



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102017010296-3

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102017010296-3

(22) Data do Depósito: 17/05/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 04/12/2018

(51) Classificação Internacional: A01N 25/34; A01N 25/10; A01N 43/90; A01N 47/34; A01P 7/04.

(52) Classificação CPC: A01N 25/34; A01N 25/10; A01N 43/90; A01N 47/34.

(54) Título: COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, FORMULAÇÕES E USOS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA - UFJF. CGC/CPF: 21195755000169. Endereço: JOSÉ LOURENÇO KELMER, S/N, MARTELOS, Juiz de Fora, MG, BRASIL(BR), 36036-900, Brasileira; UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI - UFSJ, Pessoa Jurídica. CGC/CPF: 21186804000105. Endereço: PRAÇA FREI ORLANDO Nº 170 - CENTRO, São João Del-Rei, MG, BRASIL (BR), 36307-352, Brasileira; FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 21949888000183. Endereço: AV. JOSÉ CÂNDIDO DA SILVEIRA Nº 1500, BAIRRO HORTO, Belo Horizonte, MG, BRASIL(BR), 31035-536, Brasileira

(72) Inventor: ÂNGELO MÁRCIO LEITE DENADAI; ANA MARIA DOS SANTOS MOREIRA; VANESSA CRISTINA ESTEVAM BITENCOURT; JEFERSON GOMES DA SILVA; KEYLLER BASTOS BORGES; CIBELE VELLOSO RODRIGUES; ANTÔNIO FREDERICO DE FREITAS GOMIDE; LEONARDO MENEHIN MENDONÇA; REGINA GENDZELEVSKI KELMANN.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 17/05/2017, observadas as condições legais

Expedida em: 16/08/2022

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

“COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, FORMULAÇÕES E USOS”

CAMPO DE APLICAÇÃO

[001] A presente invenção diz respeito ao processo de obtenção de composições inseticidas nanoestruturadas à base de avermectinas e/ou benzoilfenilureias, com ciclodextrinas, suas formulações e usos. As nanoestruturas obtidas por esse processo podem ser utilizadas como sistemas de liberação controlada do componente inseticida no meio ambiente, de modo a aumentar a taxa de dissolução aquosa dos princípios ativos, melhorar a biodisponibilidade em meio aquoso na presença de co-solvente, aumentar a estabilidade térmica dos componentes, servir de iscas para larvas de *Aedes aegypti* e potencializar e vetorizar a ação dos componentes para o controle larvívoro desse mosquito, bem como outras zoonoses e pragas.

ESTADO DA TÉCNICA

[002] As avermectinas são compostos naturais pertencentes a família das lactonas macrocíclicas, obtidos a partir da fermentação natural de microorganismos presentes no solo (*S. avermitis*) (CAMPBELL, 1989). Os principais representantes dessa família são a abamectina e seus derivados ivermectina e eprinomectina. Esses compostos têm sido largamente utilizados como medicamentos antiparasitários e antifúngicos em animais, em humanos e na agricultura (SIDAM, 2016), tendo sido encontrado mais de 13 mil citações utilizando a palavra chave “ivermectin” na base de dados WIPO (<https://patentscope.wipo.int/search/pt/result.jsf>). No Brasil, são encontrados

atualmente 18 pedidos de patente ou patentes no sítio do INPI utilizando a palavra chave “ivermectina” na ferramenta de busca (<https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController>).

[003] Dentre as avermectinas, a ivermectina é licenciada para tratamento em humanos, sendo utilizada no controle de parasitoses na dose única de 150-200 µg/kg de peso corporal (GUZZO et al., 2002).

[004] Seu uso eficaz e seguro para o tratamento de doenças como oncorcercose e filariose linfática faz deste composto um promissor candidato para o desenvolvimento de formulações inseticidas destinadas ao homem, bem como para aplicações inseticidas em programas de saúde pública. Na indústria pecuária, produtos à base de eprinomectina são cada vez mais importantes devido à sua propriedade de não deixar resíduos no leite e carne (FISHER AND MROZIK, 1992).

[005] Aparentemente todas as avermectinas apresentam o mesmo mecanismo de ação antiparasitária, aumentando a permeabilidade das células musculares e nervosas aos íons cloreto, provocando assim paralisia e morte do parasita. Elas atuam em receptores de glutamato, específicos de invertebrados. Considerando que mamíferos não possuem esses tipos de canais iônicos, as avermectinas proporcionam um elevado grau de segurança e especificidade a insetos.

[006] Quando utilizadas em doses mais elevadas, as avermectinas podem se ligar a receptores de ácido γ -aminobutírico (GABA) de mamíferos. No entanto, tais receptores são restritos ao sistema nervoso central, que são protegidos pela barreira hematoencefálica (BHE) à qual dificilmente as avermectinas permeiam. (CULLY et al, 1994; WOLSTENHOLME, 2012).

[007] Estudos realizados com formulações comerciais da ivermectina em baixas doses comprovaram sua alta letalidade contra várias espécies de artrópodes, bem como efeitos subletais que incluem a má formação, dificuldade de locomoção, diminuição da fecundidade, redução do número de eclosões,

redução da frequência de repasto sanguíneo, além de distúrbios sensoriais e motores (de FREITAS et al., 2012, PRIDGEON et al., 2008; ROSA et al., 2011).

[008] Dentre as aplicações das avermectinas, a atividade inseticida têm despertado grande interesse. Inclusive, recentes tecnologias relatam o uso de avermectinas como inseticida, como por exemplo US 9,485,990 (2016) da empresa Bayer, que descreve inseticidas impregnados em roupas; e outras tecnologias como US 9,456,605 (2016), US 9,402,395 (2016), US 9,301,525 (2016), US 9,247,740 (2016), US 9,204,648 (2015), US 9,260,436 (2016), US 9,420,793 (2016), US 9,265,256 (2016) que descrevem as avermectinas misturadas com outros inseticidas para controle de insetos, moluscos, nematóides fungos ou ácaros.

[009] As doenças transmitidas por insetos, especialmente por mosquitos, são responsáveis por 17% de todas as doenças infecciosas, provocando mais de 1 bilhão de mortes por ano. Além da letalidade, essas doenças trazem para os países afetados grandes prejuízos humanos, sociais e econômicos, sendo o combate a esses vetores a principal forma de controle e erradicação dessas doenças (OMS, 2016).

[010] O *Aedes aegypti* têm despertado grande interesse pela busca por inseticidas, principalmente pela importância dessa espécie, que pode veicular diversas doenças de grande impacto no cenário da saúde pública mundial, como febre amarela, febre de chikungunha, dengue e recentemente Zika.

[011] Até o momento, não existe vacina ou antiviral para a maioria das doenças veiculadas pelo *Aedes aegypti*, sendo o controle e erradicação do mosquito a melhor estratégia para o controle de doenças, principalmente através do uso de inseticidas específicos para fases de vida do inseto (larvicidas e adulticidas).

[012] Uma das classes de inseticidas mais utilizadas contra o *A. aegypti* são os organofosforados e piretróides. Entretanto, o uso prolongado provocou uma seleção de mosquitos resistentes, demandando o uso de doses cada vez

maiores e maior intervalo de tempo para garantia da ação desses compostos (CAMPOS E ANDRADE, 2001; MACORIS et al., 1999, FONTOURA et al., 2012).

[013] Atualmente, para minimizar o desenvolvimento de resistência, inseticidas das classes dos reguladores de crescimento de insetos (IGR) como as benzoilfenilureias tem sido empregados. No entanto, apesar da introdução desses novos inseticidas, o limitado número de princípios ativos preconizados pela OMS para programas de saúde pública limita a estratégia de rotatividade (OMS, 2016).

[014] Os IGRs causam anormalidades e efeitos retardados nos insetos, dos quais podem ser citados aberrações morfogénicas, declínio na reprodução e fertilidade e falhas na reprodução (MULLA, 1995). Atuam mais especificamente que os outros inseticidas já utilizados pois agem em estruturas que não existem nos vertebrados, o que reduz sua toxicidade para mamíferos (GRAF, 1993).

[015] As benzoilfenilureias tiveram sua origem na década de 70, destacando-se por sua ação mais específica e menor toxicidade para mamíferos. Somando-se a isso, são biodegradáveis e de baixo impacto ambiental (MARTINS; SILVA, 2004). Esses compostos atuam no bloqueio da síntese de quitina nos estádios larvais do inseto, causando a morte por deposição endocuticular anormal e muda abortiva. Os efeitos incluem inibição completa ou parcial da muda, pupas mal formadas e dificuldade de alimentação. A mortalidade após tratamentos com esses compostos só pode ser observada durante a mudança de estádios larvais ou do estágio larva/pupa e pupa/adulto, quando a quitina está sendo ativamente sintetizada (RETNAKARAN; WRIGHT, 1987).

[016] Por esse motivo, estão presentes em diversas tecnologias, geralmente combinadas com outros inseticidas, como por exemplo, com isoxasolina (US 9,371,293, 2016), com dihidrofurano azetidine (US9,133,172,

2015), nanoencapsulado em conjunto como ácido antranílico (US9,204,644 e US9,149,039, 2015), diamida antranílica (US8,709,976, 2014); ou em formulações complexas com emprego de surfactantes, co-solventes e agentes emolientes (US8,900,554, 2014); US8,691,256, 2014).

[017] Das benzoilfenilureias, o diflubenzuron, N-[[4-(4-clorofenil)amino] carbonil]-2,6-difluorobenzamida ou 1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil)ureia foi o primeiro inibidor da síntese de quitina a ser utilizado comercialmente em agricultura e contra moscas de importância veterinária (GRAF, 1993). A formulação é comercializada na forma de pó ou grânulos com teor máximo de princípio ativo de 25% p/p. O composto encontra-se na classe IV de toxicidade de acordo com os critérios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2015), sendo praticamente atóxico para mamíferos, biodegradável, não sistêmico e com baixo impacto ambiental (APPERSON et al., 1978). Ele pode ser utilizado ainda em recipientes com água potável desde que sua dose não exceda de 0,25 ppm, uma vez que seus efeitos tóxicos aparecem apenas em concentrações acima de 4500 ppm (BRASIL, 2008). No Brasil e no mundo, diversos estudos mostraram a susceptibilidade do *Aedes aegypti* a esse composto (GARCIA NETO, 2011; PORTO, 2015; SECCACINI et al., 2008).

[018] O novaluron, (\pm)-1-[3-cloro-4-(1,1,2-trifluoro-2-trifluorometoxietoxilo)fenil]-3-(2,6-difluorobenzoil)ureia se destaca como um dos análogos mais potentes dessa classe (CUTLER; SCOTT-DUPREE, 2007). Ele foi inicialmente indicado para uso contra larvas de *Aedes aegypti* em habitats temporários do mosquito, águas poluídas e recipientes não potáveis de armazenamento de água, sendo recomendada uma dose de 10-50 ppm ou 10-100 g/ha do princípio ativo (WHO, 2004). Após avaliação de risco em 2007, o composto passou a ser recomendado pela OMS para uso na água potável a 0,05 ppm (WHO, 2004; 2008). Inúmeras pesquisas confirmam a ação do novaluron contra formas imaturas do mosquito, constituindo uma evolução no combate ao *Aedes aegypti* (FARNESI et al., 2012; FONTOURA et al., 2012; MULLA et al., 2003).

[019] No entanto, uma avaliação realizada em laboratório tratando gerações sucessivas com uma dose pré-determinada de diflubenzuron

identificou a possibilidade de surgimento de resistência de forma rápida para o composto, sendo a mesma possivelmente relacionada à resistência metabólica (BELINATO; VALLE, 2015). Este dado corrobora para a necessidade de avaliação constante dos inseticidas preconizadas pela OMS, bem como para a busca contínua de melhoramento dos inseticidas já existentes e avaliação de novos potenciais inseticidas.

[020] Tais informações, aliadas ao expressivo crescimento do número de casos notificados de Dengue (aumento de 48% em relação a 2015), além da associação com os casos de Zika, que geram má formações neonatais e distúrbios neurológicos, mostra-se a urgência na busca por novas tecnologias e o desenvolvimento de estratégias alternativas para o combate a esse vetor.

[021] Uma estratégia tecnológica cada vez mais empregada para promover a eficiência de compostos diversos no meio biológico e meio ambiente, é o nanoencapsulamento molecular. Nanoformulações, embora já amplamente utilizadas no setor farmacêutico, somente tem recebido importância pela indústria agroquímica a partir dos últimos dez anos, quando verifica-se a ocorrência de mais de 3000 pedidos de patentes e cerca de 85 documentos científicos tratando de nanopesticidas (KAH et al., 2013).

[022] Os nanopesticidas tem como objetivo, a proteção dos componentes ativos e a liberação lenta dos princípios no meio ambiente. Por exemplo, a tecnologia PI0606042-0A (2006) descreve o uso de óleo essencial de eucalipto nanoencapsulado em micelas de surfactante aniônico, juntamente com óleo mineral como co-solvente, para liberação controlada dos componentes do óleo, para controle de pragas como mosca branca. Esta tecnologia exemplifica a relevância da estratégia de nanoencapsulamento de princípios ativos de compostos para potencializar a eficiência contra pragas. A tecnologia US6645516 (1999) descreve uma composição baseada em sistema

de nanoemulsão de óleo essencial etoxilado – surfactante derivado de óleo natural – co-surfactante – água, com aplicação como inseticidas, inclusive. As tecnologias PI 0105956-4 (2001), PI 0105957-2 (2001), PI 0105955-6 (2001) descrevem processos onde são reivindicados a preparação e uso concentrado emulsionável do óleo essencial de *Eucalyptus Globulus* solubilizado e estabilizado em nanoestruturas, para uso no controle de endo e ecto parasitas em animais domésticos e bovinos. A patente US9,023,398 (2015) reivindica um método de microencapsulamento de compostos de baixa solubilidade, incluindo inseticidas e fármacos, utilizando sais inorgânicos como fosfato, trifosfato ou carbonato de cálcio, hidroxiapatita; mediante aplicação de energia mecânica.

[023] Nanotecnologias para usos inseticidas possuem um amplo espectro de aplicações, não somente para solubilização de componentes químicos, mas para aplicações mais sofisticadas, como em sistemas de liberação controlada no meio de interesse.

[024] Dentre as diversas possibilidades de nanodispositivos, as ciclodextrinas (CDs) surgem como uma importante de matriz encapsulante. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos constituídos por 6, 7 e 8 unidades glicosídicas (as principais), que são capazes de formar compostos de inclusão molecular com diversas moléculas e princípios ativos, especialmente para a área farmacêutica. Tecnologias envolvendo o uso de ciclodextrinas tem sido relatadas no estado da técnica como estratégia para melhoria da biodisponibilidade de compostos bioativos através de: aumento da estabilidade química, redução da taxa de absorção, proteção contra ataques químicos, redução da taxa de degradação metabólica, proteção contra fixação em tecidos e órgãos indesejados e redução de efeitos tóxicos; contribuindo ainda para redução dos custos de produção, conforme relatado em algumas patentes, como WO/2008/052295 (2008), WO/2008/052294 (2008), WO/2007/044693-A2 (2007), WO/2008/052295 (2008), CN104877389-A (2015); BR 10 2013 030026 8 A2 (2013), BR1020120172348 A2 (2012), WO2016041530-A1 (2015), BR1020130300241 A2 (2013); dentre inúmeros outros.

[025] Além de formulações farmacêuticas, no estado da técnica são descritos produtos e processos baseados em ciclodextrinas e seus compostos de inclusão com inseticidas, onde diversas composições são reivindicadas, demonstrando assim o interesse tecnológico na abordagem agroquímica, veterinária e para o controle de insetos. Tais estratégias incluem o emprego de compostos de inclusão resultantes da combinação de moléculas diversas com ciclodextrinas. As patentes BR1020120308991 A2 (2012) e BR1020140246398 A2 (2014) descrevem o emprego de óleos essenciais para ação larvicida e carrapaticida. As patentes EP2848122 A4 (2012) e JP2009161471 (2009) descrevem métodos empregando ciclodextrinas e inseticidas, com auxílio de um solvente, para obtenção de composto de inclusão com atividade inseticida. A patente WO 2013/102691-A1 reivindica o desenvolvimento de novos complexos de inclusão de atividade pesticida (piretoides, carbamatos, organofosforados, neonicotinoides, fenilpirazoles, triazoles, benzoilureias, oxadiazinas, nitrometilenos, sinérgicos, etc) com ciclodextrinas naturais e modificadas. Nessas tecnologias, seu uso é destinado a eliminar, reduzir, controlar, atrair, repelir, neutralizar e prevenir organismos prejudiciais, como por exemplo: gastrópodes, nematoides, artrópodes, pragas, roedores, moluscos, aves e peixes.

[026] No estado da técnica, são descritas também, algumas tecnologias envolvendo o emprego de ciclodextrinas e avermectinas em formulações, empregando muitas vezes surfactantes, outros aditivos ou mesmo, fontes de energia como ultrassom. Na patente CN101933508-A (2010), é descrita uma composição de abamectina, etanol, β -ciclodextrina (e derivadas) e água. A composição tem como vantagens uma maior estabilidade e solubilidade aquosa dos constituintes. Todavia, não prevê aplicações específicas, apenas aumento da solubilidade e estabilidade dos constituintes.

[027] A tecnologia CN101954089-A (2010) descreve e reivindica complexos de inclusão de drogas veterinárias compostos por ingrediente ativo, entre os quais as avermectinas: ivermectina e abamectina e β -ciclodextrinas

derivadas em uma proporção molar de 1:1-1:5. O complexo de inclusão promove o aumento da solubilidade e a estabilidade das drogas veterinárias sendo vantajoso para o armazenamento, além de reduzir a utilização de solventes orgânicos e efeitos secundários tóxicos das drogas. Inclui o método de preparação dos complexos de inclusão dos medicamentos veterinários, na qual descreve o emprego dos métodos de liofilização, moagem ou ultrassom. A tecnologia descrita é destinada à sua utilização em formulação veterinária na forma de dosagem peroral ou injeção. Na forma de dosagem peroral incluem as formas de partículas, oral líquido, comprimidos, pó solúvel ou pré-misturas e na dosagem por injeção são reivindicadas as formas de solução parentérica e injeção de pó.

[028] A patente CN1918992-A (2006), descreve e reivindica um complexo sob a forma de granulado solúvel de benzoato de metilamino-avermectina com β CD e seu método de preparo. O foco desta tecnologia é a elevada solubilidade e dissolução das formulações, mas não é reivindicado nenhum uso em específico.

[029] Na patente WO2003075656A2 (2003) é descrito uma formulação de liberação lenta de ácido graxo e ester graxo nematocidas com β CD, contendo diversos outros aditivos, como estabilizante BHT, emulsificante Tween 80 e água, podendo ou não conter avermectina como nematocida auxiliar. A formulação é descrita como sendo estável, e taxa de decomposição térmica reduzida, redução na hidrólise. Todavia, considerando que possui diversos aditivos, não pode ter custo de produção tão baixo.

[030] A patente CN103417486 (2013) descreve uma dispersão sólida contendo ivermectina como principal inseticida e HP β CD como agente de encapsulamento. A patente descreve o uso de diversos outros aditivos auxiliares de solubilização, como Tween 80, citrato de sódio anidro, antioxidante e éster de ácido gálico, afim de se obter um pó molhável. O método de preparação da dispersão sólida e o uso da formulação na

preparação de medicamento veterinário anti-helmintico são reivindicados nesta patente.

[031] Na patente CN104208017 A (2013) é reivindicado uma solução de ivermectina e seu método de preparo. A formulação é caracterizada pelo complexo de inclusão ciclodextrina:ivermectina, um agente emulsionante, um co-emulsionante, um estabilizador e água purificada. A formulação sob a forma de solução é útil para o uso veterinário como medicamento antiparasitário para animais. Na presente tecnologia a complexação tem como objetivo melhorar a solubilidade aquosa da ivermectina e facilitar a sua formulação.

[032] Na patente EP0930077 (2003) é reivindicado uma formulação para uso veterinário contendo um agente anti-helmintico (ivermectina: ivermectina, abamectina ou milbemicina) e pelo menos uma ciclodextrina (α , β , ou γ) ou derivadas. A formulação é destinada ao tratamento de helmintíases corporais em animais e especialmente para o tratamento de infestações nematoides em animais domésticos. Alimentos para animais que contenham a composição e o método de preparação são também reivindicados nesta patente.

[033] A patente WO2009062939 (2008), reivindica uma formulação veterinária para controle ou tratamento de endoparasitas em animais de sangue quente (especialmente cães e gatos). Os endoparasitas patogênicos incluem cestodes, trematodes, nematodes e acantocéfalos. A formulação compreende uma pasta de anti-helmíntico em forma de uma suspensão aquosa concentrada, para uso dérmico ou oral, contendo: praziquantel como anti-helmíntico antiparasitário de amplo espectro; e avermectinas e milbemicinas como antiparasitários auxiliares; em conjunto com ciclodextrina, polímero espessante e água. Essa tecnologia promove uma melhor adesão ao tratamento através da melhora na palatabilidade e, conseqüentemente, na aceitação voluntária ou ingestão da composição farmacêutica por animais de sangue quente. Todavia, devido à complexidade,

não pode ser entendida como uma formulação de baixo valor comercial, além de priorizar principalmente o uso oral.

[034] Na patente CN105288642-A (2014) foi reivindicado o método de preparação do complexo de inclusão entre a ivermectina e ciclodextrina na proporção de 1:10 e 1:25; e o seu uso como pesticida para preparações antiparasitárias. Uma das vantagens apresentadas nessa tecnologia é o aumento da estabilidade em meio aquoso, favorecendo a sua formulação aquosa e diminuição do emprego de solventes orgânicos. Todavia, considera-se uma elevada proporção molar entre ciclodextrina e avermectina, o que fatalmente promoverá um encarecimento do processo de produção da formulação, especialmente para uso ambiental, já que o custo por peso de ciclodextrina é elevado.

[035] Como descrito acima, existe no estado da técnica várias invenções baseadas em complexos de inclusão com ciclodextrinas e avermectinas, em diferentes proporções molares, com diversos aditivos e para diversas aplicações de uso veterinário. No entanto, até o presente momento não foi encontrado no estado da técnica, nenhuma tecnologia com características similares ao da presente invenção, onde é descrito novo método de obtenção de formulação inseticida na forma de nanoprecipitados hidrofóbicos, utilizando ciclodextrinas, solvente orgânico em baixa quantidade e água. Inclusive o tamanho de partícula descrito no presente documento não foi reivindicado em nenhum documento.

[036] Quanto às benzoilfenilureias, são descritas no estado da técnica algumas tecnologias combinando novaluron, diflubenzuron com ciclodextrinas de forma genérica; muitas vezes utilizando essas moléculas como aditivos; ou descritas em formulações contendo surfactantes, estabilizantes e outros compostos, visando o aumento da solubilidade ou da estabilidade. Em ambos os casos, não se pode considerar que as formulações sejam de baixo valor comercial, ou que seja reivindicado compostos de inclusão das

benzoilfenilureias com ciclodextrinas, uma vez que em misturas complexas, ocorrerá inevitavelmente a competição dos diversos componentes da formulação pela cavidade das ciclodextrinas.

[037] Por exemplo, nas tecnologias US20120021914 A1, EP2278877A2, WO2009130282A2, WO2009130282A3 (2009), são reivindicadas formulações inseticidas contendo novaluron e ciclodextrinas, mas sem considerar a formação do correspondente composto de inclusão, muito menos o uso na forma de nanoprecipitados hidrofóbicos. Nas patentes EP2278877A2 (2010), WO2009130282A2 (2010), WO2009130282A3 (2010), são descritos e reivindicados compostos de inclusão de ciclodextrinas com diamidas antranílicas, porém, considerando ampla gama de possibilidades de emprego de pesticidas auxiliares, sem considerar o uso de nanoprecipitados hidrofóbicos, ou especificamente, compostos de inclusão de ciclodextrinas com novaluron, diflubenzuron ou outras benzoilfeniluréis. Nesse caso, a mistura de componentes implica na competição dos compostos pela cavidade das ciclodextrinas, conforme já citado.

[038] As patentes US 20140080710 A1 (2013), US20140080711 (2013), US20140080712 A1 (2013), US8119150B2 (2002), US20070020304 9 (2013), US9023398B2 (2009), CN102573912A (2009) e A1 e CA2883429A1 (2013) descrevem formulações complexas contendo partículas recobertas com polímero, hidrocarbonetos e outros aditivos, podendo conter ou não inseticidas e outros compostos. Porém, não são reivindicados nanoprecipitados hidrofóbicos, nem compostos de inclusão de benzoilfenilureias com ciclodextrinas, além do problema da complexidade da formulação, que implica em elevados preços e competição de compostos diversos pela ciclodextrina.

[039] Diante do apresentado, não foi encontrado no estado da técnica tecnologias reivindicando métodos de preparo, formulações e uso de compostos de inclusão de ciclodextrinas com as benzoilfenilureias novaluron e diflubenzuron, da forma apresentada na presente tecnologia; muito menos na

forma de nanoprecipitados hidrofóbicos, para a finalidade de controle do *Aedes aegypti*.

[040] Daí, a matéria tratada refere-se, em específico, a um processo de obtenção de composições nanoestruturadas contendo abamectina, ivermectina ou eprinomectina (não restrita a essas avermectinas); ou contendo diflubenzuron e novaluron (não restrita a essas benzoilfenilureias), nanoencapsulamento desses compostos em β -ciclodextrina (não restrito a essa ciclodextrina) na proporção molar de 1:1 (formação de compostos de inclusão moleculares), se diferenciando das demais tecnologias descritas no estado da técnica, pela obtenção de formulações contendo nanoprecipitados hidrofóbicos constituídos pelos compostos de inclusão dos inseticidas em ciclodextrina em presença de pequeno volume dimetilsulfóxido e água, de modo a se garantir um baixíssimo custo de produção.

[041] A presente tecnologia apresenta a vantagem de se dispensar sem quaisquer outros aditivos, como surfactantes ou quelantes, contribuindo para redução dos custos de produção e comercialização das formulações.

[042] Outra vantagem frente às demais é o fato de poder ser comercializada na forma de dispersão concentrada, em baixos volumes, de modo que quando diluídas em meio aquoso, num volume apropriado de água, levam à formação de suspensão estável de nanoprecipitado hidrofóbico. Isso é possível porque os compostos aqui apresentados possuem atividade inseticida em concentrações da ordem de micro ou nanomolar.

[043] Esses nanoagregados funcionam como sistemas de liberação controlada dos inseticidas no meio ambiente, com ação residual, já que os nanoprecipitados são pouco solúveis em água, impregnando-se facilmente em superfícies sólidas (como paredes), apresentando dificuldade de lixiviação por água de chuva ou de outras fontes.

[044] Formulações contendo essas nanoestruturas poderão ser utilizadas para controle do *Aedes aegypti* em programas de controle de zoonoses, epidemias e pragas (não restrito somente ao *A. aegypti*), já que apresentam eficiência superior às avermectinas ou às benzoilfeniluréias puras, conforme demonstrado nos exemplos abaixo. As formulações podem ser empregadas contra outros insetos da família do *Aedes*, pois possuem fisiologia similar.

[045] Finalmente, outra grande vantagem da tecnologia é a possibilidade de uso combinado de nanoprecipitados hidrofóbicos mistos, contendo simultaneamente avermectinas e benzoilfenilureias complexadas em ciclodextrinas e nanoagregadas na forma dos nanoprecipitados hidrofóbicos, garantindo assim, modos diferentes de ação, em mais de um estágio/estádio, com maior eficiência e eficácia contra essa espécie de mosquito e prevenindo o desenvolvimento de resistência aos ativos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[046] A presente invenção consiste em três etapas principais (I, II e III) para se obter a composição final.

[047] A etapa I consiste na obtenção do composto de inclusão pela associação entre os inseticidas e a ciclodextrinas. As moléculas, mantidas em contato químico em meio líquido, se associam através de interações não covalentes formando complexos supramoleculares conhecidos também como compostos de inclusão. Para isso, prepara-se uma solução aquosa de β CD (não restrito a esta ciclodextrina) pesando-se uma massa equivalente a 5 mmol do composto e dissolvendo-o em 500 mL de água, sob brando aquecimento (≈ 50 °C). Em seguida, prepara-se uma solução do inseticida pesando-se a massa equivalente a 5 mM do composto (avermectina: abamectina, eprinomectina ou ivermectina; ou benzoilfeniluréia: novaluron ou diflubenzuron; não restrito a esses compostos) e dissolvendo-o em 500 mL de álcool etílico 95%, grau P.A.

Preparada as soluções, procede-se com a mistura das duas, vertendo-se a solução aquosa de β CD sobre a solução etanólica do inseticida. A suspensão formada deve ser mantida sob agitação magnética e aquecimento brando (≈ 50 °C), em recipiente aberto, por 24 horas; afim de se remover o excesso de solvente orgânico. A mistura resultante é denominada “mistura I”. Proporções múltiplas da apresentada ou concentrações superiores podem ser utilizadas sem causar prejuízo à formulação.

[048] A etapa II consiste na remoção do solvente aquoso por liofilização (ou por outro método de secagem, como aquecimento). Inicialmente, procede-se com o congelamento da mistura I a uma temperatura inferior a -20 °C. Subsequentemente, insere-se o material congelado em um liofilizador. O material permanece sob liofilização até a completa remoção do solvente e obtenção de um pó amorfo (≈ 96 h), denominado “sólido liofilizado”. A remoção do solvente pode ser feita também por secagem por aquecimento.

[049] A etapa III consiste na dissolução dos sólidos liofilizados em solução de DMSO, com consequente obtenção dos nanoprecipitados hidrofóbicos em ambiente aquoso. Para isso, pesa-se a massa correspondente do composto de inclusão afim de se preparar 100 mL de solução em DMSO, numa concentração de 50 mM (a massa molar do composto de inclusão deve ser calculada pela soma da massa molar do composto puro com a massa molar da ciclodextrina a ser utilizada). Esta solução deve então ser vertida em 1 L de água, afim de se obter uma suspensão concentrada de nanoprecipitados, com concentração total de princípio ativo a 5×10^{-3} M (5 mM). Essa suspensão concentrada pode ser diluída para um volume de até 250 L, afim de se obter uma suspensão contendo 20×10^{-6} M (20 μ M) do componente ativo. Esta concentração final foi determinada com base nos ensaios de atividade larvicida apresentados nos exemplos abaixo, onde observou-se que os compostos apresentam atividade aguda ou crônica na faixa de 10 nM até próximo de 1 μ M. Assim, uma concentração de 20 μ M é suficiente para cobrir toda a faixa de atividade aguda e crônica dos compostos.

[050] Tal procedimento leva à formação nanoprecipitados hidrofóbicos, denominada “mistura II”. Tanto a formação quanto a eficiência dos nanoprecipitados pode ser melhor compreendida através dos seguintes exemplos, não limitantes aos compostos apresentados.

EXEMPLO 1: Caracterização química da nanocomposição no estado sólido por FTIR.

[051] Inicialmente, procedeu-se com a caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido com a espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR). Foram feitas comparações dos espectros de infravermelho obtidos dos inseticidas puros e dos respectivos complexos, pois deslocamentos de bandas correspondem à mudanças na energia dos modos vibracionais, enquanto que diferenças nas intensidades podem ser atribuídas a perturbações nos momentos de dipolo das ligações químicas de grupos funcionais envolvidos nas interações. Para fins de comparação, preparou-se também misturas mecânicas (MM), resultantes da pesagem conjunta dos compostos, seguida de agitação mecânica, sem contato com qualquer solvente (nessas condições, não há inclusão molecular).

[052] De modo geral, a inserção de uma molécula hóspede no interior da cavidade de uma ciclodextrina ou a sua associação externa leva a uma restrição conformacional das moléculas, reduzindo a livre movimentação, que se refletem nos espectros como alterações ou reduções de sinal (BARBATO et al, 2000).

[053] Os espectros de FTIR da β CD, das moléculas hóspede livres, das Misturas Mecânicas e das nanocomposições são apresentados nas Figuras 1-5. Pode ser observado que em todos os espectros ocorre desvios e alteração de intensidade de várias bandas quando compara-se o espectro das moléculas livres e do complexo.

[054] No espectro da β CD, observa-se principalmente a presença de bandas de absorção em 3380 cm^{-1} (estiramento O-H), 2925 cm^{-1} (estiramento C-H), 1647 cm^{-1} (deformações O-H, água de hidratação) 1158 cm^{-1} (estiramento C-O) e 1028 cm^{-1} (estiramento C-O).

[055] Para os compostos avaliados os dados estão divididos em letras de acordo com o inseticida para melhor compreensão. Sendo assim tem-se:

a) Abamectina (ABA)

[056] Para a ABA (figura 1) as principais absorções observadas foram uma banda em 3473 cm^{-1} associada ao estiramento da ligação O-H; bandas com mínimos em 1713 cm^{-1} e 1733 cm^{-1} associadas ao estiramento da ligação C=O do anel macrolídeo; bandas na região de 1656 cm^{-1} e 1669 cm^{-1} associadas ao estiramento de alcenos conjugados ($\nu\text{C}=\text{C}$); banda com mínimo em 1457 cm^{-1} associada ao dobramento assimétrico do grupo CH_3 ($\delta_{\text{ass}}\text{CH}_3$), bandas na região de 1300 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} associadas à ligação de éteres ($\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$).

[057] Na MM não ocorreram mudanças significativas nas posições das principais bandas observadas para a ABA e a β CD isoladas sendo que o perfil observado é justificado pela sobreposição das bandas oriundas na ABA e β CD.

[058] Apesar da ABA apresentar unidades glicosídicas como a β CD, no espectro do composto de inclusão (ABA/ β CD), marcantes modificações podem ser observadas como a sobreposição das vibrações atribuídas à ligação C=O em 1735 cm^{-1} oriunda da ABA e a mudança no perfil e posições de bandas na região de 1200 a 900 cm^{-1} . Estas alterações sugerem a formação desse composto de inclusão no estado sólido.

b) Eprinomectina (EPRI)

[059] O espectro IV da EPRI (figura 2) mostra bandas de absorção em 3457 cm^{-1} associada ao estiramento da ligação O-H e acoplamento com o estiramento da ligação N-H; bandas com mínimos em 1735 cm^{-1} , 1659 cm^{-1} e 1544 cm^{-1} associadas ao estiramento da ligação C=O do anel macrolídeo, da amida e ao estiramento de alcenos conjugados ($\nu\text{C}=\text{C}$); banda com mínimo em 1455 cm^{-1} associada ao dobramento assimétrico do grupo CH_3 ($\delta_{\text{ass}}\text{CH}_3$), bandas na região de 1300 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} associadas à ligação de éteres ($\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$); bandas com mínimos em 1272 cm^{-1} e 1161 cm^{-1} associadas ao estiramento da ligação C-N da amida.

[060] Na MM não foram observadas mudanças significativas nas posições das principais bandas relacionadas à EPRI e a βCD isoladas, sendo o perfil observado, justificado pela sobreposição das bandas da EPRI e da βCD .

[061] Já no complexo de inclusão (EPRI/ βCD) mudanças significativas ocorrem no perfil das bandas no espectro de infravermelho, tais como: afinamento da banda a 3404 cm^{-1} associada ao acoplamento da vibrações $\nu(\text{N}-\text{H})$, $\nu(\text{O}-\text{H})$, atribuído à formação de um novo padrão de ligações de hidrogênio; atenuação e deslocamento das bandas a 1735 cm^{-1} , 1658 cm^{-1} correspondente a vibrações da ligação C=O; o desaparecimento da banda a 1545 cm^{-1} ; a atenuação das bandas entre $1300-1100\text{ cm}^{-1}$ e a mudança no perfil e posições de bandas na região de 1200 a 900 cm^{-1} associadas à βCD .

c) Ivermectina (IVER)

[062] O espectro da IVER (figura 3) mostra bandas de absorção em 3480 cm^{-1} ($\nu\text{O}-\text{H}$), 2965 , 2933 cm^{-1} ($\nu\text{C}-\text{H}$), 1735 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{O}$, no macrociclo), 1678 , 1635 cm^{-1} ($\nu\text{O}-\text{H}$, $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$, sobreposição) 1454 , 1380 cm^{-1} ($\delta\text{C}-\text{H}$, $\text{C}-\text{O}-\text{H}$), $1341-1000$ ($\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$) e 1197 , 1183 ($\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$).

[063] No espectro da MM não foi identificadas modificações significativas de posição de bandas e o perfil observado é justificado pela sobreposição das bandas oriundas da ivermectina e da βCD .

[064] Em relação ao complexo observa-se significativas modificações no perfil das bandas de IV, tais como: afinamento da banda a 3401 cm^{-1} (referente às hidroxilas), devido à formação de um novo padrão de ligações de hidrogênio; atenuação e deslocamento das bandas a 1735 cm^{-1} , 1678 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} atribuídas à ligação C=O e ao estiramento de alcenos conjugados ($\nu\text{C}=\text{C}$) da IVER, atenuação das bandas a $1400\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ atribuídas a vibração de deformação das ligações C-H e C-O-H e a intensificação e mudança no perfil das bandas na região de $1200\text{ a }900\text{ cm}^{-1}$ associadas βCD .

d) Diflubenzuron (DIF)

[065] No espectro do DIF (figura 4) pode-se observar bandas com mínimo em 3233 cm^{-1} e 3142 cm^{-1} , características do estiramento das ligações N-H; bandas em 1705 cm^{-1} e 1685 cm^{-1} , que caracterizam o estiramento das ligações C=O; bandas na região entre $1600\text{ e }1400\text{ cm}^{-1}$ que caracterizam presença de anel aromático; bandas na região de $1400\text{ a }1000\text{ cm}^{-1}$ atribuídas a ligação C-F, bem como bandas na região de $800\text{ a }600\text{ cm}^{-1}$ atribuídas a ligação C-Cl (SILVERSTEIN; BOSSLER; MORRIL, 1994).

[066] Na MM não ocorreram mudanças significativas nas posições das principais bandas e o perfil observado é justificado pela sobreposição das bandas oriundas de ambos os compostos em separado.

[067] No composto DIF/ βCD , mudanças significativas ocorrem no perfil das bandas no espectro de infravermelho, tais como: intensificação da banda a 3379 cm^{-1} e desaparecimento da banda a 1650 cm^{-1} da βCD (referente às hidroxilas); atenuação de bandas do DIF na região de $1700\text{ a }1200\text{ cm}^{-1}$; e mudança no perfil das bandas na região de $1200\text{ a }900\text{ cm}^{-1}$ associadas a βCD .

e) Novaluron (NOV)

[068] No espectro do NOV (figura 5) pode-se observar bandas com mínimo em 3234 cm^{-1} e 3126 cm^{-1} , características do estiramento das ligações N-H; bandas em 1706 cm^{-1} e 1692 cm^{-1} , que caracterizam o estiramento das ligações C=O, estando a última relacionada à amida secundária; bandas na região entre 1600 e 1400 cm^{-1} que caracterizam presença de anel aromático e bandas na região de 1400 a 1200 cm^{-1} atribuídas aos CF_2 e CF_3 (tabela 5) (SILVERSTEIN; BOSSLER; MORRIL, 1994).

[069] Na MM não ocorreram mudanças significativas nas posições das principais bandas observadas para o NOV e a βCD isolados sendo o perfil observado é justificado pela sobreposição das bandas oriundas do NOV e da βCD .

[070] No composto NOV/ βCD mudanças significativas ocorrem no perfil das bandas no espectro de infravermelho, tais como: afinamento da banda de βCD a 3386 cm^{-1} (referente às hidroxilas), devido à formação de um novo padrão de ligações de hidrogênio; desaparecimento da banda a 1650 da βCD ; atenuação de bandas do NOV em torno de 1118 cm^{-1} e mudança no perfil das bandas na região de 1200 a 900 cm^{-1} associadas a βCD .

EXEMPLO 2: Estabilidade térmica dos complexos em relação às moléculas livres (inseticida e βCD) por análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA).

[071] Análise termogravimétrica e análise térmica diferencial foram realizadas em atmosfera inerte (N_2) a 50 mL/min e a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C/min}$ para amostras de ABA, IVER, EPRI, NOV, DIF, βCD ; para os complexos de inclusão (CIs) ABA/ βCD , IVER/ βCD , EPRI/ βCD , NOV/ βCD e DIF/ βCD e suas respectivas misturas mecânicas (MMs). Durante os

experimentos, foi utilizado cadinho de alumina e massa aproximada de 3,5 mg para cada composto.

[072] Este tipo de avaliação é importante visto que a formação dos compostos de inclusão resultam de interações intermoleculares que levam a alterações do comportamento térmico dos materiais. De modo geral, ao ser formado o composto de inclusão podem ocorrer modificações nas transições de fases (fusão, ebulição, sublimação, decomposição entre outros) e alterações nas temperaturas de desidratação e decomposição.

[073] Nas Figuras 6 a 10 são apresentadas as curvas de TGA e DTA para as moléculas livres, MMs e compostos de inclusão, onde são apresentados os valores de porcentagem de massa (%m/m₀) e potência térmica (DTA / μ V) em função da temperatura, juntamente com tabela resumindo os eventos térmicos.

[074] A curva TGA para a β CD, apresenta uma perda de 14,8% em massa na faixa de 30-110 °C correspondente a perda de moléculas de água presentes na cavidade e águas intersticiais entre as moléculas de β CD, seguida por uma estabilidade térmica até 262 °C quando inicia-se sua fusão seguida de uma primeira decomposição com perda de massa até 350°C, quando sofre uma segunda decomposição, responsável pela calcinação do composto. Na curva DTA, observa-se um pequeno pico endotérmico iniciado a 252 °C, com máximo a 316 °C, atribuído à fusão da β CD. Após esse evento, sucessivos picos endotérmicos são observados, confirmando que a decomposição ocorre por sucessivas etapas envolvendo reorganização molecular do material sólido.

[075] Para os compostos avaliados temos:

a) Abamectina

[076] A curva de TGA da ABA (figura 6) apresenta uma sequência de eventos térmicos de decomposição com máximo em 288,62 °C. Na curva de DTA foram observados discretos picos endotérmicos de decomposição.

[077] Na curva de TGA da MM ocorrem três eventos térmicos, sendo o primeiro atribuído a desidratação da β CD com faixa e mínimo bem próximos aos observados para a molécula livre. Os demais eventos correspondem à decomposição da mistura apresentando um perfil térmico diferente em relação às moléculas livres. Através da curva de DTA observa-se que todos esses eventos são endotérmicos.

[078] Na curva de TGA do composto ABA/ β CD, observa-se também três eventos térmicos. O primeiro corresponde à perda de massa devido a desidratação da β CD, ocorrendo em uma faixa menor e com menor perda de massa quando comparado à MM e à β CD livre. Esses dados podem ser justificados por interações mais fracas com as moléculas de água presentes devido a complexação, bem como pela presença de ligações glicosídicas na ABA. A decomposição da ABA na presença de β CD ocorre a uma temperatura superior de 229,65 °C, mostrando que as interações com a β CD promoveram um aumento da estabilidade térmica do composto.

b) Eprinomectina

[079] Nas curvas de TGA e DTA da EPRI (figura 7) foi observado um perfil de decomposição em sucessivas etapas. A desidratação da amostra ocorre até a temperatura de 95 °C. O primeiro evento de decomposição se inicia a 227 °C.

[080] Nas curvas TGA da MM, a primeira perda de massa, entre 30-106°C, é associada a desidratação, sendo muito próxima aquela observada para desidratação da β CD livre. A MM permaneceu estável até a temperatura de 270 °C. O aumento na temperatura de início da decomposição da MM em relação à de EPRI livre, indica aumento de estabilidade térmica resultante de interações entre os compostos durante a decomposição.

[081] A interação entre EPRI e a β CD fez com que a decomposição da EPRI/ β CD ocorresse a uma temperatura acima do observado para a EPRI livre, mostrando aumento da estabilidade térmica do composto na presença de β CD.

c) Ivermectina

[082] Nas curvas TGA da IVER (figura 8) foi observado um evento de perda de massa ($\Delta m = 5,2\%$) entre 145-168 °C, atribuído a dessolvatação de solventes residuais de síntese, geralmente etanol e dimetilformamida (78 °C e 164 °C). Em seguida, foi observado outro evento de perda de massa entre 193-280 °C, atribuído ao início da decomposição da amostra. Após este evento, sucessivas perdas de massa foram observadas até a sua completa decomposição. Na curva de DTA da IVER, foi observado um primeiro evento endotérmico entre 140 °C a 189 °C, com máxima temperatura em 164 °C, atribuído à dessolvatação de solventes residuais que ocorre juntamente com o evento relacionado a fusão (150-160 °C). Em seguida, outro evento endotérmico foi observado entre 192-250 °C ($T_{\text{máx}} \approx 219$ °C), atribuído ao início da decomposição. Outros eventos endotérmicos foram atribuídos às sucessivas decomposições até a calcinação.

[083] Nas curvas TGA e DTA da MM, foram observados os eventos de desidratação da β CD e a volatilização dos solventes residuais da IVER, bem como o pico endotérmico com máximo a 165 °C, atribuído à fusão da IVER. Na MM, os compostos são estáveis até a temperatura de 247 °C quando então inicia-se sucessivas etapas de decomposição das moléculas. O primeiro evento de decomposição na MM ocorreu a uma temperatura maior que na molécula de IVER livre, indicando aumento da estabilidade térmica do composto durante a decomposição, similar ao observado para o sistema EPRI/ β CD.

[084] Nas curvas TGA e DTA do complexo IVER/ β CD, quatro observações importantes foram identificadas, sendo elas: *i* - A faixa de

temperatura de desidratação da β CD é menor no complexo comparado com a ciclodextrina pura, indicando interações mais fracas com as moléculas de água presentes em virtude da complexação; *ii* - Na curva de DTA o primeiro evento endotérmico que ocorre entre 140-189 °C, atribuído à dessolvatação da IVER não foi observado no complexo, mostrando que o processo de síntese remove resíduos de solvente; *iii* - no composto de inclusão, a β CD inicia sua decomposição a uma temperatura mais baixa, em virtude das novas interações formadas; *iv* - Na curva TGA, a perda de massa, atribuída ao evento de decomposição da IVER que ocorre entre 192-280 °C não foi observado no complexo, mostrando um perfil térmico diferente da substância livre e sugerindo aumento da estabilidade térmica do composto.

[085] Além disso, destacamos que em toda a faixa de temperatura varrida nos experimentos, as curvas de DTA e TGA das MMs não se sobrepuseram às curvas dos complexos, indicando que existe diferenças significativas em relação às interações intermoleculares estabelecidas nas nanocomposições.

d) Diflubenzuron

[086] Nas curvas TGA e DTA do DIF (figura 9) observa-se que o composto apresenta um único evento térmico relacionado à sua decomposição. Nas curvas TG e DTA da MM observa-se eventos relacionados à β CD e ao DIF, porém com mudanças no perfil térmico em relação às substâncias livres.

[087] O composto DIF/ β CD apresenta quatro eventos térmicos. O primeiro corresponde ao processo de desidratação da β CD que ocorre em uma faixa de temperatura inferior à observada para o composto livre, provavelmente, devido a substituição das moléculas de água presentes na cavidade pelo DIF durante a complexação. Somando-se a isto, ainda verifica-se mudança em todas as faixas de decomposição o que sinaliza o ocorrência de novas interações intermoleculares.

e) Novaluron

[088] Na curva TG do NOV (figura 10) observa-se um único evento de perda de massa iniciado a 170,7 °C ($T_{\text{máx}} \approx 233,7$ °C), atribuído à decomposição. Já na curva de DTA observa-se dois picos endotérmicos, sendo um atribuído à fusão e outro à decomposição.

[089] Nas curvas TG e DTA da MM observa-se eventos relacionados à β CD e ao NOV, porém com perfil térmico diferente em relação às substâncias livres.

[090] O composto NOV/ β CD apresenta um perfil térmico diferente dos compostos isoladamente e da própria MM. Observa-se que no composto de inclusão existem moléculas de água residuais, já que apresentam desidratação na mesma faixa de temperatura da β CD livre. Além disso, ocorre a mudança em todas as faixas de decomposição o que reafirma que as interações no composto são diferentes das demais. O início da decomposição ocorre a 177 °C, acima da temperatura de decomposição do NOV puro, mostrando aumento da estabilidade térmica.

EXEMPLO 3: Caracterização química da interação entre β CD/inseticida em solução por Titulação Calorimétrica Isotérmica (ITC).

[091] O processo de formação dos compostos de inclusão entre os inseticidas com a β CD foi monitorado em solução através da Calorimetria Isotérmica de Titulação (ITC) (WISEMAN et al., 1989).

[091] Para cada titulação, procedeu-se com 51 injeções (de 5 μ L) da solução de inseticida a uma concentração de 30 mM, em 1,5 mL de solução de β CD a 2 mM, a 25 °C, utilizando-se a mistura DMSO/H₂O 90:10 v/v como solvente, já que os inseticidas são pouco solúveis em água. Em seguida, foram realizadas as titulações dos compostos no solvente puro (DMSO/H₂O 90:10

v/v) para obtenção das curvas de diluição (branco). As curvas finais de titulação foram obtidas através da subtração das curvas de titulação pelos respectivos brancos, afim de se avaliar apenas as interações soluto-ciclodextrina (DENADAI, 2005).

[092] Após esse procedimento, as curvas foram modeladas com a Isoterma de Wiseman, para se obter os dados termodinâmicos (WISEMAN et al., 1989). A seguir estão apresentados os resultados obtidos para cada sistema.

a) Abamectina

[093] A curva de titulação da ABA 30 mM em β CD 2 mM apresentou perfil sigmoidal (figura 11A), característico de compostos com altas constantes de afinidade (valores próximos ou superiores a 20000). Este dato sugere uma forte interação entre as espécies (TURNBULL; DARANAS, 2003). De fato, as interações entre os compostos fortes, já que a constante de equilíbrio calculada pela Isoterma de Wiseman foi da ordem de $K \approx 3 \times 10^4$. A espontaneidade do processo foi garantida pelo aumento de entropia, já que o processo foi endotérmico.

[094] A curva sigmoide apresentou ponto de inflexão em razão molar $R \approx 1$, mostrando que o complexo possui estequiometria preferencial, independente das proporções relativas dos compostos em solução.

b) Eprinomectina

[095] A curva de titulação calorimétrica da EPRI 30 mM em β CD 2 mM apresentou perfil sigmoidal distorcido em relação ao sistema ABA/ β CD (figura 11B), indicando uma interação mais fraca. Todavia, após a modelagem da curva com a Isoterma de Wiseman, observou-se também um ponto de inflexão em razão molar aproximadamente igual a $R \approx 1$, demonstrando que a

estequiometria mais favorável foi 1:1. O processo de complexação também foi endotérmico ($\Delta H^\circ > 0$) e favorecido pela entropia ($T\Delta S^\circ > 0$).

[096] A constante de equilíbrio apresentou valor moderado (1060 ± 71) quando comparado com outros sistemas (TURNBULL; DARANAS, 2003).

b) Ivermectina

[097] O sistema IVER/ β CD (figura 11C) se comportou de forma muito similar ao sistema EPRI/ β CD, mostrando coeficiente estequiométrico próximo de 1:1 ($R \approx 1$), processo endotérmico, regido por entropia. Os valores de constante de equilíbrio foram também muito próximos ao observado para o sistema EPRI/ β CD. Isto ocorreu pela elevada similaridade entre as moléculas.

d) Diflubenzuron

[098] Para esse sistema, o perfil da curva de titulação apresentou-se um tanto distorcido, não sendo possível definir precisamente a estequiometria do complexo. Todavia, considerando os tamanhos relativos das moléculas, o ajuste da curva de titulação pela Isoterma de Wiseman foi realizado fixando a estequiometria em 1:1 (figura 11D) e determinando-se os demais parâmetros termodinâmicos.

[099] Após a modelagem e determinação dos parâmetros, observa-se que o processo é favorecido tanto por entalpia ($\Delta H^\circ < 0$) quanto por entropia ($T\Delta S > 0$). Contudo apresenta constante de afinidade com valor muito baixo quando comparada com outros compostos de inclusão na literatura (DENADAI et al., 2007; SILVA, 2015).

e) Novaluron

[100] A titulação da solução de NOV 30 mM em β CD 2 mM apresentou comportamento muito distinto do observado para o análogo diflubenzuron.

Neste caso, foi possível determinar, mediante a modelagem, que a estequiometria do complexo é 1:1, uma vez que o N encontrado foi de $0,917 \pm 0,04$ (figura 11E).

[101] De acordo com os dados termodinâmicos, pôde-se observar que a complexação é um processo endotérmico favorecido por entropia, com uma constante de equilíbrio relativamente baixa (TURNBULL; DARANAS, 2003; REKHARSKY; INOUE; 1998).

[102] Apesar das semelhanças estruturais dos compostos NOV e DIF nas regiões aromáticas, as constantes de equilíbrio foram bem diferentes e entalpia de interação foi endotérmica para o sistema NOV/ β CD e exotérmica para o sistema DIF/ β CD. Esse dado é compatível com o fato de que o grupo “1,1,2-trifluoro-2-trifluoro-methoxyethoxy” torna o NOV muito mais hidrofóbico que o DIF, já que a solubilidade do NOV é cerca de 27 vezes menor que a do DIF. Sendo menos solúvel e mais hidrofóbico, sua interação com a β CD torna-se maior. Além disso, o fato da entalpia de interação ser positiva no caso do NOV pode ser devido ao consumo energético envolvido na dessolvatação parcial do grupo fluorcarbônico durante a inclusão, o que não ocorre no caso do DIF. Essa maior hidrofobicidade do NOV deve ser o mesmo motivo pelo qual é mais ativo que o DIF.

[103] Os dados termodinâmicos mostram, que de modo geral, a estequiometria preferencial é 1:1. Isso significa que, do ponto de vista termodinâmico, um aumento na quantidade relativa de ciclodextrina não acarreta na formação de complexo com estequiometrias superiores (como 1:2, 1:3, 1:4, etc), como esperado em algumas tecnologias (CN101954089-A, 2010 e CN105288642-A, 2014, por exemplo); podendo acarretar em desperdício de ciclodextrina.

EXEMPLO 4: Caracterização dos compostos de inclusão em solução por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

[104] Informações estruturais e morfológicas acerca dos complexos em solução, foram obtidas por RMN (FIELDING, 2000; SCHNEIDER et al., 1998). As análises foram feitas por comparação dos espectros das substâncias puras e das substâncias complexadas em β CD, buscando-se identificar alterações nas posições dos picos. Tais modificações se devem as alterações causadas pela associação das moléculas, com alteração no microambiente ao redor dos átomos de hidrogênio no interior da cavidade da ciclodextrina (HEDGES, 1998; VENTURINI et al., 2008).

[105] Os experimentos foram realizados em espectrômetro Bruker a 400 MHz, utilizando DMSO-d6 como solvente. As amostras foram preparadas dissolvendo-se a massa apropriada dos compostos no solvente, de modo a se obter soluções a 5 mM dos compostos livres ou dos compostos de inclusão.

[106] Nos espectros de RMN de ^1H dos complexos foram observadas significativas variações no deslocamento químico dos hidrogênios H1, OH-3 e OH-2 localizados na face externa da β CD, e do hidrogênio OH-6 presente no lado mais estreito da cavidade da molécula. Os valores obtidos foram condizentes com os apresentados em outros estudos de complexação (ZHANG et al, 2015; JAHED et al, 2014). Em todos os complexos, as variações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios da β CD ocorreram de forma similar, corroborando a hipótese de que as interações entre a β CD e as avermectinas sejam semelhantes, conforme já citado anteriormente nos dados de ITC. Os deslocamentos observados, principalmente com as hidroxilas externas da β CD, sugerem o estabelecimento de ligações de hidrogênio intermoleculares.

[107] Segue abaixo os principais resultados obtidos pela observação dos espectros de RMN das avermectinas e benzoilfenilureias.

a) Abamectina

[108] No espectro de RMN de ^1H de ABA/ βCD (figura 12) foram observadas variações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios CH-1, OH-2, OH-3 e OH-6 da βCD e nos hidrogênios CH-2, CH-3, CH-3', CH₃-6'', CH₂-7, OH-8a, CH-9, CH₃-12a, CH-15, CH₂-20, CH-22, CH-24, CH-26b, CH-28 da ABA. O deslocamento dos hidrogênios externos da βCD pode ser justificado pela interação entre suas hidroxilas e as subunidades glicosídicas da ABA, tendo em vista a liberdade rotacional desses grupos. O grande número de deslocamentos dos sinais envolvendo hidrogênios do anel benzofurânico da ABA indicam a participação desse grupo na inclusão.

b) Eprinomectina

[109] No espectro de RMN de ^1H de EPRI/ βCD (figura 13) foram observadas variações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios OH-2, OH-3 e OH-6 da βCD e dos hidrogênios CH-2, CH-3, CH₂-7 e OH-8a (presentes no anel benzofurânico), dos hidrogênios CH₂-2', OCH₃-3a', CH-4', CH₃-6', CH-1'', CH-5'', CH-6'', NH-7'' (presentes nas unidades glicosídicas) e dos hidrogênios CH-7, CH₃-12a, CH-13, CH₃-14a, CH₂-20, CH₃-24a, CH₃-26a, da EPRI. O deslocamento dos hidrogênios externos da βCD pode ser justificado pela interação entre suas hidroxilas e as subunidades glicosídicas da molécula de EPRI, tendo em vista a liberdade rotacional desses grupos. A variação nos deslocamentos dos sinais envolvendo hidrogênios do anel benzofurânico da EPRI indicam a participação desse grupo na inclusão.

[110] No experimento de ROESY (figura 14) para o composto EPRI/ βCD foi observado uma correlação entre os hidrogênios das hidroxilas externas (OH₂ e OH₃) da βCD e o hidrogênio da hidroxila ligada ao carbono 8a presente no anel benzofurânico da EPRI.

c) Ivermectina

[111] No espectro de RMN de ^1H de IVER/ βCD (figura 15) foram observadas variações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios OH-2, OH-

3 e OH-6 da β CD e dos hidrogênios OH-5a, OH-8a, CH-2, CH-3, CH-6, CH2-7 e CH₃-5a (presentes no anel benzofurânico), dos hidrogênios CH-1', CH-4'', OH-4a'', CH-5'' (presentes nas unidades glicosídicas) e dos hidrogênios CH-10, CH-11, CH-15, CH-20, CH₂-27, CH₃-4a, CH₃-12a, CH₃-14a, CH₃-24a e CH₃-26a da IVER. O deslocamento dos hidrogênios externos da β CD pode ser justificado pela interação entre as hidroxilas da β CD e as subunidades glicosídicas da molécula de IVER, tendo em vista a liberdade rotacional desses grupos. Novamente o grande número de deslocamentos dos sinais envolvendo hidrogênios do anel benzofurânico da IVER indicam a participação desse grupo na inclusão.

[112] No experimento de ROESY (figura 16) para o composto IVER/ β CD também foi observado uma correlação entre os hidrogênios das hidroxilas externas (OH₂ e OH₃) da β CD e o hidrogênio da hidroxila ligada ao carbono 8a do anel benzofurânico da ivermectina.

d) Diflubenzuron

[113] No espectro de RMN de ¹H do DIF/ β CD foi observada uma variação nos deslocamentos químicos dos hidrogênios CH-1, OH-2, OH-3 e OH-6 da β CD e nos hidrogênio NH-10, CH-2 e CH-6 do DIF (figura 17). Podemos sugerir que a inclusão deve estar ocorrendo pela porção fenila, pois dessa forma, as hidroxilas presente na face externa da β CD estariam mais próximas do nitrogênio possibilitando a formação de ligações de hidrogênio nessa situação.

[114] O experimento de ROESY (figura 18) para o composto DIF/ β CD mostrou uma correlação entre os hidrogênios das hidroxilas externas (OH-6) da β CD e os hidrogênios ligados ao nitrogênio 10 do DIF. A existência dessa correlação confirma o modo de interação da ciclodextrina com a molécula hóspede deve ser diferente, corroborando as diferenças nos parâmetros termodinâmicos observadas nos experimentos de ITC.

e) Novaluron

[115] No espectro de RMN de ^1H de NOV/ βCD foram observadas variações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios OH-3, OH-6 e CH-1 da $\beta\text{-CD}$, bem como dos hidrogênios NH-9, CH-15 e CH-18 do NOV (figura 19).

[116] Foram realizados ainda o experimento de ROESY para o composto NOV- βCD , visto que a presença de sinais de correlação dipolar (proximidade espacial menor do que 5 Å) entre os hidrogênios do hóspede e da matriz de encapsulamento pode confirmar a interação entre ambos. No entanto, não foram observadas correlações entre os hidrogênios da molécula hóspede e da βCD .

[117] Comparando as variações de deslocamento químicos da βCD nos complexos avermectinas/ βCD em relação aos complexos benzoilfeniluréias- βCD , observa-se que para os primeiros sistemas houve uma maior variação desse parâmetro. Tal diferença é condizente com os maiores valores de constante de equilíbrio encontrados para os sistemas βCD /avermectinas, devido à maior hidrofobicidade dos compostos em relação às benzoilfeniluréias.

EXEMPLO 5: Análise de solubilização dos compostos de inclusão

[118] A solubilidade de uma substância corresponde à quantidade máxima que esse composto pode ser dissolvida em um volume fixo de solvente, a uma dada temperatura. Ela constitui um importante parâmetro para avaliar a disponibilidade de um determinado composto no meio líquido.

[119] A curva de solubilização relaciona a quantidade de composto dissolvido em função do tempo (RIPMEESTER et al,1991). No caso dos complexos de inclusão tais curvas podem ser úteis para se avaliar o perfil de liberação dos inseticidas no ambiente. No presente trabalho, a solubilização dos compostos foi monitorada por medida da absorbância em função do tempo,

durante o intervalo de 24 h. Para isso, uma quantidade de 1 mg de cada inseticida livre e a correspondente proporção molar do respectivo composto de inclusão foi pesada e inserida em uma cubeta de quartzo, de caminho óptico de 1 cm, e preenchida com 2 mL de água destilada/deionizada. A cubeta foi colocada em um espectrofotômetro de varredura automática e a absorvância de cada inseticida foi medida em função do tempo, em intervalos de 25 minutos. Os valores de absorvância foram convertidos em concentração (quando possível) e plotados em função do tempo.

[120] Na figura 20 estão apresentadas as curvas de solubilização de ABA, IVER, EPRI e DIF e seus respectivos complexos de inclusão com β CD, onde a concentração é plotada em função do tempo a 30 °C. O Novaluron não apresentou leitura no espectrofotômetro.

[121] Conforme observado na figura 20, para todos os sistemas, as curvas de solubilização dos inseticidas na presença de β CD encontram-se acima das curvas dos compostos livres, mostrando que a solubilidade é maior na presença da ciclodextrina.

[122] No caso da ABA/ β CD, a curva de solubilização apresenta comportamento próximo do linear, mostrando que na presença de β CD o inseticida alcança o equilíbrio em poucas horas. No sistema EPRI/ β CD, o composto livre nunca atinge o equilíbrio de dissolução, já que a curva não atinge um patamar constante. Já o composto de inclusão mostra um transiente inicial até próximo de 5 h, quando tendem para o equilíbrio de dissolução. Todavia, após 20h de contato com o líquido, o complexo mostra um ligeiro aumento na solubilização, provavelmente por algum mecanismo alternativo de dissolução. Para o sistema IVER/ β CD, tanto o composto livre quanto o composto de inclusão não alcançam o equilíbrio de dissolução, já que as curvas não apresentam patamares de concentração constante. Aparentemente, o efeito da ciclodextrina neste caso é apenas de aumentar a solubilidade do inseticida. Finalmente, no sistema DIF/ β CD o efeito da ciclodextrina é de

augmentar a taxa de dissolução do composto, uma vez que as curvas convergem a um intervalo de 24 h, mostrando que após este intervalo, ambos os sistemas alcançam o equilíbrio.

EXEMPLO 6: Avaliação da estabilidade coloidal dos nanoprecipitados hidrofóbicos: Medidas de potencial zeta (ZP).

[123] A intensidade do potencial zeta de uma nanopartícula está relacionado com sua estabilidade coloidal, visto que a repulsão eletrostática ajuda a evitar coagulação das nanopartículas. É relatado no estado da técnica que valores de potencial zeta superiores a $|30|$ mV indicam estabilidade coloidal (FERNANDEZ-NIEVES; NIEVES 1999).

[124] Nesse contexto, considerando que os inseticidas descritos no presente trabalho, mesmo na presença de β CD, apresentam solubilidade relativamente baixa, uma estratégia de uso consiste em se trabalhar com suspensões aquosas formadas por nanoprecipitados hidrofóbicos. Tais precipitados se formam quando um determinado composto é dissolvido inicialmente em um solvente menos polar que a água, mas solúvel em água. Exemplos desses tipos de solvente são o DMSO ou DMF.

[125] Quando essa solução é adicionada em água sob agitação, em baixas concentrações, formam-se imediatamente os nanoprecipitados hidrofóbicos. A estabilidade desses nanoprecipitados dependerá da composição na superfície, bem como do tamanho de partícula.

[126] Na figura 21 estão apresentados os gráficos de potencial zeta em função da concentração crescente dos inseticidas ABA, EPRI, IVER, DIF e NOV e seus respectivos compostos de inclusão com β CD.

[127] Com relação aos dados de PZ, observa-se para todos os sistemas, que tanto o composto livre quanto o composto de inclusão apresentaram

valores de PZ na faixa negativa, porém, abaixo de -30 mV. Isso significa que os compostos, em ampla faixa de concentração, apresentam tendência de precipitação, mesmo na presença de β CD. Esse dado é compatível com o fato de que as espécies apresentam caráter hidrofóbico, podendo se acumular em superfícies sólidas após a aspersão, sendo fundamental para se garantir aos compostos, ação residual.

EXEMPLO 7: Determinação do tamanho de partícula dos nanoprecipitados hidrofóbicos: Medidas por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

[128] O diâmetro hidrodinâmico é um dos principais parâmetros físico-químicos utilizados para caracterizar espécies nanométricas em suspensão. No presente exemplo, os tamanhos de partícula foram medidos com o objetivo de descrever os nanoprecipitados hidrofóbicos formados através do método aqui apresentado, bem como o efeito da β CD nessas nanoestruturas.

[129] Para isso, foram preparadas soluções dos inseticidas puros e dos seus respectivos compostos de inclusão em DMSO a 5 mM. Essas soluções foram tituladas manualmente em 1 mL água pura, com incrementos de volume de 5 μ L. Após cada adição, o tamanho de partícula foi medido por espalhamento de luz dinâmico a um ângulo de espalhamento de 90°, utilizando um laser He-Ne a 600 nm. Para os experimentos, foram utilizadas cubetas de polietileno de 1 cm de caminho óptico. Os valores de tamanho de partícula foram plotados em função da concentração do inseticida e apresentado nos gráficos da figura 22.

[130] A figura 22 mostra que é possível obter nanoprecipitados hidrofóbicos tanto para as espécies livres quanto para os compostos de inclusão. Todavia, na presença de β CD, existe a vantagem de que é possível obter partículas de menor tamanho, que por sua vez, reflete no aumento da área superficial da partícula e maior exposição de átomos na superfície, possibilitando uma maior diversidade de interações e adesão a estruturas

biológicas ou superfícies sólidas. Isto se dá pelo fato de que os nanoprecipitados formados por na presença de β CD apresentam maior capacidade de interagirem com a água do que os compostos puros, devido à presença das hidroxilas das ciclodextrinas. Essa maior afinidade com o solvente contribui para uma menor tendência de coalescência, agregação e crescimento de partícula.

[131] No caso específico do diflubenzuron (figura 22D), observa-se que os valores de diâmetro hidrodinâmico (D_h / nm) foram superiores ao composto puro. Esta discrepância pode ser atribuída à ausência do grupo 1,1,2-trifluoro-2-trifluoro-metóxi-etóxi na molécula de DIF, que deve gerar um novo modo de interação hóspede-hospedeiro, produzindo alterações coloidais nos nanoprecipitados hidrofóbicos. No entanto, para a curva de titulação do DIF livre observa-se uma grande polidispersidade, já que os desvios padrões dos valores de tamanho de partícula são muito grandes, o que sugere uma instabilidade coloidal do sistema. No composto de inclusão, a presença de β CD confere uma maior homogeneidade de tamanho às partículas, já que os desvios padrões são menores. Este fenômeno foi também atribuído à maior capacidade das nanopartículas interagirem com o solvente, devido à presença da β CD.

[132] Para todos os nanoprecipitados, observou-se aumento do tamanho de partícula com o aumento da concentração. Isso acontece em virtude da redução gradativa da solubilidade dos compostos com o aumento da concentração.

EXEMPLO 8: Atividade larvicida no estágio L1, L4 24 h e L4 48h.

[133] A alimentação dos insetos nos estádios larvais é intensa, rápida e indiscriminada, através do consumo de partículas de matéria orgânica

presentes na água. Nesse contexto, o fato dos nanoprecipitados estarem sujeitos à floculação (Exemplo 6) e a vantagem de que a ciclodextrina promove redução de tamanho dessas nanoestruturas (Exemplo 7), associado ao fato de que a presença da ciclodextrina (açúcares) representa uma forma de atrair as larvas; os nanoprecipitados hidrofóbicos contendo ciclodextrina passam a servir de “isca” destinada a atrair larvas e aumentar a efetividade no controle do mosquito *Aedes aegypti*. Essa possibilidade foi avaliada através de avaliação de atividade larvicida.

[134] Para isso, ovos de *Aedes aegypti* foram colocados para eclodir em bacias plásticas com dimensões de 30 x 20 x 7 cm, contendo 2 L de água declorada, em ambiente climatizado. Após 24 h foram obtidas as larvas de 1º estágio (L1) que foram transferidas para outra bacia, onde se adicionou 2 L de água declorada e aproximadamente 118 mg de alimento (ração de peixe). A partir daí, a água foi trocada diariamente fazendo reposição do alimento até os indivíduos atingirem o estágio de desenvolvimento necessário para cada teste descrito a seguir.

[135] O teste no estágio L1, desenvolvido por Pridgeon e colaboradores, consiste em um teste de triagem que fornece de forma rápida, com redução de trabalho e utilização de pequeno número de larvas por experimento, informações acerca do potencial tóxico dos compostos em análise (PRIDGEON et al., 2009).

[136] Já o ensaio no estágio L4 é um teste preconizado pela OMS para verificar de forma padronizada a atividade larvicida de compostos com ação rápida (neurotóxicos) para os insetos tanto em laboratório, quanto em campo, uma vez que a partir deste teste pode-se observar a ação aguda dos compostos (WHO, 2005).

[137] A atividade larvicida de um composto é avaliada pela determinação da sua dose letal para matar 50% de indivíduos em determinado intervalo de

tempo (DL_{50}), servindo para se determinar a concentração ideal de inseticida a ser utilizada para o combate a determinada espécie de inseto.

[138] Para todos os nanoprecipitados na forma livre e complexada com β CD, observou-se que os valores de DL_{50} foram menores que 1 ppm (figura 23) o que demonstra a alta atividade desses compostos contra larvas de *Aedes aegypti*. Outros detalhes específicos do comportamento das larvas frente a cada inseticida são apresentados abaixo.

a) Abamectina

[139] Os resultados das DL_{50} para o estágio L1 foram inferiores aqueles encontradas no experimento envolvendo o estágio L4 a 24 h, o que demonstra a fragilidade deste estágio larval aos compostos testados e uma maior efetividade dos compostos neste estágio. Em relação ao nanoprecipitado ABA/ β CD este demonstrou ser mais potente que o nanoprecipitado ABA livre em todos os estágios larvais, especialmente no estágio L1.

b) Eprinomectina

[140] Diferente da ABA pura, os resultados das DL_{50} para o nanoprecipitado EPRI puro no estágio L1 foram próximos daqueles encontrados para o estágio L4 24h, porém superiores ao encontrado para o estágio L4 48h, mostrando que este composto tem preferência por estágio avançado da larva e que necessita de um tempo superior para início da atividade.

[141] O nanoprecipitado do composto de inclusão EPRI/ β CD seguiu a mesma tendência, apresentando maior valor de DL_{50} no estágio L1, com gradativa redução nos estágios L4 24 e L4 48h. Porém, conforme observado na figura 23, os valores de DL_{50} para o nanoprecipitado do composto de inclusão foram menores do que para o composto livre em todos os estágios, confirmando sua vantagem de se incorporar ciclodextrina. Como no nanoprecipitado EPRI/ β CD possui menor tamanho de partícula, é de se

esperar que as lavas possam se alimentar deste composto mais facilmente do que no caso da EPRI livre.

c) Ivermectina

[141] Conforme figura 23, a IVER e IVER/ β CD foi mais ativa no estágio L1 se comparado aos outros dois estádios. Além disso, a atividade desse composto foi maior quando comparado com a ABA, ABA/ β CE, EPRI e EPRI/ β CD (mesma ordem de grandeza), o que deve estar relacionado a alta toxicidade da IVER em relação as outras avermectinas (CAMPBELL AND BENZ, 1984).

[142] No caso de seu composto de inclusão, observou-se que a presença de β CD não produz um aumento na eficácia do inseticida, já que observou-se um aumento no valor de DL₅₀ em todos os estádios. Esse comportamento pode ser entendido em termos do tamanho dos nanoprecipitados. De todos os sistemas apresentados, a IVER/ β CD foi o composto de inclusão que apresentou maior tamanho de partícula em relação ao inseticida livre. Este aumento de tamanho de partícula pode ter dificultado a alimentação por parte dos insetos, levando assim a um aumento da DL₅₀. No entanto, continua válida a estratégia de se utilizar este nanoprecipitado, visto que representa uma alternativa para a rotatividade de inseticida.

d) Diflubenzuron e Novaluron

[143] NOV, DIF e seus compostos de inclusão não foram avaliados no estágio L1, por se tratar de um teste de triagem, que não exclui a realização dos ensaios L3 ou L4, como também pelo fato dos compostos livres já serem utilizados comercialmente no combate de larvas do mosquito.

[144] Para ambas as benzoilfenilureias, os ensaios foram realizados para verificar se havia alguma modificação da reposta do nanoprecipitado do composto de inclusão em relação ao do composto livre.

[145] Para o diflubenzuron, as linhas de tendência apresentadas nos gráficos da figura 24 demonstraram que, tanto o composto livre quanto o composto de inclusão apresentam o mesmo perfil, não apresentando diferença significativa nesse teste.

[146] Já no novaluron (figura 25), seus nanoprecipitados de compostos de inclusão apresentaram maior mortalidade a uma concentração a partir de 1 μ M, tanto em ambos os estádios L4 24 h e L4 48h, mostrando a vantagem da tecnologia.

EXEMPLO 10: Atividade larvicida na Inibição de emergência

[147] Compostos cujo mecanismo de ação estão relacionados com alterações no processo de crescimento e desenvolvimento dos insetos, como as benzoilfeniluréis, necessitam de um acompanhamento do desenvolvimento do inseto para verificar sua ação, uma vez que sua ação não é imediata. Por esta razão, o OMS preconizou a realização do teste de inibição de emergência para compostos em que o mecanismo de ação seja a regulação do crescimento de insetos (IGR).

[148] As avermectinas e seus compostos de inclusão não foram avaliados no teste de inibição de emergência devido ao mecanismo de ação das mesma que encontra-se mais próximo dos compostos neurotóxicos. Assim, apenas as benzoilfenilureias foram submetidas a esse teste.

[149] Os controles negativos utilizados foram água dechlorada, solução aquosa de DMSO 1% e solução aquosa de β CD na maior concentração utilizada nos testes. Em nenhum caso ocorreu menos de 80% de emergência

de adultos no controle. Assim como no experimento L4, quando a taxa de emergência nos controles ficou entre 80% e 95% os dados foram corrigidos de acordo com a fórmula de Abbott. Para a água as taxas de emergência ficaram por volta de 95% e para o DMSO 1% na faixa de 90%.

Diflubenzuron e Novaluron

[150] A partir dos dados do gráfico de acompanhamento (figura 26) observa-se que para o diflubenzuron, nas concentrações utilizadas, não ocorre a morte dos indivíduos nas primeiras 24 horas do experimento. Isso comprova que o mecanismo de ação não está relacionado a um efeito agudo, típico de compostos neurotóxicos. Além disso, durante a mudança de fase na ecdise de L3-L4, tanto para o composto puro quanto para o composto de inclusão, observamos uma significativa mortalidade principalmente nas concentrações de 10 nM, o que confirma que o mecanismo de ação de compostos é regulação de crescimento. Não houve diferença na mortalidade na concentração de 0,01 nM.

[151] Uma alta mortalidade nessas concentrações também sugere que a mortalidade é dose dependente. Nessas concentrações, os indivíduos que não morrem apresentam grande atraso de desenvolvimento em relação aos indivíduos expostos à menores concentrações dos compostos.

[152] Todavia, observa-se nitidamente que para os nanoprecipitados do composto de inclusão DIF/ β CD, os valores de mortalidade são superiores logo no terceiro dia. Outro dado importante é que os valores são mais homogêneos, apresentando valores de desvio padrão menores do que para o DIF puro. Este dado mostra que, embora o DIF/ β CD não tenha mostrado uma melhora na ação inseticida nos estádios L1, L4 24h e L4 48h frente ao DIF puro (teste agudo), no modelo de inibição de emergência (teste crônico) observa-se

nitidamente uma melhora na atividade, demonstrando assim a vantagem frente ao composto puro.

[153] Para o novaluron, observa-se pequena diferença de atividade do composto de inclusão frente o composto puro na concentração de 0,01 nM, já que os pontos do gráfico estão acima dos pontos para o composto puro. Na concentração de 10 nM o composto puro inicia o processo de mortalidade após 24 h. Conforme observado, a presença de β CD leva a um atraso no início do processo de mortalidade, que se inicia somente após o segundo dia, mostrando que o composto de inclusão não é tão eficiente na inibição de emergência, se comparado ao composto puro.

[154] Porém, na figura 27 estão apresentados os valores de dose capaz de inibir a emergência de 50% da população dos insetos (%IE₅₀) para os nanoprecipitados de NOV, DIF e seus compostos de inclusão. Os valores de %IE₅₀ para todos os compostos os compostos de inclusão foram mais potentes que as moléculas livres. Isso demonstra que a estratégia de preparar nanoprecipitados de composto de inclusão levou ao aumento da toxicidade contra larvas do *Aedes aegypti*.

EXEMPLO 11: Análise de citotoxicidade (Ensaio colorimétrico de MTT – viabilidade celular)

[155] A avaliação da citotoxicidade in vitro é fundamental na etapa inicial de desenvolvimento de novas composições fornecendo informações acerca da segurança das mesmas. Geralmente, são utilizados testes que verificam a viabilidade celular após a exposição a substância em estudo, sendo o ensaio MTT ([brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil)-2H-tetrazólio]) um dos testes colorimétricos mais empregados devido ao baixo custo e rapidez no processamento das amostras (DE ARAÚJO et al., 2008).

[156] O teste com MTT avalia a função mitocondrial da célula através da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, sendo que as células que respiram ativamente reduzem o MTT a formazan, um cristal púrpura insolúvel, que após solubilizado, permite determinar a concentração através da leitura da densidade óptica. Assim, o ensaio mede a respiração celular que é proporcional a quantidade de formazan produzida e ao número de células viáveis. Quanto menor a atividade mitocondrial, menor a viabilidade celular e maior a toxicidade do composto. A partir desses dados é possível determinar a concentração do composto capaz de reduzir em 50% as células viáveis, ou seja, o índice de citotoxicidade 50% (IC₅₀) (DE ARAÚJO et al., 2008; MOSMANN, 1983).

a) Abamectina

[157] Os resultados de IC₅₀ apresentados na figura 28 indicam que a ABA apresenta efeito citotóxico sobre fibroblastos WI26VA4, nas condições experimentais. Isso pode estar relacionado ao mecanismo de ação desse composto, o qual envolve canais de cloreto que, por existirem em células de vertebrados, podem estar sendo atingidos causando algum prejuízo aos fibroblastos. Além disso, já foram relatados no estado da técnica que a citotoxicidade desse composto em outras linhagens celulares (AL-SARAR et al., 2015; LI et al., 2013; MAIOLI et al., 2013). O composto de inclusão não apresentou diferença significativa na toxicidade.

b) Eprinomectina

[158] Os resultados de IC₅₀, apresentados na figura 28 indicam que a EPRI e EPRI/βCD apresentam efeito citotóxico sobre fibroblastos WI26VA4, nas condições experimentais. Para o complexo EPRI/βCD, o valor de IC₅₀ foi significativamente maior que o de seu precursor, demonstrando que a

complexação com β CD reduz a citotoxicidade do composto frente a fibroblastos WI26VA4, demonstrando ser vantajoso sob o ponto de vista da toxicidade da formulação.

c) Ivermectina

[159] Os resultados de IC_{50} apresentados na figura 28 indicam que IVER e IVER/ β CD apresentam efeitos citotóxicos similares sobre fibroblastos WI26VA4, nas condições experimentais, não havendo diferença significativa.

d) Diflubenzuron e novaluron

[160] As benzoilfeniluréias, NOV e DIF, apresentaram uma baixa toxicidade (tabela 23), acima da concentração máxima utilizada no experimento. NOV e DIF, por serem mais seletivos, atuando sobre a síntese de quitina, mecanismo esse que não existe nos vertebrados, mostraram uma reduzida toxicidade sobre os fibroblastos WI26VA4. DIF/ β CD apresenta um IC_{50} superior a 100 μ M, o que sugere a baixa toxicidade dessa classe de compostos para células humanas, mesmo o composto de inclusão DIF/ β CD tendo apresentado um aumento da toxicidade em relação ao seu precursor. NOV/ β CD, assim como seu precursor, apresentou um IC_{50} superior a 100 μ M, o que sugere a baixa toxicidade dessa classe de compostos para células humanas.

[161] No geral, os nanoprecipitados de avermectinas com ciclodextrinas tem efeito nulo (no caso da ABA e IVER) ou positivo (no caso da EPRI) no abaixamento da toxicidade do inseticida. Assim, os valores de IC_{50} entre 9 a 16 μ M a partir do qual os compostos começam a exercer efeitos citotóxicos contra células de fibroblastos são significativamente maiores que os valores de DL_{50} (< 0,7 μ M) para a atividade larvicida. Isso mostra que os compostos podem ser utilizados como agentes larvicidas desde que sejam seguidas as

recomendações já preconizadas para o uso seguro dos compostos da classe das avermectinas [ANVISA, 2016].

[162] No caso do novaluron, a complexação com β CD não gerou nenhum efeito significativo na toxicidade do composto. Apenas para o diflubenzuron, houve um aumento da toxicidade em três vezes aproximadamente, em relação o composto puro. De qualquer forma, as quantidades utilizadas dos inseticidas para que tenham atividade larvicida são menores que a concentração tóxica do composto, de modo a não comprometer a segurança no uso dos compostos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[163] **Figura 01:** Espectro de infravermelho da abamectina (ABA), β -ciclodextrina (β CD), mistura mecânica de (MM) e composto de inclusão (ABA/ β CD) na região 4000 a 400 em KBr.

[164] **Figura 02:** Espectro de infravermelho da eprinomectina (EPRI), β -ciclodextrina (β CD), mistura mecânica de (MM) e composto de inclusão (EPRI/ β CD) na região 4000 a 400 em KBr.

[165] **Figura 03:** Espectro de infravermelho da ivermectina (IVER), β -ciclodextrina (β CD), mistura mecânica de (MM) e complexo de inclusão (IVER/ β CD) na região 4000 a 400 em KBr.

[166] **Figura 04:** Espectro de infravermelho do DIF, β CD, MM e DIF/ β CD na região 4000 a 400 em KBr.

[167] **Figura 05:** Espectro de infravermelho do NOV, β CD, MM e NOV/ β CD na região 4000 a 400 em KBr.

[168] **Figura 06:** Curvas de TGA (A); DTG (B) e DTA (C) da β CD, ABA, MM e ABA/ β CD. Experimentos realizados em cadinho de alumina, atmosfera inerte (N_2) a 50 mL/min e a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

[169] **Figura 07:** Curvas de TGA (A) e DTA (B) da β CD, EPRI, MM e EPRI/ β CD, em N_2 . Experimentos realizados em cadinho de alumina, atmosfera inerte (N_2) a 50 mL/min e a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

[170] **Figura 08:** Curvas de TG (A) e DTA (B) da β CD, IVER, MM e IVER/ β CD. Experimentos realizados em cadinho de alumina, atmosfera inerte (N_2) a 50 mL/min e a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

[171] **Figura 09:** Curvas de TG (A) e DTA (B) da β CD, DIF, MM e DIF/ β CD. Experimentos realizados em cadinho de alumina, atmosfera inerte (N_2) a 50 mL/min e a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

[172] **Figura 10:** Curvas de TG (A) e e DTA (B) da β CD, NOV, MM e NOV/ β CD. Experimentos realizados em cadinho de alumina, atmosfera inerte (N_2) a 50 mL/min e a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

[172] **Figura 11:** Titulação calorimétrica isotérmica de solução do inseticida a 30 mM em solução de β CD 2 mM, a 25 °C (solvente DMSO:H₂O 90:10 v/v).

[173] **Figura 12:** Espectros de RMN de ¹H de β CD (A), ABA/ β CD (B) e ABA (C) em DMSO-d₆, 400 MHz.

[174] **Figura 13:** Espectros de RMN de ¹H de β CD (A), EPRI/ β CD (B) e EPRI (C) em DMSO-d₆, 400 MHz.

[175] **Figura 14:** Região selecionada do mapa de contorno ROESY de EPRI/ β CD em DMSO-d₆, 400 MHz.

[176] **Figura 15:** Espectros de RMN de ¹H de β CD (A), IVER/ β CD (B) e IVER (C) em DMSO-d₆, 400 MHz.

[177] **Figura 16:** Região selecionada do mapa de contorno ROESY de IVER/ β CD em DMSO-d₆,400 MHz.

[178] **Figura 17:** Espectros de RMN de ¹H de β CD, DIF e DIF- β -CD em DMSO-d₆,400 MHz.

[179] **Figura 18:** Região selecionada do mapa de contorno ROESY de DIF- β -CD em DMSO-d₆,400 MHz.

[180] **Figura 19:** Espectros de RMN de ¹H de β CD, NOV e NOV/ β CD em DMSO-d₆,400 MHz.

[181] **Figura 20:** Curvas de solubilização dos inseticidas e seus respectivos complexos de inclusão com β CD em água a 30°C.

[182] **Figura 21:** Valores de potencial zeta em função da concentração de inseticida e seus respectivos complexo com β CD a 25 °C.

[183] **Figura 22:** Valores de tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico – D_h / nm) em função da concentração de inseticida e seus respectivos complexo com β CD a 25 °C.

[184] **Figura 23:** Toxicidade da ABA, IVER, EPRI e seus respectivos complexos com β -CD frente a larvas de *Aedes aegypti* nos estádios L1 e L4 (os dados obtidos são médias de 9 replicatas).

[185] **Figura 24:** Gráfico de porcentagem de mortalidade das larvas de mosquito *Aedes aegypti* em seu quarto estágio de desenvolvimento em função do aumento da concentração de DIF e DIF/ β CD.

[186] **Figura 25:** Gráfico de porcentagem de mortalidade das larvas de mosquito *Aedes aegypti* em seu quarto estágio de desenvolvimento em função do aumento da concentração NOV e NOV/ β CD.

[187] **Figura 26:** Porcentagem de mortalidade dos estádios/estágios em função do tempo durante o experimento de inibição de emergência para o DIF e DIF/ β CD; e NOV e NOV/ β CD, nas concentrações de 10 nM e 0,01 nM.

[188] **Figura 27:** Porcentagem de Inibição de Emergência (%IE₅₀) para os compostos livres e de inclusão.

[189] **Figura 28:** Efeito citotóxico (IC₅₀) de ABA, ABA/ β CD, IVER, IVER/ β CD, EPRI, EPRI/ β CD, DIF, DIF/ β CD, NOV e NOV/ β CD em fibroblastos WI26VA4.

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, **caracterizada por** ser constituída por suspensão aquosa concentrada de nanoprecipitados hidrofóbicos de compostos de inclusão formados por um inseticida e ciclodextrina na proporção molar de 1:1.
2. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** ser constituída por composto de inclusão formado entre a ciclodextrina e o inseticida na proporção de 1:1.
3. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** composto de inclusão ciclodextrina/inseticida ser preparado a partir de mistura de solução aquosa de ciclodextrina a 5 mM e 500 mL, com solução etanólica de inseticida a 5 mM e 500 mL, seguida de mistura sob aquecimento por 24 h, seguida de secagem por liofilização.
4. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a inseticida ser uma avermectina.
5. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a avermectina ser a ivermectina, abamectina ou eprinomectina.

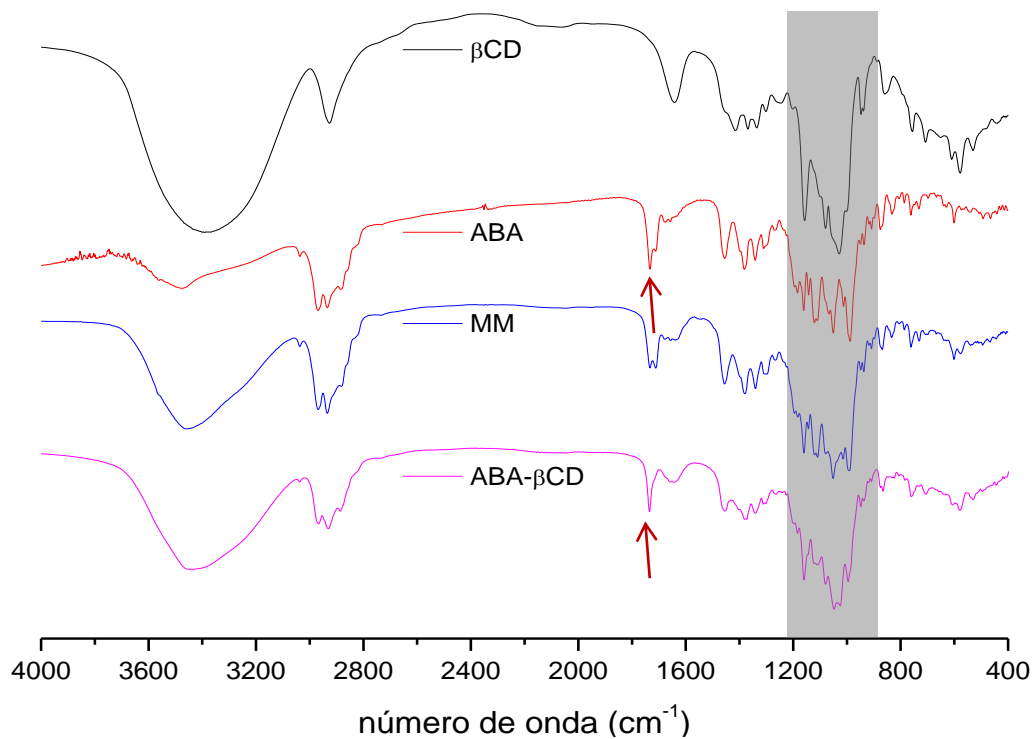
6. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** inseticida ser uma benzoilfenilureia.
7. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a benzoilfenilureia ser o novaluron ou o diflubenzuron.
8. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a ciclodextrina ser a β -ciclodextrina.
9. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato dos nanoprecipitados hidrofóbicos serem produzidos pela diluição em água a partir de solução concentrada dos compostos de inclusão em DMSO ou DMF.
10. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada por** o composto de inclusão ciclodextrina/inseticida ser preparado a partir de proporções múltiplas das descritas na reivindicação 9.
11. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada por** um método de secagem do composto de inclusão ser por aquecimento ou liofilização.

12. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada por** uma solução concentrada de DMSO apresentar uma concentração de 50 mM ou maior.
13. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizada por** uma solução de composto de inclusão em DMSO apresentar concentrações da faixa de 1 mM até 500 mM.
14. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizada por** uma suspensão concentrada que apresenta nanoprecipitados hidrofóbicos de tamanho da ordem de 100-500 nm, quando diluídas para uma concentração de até 200 μ M.
15. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizada pelo uso** dos nanoprecipitados de compostos de inclusão como dispositivos de liberação controlada dos inseticidas no meio ambiente.
16. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** nanopartículas com potencial zeta na faixa de 0 a -30 mV.
17. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com as reivindicações 1 ou 11, **caracterizada por**

nanopartículas com potencial zeta na faixa de 0 a -30 mV apresentarem ação residual, por estarem sujeitas a precipitação.

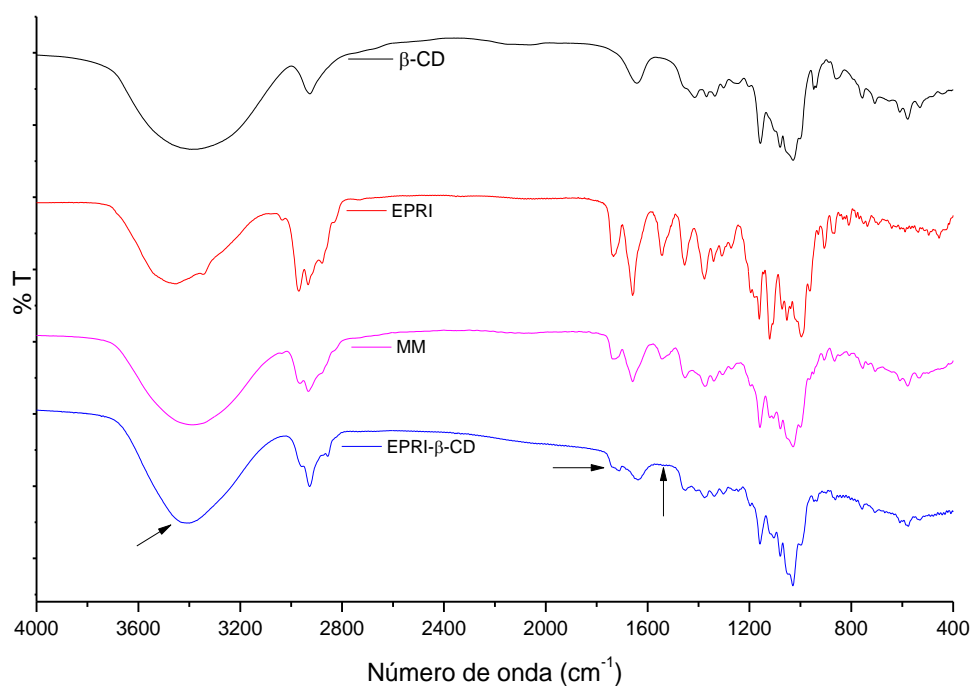
18. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizada por** os nanoprecipitados hidrofóbicos de compostos de inclusão entre benzoilfenilureias e ciclodextrinas constituírem uma formulação.
19. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizada por** os nanoprecipitados hidrofóbicos de compostos de inclusão entre avermectinas e ciclodextrinas constituírem uma formulação.
20. COMPOSIÇÕES INSETICIDAS NANOESTRUTURADAS A BASE DE AVERMECTINAS E BENZOILFENILUREIAS COM CICLODEXTRINAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizada por** conter simultaneamente, nanoprecipitados hidrofóbicos de compostos de inclusão de benzoilfenilureias e avermectinas.

Figura 01



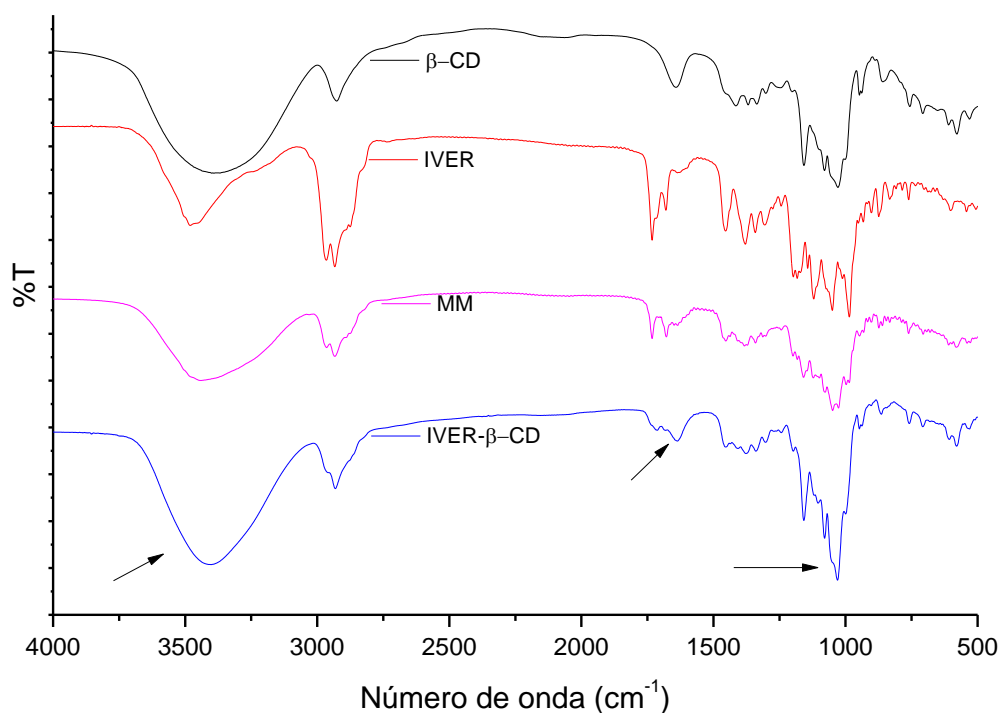
Composto	$\nu_{(\text{O-H})}$	$\nu_{(\text{C=O})}$	Vibração do anel piranose
β CD	3371	-	1158;1028
ABA	3473	1713; 1733	--
MM	3461	1712; 1734	1158
ABA- β CD	3448	1735	1160;1026

Figura 02.



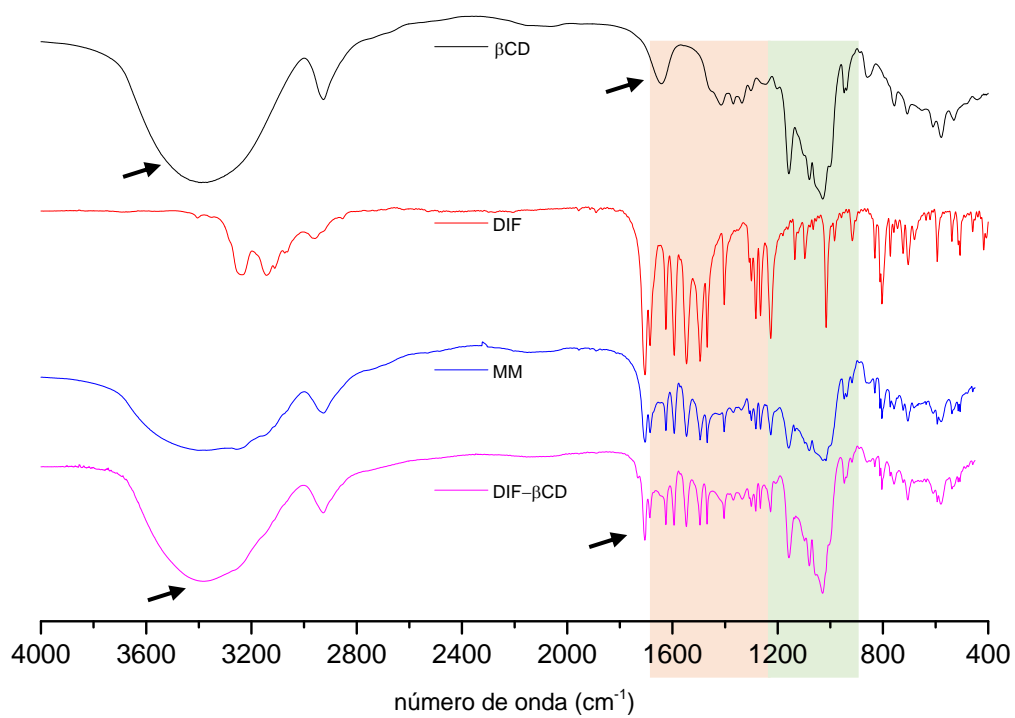
Atribuições*	Número de ondas (cm ⁻¹)			
	EPRI	β-CD	MM	EPRI-β-CD
v(O-H), acoplamento v(N-H) , v(O-H)	3457	3380	3393	3404
v(C-H), CH ₂ e CH ₃	2969;2933	2925	2965; 2932	2961, 2931
v _{ass} (C=O), carbonila do macrociclo.	1735	-	1738	1740, 1710
v(C=O), característica de amidas secundárias	1659, 1544	-	1658,1544	-
δO-H, água de hidratação	-	1647	-	1637
δ _{ass} (C-H), δ(C-OH)	1455,1377	1400-1300	1453, 1375	1453, 1375
v(C-O-C), v _{ass} (C-O-C)	1341-1072	-	1340-1078	1336-1000
C-N alifático	1272,1161	-	1271, 1159	1263, 1159
Macrociclo v(C-O-C)	1161	-	-	-
Vibração do anel piranose (acoplamento δ(O-C-H), δ(C-O-H), δ(C-C-H)		1158, 1028	1159, 1029	1159, 1029

Figura 03:



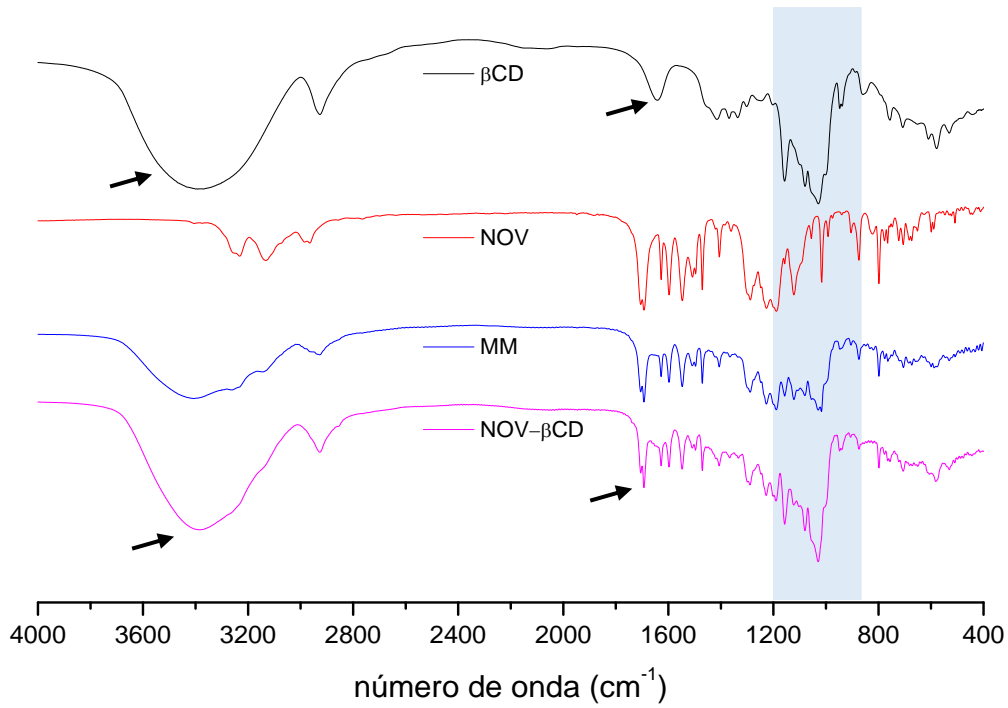
Atribuições	Número de ondas (cm ⁻¹)			
	IVER	βCD	MM	IVER/βCD
v(O-H)	3480	3380	3440	3401
v(C-H), CH ₂ e CH ₃	2965; 2933	2925	2965; 2933	2931
v _{ass} (C=O), carbonila do macrociclo.	1735	-	1735	1713
δ(OH); vC=C-C=C, sobreposição	1678, 1635	-	1678	1683
δO-H, água de hidratação	-	1647	1640	1637
δ _{ass} (C-H), δ(C-OH)	1454, 1380	1400-1300	1453, 1382	1453, 1375
v(C-O-C), v _{ass} (C-O-C)	1341-1000	-	1341-1000	1339-1000
Macrociclo v(C-O-C)	1197 e 1183	-	1198, 1183	1197, 1155
Vibração do anel piranose (acoplamento δ(O-C-H), δ(C-O-H), δ(C-C-H))	-	1158, 1028	1158, 1027	1158, 1030

Figura 04



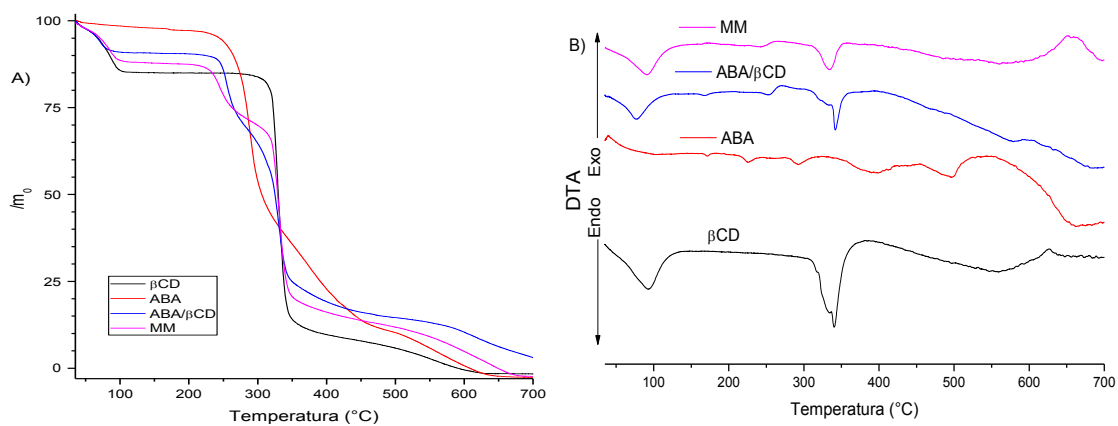
Composto	$\nu_{(\text{O-H})}$	$\nu_{(\text{N-H})}$	$\nu_{(\text{C=O})}$	Vibração do anel piranose
β CD	3371	-	-	1158;1028
DIF	-	3233; 3142	1705;1685	-
MM	3391	3256; 3156	1705;1685	1158; 1028
DIF- β CD	3379	3259	1703;1686	1157; 1031

Figura 05



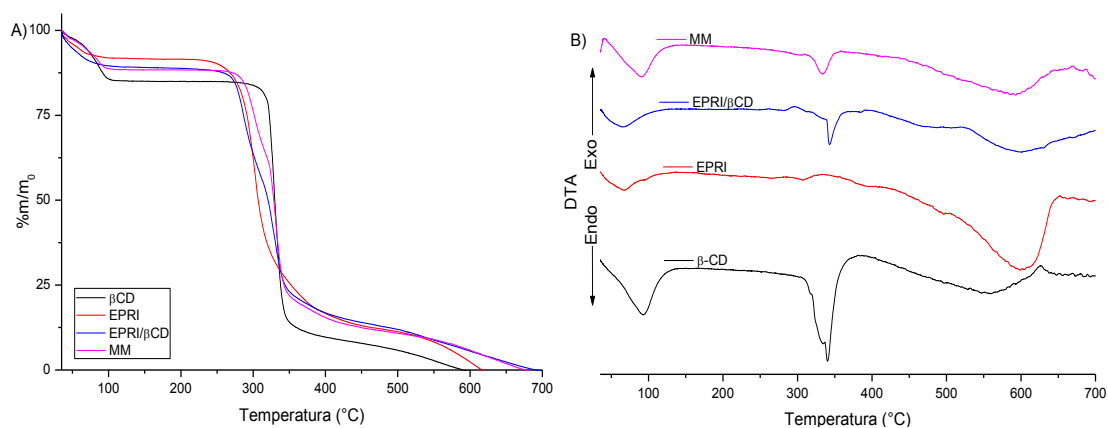
Composto	$\nu_{(\text{O-H})}$	$\nu_{(\text{N-H})}$	$\nu_{(\text{C=O})}$	Vibração do anel piranose
βCD	3371	-	-	1158;1028
NOV	-	3234; 3126	1706; 1692	--
MM	3408	3234; 3126	1705; 1693	1157; 1029
NOV- βCD	3386	3234; 3143	1706; 1693	1157;1030

Figura 06



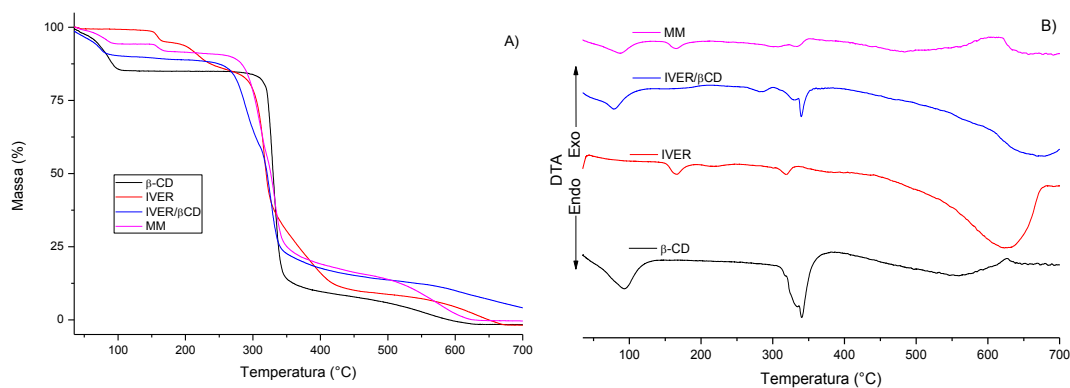
Composto	TG					DTA			
	Eventos			Δm (%)	Atribuição	Eventos			Atribuição
	T_i	T_f	$T_{máx}$			T_i	T_f	$T_{máx}$	
β CD	30	106,4	87,1	14,9	Desidratação	30	140,6	92,6	Desidratação (Endotérmico).
	279	351,3	331,6	72,7	Decomposição.	278	382	340,7	Fusão seguida de decomposição (Endot.)
	351,3	591,1		12,4		384,7	627,2	555,2	
ABA	228,87	603,74	288,73	100	Decomposição	-	-	-	Decomposição (Endot.)
MM	30	102,26	86,27	11,78	Desidratação	30	137,10	91,68	Desidratação (Endot.)
	213,49	344,80	243,17	66,55	Estágios múltiplos de decomposição	290,01	351,57	334,23	Decomposição (Endot.)
	344,80	649,97	332,16	21,67		351,57	658,71	562,58	
ABA/ β CD	30	89,07	71,65	8,69	Desidratação	30	122,79	77,15	Desidratação (Endot.)
	229,65	343,02	254,30	64,67	Estágios múltiplos de decomposição	300,41	369,88	342,79	Decomposição (endotérmico)
	343,02	700	330,58	23,67		407,38	700		

Figura 07



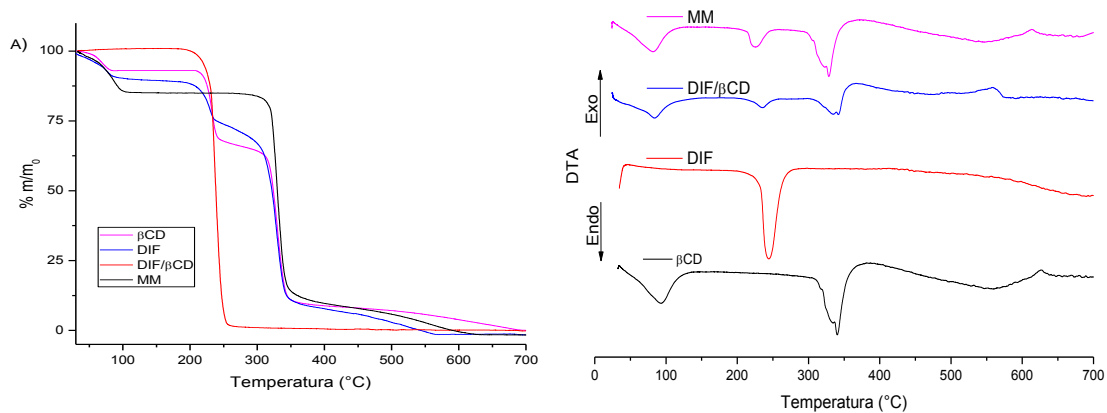
Composto	TG					DTA			
	Eventos			%Δm	Atribuição	Eventos			Atribuição
	T _i	T _f	T _{máx}			T _i	T _f	T _{máx}	
βCD	30	110	87,1	14,8	Desidratação	30	135	93	Desidratação (Endot.)
	262	350	331	72,7	Decomposição.	252	382	340	Fusão/decomposição.
	350	640	460	12,5		384	640	555	
EPRI	30	95	68	8,1	Desidratação	30	136	67,5	Desidratação (endotérmico).
	227	341	301	63,1	Estágios múltiplos de decomposição.	145	333	307	Fusão seguida de decomposição (Endot).
	341	400	367	12,0		333	656	599	
MM	30	106	71,3	11,7	Desidratação da βCD	30	141	89	Desidratação (Endot).
	270	323	305	16,0	Decomposição da EPRI e da βCD.	145	310	302	Fusão/decomposição EPRI (Endotérmico).
	325	353	330	52	Decomposição da mistura mecânica.	310	359	334	Fusão e decomposição da βCD na MM (Endot.).
	353	669	502	20,3		359	671	590	
EPRI/βCD	30	95,5	61	10,6	Desidratação da βCD	30	125	65	Desidratação (Endot.)
	252	315	291	33,9	Decomposição do complexo.	229	261	246,5	Decomposição (endotérmico)
	315	350	334	32,6		261	295	280	

Figura 08



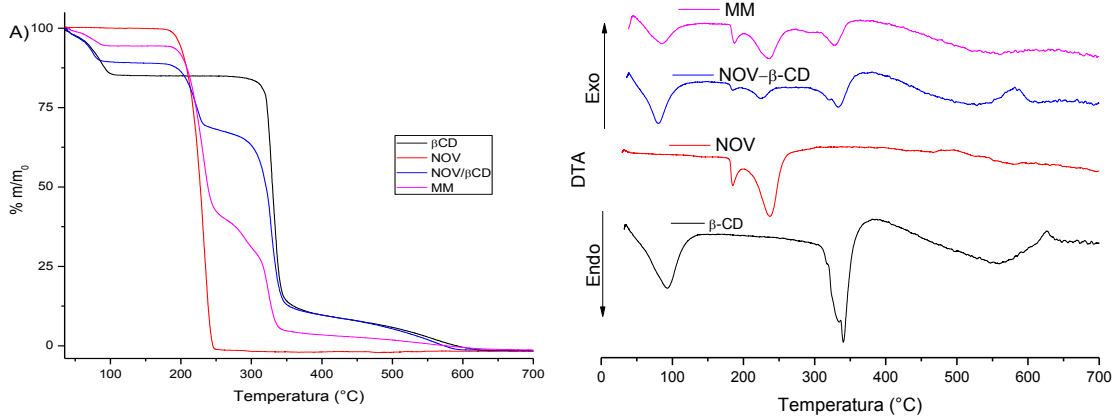
Composto	TG					DTA			
	Eventos			%Δm	Atribuição	Eventos			Atribuição
	T _i	T _f	T _{máx}			T _i	T _f	T _{máx}	
βCD	30	110	87,1	14,8	Desidratação	30	135	93	Desidratação (Endot.)
	262	350	331	72,7	Decomposição.	252	382	340	Fusão e decomposição sucessiva (Endot.).
	350	640	460	12,5		384	640	555	
IVER	145	168	157	5,2	Dessorção de DMF e etanol residuais	140	189	164	Volatilização de solventes e fusão da IVER (endotérmico).
	193	280	220	10,6	Estágios múltiplos de decomposição.	192	250	219	Decomposição da IVER em etapas sucessivas (Endotérmico).
	280	330	316	48,3		250	335	319	
	330	427	370	24,5		335	683	625	
MM	30	93	82	6,0	Desidratação	30	128	87	Desidratação (Endot.)
	153	173	160	2,5	Volatilização de solventes residuais	140	198	165	Volatilização de solventes e fusão da IVER (Endot.).
	247	320	311	35	Decomposição da mistura mecânica.	224	322	304	Decomposição da IVER e βCD em etapas sucessivas (Endot.).
	320	449	332	40,2		322	351	332	
	449	635	574	16,3		355	608	487	
IVER/βCD	30	93	73	9,5	Desidratação	30	129	78	Desidratação (Endot.).
	232	310	289	29,1	Decomposição sucessiva	221	300	284	Decomposição do complexo (Endot.).
	310	352	327	37,2		300	389	339	
	352	698	433	18,8		382	700	668	

Figura 09



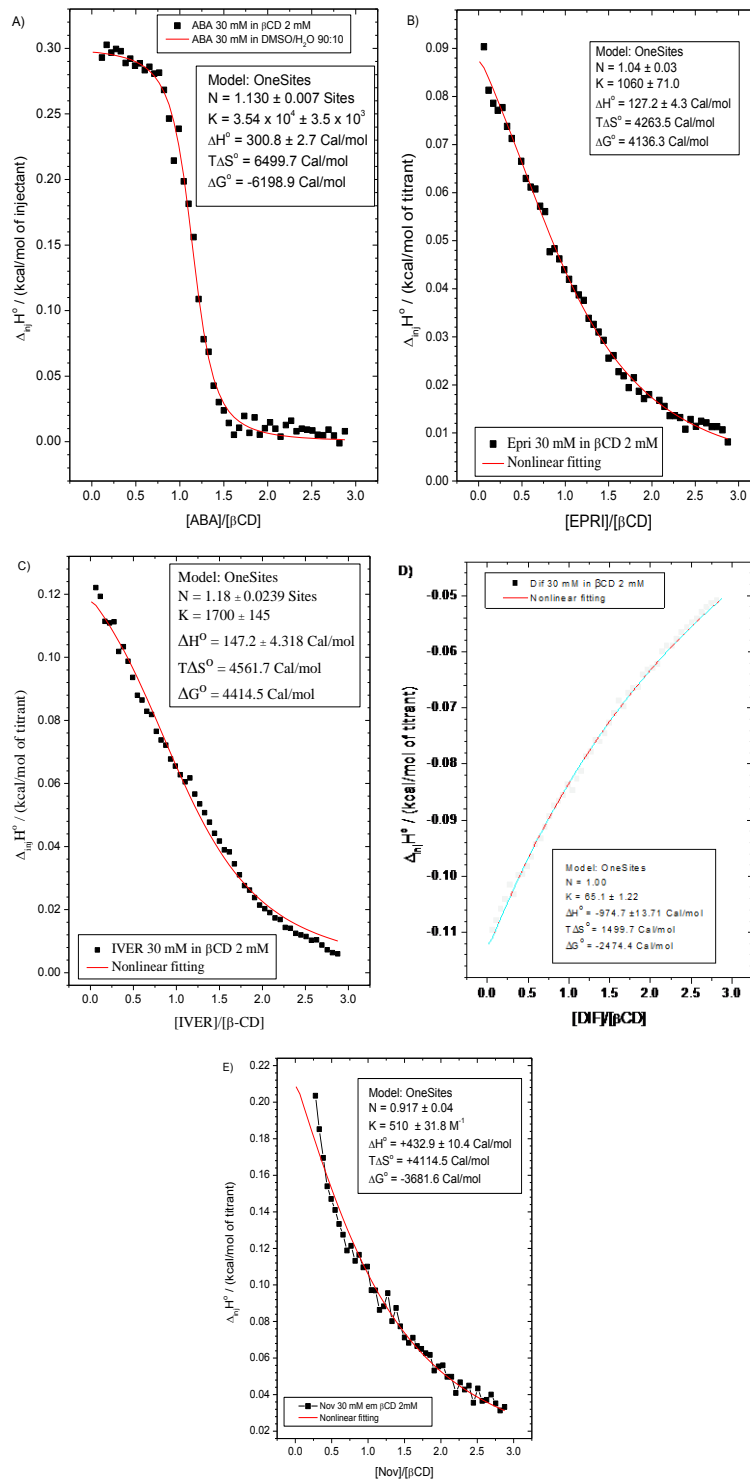
Composto	TG					DTA			
	Eventos			%Δm	Atribuição	Eventos			Atribuição
	T _i	T _f	T _{máx}			T _i	T _f	T _{máx}	
βCD	30	106,4	87,1	14,9	Desidratação	30	140,6	92,6	Processo endotérmico de desidratação.
	279	351,3	331,6	72,7	Decomposição.	278	382	340,7	Decomposição e fusão com pico característico da βCD (endotérmico).
	351,3	591,1		12,4		384,7	627,2	555,2	
DIF	183,2	269,9	237,6	100	Decomposição.	185,1	299	240,6	Processos endotérmicos de decomposição
MM	30	82,0	76,5	6,73	Desidratação	30	117,5	82,3	Processo endotérmico de desidratação.
	210,6	245,1	234,7	25,7	Decomposição da mistura mecânica.	209,4	251,1	224	Processos endotérmicos de decomposição
	245,1	361,8	331,7	58,1		294,4	363	327,8	
	361,2	697,7		9,4					
DIF/βCD	30	94,4	77,3	10	Desidratação	30	158,4	82	Processo endotérmico de desidratação.
	181,5	234	229,9	13,9	Estágios múltiplos de decomposição do complexo.	187	263,8	233,5	Processos endotérmicos de decomposição
	234	361,8	329,3	66,7		293	366,3	332	
	361,8	546,8		9,4					

Figura 10



Composto	TG					DTA			
	Eventos			% Δ m	Atribuição	Eventos			Atribuição
	T _i	T _f	T _{máx}			T _i	T _f	T _{máx}	
β CD	30	106,4	87,1	14,9	Desidratação	30	140,6	92,6	Desidratação (Endotérmico).
	279	351,3	331,6	72,7	Decomposição.	278	382	340,7	Fusão e decomposição (Endotérmico).
	351,3	591,1		12,4		384,7	627,2	555,2	
NOV	170,7	245,3	233,7	100	Decomposição.	171,8	199,7	183,7	Fusão (Endotérmico).
						199,7	291,8	237,3	Decomposição (Endot.).
MM	30	95,9	81,7	5,6	Desidratação	30	130,4	86,5	Desidratação (Endotérmico).
	187,7	256,4	231,3	53,2	Decomposição da mistura mecânica.	178,2	199,2	186,1	Decomposição do NOV (Endotérmico).
	256,4	318,1	289,9	15,6		199,2	269,8	236,7	Decomposição do NOV (Endot.).
	318,1	349,2	322,9	20,7		269,8	367,2	328,5	Decomposição sucessiva da β CD (Endotérmico).
	349,2	576,3		4,9		367,2		557,4	
	-	-	-	-		608	700	673	
NOV/ β CD	30	86,68	75,5	11	Desidratação	30	128,5	79,9	Processo endotérmico de desidratação
	177	232	222,8	19,4	Estágios múltiplos de decomposição do complexo.	175,5	200,3	185,5	Múltiplos processos de decomposição da β CD e NOV (Endotérmico)
	278,2	357,6	323,7	57,3		200,3	251,9	224	
	357,6	573,3		12,3		293,9	374	333,5	

Figura 11



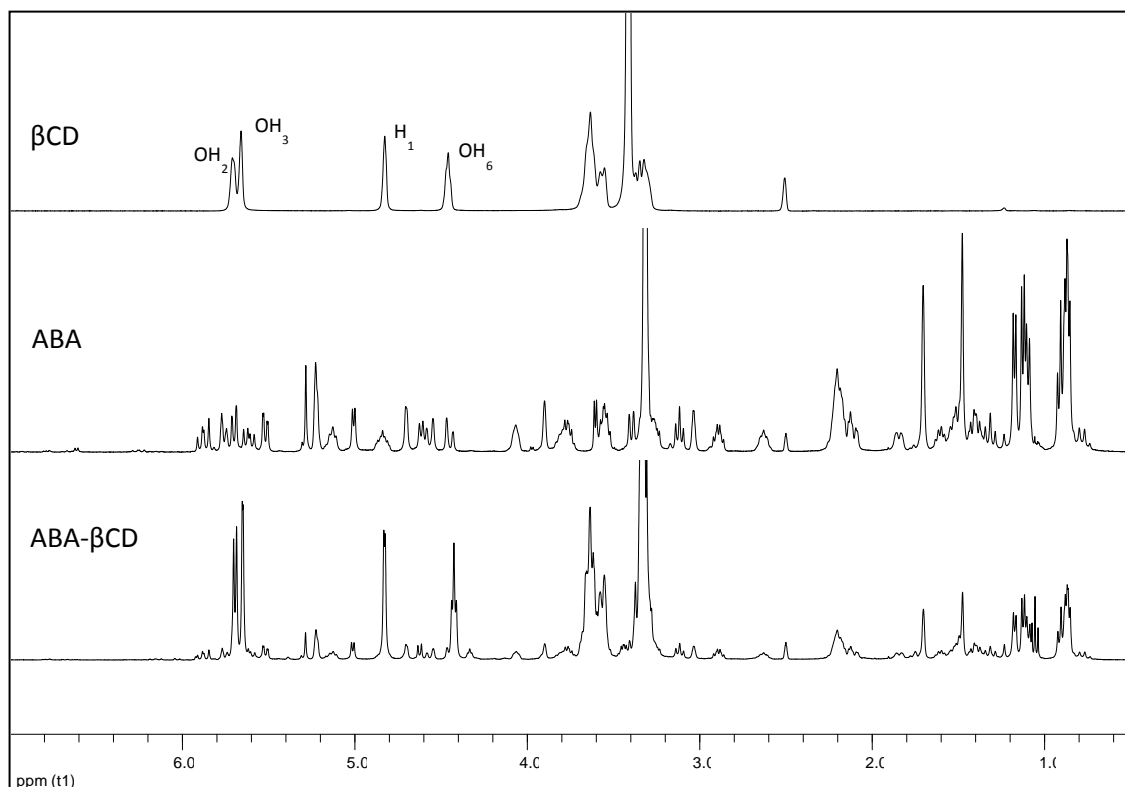


Figura 12

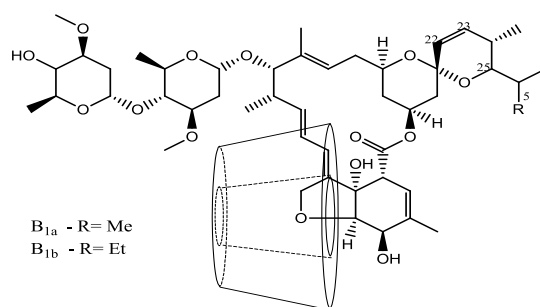


Figura 13

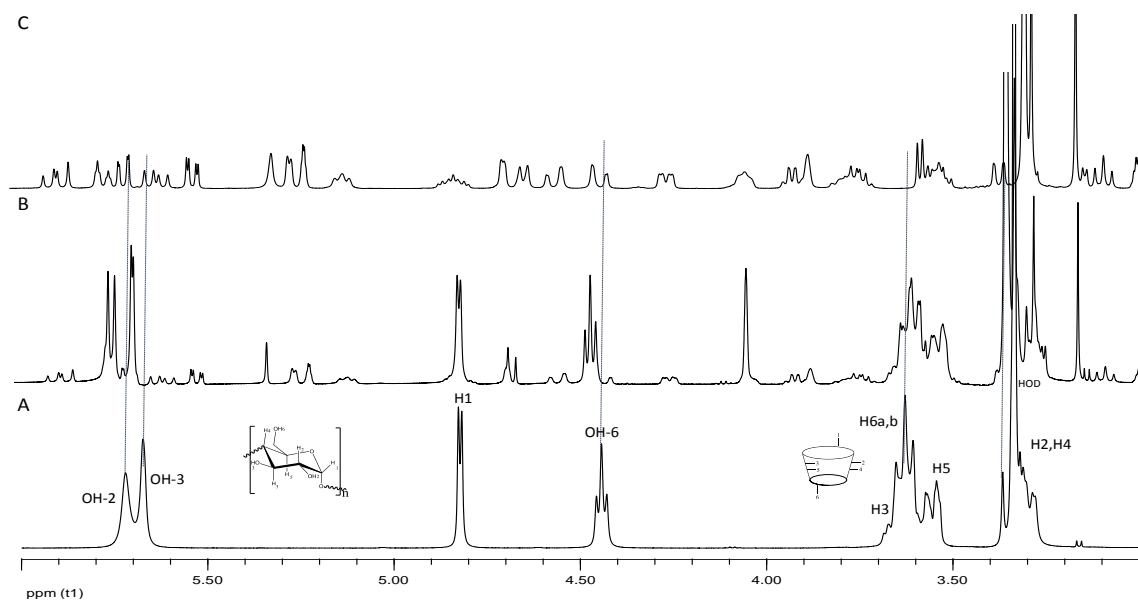


Figura 14

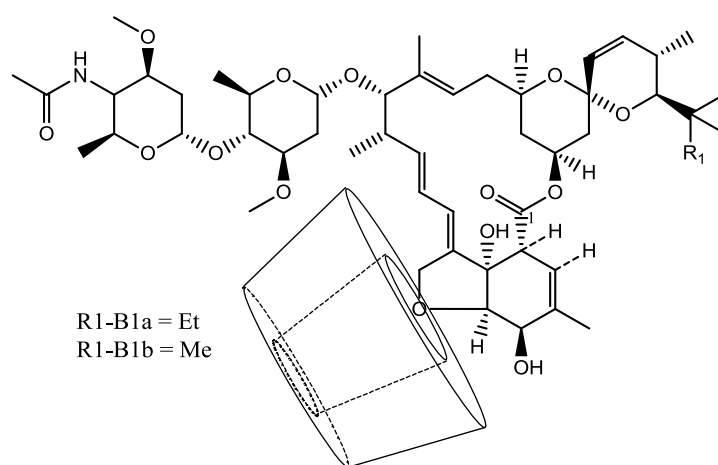
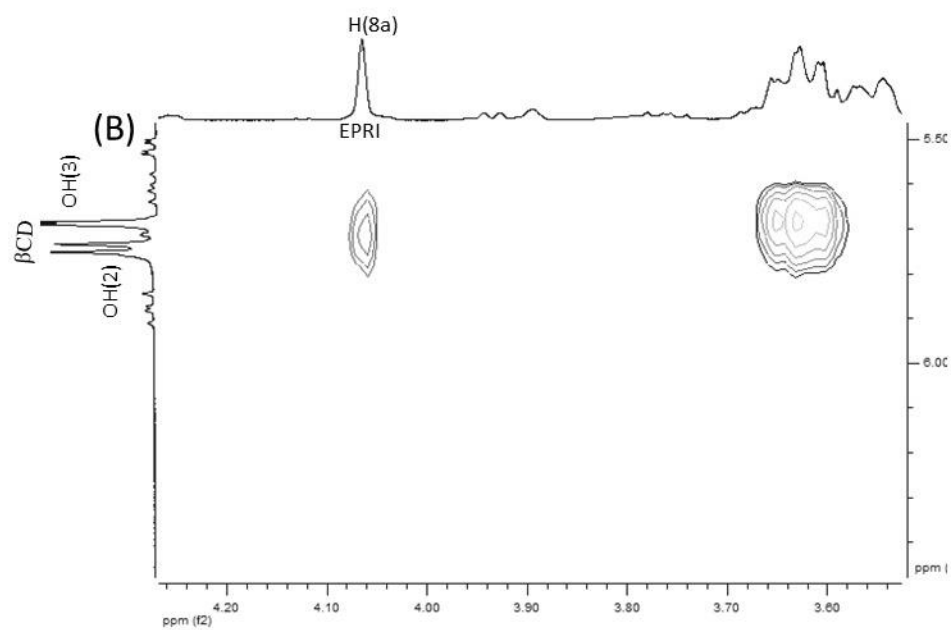


Figura 15

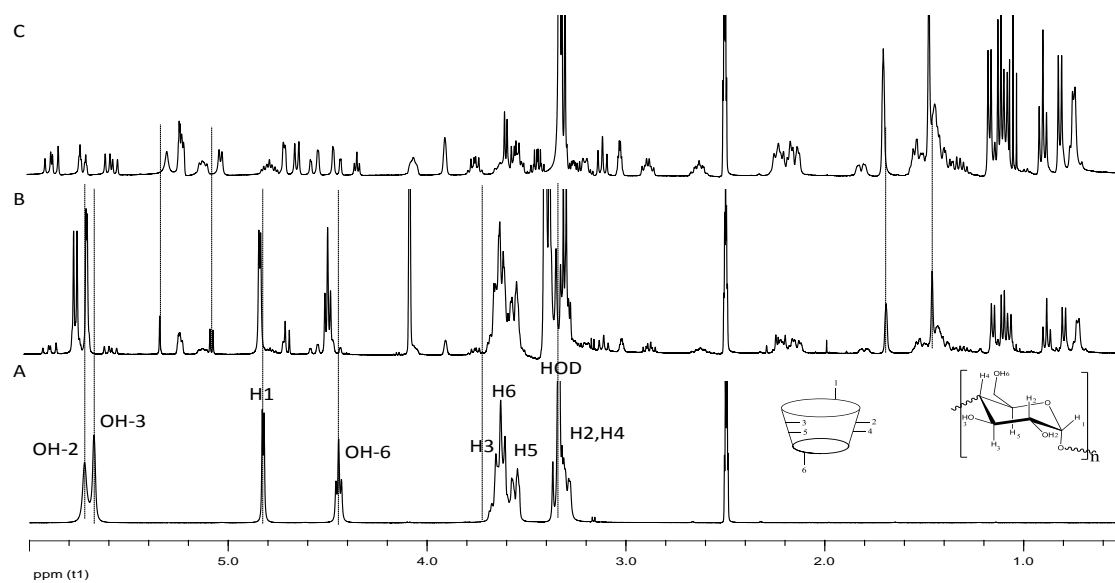


Figura 16

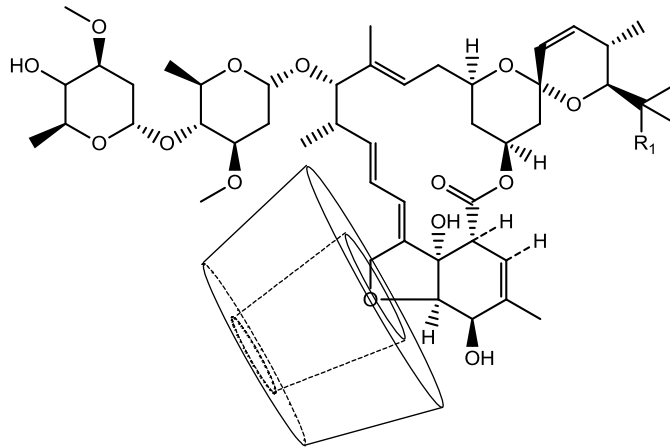
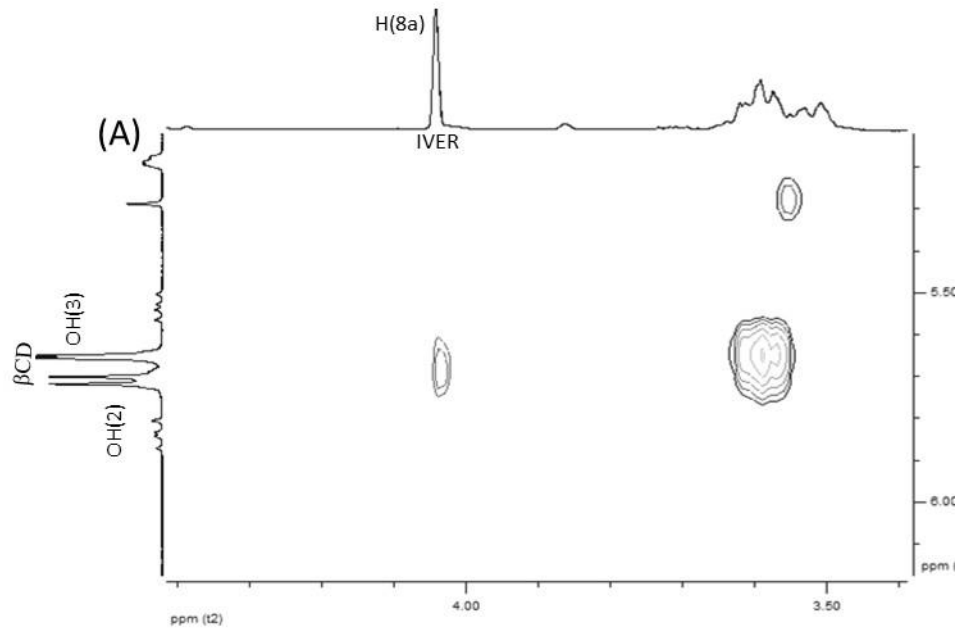


Figura 17

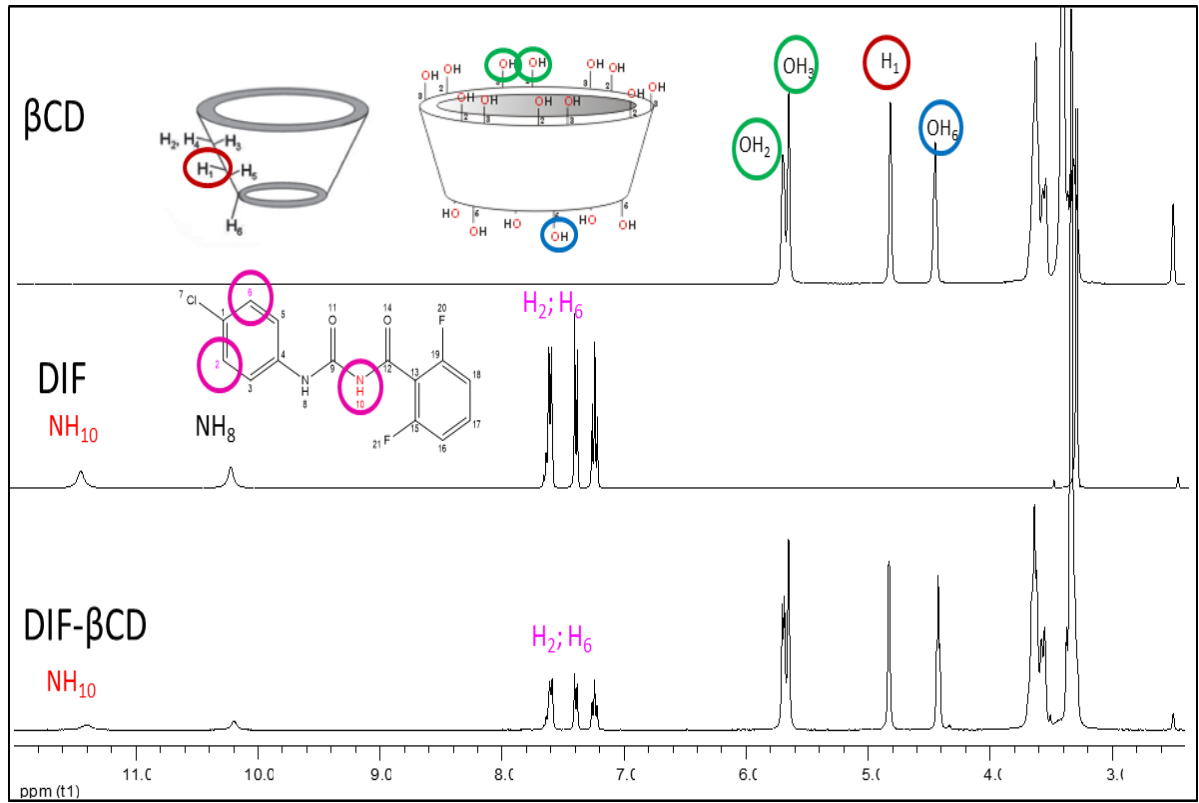


Figura 18

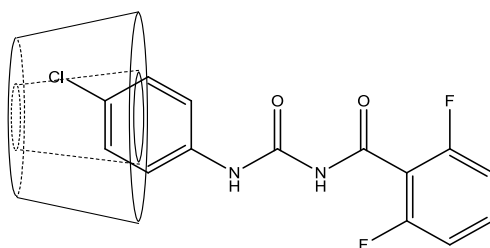
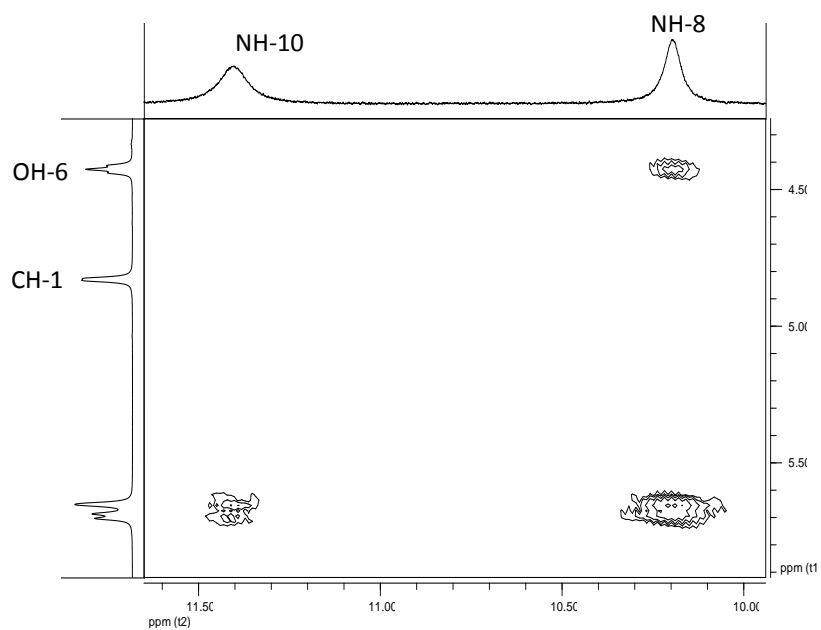


Figura 19

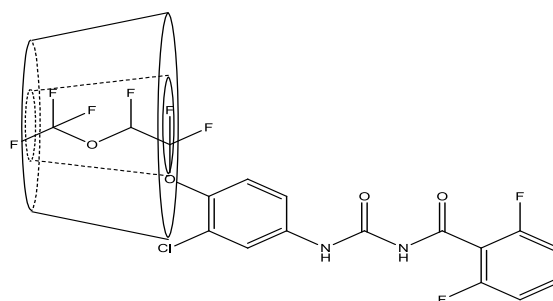
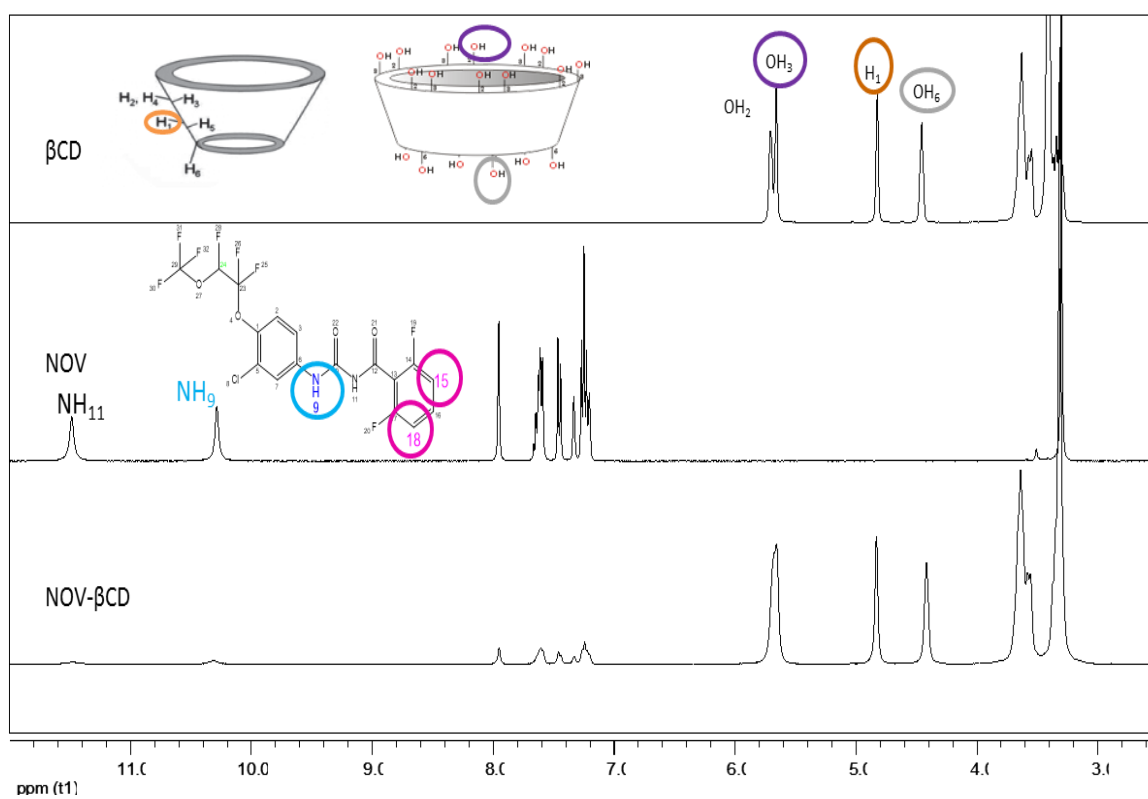


Figura 20

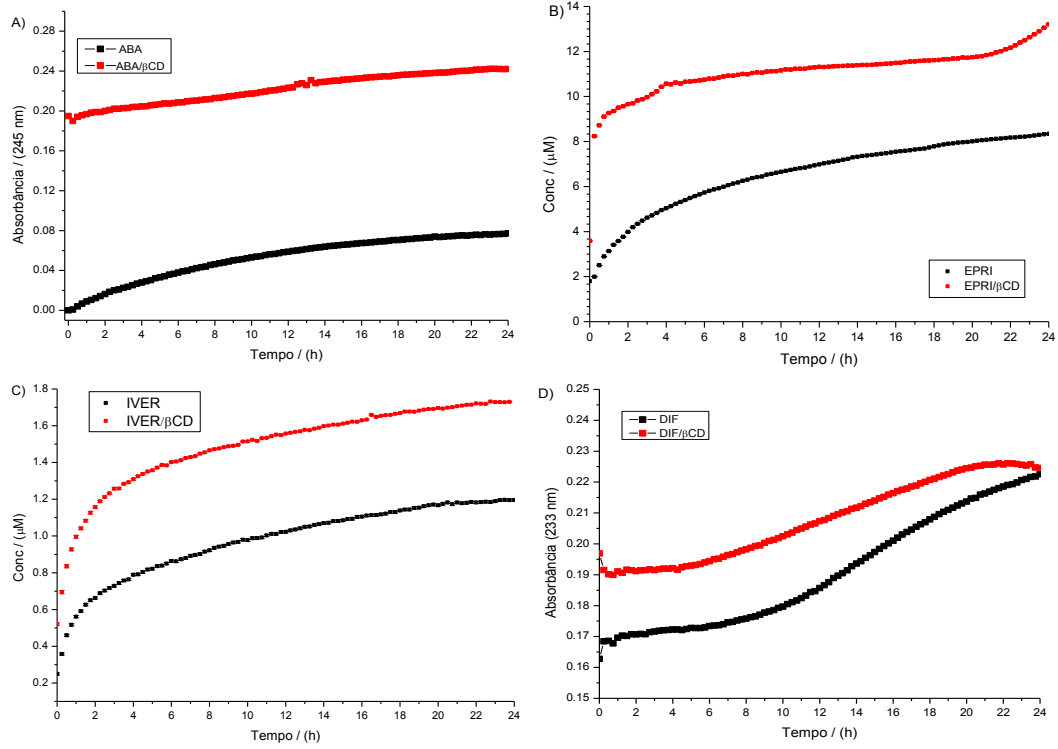


Figura 21

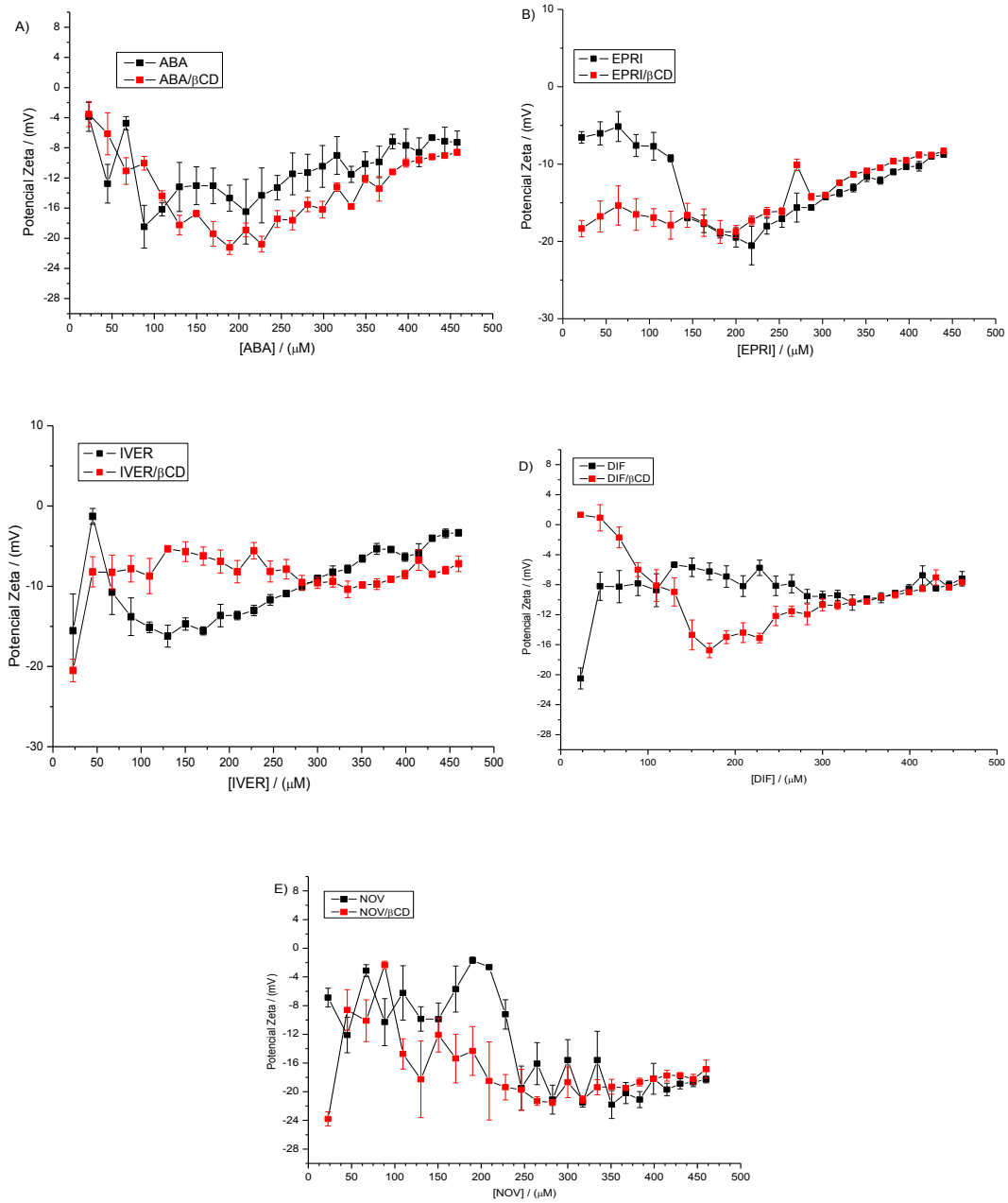


Figura 22

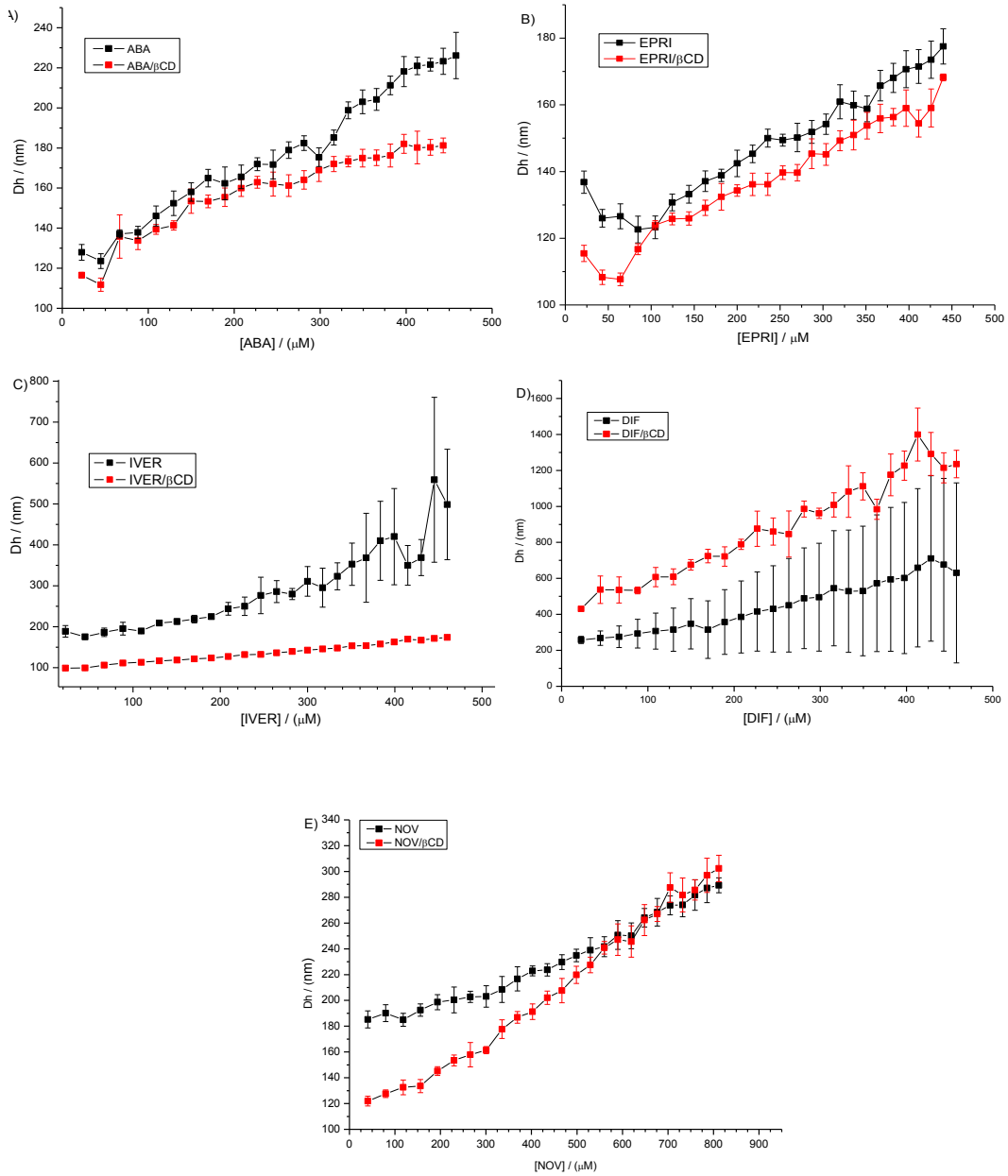


Figura 23

COMPOSTOS	DL ₅₀ ± desvio padrão em µmol L ⁻¹ /ppm					
	L1 (24 h)		L4 (24 h)		L4 (48 h)	
	µmol L ⁻¹	ppm	µmol L ⁻¹	ppm	µmol L ⁻¹	Ppm
ABA			1,02613 ± 0,13153		0,16773 ± 0,0039	
ABA/βCD			0,37702 ± 0,02398		0,18179 ± 0,0066	
IVER	0.0162 ± 0.0021	0.0142 ± 0.0018	0.2615 ± 0.0158	0.2289 ± 0.0138	0.1181 ± 0.0283	0.1034 ± 0.0248
IVER/βCD	0.0251 ± 0.0027	0.0505 ± 0.0053	0.4011 ± 0.0194	0.8062 ± 0.0389	0.1883 ± 0.0236	0.3785 ± 0.0474
EPRI	0.6851 ± 0.1170	0.6263 ± 0.1069	0.6303 ± 0.0717	0.5762 ± 0.0656	0.3991 ± 0.0106	0.3649 ± 0.097
EPRI/βCD	0.6003 ± 0.0476	1.2299 ± 0.0974	0.1987 ± 0.0292	0.4071 ± 0.0598	0.1357 ± 0.0148	0.2781 ± 0.0303

Figura 24

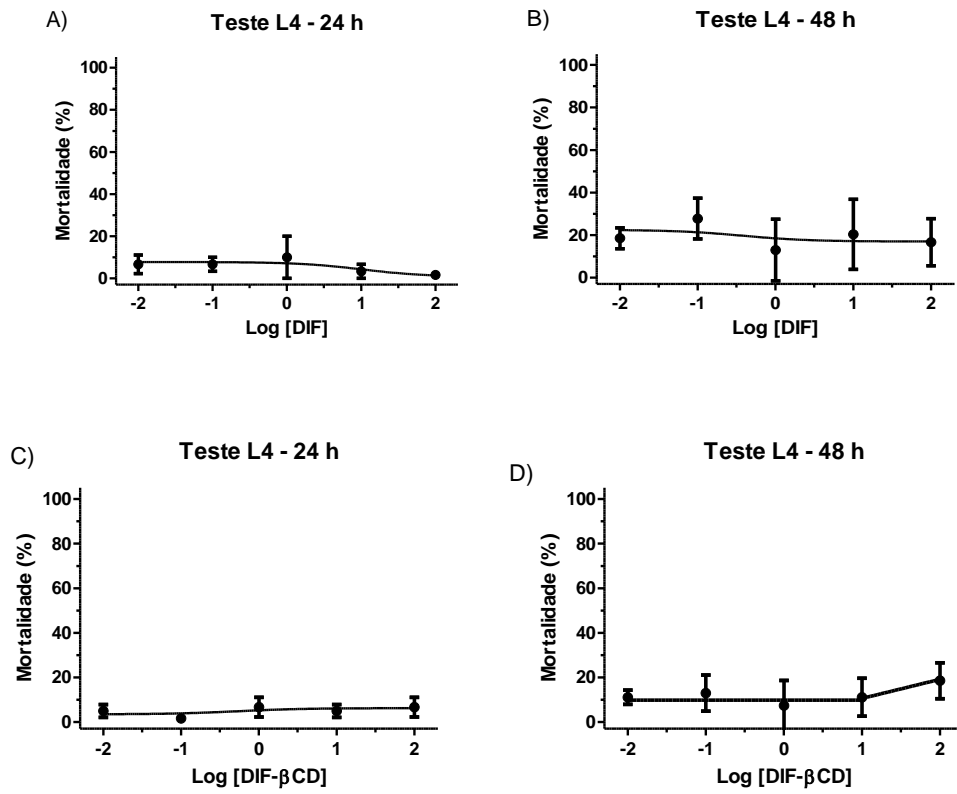


Figura 25

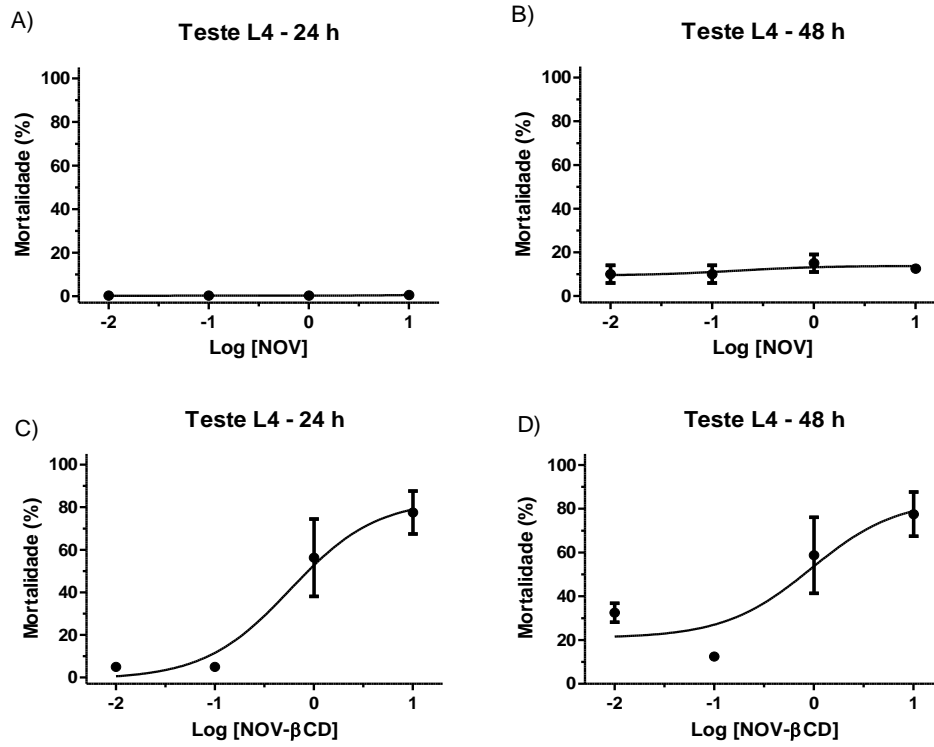


Figura 26

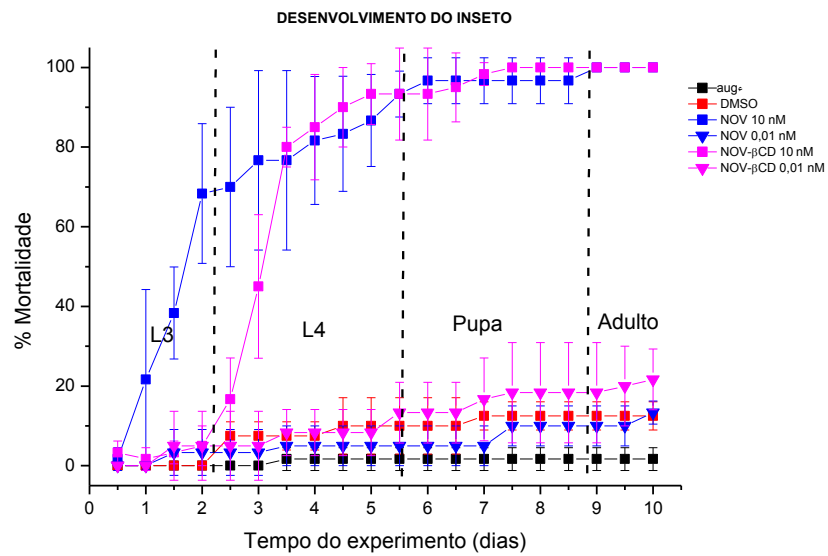
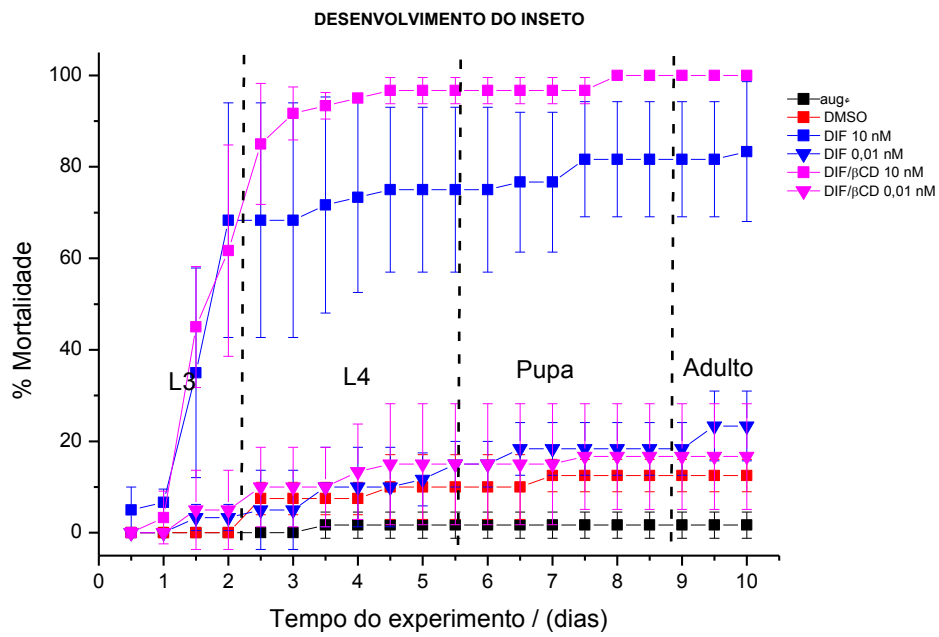


Figura 27

Composto	%IE₅₀ (nM) com intervalo de confiança de 95% (entre parênteses)	Valores em ppb para a %IE₅₀ de ativo no caso do composto de inclusão
NOV	0,877 (0,459-1,676)	0,432 (0,226-0,826)
NOV/ β CD	0,490 (0,268-0,8960)	0,242 (0,132-0,441)
DIF	5,688 (3,340-9,685)	1,767 (1,038-3,009)
DIF/ β CD	3,772 (1,812-7,853)	1,172 (0,563-2,440)

Figura 28

Composto	IC₅₀ em μM (intervalo de confiança de 95%)
ABA	14,81 (12,90-17,01)
ABA/ β CD	15,07 (13,37-16,97)
IVER	11,34 (9,84 - 13,08)
IVER/ β CD	10,79 (9,25 - 12,59)
EPRI	9,66 (8,69 - 10,75)
EPRI/ β CD	16,44 (14,48 - 18,67)
DIF	> 500
DIF/ β CD	184,5 (144,4 - 235,6)
NOV	> 200
NOV/ β CD	> 200