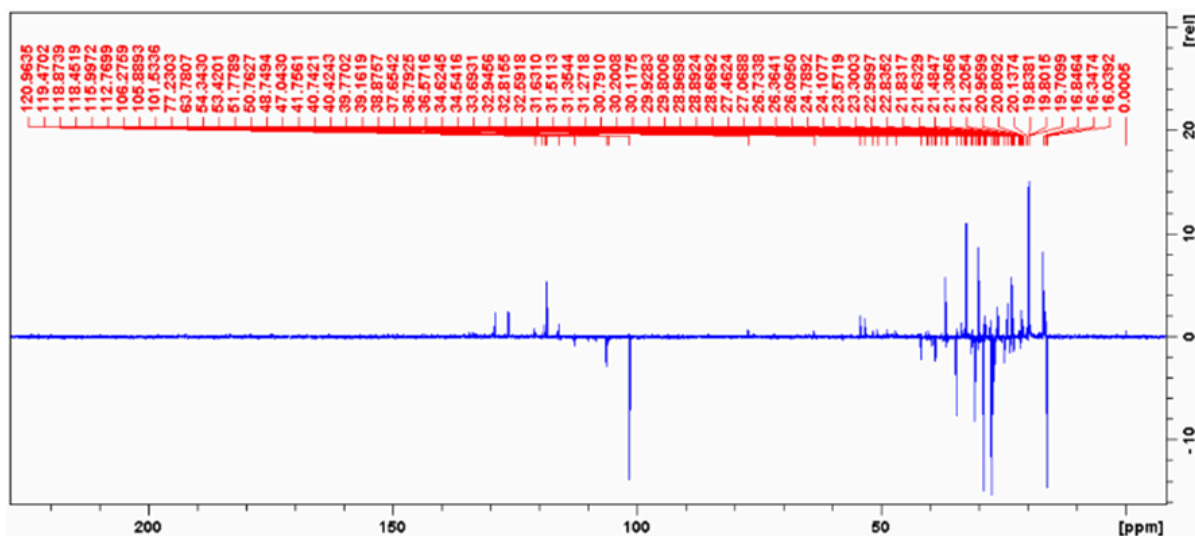


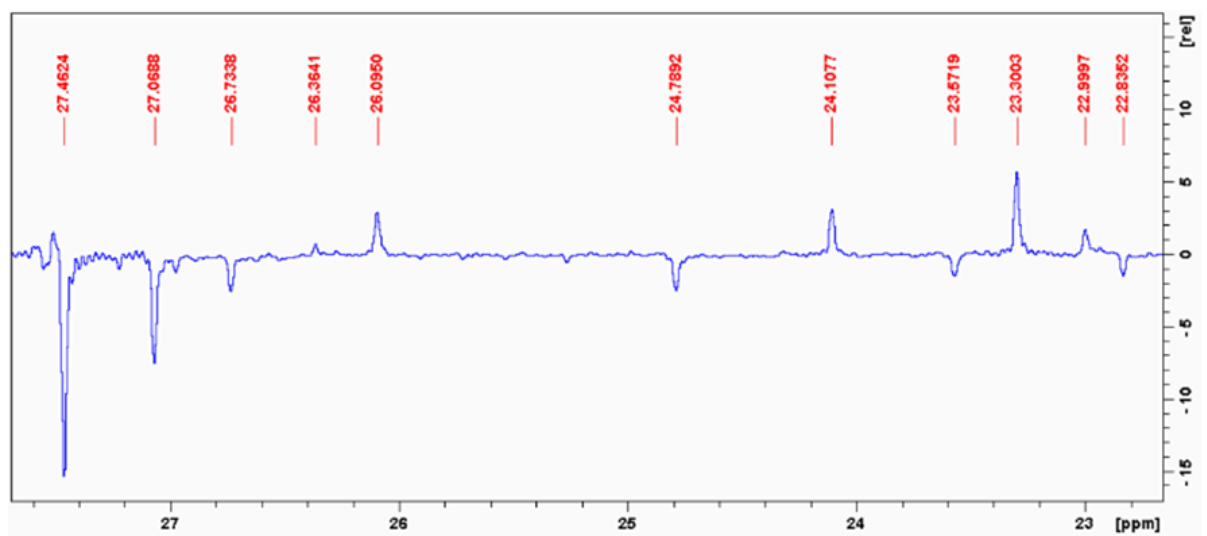
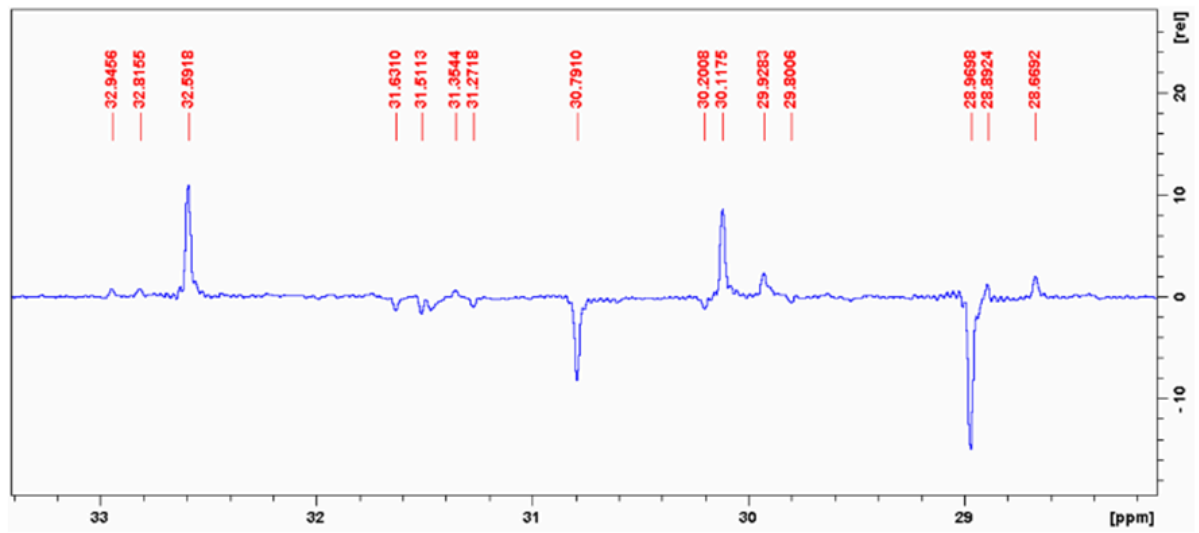
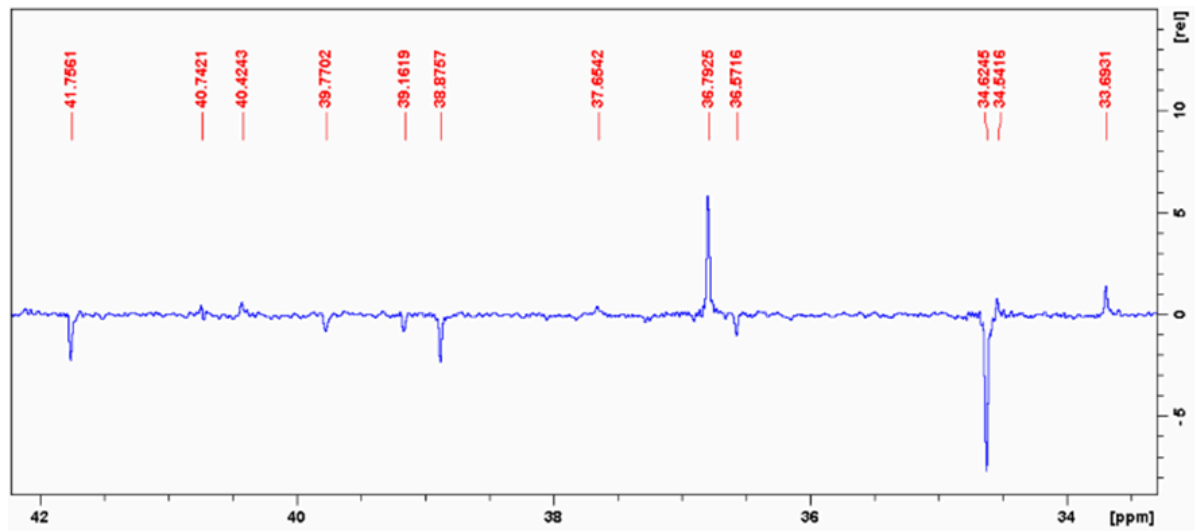


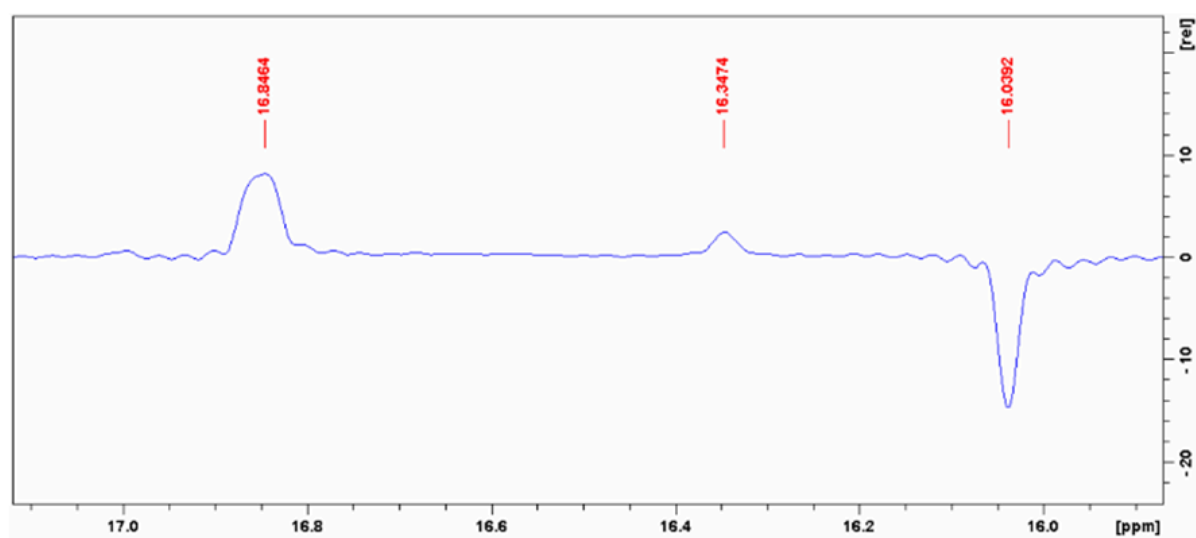
Espectros de RMN de ^{13}C do OEDs (500 MHz, CDCl_3)



Espectros de RMN de ^{13}C DEPT 135 do OEDs (125 MHz, CDCl_3)







APÊNDICE C - Análise por MEV/EDS da superfície do nanogel nGF2002Ds

