



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E
MORFOLOGIA
PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE C-DOTS COM OLEOS ESSENCIAIS
DE CRAVO, CITRONELA E LARANJA PARA APLICAÇÕES BIOLÓGICAS –
UM ESTUDO COM LARVAS DE *Zophobas morio*.**

Maria de Sousa Brito Neta

Orientador: Prof. Dr Ricardo Bentes

BRASILIA

2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Maria de Sousa Brito Neta

Orientador: Prof. Dr Ricardo Bentes

**AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE C-DOTS COM OLEOS ESSENCIAIS
DE CRAVO, CITRONELA E LARANJA PARA APLICAÇÕES BIOLÓGICAS –
UM ESTUDO COM LARVAS DE *Zophobas morio*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como Pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

BRASILIA

2022

MARIA DE SOUSA BRITO NETA

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE C-DOTS COM OLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO, CITRONELA E LARANJA PARA APLICAÇÕES BIOLÓGICAS – UM ESTUDO COM LARVAS DE *Zophobas morio*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como Pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes.
Universidade de Brasília, UnB.

Membro Titular: Prof. Dr. Mônica Pereira Garcia.
Universidade de Brasília, UnB

Membro Titular: Dr^a. Patrícia Bento da Silva.
Universidade de Brasília, UnB

Membro Titular: Prof. Dr Michel Muálem de Moraes Alves
Universidade Federal do Piauí, UFPI

Membro Titular: Prof. Dr Daniel Dias Rufino Arcanjo
Universidade Federal do Piauí, UFPI

Local: Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
UnB – *Campus* Darcy Ribeiro

Dedico
este trabalho aos meus
pais João Bosco de Brito e Ana Rosa de Lima, ao meu irmão, e afilhado George de
Lima Brito, pelo apoio nos momentos
bons , e difíceis, que passamos no
decorrer dessa trajetória de quase 5 anos, não nos
permitindo desistir dos nossos
objetivos, nem mesmo com a pandemia
AMO VOCÊS
MAIS DO QUE TUDO!”

“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza”.

Marie Curie

“Ciência e a vida cotidiana não podem e não devem ser separados”.

Rosalind Franklin

“Não importa quem você é, mas o que você é capaz de fazer”.

Jane Goodall

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, nosso ponto de apoio e o grande responsável por nos impulsionar a seguir em frente nos momentos de dificuldade, bem como nos momentos como este: realizar uma pós-graduação em uma das Universidades mais renomadas do Brasil, com o intuito de melhorar a qualidade de vida das pessoas através da ciência, auxiliando na descoberta de diagnóstico e tratamento de patologias, bem como no cuidado com o meio ambiente.

Ao meu anjo, que sempre está do meu lado, me protegendo, e acreditando, no meu potencial, emanando todas as energias positivas para que fosse possível chegar ao final, tenho uma imensa gratidão.

A mãezinha do céu e de todas as mães Nossa Senhora que sempre esta me auxiliando e demonstrando o melhor caminho mesmo quando tudo parece não ter solução, minha devoção, por me manter com saúde física e mental neste mundo para concluir meus objetivos em favor da ciência que possa beneficiar a humanidade.

À Universidade de Brasília - UnB, na pessoa da Prof Dra Márcia Abrahão Moura, reitora desta instituição, por me proporcionar a oportunidade, singular, de usufruir da estrutura técnico-científica indispensável para realização desta pesquisa.

A Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Biologia animal Prof. Dr^a. Daniela Mara, pela continuidade na condução do curso com bravura e dignidade, mesmo com todos os obstáculos financeiros que a Ciência no Brasil vem enfrentando, principalmente no cenário atual com a pandemia demonstrando toda a importância que a ciência, desenvolvida nestas instituições, consegue contornar mesmo sob o grande caos ao qual a humanidade foi submetida.

Meus sinceros agradecimentos ao apoio e incentivo na busca de respostas desse mundo chamado **Ciência** representado por todos os professores do programa, em especial: César Krisolia (apoio técnico científico e emocional), Paulo Eduardo Narciso de Sousa e sua esposa Fabiane Hiratsuza (grandes profissionais), Osmino Júnior (apoio no início desta caminhada), Sebastião William da Silva (grande profissional e um exemplo de sabedoria para a vida), Marcelo Oliveira Rodrigues (parceiro de caminhada na vida acadêmica), Fabrício Machado (o responsável por tudo ter dado certo na formulação, disponibilizando recursos físico e financeiro para o resultado ser obtido, sem o senhor não teria chegado até aqui, valeu cada reunião discutindo dados e aprendendo cada dia, mesmo distante não deixou de me socorrer um momento, ao senhor minha eterna gratidão, admiração e respeito) e Carolina Lucci (aprendi com a senhora o verdadeiro caminho da seleção de ciência e vida).

Um agradecimento muito especial ao meu **Orientador** Ricardo Bentes, que foi responsável por todo este sonho se tornar realidade, me falando sempre para aprender a ser uma cabeça pensante, e não apenas concordar com o que o mestre de estrada fala, pois no mundo científico tudo se constrói e nada é perfeito, foi tudo como sempre desejei. Ao Senhor o meu carinho e meu muito obrigada, pois se não fui uma filha científica à altura do que o senhor planejou, posso assegurar que foi o pai científico que escolhi.

Um agradecimento especial também ao meu **Colaborador** e eterno pai científico Sacha Braun, também responsável pela realização deste sonho, com o senhor eu fui ao extremo, o senhor sempre me deu muitas alegrias e quando em desespero me dava paz com suas palavras calmas, acalmando a tempestade de emoções que só um pós graduando, de verdade, sabe reportar. Estamos juntos desde o mestrado e sempre terei o senhor como uma referência de amigo, colega de profissão e como já falei meu PAI

CIENTIFICO. Muito obrigada pelo carinho e acolhimento desde o primeiro dia em que cheguei a UnB.

A todos os funcionários desta instituição, pela convivência que tivemos durante todo esse período, sempre dispostos a ajudar e auxiliar nas variadas atividades que ali desenvolvi, em especial à minha linda e querida **VOVOZONA Dona Zélia** por todo amor, orientação e carinho que me dedicou e dedica, como também Diogo, Karen e Juliana.

A todos os colegas, pelo entendimento de que as diferenças expressas nas atitudes de cada um nos faz crescer como pessoa e profissional, só tenho a agradecer pela convivência diária, pelas experiências trocadas e pelo apoio que nos faz persistir no nosso sonho. Sou mais feliz por ter vocês em minha vida, principalmente por fazerem com que a saudade de casa fosse suportável, em momentos ímpares vividos, em especial, com Fred (meu eterno chefinho e amigo para a vida), Dany (amiga tímida), Victors (minha dupla amada), Wille (pai da pequena Helena), Khellida (conselheira e amiga), Marina, Ludmilla (símbolo de amizade), Patrícia Costa, Bia e Lucas (trio que adoro, e que marcou minha vida), Jaqueline Rodrigues, Alexandre (conterrâneo e amigo fiel) Graciane Resende (guerreira que lutou comigo do início ao fim para que tudo fosse possível), Maria Luiza (incentivo na busca pelo conhecimento), Tathy (amiga e colaboradora fiel dos peixes) e a todos os outros que direta, ou, contribuíram para que tudo fosse possível durante este trabalho.

Faço aqui um agradecimento especial aos meus pais: JOÃO BOSCO DE BRITO e ANA ROSA DE LIMA e ao meu irmão GEORGE DE LIMA BRITO, que me acompanharam por toda essa longa jornada, abrindo mão, muitas vezes, dos seus próprios sonhos para tornar os meus uma prioridade. Registro aqui mais uma vez o incentivo de meu pai que mesmo não conseguindo estudar, devido aos obstáculos de uma vida sofrida, não mediu esforços para que seus filhos pudessem ter o maior de todos os bens, que é o CONHECIMENTO e durante a conclusão desta tese passou por um câncer, que com a benção de Deus vencemos. Muito obrigada meu Pai, você é o AR que RESPIRO e minha inspiração de luta diária, e não podia ser diferente, este título é para o Senhor.

Aos meus padrinhos, familiares e grandes amigos da vida, por acreditarem em meu potencial, me apoiando sempre que necessário.

Ao meu tio paterno, muito especial e irmão de leite do meu Pai, o senhor Raimundo Carvalho (Nem) e família, por todo o carinho e apoio de sempre, em todos os momentos bons e ruins. A vocês, a minha eterna admiração, amor e gratidão.

A minha amiga e conterrânea Ana Emilia, e sua família, pelos momentos de carinho e apoio desde o nosso reencontro em Brasília em que uma se apoiou na outra para aliviar a saudade de casa.

Aos amigos Fred Madeira e Ricardo Perpétuo pela amizade, carinho e apoio em todos os momentos de alegria, doença, saudade e provações que a vida longe, de casa, me imprimiu, pois sem vocês teria sido difícil vencer todos esses desafios. Amo vocês.

Aos amigos e médicos da minha família em especial Dr Carlos Eduardo Lucio Filho, que cuida muito bem de mim e meus familiares, e o Dr Claudio Mendes, responsável pelo bem estar do meu bem mais precioso meu Pai, que sempre estão de braços abertos para nos acolher nos piores momentos e conseguem nos levantar com suas forças e alegrias na cura de doenças físicas e emocionais. A vocês, em nome de todos os médicos, meu muito obrigada.

Não poderia deixar de lembrar os meus GRANDES E VERDADEIROS MESTRES do departamento de Química da Universidade Federal do Piauí- UFPI, em especial o professor Daniel Arcanjo, coordenador da família LAFMOL (AMIGO de

VIDA, há mais de uma década, sempre me ajudando com conselhos, e energias positivas, e no final desta jornada me apoiou com toda sua estrutura humana, e técnica excelentes, contribuindo para o enriquecimento do conhecimento científico e valorização da ciência com toda a força NORDESTINA). Agradeço ao meu filho científico, Otávio, que me ajudou intelectualmente, e fisicamente, nos experimentos realizados na UFPI. Sou grata também ao Prof Dr.Michel Muálem (pessoa de um coração, e humildade, impar, que não mediu esforços para contribuir com este trabalho) a Lima Neto (um amigo de décadas, colaborador e profissional que admiro e respeito). Agradeço ao Centro Universitário Uninovafapi, por sempre acreditar em mim e me apoiar durante a vida acadêmica. A vocês, que foram minha base intelectual, mesmo com todas as dificuldades vividas no nosso NORDESTE (Piauí, cidade de Teresina e Maranhão, cidade de Paraibano, minha terra Natal) dedico todo o conhecimento adquirido até o momento.

Um agradecimento a minha família e amigos da cidade de Bom Jesus no Piauí na pessoa de Carmen Laura Lemos e Nilva Lisboa Lemos, pelo carinho e cuidado com minha família durante a minha ausência para a conclusão deste trabalho.

Agradeço a Instituição CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado que me ajudou a crescer profissional e pessoalmente.

RESUMO

Visando a utilização de produtos que permitam uma sustentabilidade econômica, ambiental e com baixa agressão para aplicação em humanos, utilizamos a nanotecnologia com carbon dots associada aos óleos essenciais, os quais possuem diversas aplicações biológicas e propriedades microbiológicas e antioxidantes. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi funcionalizar nanopartículas de carbon dots (DOTS) com óleos essenciais de: citronela (*Cymbopogon winterianus*)-(DCIT), cravo da índia (*Eugenia caryophyllus*)-(DCRA), e laranja (*Citrus sinensis*)-(DLAR) para aplicação em produtos nanoestruturados de baixo custo, que promovam uma maior solubilidade, melhor estabilidade molecular e menor toxicidade, em relação aos produtos já existentes no mercado. Antes da funcionalização dos DOTS, foi determinado o grau de pureza de cada óleo utilizado no trabalho por análise de Cromatografia gasosa acoplada por espectrometria de massas (CG-EM). Após a obtenção das nanopartículas funcionalizadas, todas as formulações foram submetidas a técnicas de caracterizações físico-químicas com os ensaios de termogravimetria (TG), espectroscopia por UV-Vis, infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e por RAMAN, assim como a microscopia de transmissão (MET) para a avaliação do tamanho, teste de estabilidade pela avaliação da variação do pH, bem como a presença de antioxidantes por técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR). Como modelo para os testes *in vivo* foi utilizado larvas de *Zophobas morio* (Tenebrio Gigante) e avaliado a toxicidade em 24 e 48h após administração, e alguns parâmetros de marcadores antioxidantes como Nitrito, Mieloperoxidase (MPO) e Glutathiona Reduzida (GSH) e Melanização como parâmetro indicativo de toxicidade. Os óleos apresentaram um grau de pureza superior a 85%. Para os compostos majoritários dos óleos de cravo da índia as moléculas de eugenol com 85% de pureza e β -cariofileno 11%. O óleo de laranja representado pelo limoneno apresentou 97% de grau de pureza. Para o óleo de citronela as três moléculas mais representativas com seu grau de pureza respectivamente são o citronelal 41%, geraniol 23% e citronelol 8,6%. Dados das análises de RAMAN mostraram que os DOTS em temperatura ambiente apresentaram um aumento no teor de defeitos estruturais com o decorrer do tempo, provavelmente devido a processos oxidativos induzidos pelo oxigênio do meio; por outro lado a presença do óleo na superfície dos DOTS promoveu uma estabilidade nas ligações com os óleos em temperatura ambiente, para DCRA foi sugestivo de uma estabilidade de seis meses e as demais formulações DLAR e DCIT de aproximadamente doze meses. Nos ensaios de FTIR os espectros de absorção exibiram uma forte banda em $\sim 1450\text{ cm}^{-1}$, associada com modos de estiramento simétrico da carboxila. Modos vibracionais $\nu_{as}(COO^-)$ e $\nu(C=O)$ podem ser encontrados em 1670 e 1715 cm^{-1} , respectivamente, deslocamento para maiores energias assim como o aumento das intensidades dos modos associados aos grupos oxigenados indicando mais uma vez a oxidação da superfície dos DOTS, corroborando com os resultados do RAMAN. No UV-Vis, os espectros de absorção dos DOTS, DLAR e DCIT, apresentaram uma banda de absorção típica em 337 nm, atribuída a transição $n-\pi^*$ (ligações $C=O$) e um ombro em torno de 240 nm, atribuído a transição $\pi-\pi^*$ ($C=C$ ligações com hibridização sp^2), diferentemente no DCRA não foi observado o ombro em torno de 238 nm, atribuído as transições $\pi-\pi^*$, e sim apresentou um pico atípico, em 279 nm. Para a determinação das capacidades antioxidantes por meio do EPR foi encontrado que apenas a formulação DCRA apresentou uma potencial capacidade antioxidante, enquanto os DOTS, DLAR e DCIT, com o comportamento semelhante, apresentaram em média um decaimento de 100 para 60% no consumo de DPPH, mostrando um grau de eficácia inferior. Não foi observado morte *in vivo* após

48h de administração das formulações, e a produção de radicais livres e antioxidantes associados a Nitrito, GDH e MPO foram dependentes das concentrações das formulações. Para a detecção do Nitrito apenas duas formulações apresentaram alterações; o DCRA nas concentrações de 25 e 100 mg/g de animal e o DCIT em 25 e 50 mg/g. Alterações nos valores de GSH foi observado nas formulações DCRA em 25 mg/g, DOTS em 50 e 100mg/g e DLAR em 50mg/g. Os níveis da MPO se mostraram alterados em todas as concentrações de DOTS e DCIT testada, e para formulação do DCRA apenas em 50mg/g de animal. A melanização apresentou alterações apenas à formulação DCRA nas concentrações de 50 e 25 mg/g de animal. Assim, podemos concluir que a funcionalização dos DOTS com os óleos essenciais usados neste estudo se mostrou eficaz, podendo reduzir a toxicidade e aumentar a capacidade antioxidante dos mesmos para potenciais aplicações em produtos biocompatíveis.

Palavras - chaves: Toxicidade, óleos essenciais, larvas de *Zophobas morio* Tenebrio Gigante, Funcionalização, DOTS, antioxidantes, melanização.

ABSTRACT

Seeking at the use of raw material or products that allow an economic, environmental sustainability and low toxicity for human's application, we use nanotechnology based in carbon dots, associated with essential oils which have several biological applications with microbiological and antioxidant properties. Thus, the main objective of this work was to functionalize carbon dot nanoparticles-(DOTS) with three essential oils: citronella (*Cymbopogon winterianus*) – (DCIT); clove (*Eugenia caryophyllus*) - (DCRA), and orange (*Citrus sinensis*) - (DLAR) that could promote a greater solubility, better molecular stability and lower toxicity for the oils and DOTS. The degree of purity of each oil used in the work was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) analysis. After nanoparticles functionalization's, all formulations were analyzed by thermogravimetry (TG), UV-Vis spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and RAMAN to determine their physicochemical parameters, as well as transmission microscopy (MET) for size evaluation, pH variation, and presence of antioxidants by magnetic resonance technique (EPR). The *Zophobas morio* larvae (superworms) was the *in vivo* model used to evaluate toxicity and antioxidant markers such as Nitrite, Myeloperoxidase (MPO) and Reduced Glutathione (GSH) and Melanization. The oils purity was more than 85%. For the major compounds of clove oils, eugenol purity was 85% and β - Caryophyllene 11%. The orange oil represented by limonene presented 97% purity. For citronella oil the three most representative molecules with their purity degree respectively are citronellal 41%, geraniol 23% and citronellol 8.6%. Data from RAMAN analyses showed that DOTS at room temperature showed an increase in the content of structural defects over time, due to oxidative processes induced by oxygen in the medium; on the other hand, the presence of oil on the surface of DOTS promoted a stability in the bonds with the oils, for DCRA it was six months and the DLAR and DCIT formulations were of twelve months. FTIR data show additional spectra bands in $\sim 1450\text{ cm}^{-1}$, associated with symmetrical carboxyl stretch modes. Vibrational modes $\nu_{as}(COO^-)$ and $\nu(C=O)$ can be found in 1670 cm^{-1} and 1715 cm^{-1} , respectively, displacement to higher energies as well as the increase in the intensities of the modes associated with the oxygenated groups, indicating once again the oxidation of the DOTS surface. In the UV-Vis analyzes, the absorption spectra of DOTS, DLAR and DCIT, presented a typical absorption band at 337 nm as a $n-\pi^*$ transition (C=O bonds) and a shoulder around 240 nm, attributed to the $\pi-\pi^*$ transition (C=C bonds with sp^2 hybridization); in the DCRA, the shoulder around 238 nm was not observed, for transitions $\pi-\pi^*$, but it was presented an atypical peak, at 279 nm. It was found that only the DCRA formulation presented a potential antioxidant, while DOTS, DLAR and DCIT, with similar behavior, the decay average was from 100 to 60% in the consumption of DPPH showing a lower degree of antioxidant effect. No death was observed *in vivo* studies after 48h of formulation administration, and the production of free radicals and antioxidants associated with Nitrite, GDH and MPO were dependent on the concentrations of each formulations. For the detection of Nitrite, only two formulations presented alterations; DCRA at concentrations of 25 and 100 mg/g of animal and DCIT at 25 and 50 mg/g. Changes in GSH values were observed in the DCRA at 25 mg/g, DOTS at 50 and 100mg/g and DLAR in 50mg/g. MPO levels were altered in all concentrations of DOTS and DCIT tested, and for DCRA only in 50mg/g of animal. Melanization presented alterations only to the Formulation DCRA at concentrations of 50 and 25 mg/g of animal. The results presented, demonstrated that the carbon-dots functionalized with essential oils used in

this study can produce DOTS with reduced toxicity and a better antioxidant property for potential applications in biocompatible products.

Keywords: Toxicity, essential oils, *Zophobas morio* larvae (superworms), Functionalization, DOTS, antioxidants, myelinization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processos envolvidos no metabólito primário produzido pelas plantas.	26
Figura 2: Formação das classes de metabólitos secundários (alcalóides, terpenos e fenilpropanoides) originários do metabólito primário das plantas.	27
Figura 3: Representação da estrutura química dos principais componentes presentes no Óleo Essencial de Cravo-da-Índia.	29
Figura 4: Estrutura química do Eugenol.	30
Figura 5: Estrutura molecular dos compostos majoritários presentes no óleo de citronela.	31
Figura 6: Estrutura molecular do Limoneno.	34
Figura 7: Estrutura molecular do D-Limoneno.	35
Figura 8: Representação da estabilização estérica por forças de repulsão estérica.	37
Figura 9: Reprodução do mecanismo de estabilização eletroestérico.	38
Figura 10: Representação dos três mecanismos de estabilização em sistema de funcionalização de partícula.	39
Figura 11: Reação de consumo de DPPH.	40
Figura 12: Ciclo de vida da Larva de <i>Zophobas morio</i> .	41
Figura 13: Ciclo de vida completo do <i>Tenébrio Molitor</i> .	42
Figura 14: Fórmula estrutural da molécula de Glutathione reduzida GSH e glutathione oxidada GSSG.	44
Figura 15: Reação da redução da glutathione oxidada reduzida pela enzima glutathione reductase no mecanismo NADPH dependente.	45
Figura 16: Esquema do mecanismo de reação do método de Griess.	47
Figura 17: Reação bioquímica da obtenção da melanina.	49
Figura 18: Esquema da formulação e caracterização do produto carbon dots e óleo essencial.	52
Figura 19: Apresentação do Carbon Dots.	53
Figura 20: Frascos dos óleos utilizados no preparo das formulações estudadas.	53
Figura 21: Processo de funcionalização da partícula de DOTS com os óleos essenciais.	57

Figura 22: Exposição do pH das formulações.	59
Figura 23: Esquema da avaliação <i>in vivo</i> do produto carbon dots e óleo essencial.	63
Figura 24: Cultivo, obtenção e seleção das Larvas de <i>Zophobas morio</i> , Tenebrio Gigante para administração das formulações DOTS, DCRA, DLAR e DCIT nas doses de 25, 50 e 100 mg/g , tendo DMSO 1% como controle positivo e no mesmo volume água destilada como controle negativo.	65
Figura 25: Administração, separação de grupos e congelamento das Larvas de <i>Zophobas morio</i> , Tenebrio Gigante, das formulações a serem avaliadas nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/g de DOTS, DCRA, DLAR e DCIT tendo DMSO 1% como controle positivo e, no mesmo volume água destilada como controle negativo.	66
Figura 26: Esquema do preparo do homogeneizado das Larvas de <i>Zophobas morio</i> , Tenebrio Gigante.	67
Figura 27: Esquema da quantificação da melanização das Larvas de <i>Zophobas morio</i> , Tenebrio Gigante.	68
Figura 28: Esquema da avaliação da atividade Mieloperoxidase (MPO) em Larvas de <i>Zophobas morio</i> Tenebrio Gigante.	69
Figura 29: Esquema do protocolo da avaliação de Nitrito pelo método de Griess modificado das Larvas de <i>Zophobas morio</i> Tenebrio Gigante.	70
Figura 30: Esquema da avaliação de grupos sulfidril não proteicos reduzidos-Glutationa reduzida (GSH) das Larvas de <i>Zophobas morio</i> Tenebrio Gigante.	71
Figura 31: Cromatograma de íons totais do óleo de <i>Cymbopogon winterianus</i>	72
Figura 32: Espectro de massas dos compostos majoritários identificados no óleo de <i>Cymbopogon winterianus</i> .	74
Figura 33: Cromatograma de íons totais do óleo de <i>Eugenia caryophyllus</i> .	75
Figura 34: Espectro de massas dos compostos majoritários identificados no óleo de <i>Eugenia caryophyllus</i> .	76
Figura 35: Cromatograma de íons totais do óleo de <i>Citrus sinensis</i> .	78
Figura 36: Espectro de massas do limoneno (composto majoritário do óleo de <i>Citrus sinensis</i>).	79
Figura 37: Gráfico da análise termogravimétrica das amostras de DOTS (Carbon dots), DLAR (DOTS Laranja), DCRA (DOTS Cravo), DCIT (DOTS Citronela) que mostra a perda de massa do material em função da variação de temperatura de 25 a 800°C.	81
Figura 38: Imagens de MET das amostras A) DOTS (Carbon dots), B) DCIT(DOTS Citronela), C) DCRA (DOTS Cravo) e D) DLAR (DOTS Laranja).	83

- Figura 39:** Valores de pH para as formulação DOTS, DCRA, DLAR e DCIT nos tempos de 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 77, 84, 91, 97, 104, 111, 118, 125 e 132 dias após a obtenção dos materiais. 85
- Figura 40:** Espectros Raman dos Carbon Dots: DOTS (a), DCIT (b), DLAR (c) e DCRA (d) para diferentes idades. 88
- Figura 41:** (a) Espectros de FTIR das amostras de Carbon Dots puro DOTS com idades de 4, 14 e 17 meses. Ampliações dos espectros de FTIR das amostras de carbon Dots puro DOTS (b), DCIT (c), DLAR (d) e DCRA (e) para as deferentes idades. 90
- Figura 42:** Espectros UV-Vis das amostras DCIT, DLAR, DCRA e DOTS com curvas de cores verde, vermelho, azul e preto respectivamente. 92
- Figura 43:** Avaliação da atividade antioxidante de óleos essenciais acoplados a carbon-dots tendo como radical livre o DPPH com etanol. 93
- Figura 44:** Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, avaliação de toxicidade em 24h das formulações em análise. 97
- Figura 45:** Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, avaliação de toxicidade em 48h das formulações em análise. 98
- Figura 46:** Quantificação da expressão de melanização em Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, após administração das formulações DOTS, DCRA, DLAR e DCIT. 100
- Figura 47:** Unidades de atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) por MG de Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, após administração das formulações DOTS, DCRA, DLAR e DCIT. 103
- Figura 48:** Valores de concentração de Nitrito em Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, após administração das formulações DOTS, DCRA, DLAR e DCIT. 106
- Figura 49:** Valores de concentração de grupamentos sulfidríla não proteicos reduzidos - Glutationa reduzida (GSH) em Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, após administração das formulações DOTS, DCRA, DLAR e DCIT. 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados necessários para o cálculo do número de moléculas.	55
Tabela 2: Dados necessários para o cálculo do número total de partículas.	55
Tabela 3: Volume total de óleo necessário para funcionalizar 1, 2 g de C -dots.	56
Tabela 4: Composição do óleo de <i>Cymbopogon winterianus</i> .	73
Tabela 5: Composição do óleo de <i>Eugenia caryophyllus</i> .	76
Tabela 6: Composição do óleo de <i>Citrus sinensis</i> .	79
Tabela 7: Valores da razão I_D/I_G encontrados para as idades de 4, 14 e 17 meses, determinados para as formulações DOTS, DCIT, DLAR e DCRA.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC CRL-2095 linhagem de câncer de língua
ATCC CRL-1619 linhagem de câncer de pele
ATCC CRL-1739 linhagem de câncer de estômago
ATP adenosina trifosfato
ATR-FTIR - Reflexão Total Atenuada
CAT catalase
CCD - Charge Coupled Device
CG-EM Cromatografia gasosa acoplada por espectrometria de massas
Cl cloreto
CNPs Nanopartículas de carbono
DCIT partícula de carbon dots acoplado com óleo de citronela
DCRA partícula de carbon dots acoplado com óleo de cravo
DHE Dihydroethidium
DLAR partícula de carbon dots acoplado com óleo de laranja
DMSO Dimetilsulfóxido
DOTS formulação de carbon dots puro
DOPA dioxifenilalanina
DNA Ácido Desoxirribonucleico
DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EO estresse oxidativo
EPS poliestireno expandido
EPR ou RPE Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica
ERO ou ROS Espécies Reativas de Oxigênio
FTIR– Infravermelho com transformada de Fourier
GEM - Laboratório de Genética e Morfologia
GPx glutathione peroxidase
GR glutathione reductase
GSH glutathione
H₂O₂ peróxido de hidrogênio
HeLa - Linhagem de células de carcinoma cervical humano
HL-60 leucemia promielocítica humana
HClO ácido hipocloroso

HTAB hexadeciltrimetilamônio
IF - Instituto de Física
IQ - Instituto de Química
K-562 Linhagem de células de leucemia mieloide
LabMic Laboratório Multiusuário de Microscopia de alta resolução
LAFMMOL Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia
LAGO Laboratório de Geoquímica Orgânica
LDPQ Laboratório de Desenvolvimento de Processos Químicos
LEO - Laboratório de Espectroscopia Óptica
LIMA Laboratório de Inorgânica e Materiais
MCF-7 células de câncer de mama
MET Microscopia Eletrônica de Transmissão
MPO Mieloperoxidase
NaOH Hidróxido de Sódio
NaNO₂ Nitrito de Sódio
NETs neutrófilos extracelulares
NO oxido nítrico
NO₂ Nitrito
NPs nanopartículas
OCIT formulação de óleo de citronela com solvente
OCRA formulação de óleo de cravo com solvente
OH• radical hidroxila
OLAR formulação de óleo de laranja com solvente
O₂•⁻ ânion superóxido
OVA ovalbumina
PBS Tampão Fosfato Salina
POH perill álcool
PON Paraoxonase
PS P pterostilbeno
QDs *Quantum Dots*
RAMAN - Espectroscopia Raman Amplificada por superfície (sigla em inglês, *SERS*)
RL radicais livres
RPM rotação por minutos
SD desvio padrão

SOD superóxido dismutase

TFD, PDT terapia fotodinâmica

TG Termogravimetria

UV-Vis

VE veículo

ZnSO₄ Sulfato de Zinco

Sumário

1 Introdução	23
2 Justificativa	25
3. Referencial teórico	26
3.1 Produtos naturais	26
3.2 Óleos essenciais	28
3.2.1 Óleo de <i>Eugenia caryophyllus</i> cravo da Índia	28
3.2.1.1 <i>Eugenol</i>	30
3.2.2 Óleo de <i>Cymbopogon winterianus</i> citronela	31
3.2.2.1 <i>Citronelal</i>	32
3.2.2.2 <i>Citronelol</i>	32
3.2.2.3 <i>Geraniol</i>	33
3.2.3 Óleo de <i>Citrus sinensis</i> laranja	33
3.2.3.1 <i>Limoneno</i>	34
3.3 Carbon-Dots (DOTS)	35
3.4 Funcionalização de partícula	37
3.5 Antioxidantes	39
3.6 Sequestro do Radical Livre DPPH	39
3.7 Modelo <i>in vivo</i>	40
3.7.1 Larvas de <i>Zophobas morio</i> Tenebrio Gigante	41
3.8 Grupos sulfidril não proteicos reduzidos - Glutathione Reduzida (GSH)	43
3.9 Determinação de Nitrito (NO ₂) pelo método de Griess	45
3.10 Mieloperoxidase (MPO)	47
3.11 Melanina	48
4 Objetivos	51
4.1 Geral	51
4.2 Específico	51
5 Metodologia	52
5.1 Desenho experimental	52
5.2 Obtenção do Carbon Dots	52
5.3 Obtenção dos óleos essenciais	53
5.4 Detecção e quantificação da composição química dos óleos por Cromatografia gasosa acoplada por espectrometria de massas (CG-EM)	54
5.5 Funcionalização dos óleos essenciais ao Carbon Dots	54
5.5.1 Determinação do valor de óleo utilizado	54
5.5.2 Funcionalização das partículas com óleo essencial	57
5.6 Caracterização das formulações	58
5.6.1 Análise Termogravimétrica (TG)	58
5.6.1.2 Análise morfológica da partícula do Carbon Dots	58
5.6.1.3 Estabilidade físico-química por ensaio de pH em exposição diferentes de luz	58
5.6.1.4 Propriedades ópticas	59
5.6.1.4.1 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	60
5.6.1.4.2 <i>Espectroscopia Raman</i>	60
5.6.1.4.3 Espectroscopia de absorção molecular (UV-VIS)	60
5.7 Avaliação de atividade antioxidante por radical livre DPPH com técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)	61
5.7.1 Preparo do DPPH	61

5.7.2	Preparo da amostra.....	61
5.7.3	Leitura das amostras	62
5.7.4	Interpretação de resultados e plotagem de gráficos	62
5.7.5	Análise estatística dos dados.....	62
5.8	Ensaio <i>in vivo</i>	62
5.8.1	Ensaio <i>in vivo</i> com Larvas de <i>Zophobas morio</i> Tenebrio Gigante	63
5.8.1.2	Obtenção das Larvas de <i>Zophobas morio</i> Tenebrio Gigante.....	63
5.8.1.3	Cultivo das Larvas de <i>Zophobas morio</i> Tenebrio Gigante	64
5.8.1.4	Seleção dos grupos para avaliar dose de toxicidade nas Larvas de <i>Zophobas morio</i> Tenebrio Gigante.....	64
5.8.1.5	Administração das formulações nos grupos, para avaliar a dose de toxicidade nas Larvas de <i>Zophobas morio</i> , Tenebrio Gigante	65
5.8.1.6	Preparo do homogenato das Larvas de <i>Zophobas morio</i> , Tenebrio Gigante, para avaliação dos parâmetros antioxidantes.....	67
5.8.1.7	Determinação de parâmetros de antioxidantes em Larvas de <i>Zophobas morio</i> Tenebrio Gigante	67
5.8.1.7.1	Avaliação da quantificação da Melanização.....	67
5.8.1.7.2	Avaliação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)	68
5.8.1.7.3	Avaliação de Nitrito por método de Griess.....	69
5.8.1.7.4	Avaliação da concentração de grupos sulfidril não proteicos reduzidos - Glutathiona reduzida (GSH)	70
5.9	Análise estatística dos dados.....	71
6	Resultados e Discussão	72
6.1	Caracterização das formulações	72
6.1.1	Deteção e quantificação da composição química dos óleos por Cromatografia gasosa acoplada por espectrometria de massas (CG-EM).....	72
6.1.2	Termogravimetria (TG)	80
6.1.3	Análise morfológica da partícula do Carbon Dots	82
6.1.4	Estabilidade físico-química por ensaio de pH em exposição diferentes de luz ..	84
6.1.5	Propriedades ópticas	86
6.1.5.1	<i>Espectroscopia Raman</i>	86
6.1.5.2	<i>Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	89
6.1.5.3	<i>Espectroscopia de absorção molecular (UV-VIS)</i>	91
6.2	Avaliação de atividade antiradicalar DPPH com técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)	93
6.3	Ensaio <i>in vivo</i>	97
6.3.1	Avaliação da toxicidade nas Larvas de <i>Zophobas morio</i> , Tenebrio Gigante ..	97
6.3.2	Avaliação da quantificação da Melanização	99
6.3.3	Avaliação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)	102
6.3.4	Avaliação de Nitrito por método de Griess	105
6.3.5	Avaliação de grupos sulfidril não proteicos reduzidos - Glutathiona reduzida (GSH).....	108
7	Conclusão	111
	Referências	113
	Anexos	145
	Anexo 1	146
	Anexo 2.....	147

1.Introdução

Grupos de pesquisas vêm disponibilizando dados que podem contribuir para a avaliação e uso de moléculas que possuem princípios ativos oriundos da biodiversidade. Com isso, para que a extração e isolamento destes para uma produção em diversos setores possa ser realizada, são necessárias informações seguras para aplicação desejada, seja no meio ambiente ou mesmo para consumo humano como um cosmético ou fármaco (SANTOS, 2016 ; GANESAN; CHOI, 2016).

É constatado por dados científicos que as plantas apresentam um mecanismo de defesa contra o ambiente no qual é inserida, e também possui seu próprio metabolismo. Ao investigarmos os compostos originados do metabolismo das plantas, podemos observar propriedades como antimicrobiana, antioxidantes e outros. Estes compostos originados do metabolismo da planta podem ser uma alternativa ao uso de matéria prima sintética por serem naturais e possuírem não apenas um potencial ecológico, mas também propriedades que fornecem a demanda de qualidade e para obtenção do produto final em diversos ramos desde a agricultura a biomedicina, (ALMEIDA, 2017, BATISTA et al, 2021).

São observados dois tipos de metabolismo nas plantas: o primário, e o secundário. O primário considerado o responsável direto a produção dos compostos comuns em todas as plantas como hidratos de carbono e clorofilas (VAN GROENIGEN et al, 2015) essenciais à sobrevivência da planta, ou seja, que está ligado diretamente à fotossíntese, e responsáveis pela síntese de carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. (ALMEIDA, 2017; REZENDE et al., 2016).

O metabolismo secundário possui um importante papel no ciclo que envolve a relação entre a planta e o ambiente onde ela se encontra. Esse meio vegetal produz substâncias que são utilizadas pelo vegetal como defesa, com produção de compostos antioxidantes, antimicrobianos, repelentes, entre outras. Quando estas substâncias são isoladas e aplicadas em seres humanos suas características podem atuar de forma medicinal, sendo necessário antes serem avaliadas por meio de ensaios como composição, via de administração, dose, efeito e toxicidade, para que possam ser consideradas como uma opção terapêutica ou mesmo para outros fins de aplicação (REZENDE et al., 2016). Dentre os compostos relacionados ao metabolismo secundário das plantas estão os óleos essenciais, com propriedades fungicidas, antioxidantes, entre outras já relatadas na literatura (FERREIRA et al, 2020).

Os óleos essenciais, produzidos por plantas conhecidas, em concentrações baixas ou elevadas na sua composição (MENDES et al., 2017; BERMÚDEZ, 2019) tendem a ser utilizados principalmente pelas indústrias farmacêutica e cosmética que são as mais envolvidas na fabricação de produtos que englobam uma cadeia de produtos orgânicos que concentra desde o produtor no campo até o consumidor final (ALMEIDA, 2017).

Associar produtos naturais com a nanotecnologia pode promover benefícios em diversas áreas como agricultura, medicina e outros, como por exemplo, utilizar princípios ativos em menor concentração, mas, promovendo o mesmo efeito (SILVA, 2015).

Carbon dots, ou pontos de carbono (DOTS), possuem algumas características que as tornam vantajosas do ponto de vista da aplicação, tais como: estabilidade química, baixa toxicidade, baixo risco ambiental, biocompatibilidade, fácil preparação, solubilidade aquosa e fácil modificação, proporcionando assim seu uso em bioimagem, sensores ópticos, dispositivos fotoelétricos e outros (EWEN, 2018).

O emprego de moléculas antioxidantes, como suporte em terapia, na clínica, tem sido muito utilizado na atualidade. Os “antioxidantes”, são substâncias como, vitaminas, minerais, pigmentos naturais, compostos vegetais, enzimas, e outros, que são responsáveis pela proteção de danos provocados por radicais livres (RL), (BUCIOLI et al, 2019). Vale ressaltar que o excesso de RL neutraliza as defesas naturais do organismo que são compostas de enzimas: Glutation-Peroxidase (que necessita do Selênio), Catalase, Metionina-Redutase e Superóxido Dismutase (há vários tipos, e os 2 principais necessitam de Zinco, Cobre e Manganês), os quais combatem, no organismo, os seguintes Radicais Livres: Peróxido de Hidrogênio, Superóxido, Oxigênio Single, Íon Hidroxila, Óxido Nítrico e Óxido Nitroso respectivamente (BARBOSA et al, 2010).

O objetivo desta tese é avaliar o potencial da nanotecnologia para que, por meio de processo técnico científico, seja possível funcionalizar partícula de carbon dots com óleos essenciais (*Eugenia caryophyllus* cravo da india, *Citrus sinensis* laranja e *Cymbopogon winterianus* de citronela) para obter as mesmas propriedades requeridas como antifúngicas, bactericidas, antioxidantes, estabilidade das formulações por caracterização ópticas e outros, para utilização como produto de mercado com menor concentração, elevada eficácia e futuras aplicações, sem danos ambientais, podendo obter um produto atóxico ou com toxicidade aceitável bem como uma estabilidade por um período máximo desejado em temperatura ambiente. Avaliar o potencial antioxidante das formulações desenvolvidas, em Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante utilizando ensaio *in vivo*, um modelo alternativo.

2. Justificativa

Diante da escassez de matéria prima para aplicação em diversos setores, como a indústria têxtil, farmacêutica, agro, construção civil e biomedicina, o uso de tecnologias que venham a contribuir com a expansão destes setores, através da aplicação de produtos que minimizem os impactos ambientais para sua obtenção, é de extrema importância. Uma nova formulação, que possua todas as propriedades dos produtos já existentes no mercado, aliada ao estudo com produtos de origem natural, pode contribuir para a descoberta de novos compostos para suprir a demanda já relatada no texto, visando com isso à sustentabilidade econômica, ambiental e menos efeitos adversos ou colaterais para o organismo humano por meio do uso de sistemas nanoestruturado (DAUDT et al, 2013).

Com o avanço da nanotecnologia voltado para nanomedicina, à ideia de desenvolver uma nanopartícula utilizando um carreador atóxico, como os carbon-dots funcionalizados com óleos essenciais, podem proporcionar benefícios como avanços em tratamentos médicos, elaboração de possíveis novos fármacos ou, até mesmo, outras aplicações, em diversos setores como agricultura, cosméticos e outros que possam surgir tendo como base os resultados obtidos no estudo.

A obtenção de uma nanopartícula de carbon dots funcionalizada com óleos essenciais de cravo, citronela e laranja para obter estabilidade química, biocompatibilidade, solubilidade aquosa, atoxicidade e elevada atividade antioxidante, são as evidências geradas neste estudo. E para avaliar as formulações desenvolvidas, que demonstrem se os parâmetros, citados anteriormente, validam o produto, realizou-se a caracterização com os ensaios que permitam investigar todos esses possíveis parâmetros de estabilidade, composição, morfologia e outros, como também a realização de avaliação biológica por meio de ensaio *in vivo*, utilizando um modelo alternativo, promovendo uma triagem para novos ensaios de futuras aplicações.

3. Referencial teórico

3.1 Produtos naturais

Aprofundando um pouco na história é possível identificar que, o homem, sempre buscou detectar princípios ativos em vegetais, e extração de plantas como remédios para a cura de doenças (FRANÇA et al., 2008, LARA, 2019).

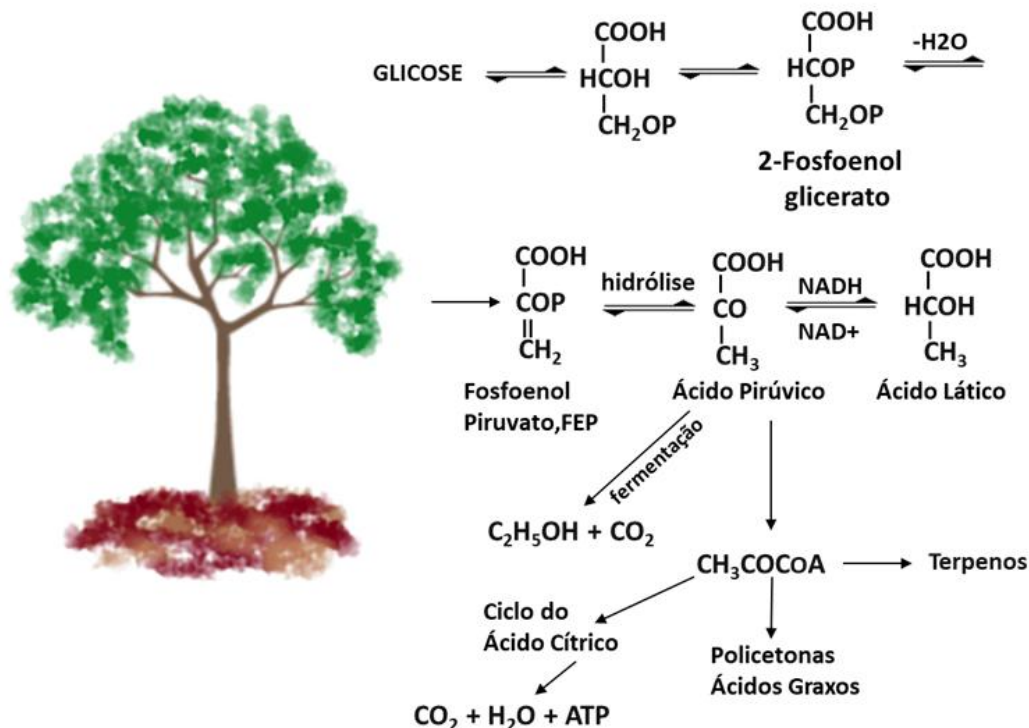
Partindo destas descobertas, a ciência demonstrou um olhar investigativo para os recursos da biodiversidade voltados aos tratamentos de doenças com base no conhecimento do senso comum e cultural da humanidade (MENDES et al, 2018).

Para compreender as propriedades, e mecanismo de ação, das substâncias presentes nos produtos naturais, pesquisas foram aplicadas para que fosse possível isolar estes compostos ainda no século XIX, considerados o marco inicial dos trabalhos voltados para extração e caracterização dos compostos de origem natural (ALMEIDA, 2017).

Sabe-se que as plantas produzem substâncias que exercem funções de proteção contra predadores e patógenos. Neste contexto, a ciência vem ampliando os estudos com o intuito de explorar suas propriedades para aplicações principalmente nas áreas de farmácia, cosmética, alimentícia e agricultura (DRAWANZ et al, 2020).

Os metabólitos produzidos pelas plantas são divididos em dois grupos, o metabólito primário e secundário, onde o primeiro é responsável pelo processo de fotossíntese, desenvolvimento da adenosina trifosfato (ATP), sacarose, amido, formação de ácidos carboxílicos do ciclo de Krebs, α - aminoácidos, ácido graxo, proteínas e ácidos nucleicos, e neste metabolismo a função estrutural é de armazenamento de energia e respiração (ALMEIDA, 2017). A **Figura 1** representa o metabólito primário das plantas.

Figura 1: Processos envolvidos no metabólito primário produzido pelas plantas.



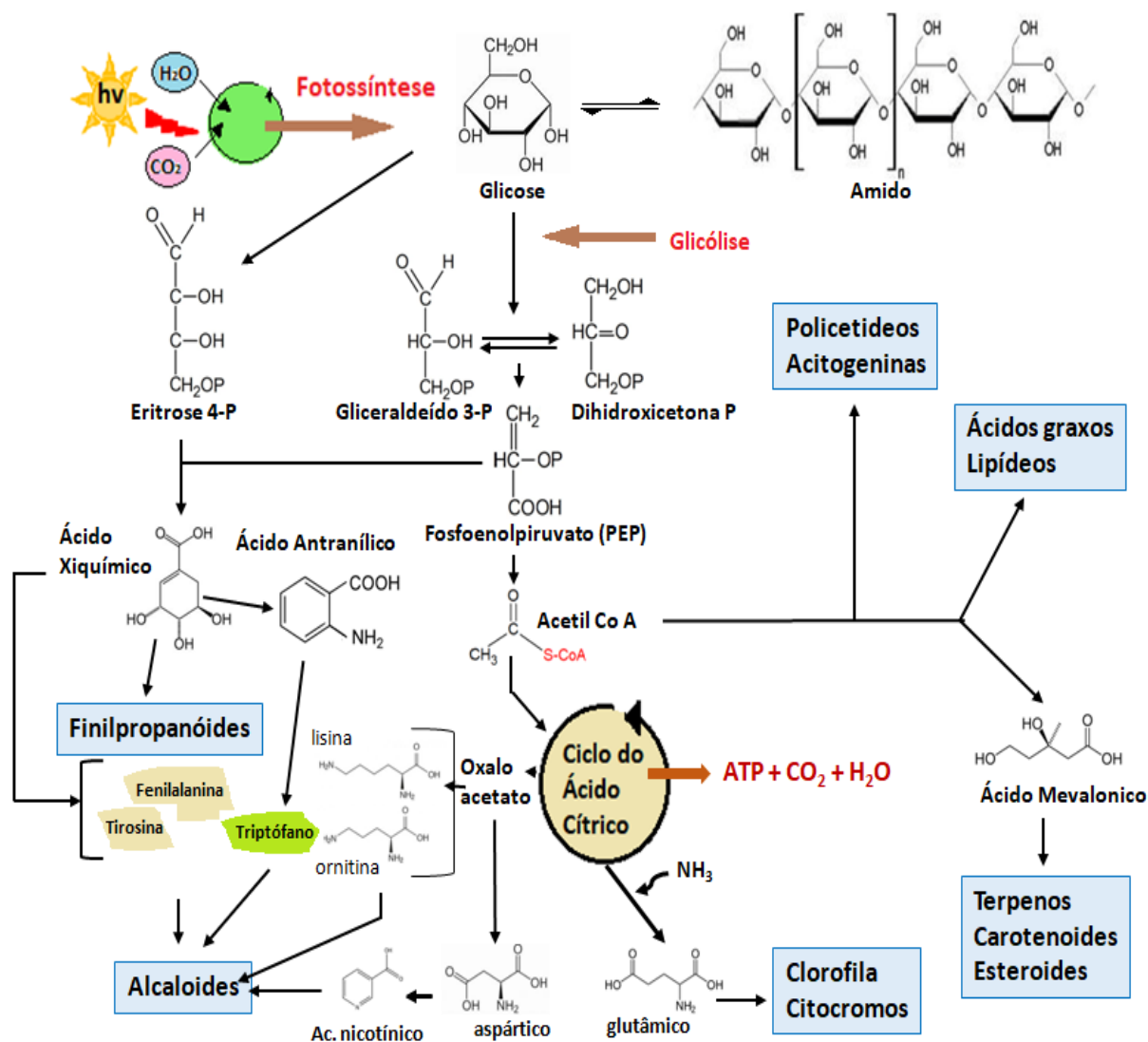
Fonte: Adaptado de ALMEIDA (2017).

O metabólito secundário é responsável pela sobrevivência e competição de existência no ambiente onde a planta se encontra, onde ocorre a elaboração de substâncias utilizadas no contra-ataque à patógenos, e estas possuem relação com o crescimento e desenvolvimento da planta (ALMEIDA, 2017).

Estudos mostram que as plantas medicinais produzem este metabólito em situação extrema de estresse, e outras condições também associadas, tais como: infecções, fermentos, radiações UV, quando são detectados os principais compostos antipatogênicos (CALIXTO, 2022).

As substâncias que são obtidas no metabólito secundário encontram-se divididas em três classes: terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos, e suas atividades farmacológicas são bastante exploradas na indústria como potencial agente terapêutico (Pal et al., 2014). Na **Figura 2** é possível observar a reação de formação das classes citadas.

Figura 2: Formação das classes de metabólitos secundários (alcalóides, terpenos e fenilpropanóides) originários do metabólito primário das plantas.



Fonte: Adaptado de ALMEIDA (2017).

3.2 Óleos essenciais

Tendo em sua composição química diversos componentes, os óleos essenciais possuem derivados de fenilpropanoides e de terpenoides, sendo os últimos os que se encontram em maior predominância (SIMÕES e SPITZER, 2007). Estes elementos são compostos de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre, em diferentes concentrações (MAFRA, 2014). No geral 2 ou 3 componentes principais, são classificados como majoritários, e são os responsáveis pela determinação de suas propriedades biológicas (MAFRA, 2014).

As evidências reportadas na literatura em relação aos óleos essenciais mostram que eles possuem características de substâncias líquidas voláteis, aromas intensos e agradáveis, estão presentes em espécies vegetais, e sua obtenção se dá principalmente utilizando protocolo de arraste com vapor d'água, bem como o de hidrodestilação (ROTHE, 1947; GUENTHER, 1948; SHREVE e BRINK Jr., 1980; POVH *et al.*, 2001).

Sendo a natureza sua fonte de aquisição, os óleos essenciais exercem um papel extraordinário na proteção das plantas atuando como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e até mesmo contra os herbívoros, que se alimentam de tais plantas. Também possui poder de atrair alguns insetos para favorecer a dispersão do pólen e das sementes, ou repelir outros tantos insetos indesejáveis (BAKKALI *et al* 2008).

Uma classificação para os óleos, que podem ser chamados de óleos voláteis, são os óleos etéreos ou essenciais. Esta nomenclatura possui como características físico-químicas, a aparência líquida em temperatura ambiente, e a volatilidade, consideradas suas principais características. São diferentes dos óleos fixos, que são considerados misturas de substâncias lipídicas, e são obtidos, comumente, de sementes (MAFRA, 2014).

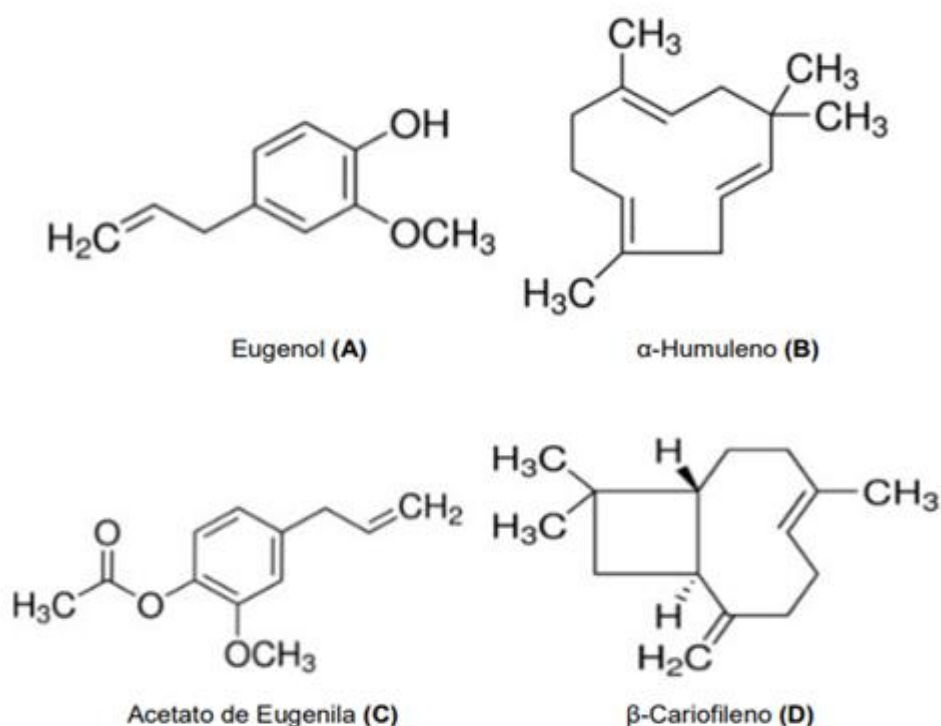
Estudos relatam que a composição química dos óleos essenciais pode apresentar alteração, dependendo do método de extração, associada às condições de operação, tais como, aumento de temperatura e pressão, que podem ocasionar a quebra, e a oxidação, de moléculas do princípio ativo de algum componente do óleo, intervindo na qualidade final e podendo comprometer suas propriedades químicas e físicas, afetando assim os efeitos da aplicação biológica (POVH *et al.*, 2001; SIMÕES e SPITZER, 2003).

3.2.1 Óleo de *Eugenia caryophyllus* cravo da Índia

O cravo da Índia (*Eugenia caryophyllus*) componente da família das mirtáceas (*Myrtaceae*) é uma planta de porte arbóreo que pode atingir, aproximadamente, cerca de 10 metros de altura. Esta planta vem despertando interesse em grupos de pesquisas por apresentar propriedades terapêuticas como analgésica, higiene bucal, nematocida, antiviral e fungicida (MARTINS, CORTEZ, FELIPE, 2008), na cultura popular, para tratamento de doenças na medicina humana (MOTTIN 2019).

Os óleos essenciais são constituídos por uma combinação de componentes, e no óleo de cravo-da-Índia, o que majoritário é o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), com concentração de 76,8 a 95%, sendo os demais elementos fenólicos presentes numa quantidade mínima a exemplo do β -cariofileno (17,4%), o α -humuleno (2,1%) e o acetato de eugenila (1,2%) (CHAIIEB *et al*, 2007), e as estruturas químicas destes estão representadas na **Figura 3**.

Figura 3: Representação da estrutura química dos principais componentes presentes no Óleo Essencial de Cravo-da-Índia.



Fonte: SANTOLIN, (2019).

O óleo de cravo está presente nos botões florais secos, nas folhas, nos frutos e em outras partes, mas o óleo essencial obtido das folhas contém 95% de eugenol, (75% - 87%) (TEXEIRA, 2017).

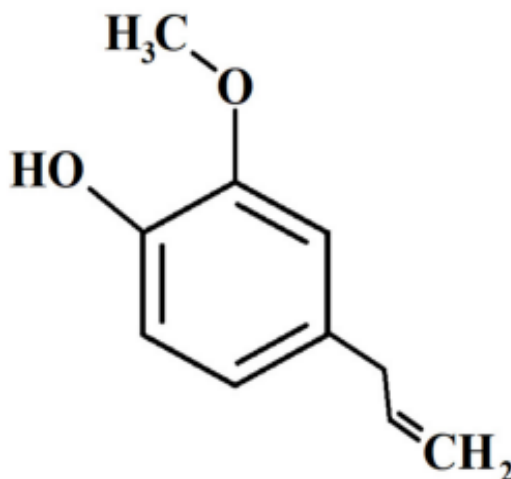
A literatura reporta que o óleo de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) possui substâncias aromatizantes naturais usados nos alimentos e produtos cosméticos, como também propriedades de atividades antimicrobianas, bactericidas, antifúngicas, antinematóides, atividades pró-oxidante e antioxidante devido à presença de compostos bioativos, como sesquiterpenos e triterpenos (MULLA *et al.*, 2017). Os sesquiterpenos são classificados como uma classe de substâncias que possui, em sua estrutura, três unidades de isopreno, que são compostos coconstituídos por uma estrutura molecular contendo cinco átomos de carbonos em seu esqueleto (Souza *et al.*, 2021).

O composto triterpeno é oriundo de metabólitos secundários e faz parte da classe química denominada de terpenos, e essa substância pode ser produzida por reações com ácido mevalônico (presente no citoplasma), como também com piruvato e 3-fosfoglicerato (presente nos plastídios, que são organelas celulares de células vegetais responsáveis pela fotossíntese, síntese de aminoácidos e ácidos graxos), e a grande maioria deste composto está presente em vegetais, e também é detectado em organismos como fungos e bactérias, sendo a característica química do triterpeno a presença de cadeia com seis unidades de isopreno, totalizando 30 átomos de carbono (SILVA *et al.*, 2020). Análises apresentaram atividades biológicas satisfatórias como anti-inflamatória, antioxidante, antialérgico e antimicrobiana, como também uma representativa porcentagem de seletividade anticancerígena (QING *et al.*, 2017).

3.2.1.1 Eugenol

Dentre os componentes majoritários presentes na composição do óleo de cravo, o que se destaca é o eugenol, com potencial antibactericida oral, como relatado na literatura (MILADI et al., 2017). O registro da primeira vez que esta molécula foi isolada é datado de 1929, quando foi considerado como composto de volatilidade elevada, sendo sua produção industrial iniciada em 1940 nos Estados Unidos para diversas aplicações no setor industrial farmacêutico, alimentício, agrícola e cosmético (MARCHESE et al, 2017; KAUFMAN, 2015). A **Figura 4** apresenta a estrutura química do eugenol.

Figura 4: Estrutura química do Eugenol.



Fonte: ULANOWSKA, (2021).

Estudos demonstraram que o eugenol possui baixa estabilidade química e é considerado sensível a processo de oxidação, porém quando administrado por via oral sua absorção é rápida e o seu metabolismo ocorre no fígado. Com isso o uso de carreadores são sugeridos para uma melhora no processo de absorção, solubilidade e elevada atividade deste óleo (MARCHESE et al, 2017).

Em relação à atividade citada no parágrafo anterior, estudos demonstraram que esta molécula tem eficácia como antioxidante, analgésico, antimutagênico, antiplaquetário, bem como algumas características antialérgicas, anti-edema e anti-inflamatórias, sendo bastante utilizada, com resultados satisfatórios, como efeito antimicrobianos no combate de patógenos humanos dos grupos de bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas e fungos e ainda vários parasitas, incluindo *Giardia lamblia*, *Fasciola gigantica* e *Haemonchus contortus*, protegendo também contra hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) (BATIHA et al, 2020). Atualmente está sendo aplicado no setor agrícola no controle de pragas sem degradar as propriedades do solo, sem causar citotoxicidade, genotoxicidade e ecotoxicidade no ciclo agrícola, beneficiando o produto destinado a consumo sem risco

à saúde humana (DA SILVA et al, 2019). É também utilizado na pecuária como carrapaticida (FERREIRA, 2018).

A aplicação como antiviral se deu por ensaio com o vírus herpes, tanto do isolado, quanto no efeito sinérgico, envolvendo outras substâncias, e com isso outras cepas como citomegalovírus humano, citomegalovírus humano murino, hepatite vírus C e influenza-A também apresentaram uma inibição, onde o destaque foi observado no vírus influenza-A cuja inibição ocorreu por meio de ativação de vias de sinalização ERK, p38MAPK e IKK/ NF-κB e antagonização dos efeitos ativadores dessas vias (MAK et al., 2019; SANTANA DE et al., 2021).

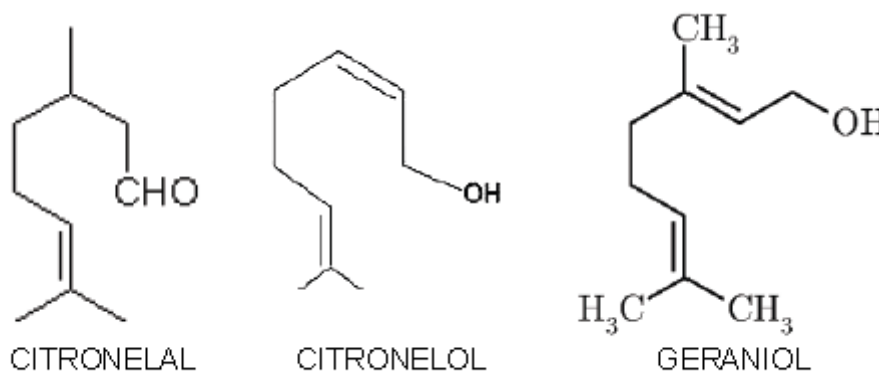
Os estudos que avaliam o potencial do eugenol no tratamento de células de câncer partem do princípio de que, por esta molécula apresentar propriedades antioxidantes, ocorre um ataque na célula de câncer, antecipando uma mutação como pró-oxidante, influenciando vias de sinalização para que ocorra a morte da célula de câncer onde o mecanismo inibe a ativação de NF-κB, regulação negativa da síntese de prostaglandinas, reduzindo assim ativação da ciclooxigenase-2 e induzindo a célula a realizar uma parada na fase S do ciclo, ocorrendo apoptose e diminuindo assim a inflamação e os níveis de citocinas (FATHY et al, 2019).

3.2.2 Óleo de *Cymbopogon winterianus* citronela

A citronela pertence ao gênero *Cymbopogon*, da família Poaceae, podendo ser encontrada nas regiões tropicais e temperada, com origem na Índia. Existem duas espécies em destaque, que são, a *Cymbopogon nardus* var. *lenabatu* (L.) Rendle e *Cymbopogon winterianus* Jowitt sendo o diferencial o teor do elemento denominado citronelal (ANDRADE, 2018).

O óleo de citronela é constituído por várias moléculas, as principais são geraniol (28,62%), citronelal (23,62%) e citronelol (17,10%). A extração, a partir das folhas, fornece uma alta diversidade de moléculas (aldeído citronelal, geraniol, citronelol e ésteres), onde o destaque é o citronelol, por ser aromatizante de ambientes e repelente de insetos, além de apresentar ação antimicrobiana local e acaricida. Justamente o citronelal e o geraniol produzem um aroma rosa floral cítrico, que também são usados em preparações sanitárias (SCHERER et al., 2009; BARUAH et al., 2017). A **Figura 5** abaixo apresenta a estrutura molecular dos componentes do óleo de citronela.

Figura 5: Estrutura molecular dos compostos majoritários presentes no óleo de citronela.



Fonte: LEITE, (2012).

Estudos da aplicação deste óleo como inseticida mostram eficácia contra *Frankliniella Schultzzei*, um inseto polífago presente em culturas como: amendoimzeiro, girassol, melancia, soja e plantas daninhas como a denominada de falsa serralha (LIMA, 2000). O óleo de citronela também foi efetivo contra *Myzus persica*, um outro tipo de inseto polífago, cosmopolita, que vive em regiões temperadas que apresenta mais de 400 espécies, habitando mais de 40 famílias de plantas diferentes, considerado como uma praga, de grande impacto econômico, atacando pomares, plantas ornamentais, ou daninhas e tendo destaque nas plantações de tomate, mamão, algodão, batata, pimenta e outros. Isso produz danos não apenas diretos, como indiretos, pois este inseto pode atuar como um vetor potente para mais de 120 fitopatógenos (PEREIRA, 2021), PINHEIRO et al., 2013)

O óleo de citronela também foi aplicado como controle de ectoparasitas de bovinos numa solução de 4% de óleo, e no controle de pragas em plantação de café, como a ferrugem e a cercosporiose, com eficácias de 47,2% e 29,7%, respectivamente (PEREIRA et al., 2012).

Uma série de outras aplicações vem sendo estudadas com o óleo de citronela como antibiótico natural, regenerador da pele em feridas, no caso de queimaduras, enxaqueca, dores localizadas, anti-inflamatório, antioxidante e como sedativo do sistema nervoso, em casos de insônia, hiperatividade, depressão e ansiedade. (FREIRE, 2017).

3.2.2.1 Citronelal

O composto químico *Citronelal* é um monoterpene oriundo do metabolismo secundário das plantas, que é obtido de forma isolada da mistura denominada racêmica ou também de forma sintetizada sob a forma dos enantiômeros R e S (QUINTANS-JUNIOR et al., 2008).

O citronelal tem atividade antimicrobiana, e ação alelopática. Originada do metabolismo secundário vegetal, as substâncias resultantes em destaque, são as fenólicas, terpenos e alcaloides, (SILVA; PINTO, 2017). Também é considerada antioxidante, herbicida e com atividade inseticida e repelente. Na agricultura atua como antimicrobiana na proteção de alimentos contra três importantes bactérias patogênicas, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*. Os estudos apontam ser um potencial fármaco para patógenos humanos (PONTES et al., 2018).

3.2.2.2 Citronelol

Um dos componentes majoritários do óleo de citronela, o Citronelol possui características similares aos outros como antibacteriano, antidepressivo, antisséptico, antiespasmódico, anti-inflamatório, desodorante, diaforético, diurético, febrífugo, fungicida, repelente de insetos, efeito estomacal e estimulante, tônico e vermífugo (QNEIBI, 2019). Este composto é adquirido da citronela como também de diversas espécies de capim-limão (*Cymbopogon*), rico em citronelol, catalogada em aproximadamente 70 plantas, até o momento (LOWRING, 2019).

3.2.2.3 Geraniol

O geraniol são ésteres presentes, em grande número, em óleos essenciais extraídos das plantas aromáticas (MURCIA et al., 2018).

Este componente químico tem grande atividade biológica, suas propriedades são: bactericida, inseticida, anti-inflamatório, espasmolítico, antifúngico, hipoglicêmicos, com habilidade de sanar sangramentos, curar feridas, úlceras e doenças de pele, além de tratar diarreia, disenteria, doenças de pele, depressão, diabetes, cólicas, úlceras gástricas, esterilidade e cálculos urinários (SARAIVA 2018).

Não apenas como atividades farmacológicas, a molécula de geraniol também possui valor industrial, por suas propriedades aromatizantes, muito utilizadas em fragrâncias, imunostimulantes, não irritante e sensibilizante. Nos estudos, até o presente momento, não foram registrados efeitos adversos (ADENUBI et al., 2018).

3.2.3 Óleo de *Citrus sinensis* laranja

Os óleos essenciais retirados de frutas cítricas, como laranja, limão e outros, tem em sua composição uma variedade de substâncias em que 85-99% são compostos voláteis, sendo uma mistura de monoterpenos, sesquiterpenos e sesquiterpenóides como aldeídos, cetonas, ácidos, alcoóis e ésteres (RUIZ; FLOTATS, 2014; FAN et al., 2015; BUSTAMANTE et al., 2016). Esses produtos são bastante utilizados no ramo da perfumaria, cosméticos e farmacêutica, e vem sendo destacado na área de saneantes, limpeza e alimentos (BIZZO et al., 2009).

Podemos evidenciar que o óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis* (L.) é composto de 98% da substância R-limoneno e por ser insaturado este óleo é quimicamente instável, e de fácil processo oxidativo quando exposto a algumas condições de luz, ar ou umidade (GALVÃO et al., 2015).

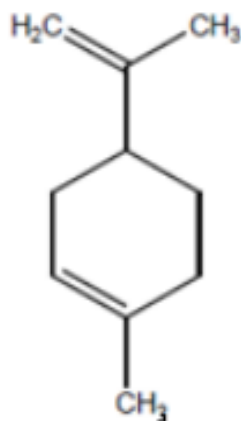
Estudos sugerem que o óleo essencial de laranja tem ação como antianêmico, antibiótico, antisséptico, antidepressivo, anti-inflamatório, bactericida, antireumático e antidisentérico (VENDRUSCOLO et al., 2005). O poder de inibição de bactérias patogênicas foi apenas um dos marcos para evidenciar o efeito terapêutico deste óleo, pois seus constituintes também apresentaram possíveis resultados anticancerígenos e quimiopreventivos, relacionados ao limoneno, com potencial para inibição da proliferação de células de câncer de pulmão e próstata (YANG et al. 2017; KRINGREL, 2019), provavelmente por meio da supressão da COX-2 e IL-6, levando à apoptose das células (JAYAPRAKASHA et al, 2013).

O álcool perílico, que é um monoterpeno oxigenado e está presente em óleos essenciais cítricos, produz efeito clínico satisfatório em pacientes detectados com tumores cerebrais em estágios avançados (CHEN, 2015). Outros relatos de pesquisa com óleo de laranja mostram características de inibir processos de angiogênese, metástase e morte celular em células de câncer de cólon humano (MURTHY, 2012).

3.2.3.1 Limoneno

O limoneno que é o principal constituinte dos óleos essenciais cítrus, está presente na casca da laranja pêra, e tem elevado valor na indústria de cosméticos, na indústria farmacêutica e alimentícia, sendo também geralmente, o componente de ação terapêutica das plantas medicinais (SILVA et al., 2014). Sua fórmula química é $C_{10}H_{16}$ e a estrutura molecular está apresentada na **Figura 6** abaixo.

Figura 6: Estrutura molecular do Limoneno.



Fonte: GOULART, (2018).

Em ensaios farmacológicos, o Limoneno tem apresentado propriedades bactericidas, pois estudos mostraram ação inibitória em cepas de *Escherichia Coli* e *Staphylococcus aureus*, cujo efeito inibitório está relacionado, principalmente, a alteração da permeabilidade, e integridade, da membrana celular bacteriana (TRAJANO et al., 2009).

O limoneno tem sido reconhecido, em destaque, por seu poder terapêutico no tratamento do câncer, com seu potencial quimioterápico, descritos na literatura (YANG et al, 2017).

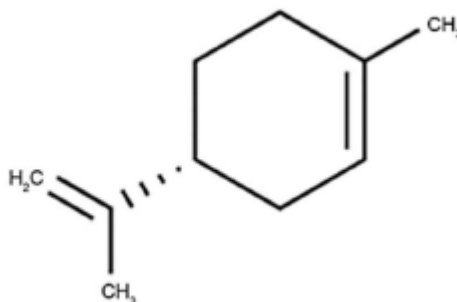
Por serem constituintes dos grupos de monoterpenos, esses compostos possuem como base duas unidades de isopreno ligados, tendo, cada um ligações de carbono (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS-JÚNIOR, 2013), e toda esta estrutura se faz presente em 90% dos óleos essenciais com propriedades farmacológicas relevantes, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antipruriginosa, hipotensora além de atividades analgésicas (BARRETO et al., 2014).

Dentre os monoterpenos, que podemos destacar, e que apresentaram resultados promissores no processo contra inflamação e na aceleração da cicatrização de feridas, está o limoneno e o D-limoneno. (D’ALESSIO et al., 2014).

O D-limoneno foi detectado por ensaios laboratoriais como sendo uma fração oleosa, ultrapura, de fontes de terpeno monocíclico (CORAZZA; RODRIGUES; NOZAKI, 2001). A literatura demonstra ser um isômero mais frequente, e o principal constituinte de óleos essenciais cítricos, com aproximadamente 70 e 96% destes

(MENÉNDEZ et al., 2002). Outras propriedades são o sabor e a fragrância, muito utilizados no setor industrial alimentício, cosmético, de limpeza, pesticidas ecológicos e conservantes alimentícios (VIEIRA et al., 2018). A **Figura 7** apresenta a estrutura molecular do D-limoneno.

Figura 7: Estrutura molecular do D-Limoneno.



Fonte: YU et al, (2017).

O limoneno apresenta propriedades anti-inflamatórias, antidiabética, antioxidante, anticancerígena, antialérgica, antinociceptiva, e atividades anti-estresse, além de efeitos positivos no tratamento de úlcera gástrica, colite, asma e inflamação das vias aéreas, entre outras atividades (VIEIRA et al., 2018). O D-limoneno, além de cicatrização de feridas, tem resultado mediado pelo seu principal metabolito POH (perilil álcool) que possui a capacidade, específica do POH, de diminuir a inflamação e a neoangiogênese, envolvendo um resultado direto nas células epiteliais e assim o D-limoneno torna-se um produto esperançoso no tratamento de feridas (MOTA, 2019).

3.3 Carbon-Dots (DOTS)

O elemento carbono possui presença abundante na natureza, pois além de estarem presentes em todas as moléculas orgânicas das mais diversas formas, como grafite, diamante e o carbono amorfo, como também os nanomateriais compostos de carbono, que são os fulerenos, os nanotubos de carbono e o grafeno (SHARMA et al, 2018).

Como ressaltado anteriormente, a família dos nanocarbonos é constituída pelos fulerenos, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono, nanodiamantes, grafeno e, mais recentemente, pelas Nanopartículas de carbono CNPs (MIRANDA, 2014, BRITO NETA, 2018). Estas Nanopartículas de carbono (CNPs) são as mais recentes classes de nanopartículas (NPs) fluorescentes, as quais geraram um grande interesse devido à afinidade de suas propriedades ópticas com a dos *Quantum Dots* (QDs), possuindo a vantagem de anular a toxicidade dos metais pesados (MIRANDA, 2014 ; BRITO NETA, 2018).

Grupos de pesquisa relatam que os carbon dots (DOTS) classificados como típicos, podem ser avaliados em uma classe de nanomaterial denominada de carbono

0D, que apresenta um tamanho inferior a 20 nm, e consistem em esqueleto de nomenclatura de carbono sp²/sp³ e abundantes grupos funcionais / cadeias poliméricas. (ZHU et al., 2015, TAO, 2017; XU, 2014). Na superfície de grupos /cadeias poliméricas, estão presentes as carboxilas, hidroxilas, aminas e outras, que são responsáveis por originar propriedades de extraordinária solubilidade em água e conformidade, na composição, com demais materiais para que não ocorra a separação de fases (ZHU et al., 2013, JIANG et al., 2016; LI et al., 2019; ZHU et al., 2012).

Baseado em todos os dados da literatura pode-se destacar que os diversos grupos funcionais são responsáveis por os DOTS serem mais espontaneamente modificáveis, com diversas moléculas orgânicas, ou poliméricas (KONG, 2012; LEI et al., 2015), bem como prósperas como os diversos sensores.

O carbono é composto em sua estrutura de um núcleo centrado, incidindo de átomos de carbono sp²/sp³, podendo formar treliça de grafite, ou carbono amorfo (XIA et al., 2019), ao que pode ser conferido diferentes graus de carbonização dos DOTS. Esta estrutura, do denominado esqueleto de carbono covalente, também pode aumentar a estabilidade dos DOTS, o que é considerado criticamente importante para suas diversas aplicações práticas, que vão desde a resistência à decomposição da luz, fotodegradação e além de alto rendimento quântico de fotoluminescência. Sua maior, e melhor, propriedade de destaque, é possuir um menor índice de toxicidade para suas aplicações, dentre elas como carreador de fármaco, ou drug delivery, como também a obtenção, em larga escala, com um menor custo, de aquisição da síntese com seus produtos e sua excelente biocompatibilidade(XIA et al., 2019).

Sendo considerado um grupo de recém-emergidos nanomateriais fluorescentes os DOTS vem mostrando grande potencial como nanomateriais versáteis, utilizados em uma série de aplicações, desde detecção química, biosensoriamento, bioimagem, entrega de fármacos, terapia fotodinâmica (TFD), fotocatalise e eletrocatalise. Os atributos de DOTS são a composição química versátil, que permite a solubilidade e a aplicação em meios fisiológicos (MIRANDA, 2014), a fluorescência sintonizável de emissões, a funcionalização fácil e interação físico-química excelente, bem como a estabilidade fotoquímica (ou não fotobranqueamento), tornando assim mais viável para aplicações técnicas, além de ter baixo custo e facilidade de síntese (YE et al. 2013).

Estas características fazem os DOTS muito desejáveis como alternativas aos pontos quânticos semicondutores, em visualização biológica de sistemas tanto *in vitro* como *in vivo* (MEHTA et al.2014). Com efeito, estas NPs apresentam-se como marcadores biocompatíveis de elevada solubilidade em meio aquoso, possibilitando a utilização de métodos de síntese simples, e moléculas precursoras de baixo custo, na produção destas NPs, o que pode torná-las candidatas ideais para a marcação celular e para aplicações biossensoriais (MIRANDA, 2014).

Os DOTS apresentam baixa toxicidade tanto para células como para animais, como reportam dados na literatura, que demonstraram que DOTS produzidos a partir de polietileno glicol não apresentaram citotoxicidade, mesmo em concentrações de 400 µg mL⁻¹ (FAN et al. 2014). DOTS, recobertos com o antibiótico ciprofloxacino, não apresentaram citotoxicidade em concentrações de até 80 mg mL⁻¹ (THAKUR et al. 2014). Outros grupos de cientistas mostraram que DOTS solúveis em água não apresentaram toxicidade para o peixe zebra (SHI et al. 2014). Contudo, dependendo de sua cobertura, *carbon dots* podem apresentar maior, ou menor, toxicidade, e quando *Carbon dots* foram recobertos com PEI apresentaram maior toxicidade do que *carbon dots* recobertos com PPEI-EI (WANG et al. 2011). Quando recobertos com PEG, *carbon dots* apresentaram menor toxicidade do que PEG sozinho (YANG et al. 2009).

3.4 Funcionalização de partícula

O termo funcionalização de uma partícula é um processo que engloba uma associação de nanopartículas, ou moléculas envolvidas por interações de ligações de Van Der Waals e Dipolo magnético, com objetivo de originar uma estabilidade das suspensões coloidais, fazendo com que não ocorra uma aglomeração de partículas, ou sedimentação, sendo necessária a introdução de forças denominadas repulsivas, que são originadas por mecanismos distintos, sendo eles a estabilização por repulsão eletrostática, ou estérica, podendo mesmo ocorrer, em alguns casos, uma combinação destas repulsões, sendo denominada de eletroestérica (XIYAN, 2021).

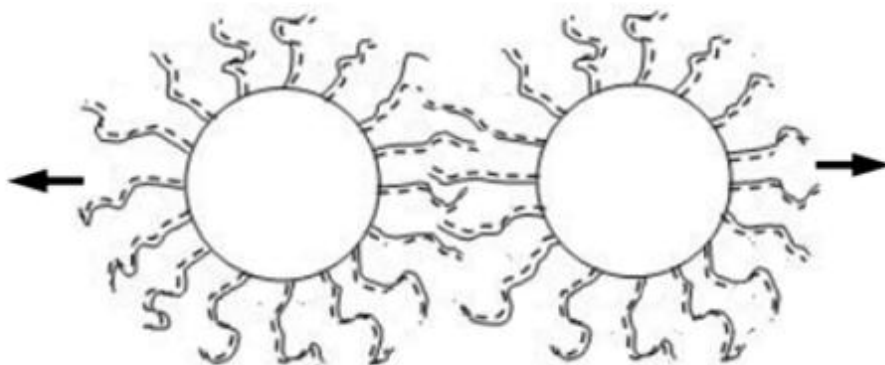
As interações Dipolares, e as forças de Van Der Waals, que também são avaliadas como atrativas, possui um papel fundamental em sistemas de materiais com estruturas em 2D, a exemplo dos carbon dots, que são um tipo de estrutura denominada de heteroestrutura, onde encontram camadas empilhadas, e as forças de Van Der Waals são fundamentais para manter esta estrutura (LI, et al 2020).

Uma das formas de dispersão funcionalizada de partícula é através da estabilidade do sistema, adquirida por força repulsiva eletrostática, onde as interações eletrostáticas tem origem em carga superficial da partícula, ou na sobreposição de uma dupla camada elétrica (ANAND, et al, 2016), como também quando a aglomeração se apresenta expressiva a força de repulsão é mais significativa, podendo estar presente com maior energia na superfície da partícula (GONG, 2012).

Um fenômeno resultante da interação de forças de repulsões, combinadas ,pode vir a ocorrer em sistemas de funcionalização, neste evento a estabilização se destaca sendo originada da repulsão eletroestérica, que é uma combinação entre as repulsões eletrostática e estérica (MORAIS; LIMA, 2006).

A repulsão estérica que também pode ser denominada como estabilização estérica, é um processo que ocorre na formação de uma camada protetora composta de macromoléculas, como os polímeros e oligômeros, que se fixam na superfície da nanopartícula, dificultando a formação do processo de agregação das nanopartículas. Ela pode ser utilizada tanto em fase aquosa quanto orgânica, e suas cadeias, com estruturas longas, são promissoras na espessura da camada protetora e na estabilidade do sistema (ZHIXIONG, et al, 2020). A **Figura 8** ilustra a estabilização estérica em um sistema em que o exemplo pode ser de nanopartículas que são compostas por moléculas de polímeros ou surfactantes em sua superfície.

Figura 8: Representação da estabilização estérica por forças de repulsão estérica.

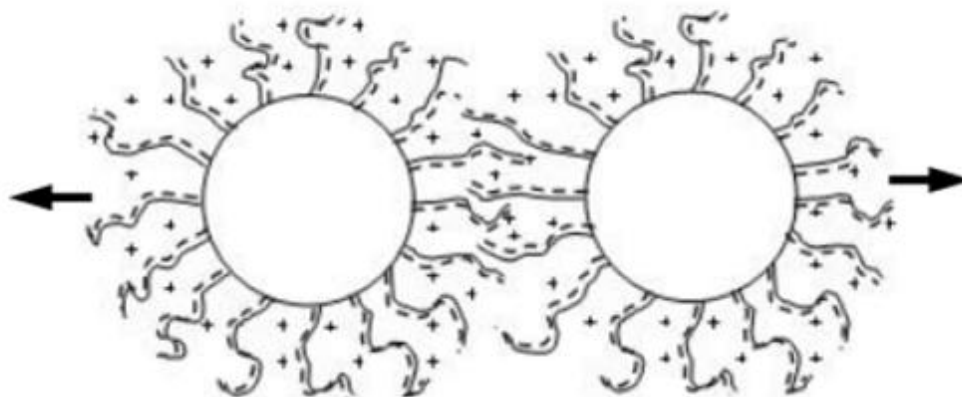


Fonte: ROUCOUX, et al, 2002.

Quando se trata de repulsão eletroestérica ou estabilização, esta é considerada eficaz quando a funcionalização da superfície ocorre com a presença de cargas elétricas. Isso se dá por meio de parâmetros como pH, agrupamento de espécies de eletrólitos presentes, variáveis de propriedades químicas de polímeros, desde sua densidade até peso molecular, como também grupos funcionais presentes na partícula (RUNKANA; SOMASUNDARAN; KAPUR, 2006).

A combinação dos sistemas eletrostática e estérica geradas por meio de surfactantes iônicos, para obter a estabilização eletroestérica, geralmente advém de nanopartículas cuja composição tem presente moléculas de polieletrólitos adsorvidas, ou pequenas moléculas de grupos multifuncionais como carboxilatos, tióis, fosfatos e aminos, que tendem a promover a formação de ligações químicas com átomos metálicos na superfície da nanopartícula (LAURENT, et al 2008). Na **Figura 9** é possível identificar o processo de estabilização, onde a região polar considerada dos elementos responsáveis por estabilizar o sistema, realiza uma dupla camada elétrica e a outra região classificada lipofílica realiza a repulsão estérica.

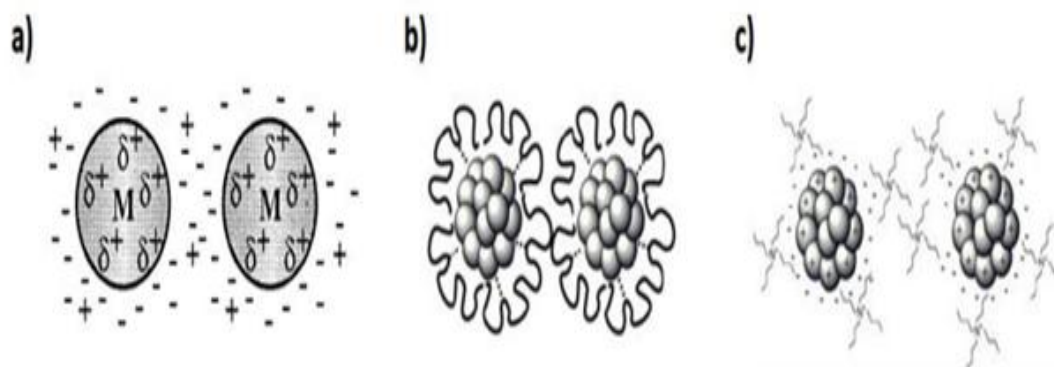
Figura 9: Reprodução do mecanismo de estabilização eletroestérico.



Fonte: ROUCOUX, et al, 2002.

O processo de funcionalização de partículas tende a formar bicamadas no sistema, e a obtenção destas é realizada em duas etapas, onde um ácido graxo pode ser o marco inicial na camada primária, e na secundária pode se repetir o mesmo elemento ou polímero, com isso estudos demonstram que a cobertura, quando envolve uma partícula, esta impede o descontrole da fase de crescimento e, conseqüentemente, a coalescência da mesma (ZHOU; BURKE, 2017). A **Figura 10** abaixo demonstra um esquema da estabilização dos três tipos de mecanismos já descritos: a) eletrostática; b) estérica e c) eletroestérica.

Figura 10: Representação dos três mecanismos de estabilização em sistema de funcionalização de partículas.



Fonte: AIKEN, 1999.

3.5 Antioxidantes

Compostos antioxidantes possuem uma diversidade de aplicações nos mais distintos setores da economia, como alimentação, medicina, construção e combustíveis, podendo ser destaque em etapas de processos específicos de produção que vão desde o tratamento da matéria prima, a embalagem, o armazenamento e o transporte, evidenciando assim uma redução, e prevenção, da degradação pelo processo de oxidação dos materiais. A ausência de atividade antioxidante pode gerar dificuldades na qualidade e no tempo de armazenamento de produtos. (MAGALHÃES, 2018).

Existe a busca pela substituição dos antioxidantes considerados fósseis, pelos naturais, não apenas pelo fato do impacto ambiental, mas pela possibilidade de utilizar um componente natural, que seja considerado seguro e renovável (CALEJA et al, 2017).

Antioxidantes são as moléculas responsáveis por bloquear o processo de oxidação, ou impedir que radicais livres comprometam as células, proporcionando assim uma recuperação da estrutura química estável (DE OLIVEIRA et al, 2021).

É fundamental a avaliação precisa das propriedades antioxidantes de novos compostos, utilizando protocolos validados, O método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é empregado em estudos de compostos com esta aplicação, pois requer um tempo relativamente mínimo na realização, quando comparado com outros protocolos, que visam mensuração do consumo de radicais livres para avaliação do efeito da atividade antioxidante de diferentes compostos (OLIVEIRA et al, 2019).

3.6 Sequestro do Radical Livre DPPH

A **Figura 11** apresenta um esquema que ilustra o método de avaliação de atividade antioxidante de novos compostos por meio da captura de DPPH. No início da reação a solução, rica em DPPH, com coloração púrpura, é utilizada para identificar doadores de hidrogênio e compostos fenólicos presentes em determinados elementos (ROGINSKY E LISSI, 2005) e, quando a reação acontece, o DPPH, reduzido obtido de

coloração amarelada, comprova todo o consumo da molécula de DPPH (OLIVEIRA, 2021).

Figura 11: Reação de consumo de DPPH.



Fonte: OLIVEIRA, (2021).

3.7 Modelo *in vivo*

Baseado na crescente demanda de pesquisas em todas as vertentes, seja na biomedicina, na tecnologia, na agricultura ou outros, a procura por ensaios com modelos animais vem aumentando nos últimos anos. Um problema em suprir esta necessidade gerou um ramo da pesquisa que desenvolve modelos alternativos, que possam ser capazes de suprir os mesmos parâmetros, de forma mais barata no cultivo, com escala de produção maior e que atenda a um maior número de parâmetros possíveis num mesmo modelo.

Para que ocorra a etapa classificada como ensaio clínico na pesquisa é necessário um modelo animal ou modelo *in vivo*, termo este bastante usado no meio científico como parte de um protocolo para avaliações toxicológicas e demais parâmetros necessários dentre eles, comportamento, dose e efeito de um composto, ou molécula. Diante de toda esta expectativa para que as perguntas biológicas sejam respondidas num mesmo modelo, ou pelo menos grande partes dela, pesquisas têm sido intensificadas na aplicação de técnicas biomédicas, veterinárias e biológicas cujo foco principal é o desenvolvimento de fármacos para que cada vez mais grupos de pesquisadores se aprofundem nos estudos deste ramo (CLAVIJO-GIRALDO et al, 2016).

Visto que uma redução no emprego de modelos animais em áreas biomédicas está diretamente relacionada ao desenvolvimento de técnicas que tendam a ser mais proveitosas, a associação da área tecnologia e da ética tem se mostrado a favor da substituição do modelo animal em atividades acadêmicas (FEIJÓ et al., 2010). Isso mostra que a academia desperta, desde já, questionamentos para resoluções de grandes problemas futuros, quando indicam pontos positivos para o uso de métodos alternativos. A qualidade na educação teve ênfase no recorte da pesquisa, assim como a possibilidade de substituição do animal em pesquisas (FURLAN, 2020).

Sendo fato, a nível internacional, a procura por métodos alternativos de modelos experimentais, com intuito de pesquisa, atividades vêm se destacando por possuir uma maior maturidade do meio acadêmico, e do setor industrial norte-americano

e europeu, com relação à aplicação do princípio dos 3R no uso de animais como modelos experimentais, com vias a favorecer a substituição (FURLAN, 2020). Esta teoria dos “três Rs”⁷ – replacement (substituição), reduction (redução) e refinement (refinamento) enfatiza que o uso consciente dos animais, sempre deve ser levada em conta, racionalizando e reduzindo o uso de animais, no intuito de preservar o bem-estar do ser vivo (GODOI, 2018).

Dentre os modelos alternativos, algumas pesquisas já vêm apresentando destaque para um inseto em especial, que são as Larvas de *Zophobas morio*, conhecido como Tenebrio Gigante, um besouro. Essas larvas têm sido usadas para realização de pesquisas com uma particularidade em relação a outros animais como ratos, camundongos e zebrafish, eles demandam instalações complexas e podem ser cultivados em grandes quantidades, favorecendo assim um número elevado de indivíduos para avaliar vários parâmetros ao mesmo tempo, além da facilidade do manejo alimentar (CLAVIJO-GIRALDO, 2016).

3.7.1 Larvas de *Zophobas morio* Tenebrio Gigante

O modelo experimental utilizado neste estudo foi as Larvas de um besouro, *Zophobas morio* conhecido como Tenebrio Gigante. Baseado neste modelo, podemos realizar um comparativo no que diz respeito à utilização de larvas na pesquisa com outros modelos já bem utilizados por outros grupos.

As Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, possuem algumas características como tamanho bem maior, quando comparadas com as larvas, também conhecidas na literatura, de *Tenebrio molitor*, proporcionando extração de uma quantidade mais significativa da hemolinfa, que é a matéria prima primordial para efetivação dos ensaios (CANTERI DE SOUZA et al, 2018; VIGNERON et al, 2019).

As larvas desta espécie de besouro, *Zophobas morio*, são de uma distribuição geográfica espaçosa, pois são bastante adaptados a diferentes habitats, principalmente os modificados por seres humanos. Este modelo é da ordem Coleoptera, sendo um inseto holometábolo e, portanto, sua metamorfose é composta por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. Ainda é popularmente nomeado como “bicho da farinha” (COSTA, 2018). A **Figura 12** apresenta as fases do modelo de Larva de *Zophobas morio*.

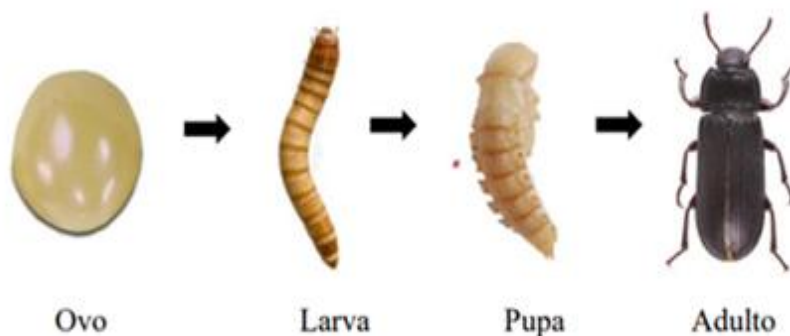
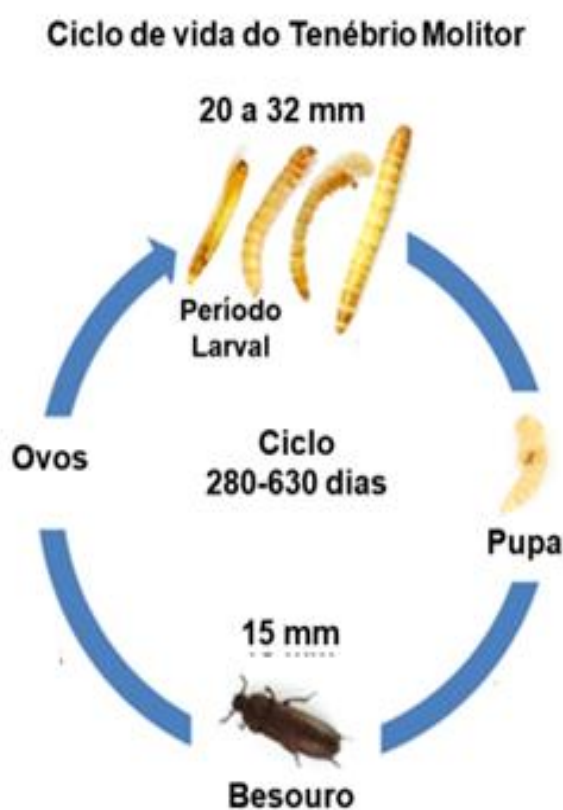


Figura 12: Ciclo de vida da Larva de *Zophobas morio*.

Fonte: CASTRO et al, (2021).

O ciclo deste modelo de Larva de *Zophobas morio* vai do ovo até a fase adulta, as larvas chegam a atingir, aproximadamente, 4,0 cm de comprimento, tem coloração amarelada e manchas em forma de anéis, com coloração mais escura, por todo o corpo. As pupas imaturas possuem coloração amarelada e, conforme vão se desenvolvendo, a coloração vai adquirindo tons mais escuros, principalmente na região cefálica. Quando adultos, a coloração negra é bem característica, e já se encontram totalmente desenvolvidos, com um tamanho de 2,5 cm, e todo este ciclo se completa em torno de 06 meses, em condições favoráveis. A **Figura 13** mostra o ciclo de vida do *Tenebrio Molitor* (HAINES, 1991), que é ciclo semelhante ao *Zophobas morio*.

Figura 13: Ciclo de vida completo do *Tenébrio Molitor*.



Fonte: ARCANJO, (2020).

Este novo modelo experimental, com essas larvas, vem despertando interesse na comunidade científica, pois, estudos apontam que se mostrou eficiente, em ensaios, onde foi avaliado como hospedeiro alternativo para examinar infecções fúngicas. Essas infecções possuem mecanismo de defesa na produção de antimicrobianos (JOHNSTON et al., 2014), produzem tenecinas que atuam como antimicrobiano contra *Candida albicans*, e contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (LEE et al., 1999; KIM et al., 2001; CHAE et al., 2012; ROH et al., 2009).

Em outros estudos, este modelo foi utilizado para promover a decomposição biológica do poliestireno expandido (EPS, do inglês expanded polystyrene). Este material é um plástico, com elevada resistência, sendo resultado da reação de uma polimerização do estireno em água tendo em sua estrutura, o pentano, hidrocarboneto

que, por reação fotoquímica de raios solares, tem uma fácil desintegração, tendo como resultado uma expansão do material (COSTA, 2018). Dentro do trato digestivo das Larvas de *Zophobas morio*, ocorre a biodegradação, que transforma o EPS, gerando também dióxido de carbono e fragmentos (Yang et al., 2015).

Outros autores também certificaram que, este modelo experimental, em Larvas de *Zophobas morio*, usado na biodegradação do EPS, com o isolamento de bactérias, com avaliação de alguns parâmetros laboratoriais como turbidez, caracterização das bactérias, TSI ágar etc., mostrou uma redução significativa do EPS (TANG et al, 2017).

O *Zophobas morio* evidenciou em estudos a presença, de um sistema de defesa antioxidante, com capacidade para neutralizar espécies reativas presentes em elevadas concentrações (DE SOUZA et al., 2015). E por este modelo apresentar um sistema compostos com enzimas antioxidantes e desintoxicantes como superóxido dismutase, peroxidases, catalases, tirosinase, acetilcolinesterase, carboxilesterase e glutathione S-transferase (LI et al., 2016) o estudo destas substâncias, considerando ser um organismo multicelular apresenta vantagens, pois avalia a toxicidade do agente antioxidante (ZHU et al., 2014; NASCIMENTO DA SILVA et al., 2016).

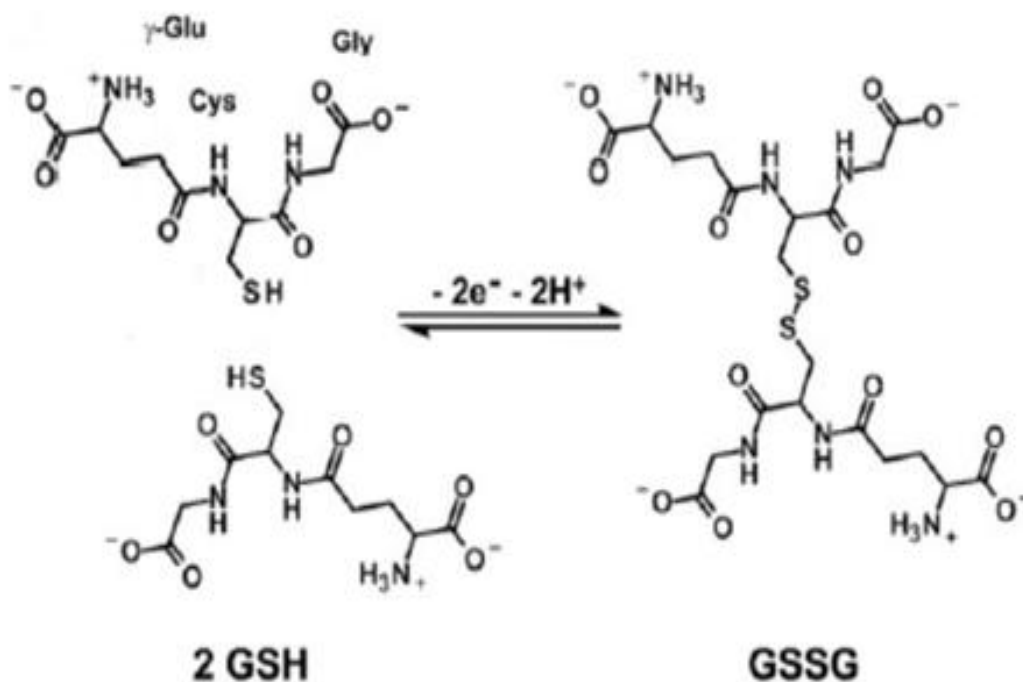
Utilizar invertebrados para esta finalidade já esta bem descrita como o *Caenorhabditis elegans*, e com toda a facilidade e vantagens de uso de insetos como manuseio, inoculação direta do antioxidante diretamente na larva (ZHANG et al., 2016; WANG et al., 2016).

3.8 Grupos sulfidril não proteicos reduzidos - Glutathione Reduzida (GSH)

Sendo a Glutathione Reduzida (GSH) componente do grupo sulfidril, não proteico reduzido, esta proteína está diretamente relacionada a um sistema de defesa antioxidante, denominado não enzimático, que também é composto pela glutathione oxidada (GSSG). Dados da literatura comprovam que a proteína GSH é considerada o grupo tiol com maior prevalência no organismo humano, sendo um tripeptídeo sintetizado no citosol por dois trifosfatos de adenosina, por meio de uma reação enzimática (OESTREICHER; MORGAN 2019). Ela possui características tão particulares que é uma das poucas que participa do processo de equilíbrio de espécies reativas, através da doação de prótons H^+ derivados de Nicotinamida Adenina dinucleotídeo Fosfato no estado reduzido (NADPH), em reação catalisada pela glutathione reductase, sendo responsável por realizar, também, a detoxificação de xenobióticos prejudiciais ao organismo, que são oriundos do produto lipoperoxidação, assim como atua como substrato da enzima Glutathione Peroxidase (GPx), para sua conversão em GSSG (CRUZAT, 2017; MARI et al., 2020).

Toda a estrutura molecular da GSH pode ser visualizada nas células quando ela está em estado livre, ou ligada a proteínas. Geralmente, em sua maioria, encontra-se na forma reduzida, quando dispõe de artifícios para ser convertida a oxidada, ao longo do processo de estresse oxidativo, sendo este estado denominado redox e depende da quantidade relativa das formas, reduzida e oxidada, da GSH/GSSG que são consideradas fator primordial para a célula (HERMES et al, 2013). A reação está esquematizada na **Figura 14**.

Figura 14: Fórmula estrutural da molécula de Glutathiona reduzida, GSH, e glutathiona oxidada, GSSG.



Fonte: DEPONTE, (2013).

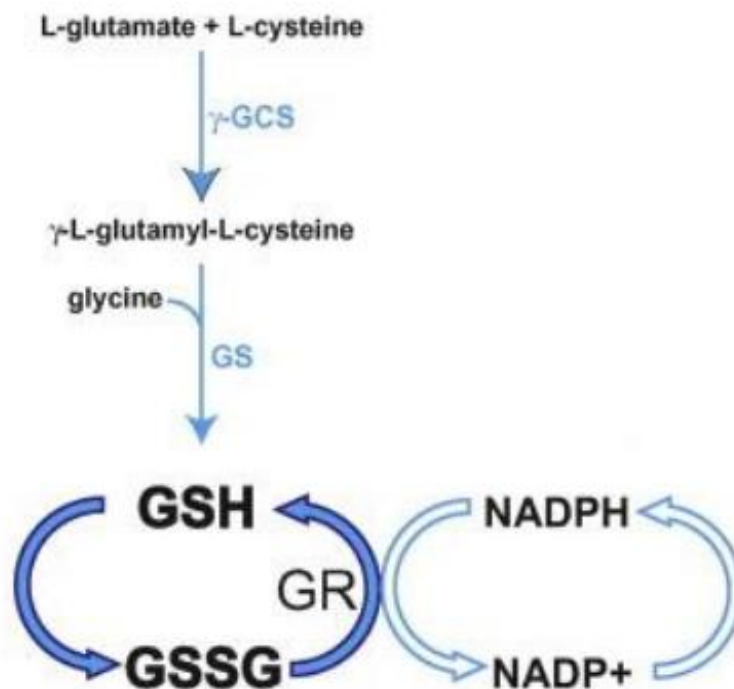
A conversão de GSSG se dá em um processo em que a glutathiona reduzida promove a proliferação celular, seguida de uma resposta imune do cultivo de leucócitos, prostaglandinas e acionamento da GPx que oferece seu grupamento $-\text{SH}$, para a formação da reação, e o resultado é a obtenção da GSSG que auxilia no processo de eliminação de H_2O_2 (YOUNG et al., 2019).

O processo de REDOX celular é calculado pela razão entre GSH/GSSG, onde a GSSG pode ser revertida a GSH pela reação catalisada pela glutathiona redudase (GR), gerando assim um parâmetro de indicador de estresse oxidativo celular (CALABRESE; MORGAN; RIEMER, 2017).

Sendo a GSH considerada um antioxidante mais concentrado, em um sistema de combate aos radicais livres, também é responsável por atuar na recuperação celular, bem como na erradicação de toxinas. Sua síntese é realizada, excepcionalmente, no citosol, podendo ser localizada em distintas organelas, tais como reticulo endoplasmático, núcleo e nas mitocôndrias (OESTREICHER; MORGAN 2019).

Quando toda a conversão de reação se realiza, a glutathiona se faz presente nas células, na forma reduzida, sendo biologicamente mais ativa, sua síntese ocorre no cortisol por duas reações enzimáticas principais. Uma particularidade para os mamíferos é que a glutathiona está presente em três mecanismos responsáveis pelo sustento da homeostase, denominados como síntese de novo, captação de fontes exógenas, através da membrana plasmática, e redução de GSSG catalisada pela GR (ZHENG, 2007), que pode ser visualizado na **Figura 15**.

Figura 15: Reação da redução da glutatona oxidada reduzida pela enzima glutatona redutase no mecanismo NADPH dependente.



Fonte: LEHANE et al , (2012).

Pesquisas mostram que, quando são detectados elevados índices de GSH no organismo, pode ser uma sinalização de desenvolvimento de doenças como cardiovasculares, envelhecimento, câncer e outros. Em concentrações acentuadas, em células cancerígenas, por exemplo, o valor até 1000 vezes maior do que em células consideradas normais, confirma este parâmetro como um biomarcador (GONG, 2018).

Além das doenças citadas, um estudo avaliou o GSH, em outra patologia, pois além do estresse oxidativo, uma redução acentuada de GSH no cérebro é considerada responsável pela neurodegeneração, com exclusividade na substância nigra pars compacta (SNpc). A reação neste processo é um desencadeamento da neurodegeneração, que precede o estresse oxidativo e o mal de Parkinson. Com isso, se houver um reparo nos níveis de GSH, pode ocorrer o impedimento do desenvolvimento desta patologia (HARISH et al., 2010).

3.9 Determinação de Nitrito (NO₂) pelo método de Griess

O elemento Nitrito (NO₂) possui características bem importantes, e necessárias, para um bom funcionamento de vários ciclos, desde o ambiental, pois é matéria prima fundamental adquirida no ar e absorvida pelas plantas, até o ciclo de vida humano, onde podemos citar o uso na conservação de alimentos, e sua participação no processo de respiração celular.

Estudos mostram que nitratos e nitritos são responsáveis pelo desenvolvimento de civilizações onde foram implantadas tecnologias utilizando estas moléculas como conservante de alimentos, mantendo a mesma conservada por mais tempo evitando a proliferação de microrganismos, responsáveis por malefícios à saúde humana, atuando também na coloração, no sabor e na textura (OLIVEIRA et al., 2017).

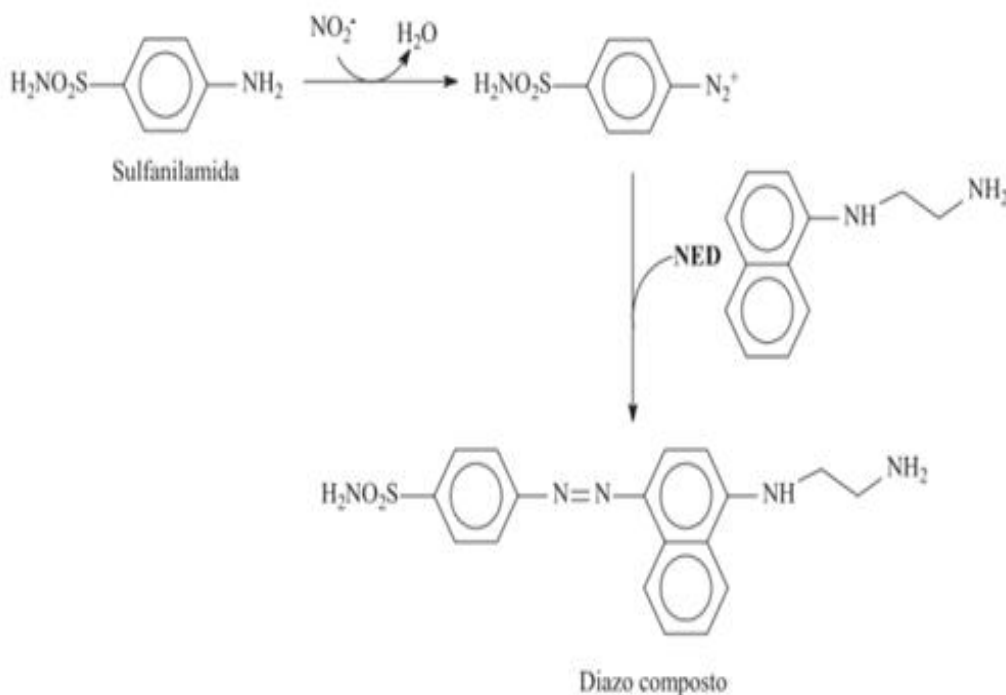
Apesar de seu benefício em conservação de alimentos, estudos apontam que o excesso no processamento industrial tem preocupado a sociedade científica com dados que apontaram ter efeito tóxico em dieta com excesso desta substância, devido a reações que geram compostos n-nitrosos tais como nitrosodimetilamina e monometilnitrosamina, que podem desencadear carcinógenos, teratogênicos e mutagênicos (IAMARINO et al., 2015). Um dos tipos de câncer mais relatado é o gástrico devido a eventos onde as aminas secundárias, localizadas nas proteínas, tem uma predisposição a interagir com o nitrito (NO_2), resultando num composto denominado de nitrosaminas, que estão presentes com aquecimento e/ou pH ácido (OLIVO; RIBEIRO, 2018).

Com a vida moderna, mesmo que moderadamente, os conservantes estão presentes na alimentação diária. Pesquisas identificaram antígenos no organismo, apontando processo inflamatório e perda da homeostase (OLIVO; RIBEIRO, 2018). Outros estudos apontaram que o nitrito (NO_2), mesmo sendo uma molécula comumente detectada no organismo, possui característica de atuar neste processo de homeostase vascular, quando ocorre uma diminuição de óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), pois este também compartilha do processo de respiração celular, imunidade inata, sinalização celular e ativação de proteínas reguladoras (SHIVA, 2013). Uma redução da concentração do NO, presente no sistema, é responsável por gerar distúrbios cardiovasculares como hipertensão e aterosclerose (FORSTERMANN, 2006).

Para que seja possível mensurar esta molécula, e avaliar seus danos e benefícios, métodos têm sido desenvolvidos, e aplicados, com o intuito de que compostos pudessem reagir e potencializar seus benefícios e erradicar ou controlar seus danos, como os métodos cromatográficos (KODAMATANI et al, 2011), eletroquímicos (MANEA et al, 2010), eletroforese capilar (ERDOGAN e ONAR, 2012), espectrofotométricos (AYALA et al, 2012) além do uso da quimiluminescência (YAQOOB et al, 2011) e fluorimetria (HUANG et al, 2006).

O protocolo, mais empregado, utiliza a técnica de espectrofotometria que se baseia na determinação de íons nitritos e nitratos, onde a reação mais usada é a de Griess. Nesta reação o íon nitrito reage com a sulfanilamida, em meio ácido, formando um sal de diazônio e este reage por acoplamento com cloridrato de N-(1-naftil) - etilenodiamina (NED) formando um diazo composto, de coloração vermelha, cuja absorção é em 540nm (RAMOS, 2006). Esta reação está apresentada na **Figura 16** abaixo.

Figura 16: Esquema do mecanismo de reação do método de Griess.



Fonte: RAMOS (2006).

Diante do que foi explanado, podemos considerar, com base em dados científicos, que a depender do composto, e da dose, a que o organismo pode ser exposto, incluindo também a variante tempo, quando o nitrito tem sua concentração diminuída induzida pela inativação do superóxido de oxigênio (O_2), o estresse oxidativo vascular é gerado (WILCOX, 2005), levando a uma redução de biodisponibilidade de NO, acarretando danos em sistemas renais e vasculares, e fazendo com que sobrecarregue o perfeito funcionamento da pressão arterial (WILCOX, 2008).

Mas, como toda molécula, o NO_2 também vem apresentando resultados promissores na área da saúde, quando associado à molécula de óxido nítrico, que é um subproduto da reação de redução do nitrito, um gás do sistema cardiovascular (WELCH, 2019), que devido às pesquisas na área foi nomeada como “molécula milagrosa”, por ter atuações fisiológicas consideradas indispensáveis no processo de homeostase (OLIVO; RIBEIRO, 2018).

3.10 Mieloperoxidase (MPO)

Nos diferentes grupos de enzimas, presentes no organismo, podemos destacar uma por suas particularidades que é a Mieloperoxidase (MPO), oriunda de leucócitos que são responsáveis por catalisar espécies reativas de oxidantes, como também é parte da resposta imune inata que está presente nos processos de inflamação, durante a lesão tecidual, como em patologias cardiovasculares, incluindo a fase aguda aterosclerótica (ROMAN, 2008). A origem do nome desta enzima foi devido à mesma ter sido detectada em estudos primeiramente em células de origem da linhagem mieloide (OKADA et al., 2016).

Estudos prévios têm reportado que a MPO é integrante da superfamília das heme-peroxidases, que ocorre nos neutrófilos e monócitos que tem a capacidade de oxidar o ânion cloreto (Cl⁻) em ácido hipocloroso (HClO), que exerce função de agente oxidante contra patógenos. (VLASOVA, 2018). O resultado da reação da MPO gera produtos como a atividade antimicrobiana de neutrófilos, que é a forma de defesa a patógenos, sobretudo em processo de fagocitose (NDREPEPA, 2019) e, em determinados momentos, MPO liga-se a albumina, lipoproteínas plasmáticas, eritrócitos ou então dentro dos neutrófilos, para circular no plasma. (VANHAMME et al., 2018).

Ainda sobre a importância da MPO, enquanto membro da família das peroxidases, ela pertence ao grupo de enzimas que tem a capacidade de oxidar um elevado número de substratos, auxiliado pelo peróxido de hidrogênio, estão presentes nos mamíferos, nas bactérias, nos fungos e nas plantas. Sua atividade opera diretamente no patógeno, formando armadilhas extracelulares de neutrófilos, em formato de teias, cuja composição é de cromatina e proteínas de grânulos citoplasmáticos, que agem em defesa contra o microrganismo presente (KHAN et al., 2018).

Para obter a MPO no processo bioquímico, pode-se observar a diferenciação mieloide na medula óssea, até a completa reação dentro dos granulócitos, mesmo tendo sua presença marcante em neutrófilos e monócitos, como também em alguns subtipos de macrófagos teciduais. Possui uma taxa de 5% do conteúdo proteico total da célula em neutrófilos e 1% em monócitos (ROMAN, 2008).

Ao associar a MPO com processos inflamatórios, pesquisas apontam que sua cascata inflamatória representa um potencial alvo prognóstico terapêutico em patologias como doença aterosclerótica cardiovascular. (ROMAN, 2008). Isso acontece porque ela proporciona capacidade de intensificar o processo inflamatório nos tecidos, decorrente das lesões causadas no DNA celular. (KHAN et al., 2018). Uma outra evidência está ligada à obesidade, pois a infiltração de neutrófilos na camada adiposa eleva a concentração da MPO, estando sua atividade relacionada a doenças cardiovasculares, como diabetes e aterosclerose. (KHAN et al., 2018; MAHAT et al., 2019). Dessa forma, associado ao seu aumento em algumas patologias, a MPO demonstrou também ter uma versatilidade como alvo terapêutico, (CHAMI et al., 2018), e biomarcador de eficiência elevada para doenças cardíacas (OMRAN et al. 2018).

Numa outra linha de pesquisa com animais (ratos Wistar), onde foi detectada a carência da MPO foi observada uma resistência à obesidade e a insulino-resistência induzida por dieta. Dados demonstram que a obesidade é elemento chave na resistência à insulina, causada pela inflamação crônica nos tecidos-alvo da insulina: o fígado, o músculo esquelético e o tecido adiposo (QADDOUMI et al., 2020). Esses relatos corroboram com outro estudo, onde atestam que a MPO está integrada ao elevado risco cardiovascular em pacientes pré-diabéticos, e esta condição se mostra fator de risco para o diabetes mellitus e a aterosclerose (MAHAT; SINGH; RATHORE, 2019).

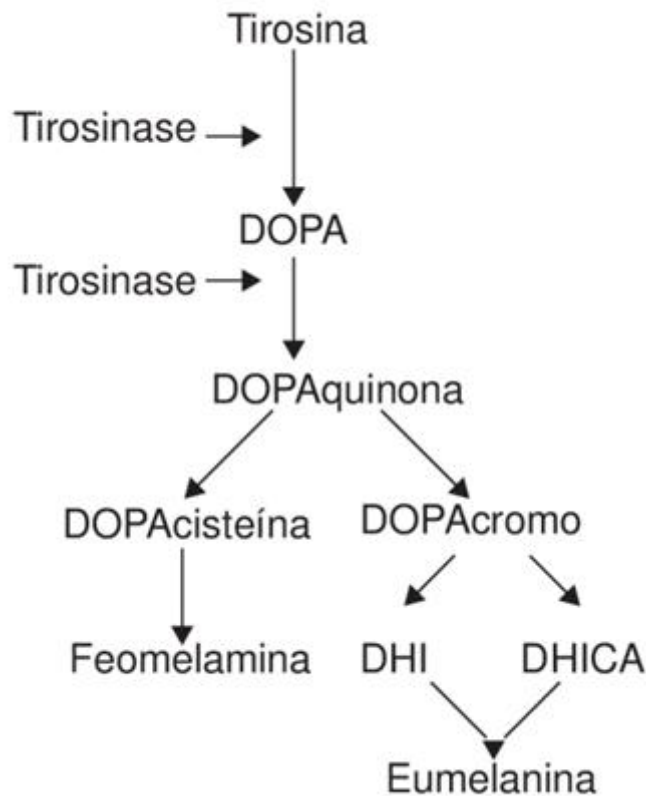
3.11 Melanina

A Melanina é uma designação de uma classe de compostos poliméricos que são obtidos da tirosina, um aminoácido essencial para a produção de células, cuja função, primordial, é a produção dos melanócitos. A tirosina encontra-se em abundância no reino animal, em plantas e nos protistas, pois sua função principal é a de proteção contra a radiação solar. Estudos enfatizam ainda que este pigmento no corpo humano atua na

eliminação de radicais livres, fotoproteção, pigmentação, quelação de íons metálicos, termorregulação e transmissão de sinais neurais (. FEDOROW et al, 2005).

A biossíntese de melanina ocorre através de uma reação bioquímica considerada bem complexa no organismo, onde o aminoácido tirosina passa por uma ação da enzima tirosinase, que é sintetizada nos ribossomos e transferida para os melanossomas. Após este processo, na presença de oxigênio molecular, a tirosinase sofre uma reação de oxidação, convertendo tirosina em DOPA (dioxifenilalanina), e esta em dopaquinona, onde a presença da cisteína gera transformação de eumelanina em feomelanina. Nos processos bioquímicos, em que há presença de cisteína, ocorre a formação da feomelanina, e quando ausência prevalece desta molécula, a melanina produzida será a eumelanina (MOTA, 2019). A **Figura 17** ilustra a cascata de biossíntese da melanina.

Figura 17: Reação bioquímica da obtenção da melanina.



Fonte: ROCHA, (2007).

Por ser designada como responsável por originar a cor da pele, olhos e pelos, a melanina concede proteção ao DNA (Ácido Desoxirribonucleico) da ação nociva da radiação solar. Entretanto, estudos apontam sua relação com melanoma que é classificado como um câncer de pele, com tendências a progressão de metástase, como também alguns tipos de distúrbios neurológicos (PAL et al,2015). Com base nestes dados, pesquisas foram intensificadas e associaram esta proteína com uma

biomacromolécula funcional, resultante das quinonas e fenóis que pode ser encontrada em toda fauna de mamíferos, insetos, fungos e bactérias (PAULIN et al, 2021).

Ao relacionar a melanina com antioxidantes, a literatura reporta que esta pode tanto sequestrar radicais livres, quanto gerar o processo de fotoexcitação gerado por luz UV ou visível. Com isso a expansão das propriedades antioxidantes e pró-antioxidantes são administradas com base no pigmento obtido (CHIARELLI-NETO et al, 2011). Dentre os pigmentos obtidos, o que se destaca é a feomelanina que produz radicais livres onde a eumelanina consome-os, tendo a capacidade de efeito protetor, e a conclusão é que quanto maior a razão da eumelanina e da feomelanina, é menor o aparecimento de espécies reativas, e o efeito antioxidante é mais elevado. Assim a habilidade da eumelanina de neutralizar os radicais livres depende da intensidade dos grupos passíveis de sofrerem oxidação/redução presentes, como seu potencial redox para um melhor ingresso dos grupos aos radicais (PAULIN et al, 2021).

Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e potenciais redox, estão todos entrelaçados. Quando se enfatiza que, em um processo, ocorre uma concentração acentuada de espécies reativas de oxigênio EROS/ROS, pode ser atribuído a uma falha na homeostase redox que desencadeia uma patologia ligada à melanina que é denominada de vitiligo, que se apresenta em determinadas localizações do corpo e que ocasiona a destruição de melanócitos (AKSOY; ÇELIK, 2018), levando ao envelhecimento da pele, pois não ocorre o transporte de elétrons para a mitocôndria, sendo considerado um processo inflamatório, pois há a prevalência de ROS, visto que radicais superóxidos estão mais presentes, resultando em danos na mitocôndria (DAMIANI et al., 2018; SCHARFFETTER-KOCHANNEK et al, 2000; SILINA et al, 2018).

4 Objetivos

4.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi realizar a funcionalização de partículas de *carbon dots* com óleos essenciais (*Eugenia caryophyllus* - cravo, *Citrus sinensis* - laranja e *Cymbopogon winterianus* - citronela) visando obter menor toxicidade do sistema, maior estabilidade e avaliar a atividade antioxidante do sistema, visando estabelecer aplicações futuras.

4.2 Específico

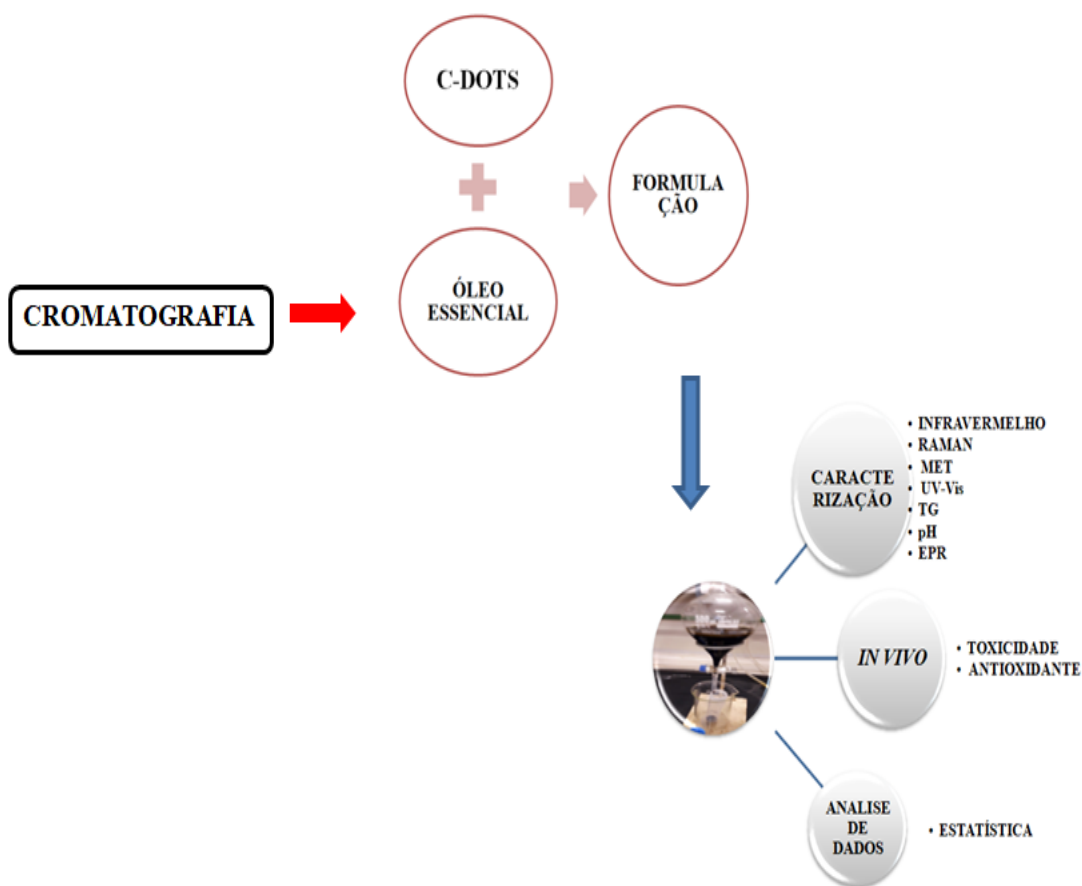
- Avaliar o perfil lipídico dos óleos *Eugenia caryophyllus* - cravo, *Citrus sinensis* - laranja e *Cymbopogon winterianus* - citronela por Cromatografia gasosa acoplada por espectrometria de massas (CG-EM);
- Funcionalizar a partícula com óleos essenciais;
- Análisar por técnica Termogravimétrica as formulações;
- Análisar morfologia da partícula;
- Avaliar a estabilidade físico-química por ensaio de pH em exposição diferentes de luz;
- Caracterizar as propriedades ópticas (Espectroscopia Raman; Espectroscopia de absorção molecular-UV-VIS; Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier – FTIR);
- Avaliar atividade antioxidante das formulações em estudo por ressonância paramagnética eletrônica (EPR);
- Determinar a toxicidade das formulações dos Dots funcionalizadas com os óleos de cravo, citronela e laranja por meio do ensaio *in vivo* de Larvas de *Zophobas morio* Tenebrio Gigante;
- Avaliar a atividade antioxidante das formulações dos DOTS funcionalizadas com os óleos de cravo, laranja e citronela através da determinação dos parâmetros de Glutathiona reduzida - GSH, Nitrito, Mieloperoxidase - MPO e Melanização via ensaio *in vivo* de Larvas de *Zophobas morio* Tenebrio Gigante .

5 Metodologia

5.1 Desenho experimental

A **Figura 18** apresenta o desenho experimental realizado para a obtenção do produto final, que é a formulação do carbon dots funcionalizados com os óleos essenciais a serem estudados.

Figura 18: Esquema da formulação e caracterização do produto carbon dots e óleo essencial.



Fonte: Própria do autor

5.2 Obtenção do Carbon Dots

O material Carbon Dots foi sintetizado e caracterizado pelo Laboratório de Inorgânica e Materiais – LIMA do Instituto de Química - IQ da Universidade de Brasília-UnB, sob orientação do professor Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues que gentilmente ofertou aproximadamente 1 kg deste material para que fossem realizados todos os experimentos deste trabalho, com o mesmo lote, garantindo assim uma maior confiabilidade de resultados. Por estarem protegidos por patenteamento, os dados da síntese deste material, e sua composição, não podem ser disponibilizados. A **Figura 19** apresenta o material utilizado durante todo o estudo desta tese.

Figura 19: Apresentação do Carbon Dots.



Fonte: Própria do autor

5.3 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados nesta tese foram obtidos da marca Now Essential Oils, sendo escolhidos três tipos de óleos para serem analisados: o óleo de cravo, de citronela e de laranja. De cada óleo foi adquirido 1000 mL, do mesmo lote, para todo o estudo. A empresa forneceu certificados de pureza, na aquisição da compra, que garante a qualidade do produto. Os certificados se encontram em anexo. A **Figura 20** ilustra os frascos dos óleos essenciais utilizados neste estudo.

Figura 20: Frascos dos óleos utilizados no preparo das formulações estudadas.



Fonte: Própria do autor

5.4 Detecção e quantificação da composição química dos óleos por Cromatografia gasosa acoplada por espectrometria de massas (CG-EM)

Para garantir a qualidade dos óleos adquiridos, determinou-se o perfil lipídico dos óleos pela técnica de Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), no intuito de detectar a composição dos óleos e em qual percentagem estavam presentes, para que possíveis relações futuras entre a composição e os resultados biológicos pudessem ser realizadas. Aliquotas de aproximadamente 2 mL de cada amostra foram enviadas para análises na Universidade Federal do Piauí-UFPI em colaboração com o Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), sob responsabilidade da mestrandia Iolanda Souza do Carmo sob orientação do Prof. Dr. José de Sousa Lima Neto, do Departamento de Farmácia.

Os óleos essenciais foram analisados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas de modelo GCMS-QP2010 SE da Shimadzu, equipado com injetor automático Shimadzu AOC-5000 e coluna capilar SLB-5MS (5% difenil-95% dimetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,10 µm). Injetou-se 0,1 µL (10 µL do óleo em 1000 µL de acetato de etila) das amostras no modo *Split* (1:100), a temperatura do injetor foi de 220 °C e a temperatura de interface de 240 °C. As condições de análise utilizadas foram: coluna programada para iniciar em 60 °C, com taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹, até 246 °C mantido por 10 min, sendo realizado corte de solvente em 2,5 min. O gás de arraste foi hélio (99,9999%; White Martins) com fluxo de 1 mL min⁻¹. O espectrômetro de massas foi operado no modo '*scan*' com intervalo de massas de 47-500 Da. A fonte de íons foi operada no modo ionização por elétrons (EI) a 70 eV. A identificação foi realizada através da comparação entre os padrões de fragmentações obtidos com a biblioteca WILEY[®] com os dados relatados na literatura (ADAMS, 1995). E também pela comparação dos índices de retenção calculados (I.R._(calc.)) com os índices de retenção relatados na literatura (I.R._(liter.)). Os índices de retenção foram calculados com base na prévia injeção de padrões de hidrocarbonetos normais (C₈-C₂₅) nas mesmas condições utilizadas para os óleos essenciais estudados. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

5.5 Funcionalização dos óleos essenciais ao Carbon Dots.

5.5.1 Determinação do valor de óleo utilizado

O processo para determinar a quantidade de óleo utilizado, para funcionalizar a partícula de carbon dots, em sua superfície, originou-se com base em cálculos do número de moléculas de óleo essencial que é possível ancorar na superfície do DOTS, com base na sua área superficial, calculada sabendo o diâmetro do DOTS e a distância da ligação da carbonila, utilizado como aproximação referente a ligação do óleo na superfície do DOTS, esse cálculo foi adaptado de Neves et al.(2011).

Com isso, pelos dados da **Tabela 1** é possível calcular o número de moléculas que podem ancorar em uma partícula.

Tabela 1 – Dados necessários para o cálculo do número de moléculas.

Diâmetro do DOTS	5,000 nm
Distância de ligação da carbonila	0,122 nm
Área da partícula	78,540 nm ²

Sabendo que a área foi calculada aproximando-se o formato do DOTS ao de uma esfera, então a equação 01 é a área do DOTS:

$$\text{Área do C - dots} = 4 * \pi * \left(\frac{D}{2}\right)^2$$

Onde D é o diâmetro da partícula.

O número de moléculas é então calculado através da divisão entre a área da partícula pela distância de ligação da carbonila, então equação 02 para o número de moléculas:

$$\begin{aligned} \text{Número de moléculas} &= \frac{\text{Área da partícula}}{\text{Distância de ligação da carbonila}} \\ &= 644 \text{ moléculas de óleo essencial} \end{aligned}$$

Para saber o número total de moléculas é preciso saber o número total de partículas presentes na massa de DOTS utilizada, por isso aproximou-se o volume do DOTS para o de uma esfera, sendo assim equação 03 representa o volume do c-DOTS:

$$\text{Volume do C - dots} = \frac{4}{3} * \pi * \left(\frac{D}{2}\right)^3$$

Com os dados presentes na **Tabela 2** foi possível encontrar o número total de partículas e com isso o número total de moléculas e, por fim, a massa de óleo necessária para funcionalizar completamente todas as partículas.

Tabela 2 – Dados necessários para o cálculo do número total de partículas.

Volume da partícula	6,54 x 10 ⁻²⁰ mL
Densidade da partícula	0,7497 g mL ⁻¹
Massa de DOTS utilizado	1,2 g
Massa molar do óleo de cravo	160 g/ mol
Constante de Avogadro	6,022 x 10 ²³

O volume total de partículas é encontrado através da densidade da partícula pela massa utilizada, então equação 04 para o volume total da partícula:

$$\begin{aligned} \text{Volume total de partículas} &= \frac{\text{Massa de c - dots utilizado}}{\text{Densidade da partícula}} \\ &= 1,6 \text{ mL de partículas de DOTS} \end{aligned}$$

Dividindo o Volume total das partículas pelo volume de cada partícula é possível encontrar o número total de partículas, então equação 05 para o número de partículas:

$$\begin{aligned} \text{Número de partículas} &= \frac{\text{Volume total de partículas}}{\text{Volume da partícula}} \\ &= 2,45 \times 10^{19} \text{ partículas de DOTS} \end{aligned}$$

Com isso é possível encontrar o número total de moléculas, sabendo que, em uma partícula de DOTS são ancoradas 644 moléculas de óleo essencial, então em $2,45 \times 10^{19}$ partículas de DOTS são ancoradas, pela equação 06 de número total de moléculas:

$$\begin{aligned} \text{Número total de moléculas} &= 644 * 2,45 \times 10^{19} \\ &= 1,57 \times 10^{22} \text{ moléculas de óleo essencial.} \end{aligned}$$

Com o número total de moléculas de óleo essencial, a constante de Avogadro e a massa molar do óleo de cravo, é possível encontrar a massa total de óleo necessária para ancorar em todas as partículas, então na equação 07 da massa total de óleo:

$$\begin{aligned} \text{Massa total de óleo} &= \frac{\text{Número total de moléculas} * \text{Massa molar do óleo de cravo}}{\text{Constante de Avogadro}} \\ &= 4,18 \text{ g de óleo essencial de cravo} \end{aligned}$$

Sabendo que a densidade do óleo de cravo é de 0,973 g/mL então o volume total de óleo necessário para funcionalizar completamente 1,2 g de DOTS é de 4,30 mL. O mesmo cálculo foi realizado para os três óleos diferentes resultando na massa total mostrada na **Tabela 3**

Tabela 3 – Volume total de óleo necessário para funcionalizar 1,2 g de DOTS.

Óleo de cravo	4,30 mL
Óleo de citronela	4,58 mL
Óleo de laranja	4,09 mL

Portanto, foi após esse cálculo, que decidiu-se a quantidade de óleo essencial utilizado de 10 mL, pois, o excesso garante que toda a superfície do DOTS seja funcionalizada com o óleo essencial.

5.5.2 Funcionalização das partículas com óleo essencial

A realização da funcionalização da partícula de carbon dots com os óleos essenciais foi baseada no protocolo adaptado de Neves et al (2011), sendo toda a parte experimental desenvolvida no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Químicos - LDPQ do Instituto de Química -IQ da Universidade de Brasília-UnB, sob orientação do professor Dr Fabrício Machado e foi desenvolvido pela Mestranda em Engenharia Química Graciane Resende da Universidade Federal de Goiás.

A funcionalização das nanopartículas de DOTS foi adaptada de Neves et al.(2011), utilizou-se óleo essencial de cravo, de laranja e de citronela, com peso aproximadamente de 1,2 g de DOTS suspensas em 200 mL de água destilada e submetido a agitação mecânica constante, aquecimento a 85 °C, tampado com papel alumínio, para evitar possíveis evaporações dos óleos, em ambiente escuro e atmosfera borbulhante de nitrogênio, para evitar a oxidação do óleo. Então, o material de revestimento, 10 mL de óleo essencial, foi adicionado gota a gota a uma taxa máxima de 0,5 mL / min. Após 30 min da adição do óleo essencial, as nanopartículas foram acondicionadas em um funil de separação, para remover o material de revestimento livre. O processo foi feito separadamente, para cada óleo essencial. A **Figura 21** apresenta um esquema resumido do processo de funcionalização das partículas.

Figura 21: Processo de funcionalização da partícula de DOTS com os óleos essenciais.



5.6 Caracterização das formulações

As amostras foram nomeadas para uma forma mais didática de identificação nesta tese, sendo o carbon dots sozinho **DOTS**, carbon dots acoplado com óleo de cravo nomeado de **DCRA**, carbon-dots com óleo de laranja **DLAR** e, por último, carbon-dots com óleo de citronela a **DCIT**. Em alguns parâmetros avaliou-se o óleo separado e também utilizou-se uma nomenclatura, para facilitar a identificação, onde o óleo de cravo foi nomeado de **OCRA**, o óleo de laranja **OLAR** e, por último, o óleo de citronela sendo o **OCIT**.

5.6.1 Análise Termogravimétrica (TG)

Para a análise de Termogravimetria (TG), o protocolo utilizado foi de NEVES et al, (2019), onde o mesmo visa determinar a estabilidade térmica dos materiais em estudo. Os ensaios foram realizados na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília.

A análise termogravimétrica foi realizada utilizando o equipamento Shimadzu modelo DTG – 60H. Para essa análise foram utilizados aproximadamente 10 mg de amostra seca, contidos em um porta-amostra de platina, com intervalo de temperatura entre 25 °C até 800 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹, operando em atmosfera de N₂ com vazão de 50 mL·min⁻¹.

5.6.1.2 Análise morfológica da partícula do Carbon Dots

Após a funcionalização das partículas carbon dots com os óleos essenciais, foram retiradas amostras para análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), que foi realizada no Laboratório Multiusuário de Microscopia de alta resolução (LabMic) pela Dr^a Tatiane Oliveira dos Santos, no Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, na cidade de Goiânia, e foram cedidas imagens que comprovam o tamanho da partícula em estudo. O equipamento utilizado para a realização deste ensaio foi o microscópio eletrônico JEOL JEM 2010 operando a uma voltagem de aceleração de 200 kV. As soluções aquosas dos materiais foram colocadas numa tela de cobre revestida com carbono de 400 malhas (Ted Pella Inc- USA) e em seguida foram secadas em temperatura ambiente.

5.6.1.3 Estabilidade físico-química por ensaio de pH em exposição diferentes de luz

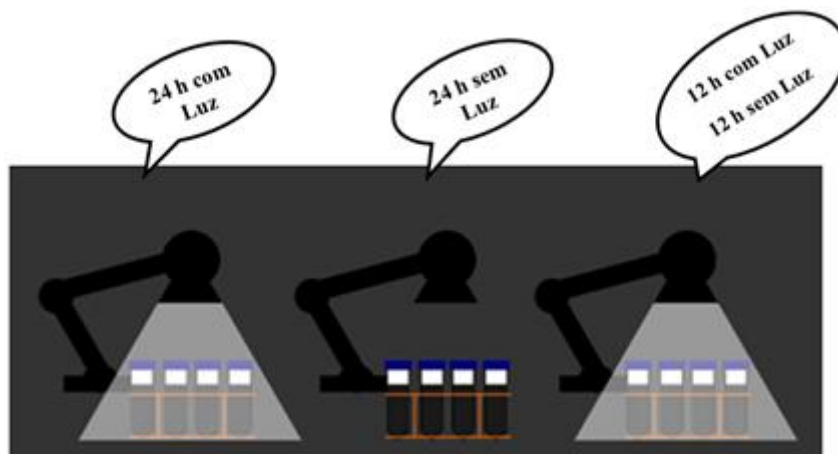
Para análise da estabilidade por ensaio de pH, em exposição diferentes de luz, o protocolo utilizado foi de AGUIAR et al. (2021) com adaptações, onde a técnica determina a estabilidade dos materiais em estudo. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Genética e Morfologia - GEM do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

A avaliação das medições do pH, como forma de analisar a estabilidade das formulações em três diferentes exposições foi realizada durante 132 dias contados a partir do primeiro dia após sua formulação. As medidas foram realizadas um vez por semana no início do dia.

As amostras foram divididas em três tubos falcon de 50 mL, contendo, aproximadamente, 40 mL de cada formulação, em que todos foram devidamente identificados com a formulação, e com a exposição que iria ser acomodada durante o tempo citado anteriormente.

As medidas do pH foram realizadas no equipamento de pHmetro DIGIMED DM-22, sendo antecipadamente calibrado com as devidas soluções tampões de calibração de pH $4,00 \pm 0,02$ e $7,00 \pm 0,02$ em ambiente climatizado com a temperatura controlada a 25 °C. Para a realização de cada medida foram feitas as amostras de todas as formulações expostas 24h com luz; 24 h sem luz; 12 h com luz e 12 h sem luz. Os frascos contendo as formulações eram agitados, abertos e o eletrodo do equipamento era introduzido para que fosse realizada a medição do pH da formulação em estudo. A **Figura 22** ilustra o esquema de como foram expostas as formulações para este experimento.

Figura 22: Exposição do pH das formulações.



Fonte: Própria do autor

5.6.1.4 Propriedades ópticas

Para a realização da avaliação das características ópticas das formulações, com as partículas dos Carbon dots, preparadas pelo método de funcionalização, descrito anteriormente, foram feitos ensaios de Raman e Infravermelho com transformada de Fourier-FTIR, sendo esta parte experimental desenvolvida no Laboratório de Espectroscopia Óptica - LEO do Instituto de Física - IF da Universidade de Brasília-UnB, em parceria com o doutorando Alexandre Silva Santos sob supervisão do Prof. Dr. Sebastião William da Silva, e a análise de Espectroscopia de absorção molecular (UV-vis) foi realizada em colaboração com a Mestranda em Engenharia Química Graciane Resende da Universidade Federal de Goiás, na Central Analítica do Instituto de Química, da Universidade de Brasília. A análise dos dados foi realizada pela equipe

da física, da UnB citada anteriormente. Para as análises de Raman e Infravermelho foram avaliados lotes diferentes das formulações, pois todos os ensaios foram realizados em lotes de três formulações de nanopartículas diferentes para cada óleo. Os lotes foram nomeados com base em sua data de produção, sendo o lote 01 produzido em 27 de outubro de 2019, o lote 02 em 27 de janeiro de 2020 e o lote 03 em 17 de novembro de 2020.

5.6.1.4.1 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Com o intuito de avaliar as características das partículas de carbon dots funcionalizadas com os óleos essenciais, pela metodologia utilizada neste estudo, foi utilizada a técnica de Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), para que nestas medidas fosse possível caracterizar grupos funcionais, e não funcionais, dos compostos constituintes das formulações em análise.

As medidas FTIR foram realizadas usando um espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier da marca Bruker, modelo Vertex 70. Usando o módulo de Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR). Foram executadas em média 96 varreduras, com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} , no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , sendo realizado o background antes de cada medição. De cada amostra foi usado 20 uL para a realização da medida.

5.6.1.4.2 Espectroscopia Raman

A espectroscopia de Raman auxilia na avaliação das propriedades dos elementos presentes nas formulações, bem como avalia se ocorreu a ligação entre eles, ou seja, uma interação química dos elementos, como também é possível avaliar a estabilidade através da intensidade do sinal.

As medidas micro Raman foram feitas usando o espectrômetro LabRam HR Evolution, da marca HORIBA Scientific. O espectrômetro Raman é equipado com microscópio confocal, detector CCD (Charge Coupled Device) e grade de 1800 linhas/mm. Usando laser de 532 nm, com potência de aproximadamente 1 mW e focado com uma objetiva de 50x. As amostras foram colocadas no interior de um porta amostra de aço com orifício no centro, sendo usado 40 uL por amostra.

Após a obtenção dos dados, a análise do mesmo foi realizada usando o LabSpec[®] para correção da linha de base e normalização pela intensidade da banda G, o OriginPro[®] 9 foi utilizado para a plotagem dos dados e o fitting das razões das bandas G e D foram realizadas no Peakfit. Todas as medidas foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Óptica-LEO do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

5.6.1.4.3 Espectroscopia de absorção molecular (UV-VIS)

As formulações de carbon dots foram analisadas para avaliar o método de funcionalização utilizado neste estudo com os óleos, e a espectroscopia UV/Vis mostra-se como fonte de análise de espectro de absorção.

Utilizando o protocolo adaptado de NEVES et al, (2019), as amostra das formulações foram colocadas até a marca indicada nas cubetas 1 mL, utilizando o

espectrômetro de absorção CaryWin 50 Varian, instalado no Laboratório AQUA, da Universidade de Brasília e foram realizadas leituras em triplicata, onde os resultados dos espectros foram obtidos na região espectral do UV-Vis 200 a 800 nm.

5.7 Avaliação de atividade antioxidante por radical livre DPPH com técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

Para a realização do ensaio de atividade antioxidante, foi necessário a determinação de alguns parâmetros como tempo de leitura e concentração, para melhor aplicação do protocolo (FERREIRA-NUNES et al, 2018) para avaliar a atividade antioxidante por meio da técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica EPR. A atividade antioxidante foi mensurada com base no método de capacitação das moléculas de antioxidantes que se encontram presentes nas amostras deste estudo, tendo como fator determinante a molécula de DPPH• - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, cuja função é sequestrar radicais livres presentes na amostra (BRAND-WILLIAMS, 1995).

Todo o ensaio foi realizado no Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Instituto de Física da Universidade de Brasília, sob a colaboração e supervisão, do Prof. Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza.

5.7.1 Preparo do DPPH

Preparou-se uma solução de 500 µmol de DPPH. Em um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 2,4 mg de DPPH com o acréscimo de 3 mL de etanol (foi utilizada proveta, ou pipeta, para medir o volume do líquido) e completou-se o volume para 10mL.

5.7.2 Preparo da amostra

As diluições foram realizadas da maior concentração para a menor, podendo variar conforme a natureza da amostra em análise. Com base em ensaios biológicos realizados com as amostras em estudo, foram determinadas as concentrações testes, sendo que apenas a amostra de carbon dots acoplado com óleo de cravo DCRA, apresentou valores diferentes das outras amostras e de DOTS. Também foi realizada a medida para o DPPH puro, DPPH com etanol.

No ensaio realizaram-se as medidas de Três lotes de formulações de nanopartículas diferentes, podendo assim avaliar sua estabilidade com a presença do radical antioxidante presente em todas. Os lotes foram nomeados com base em sua data de produção, sendo o lote 01 produzido em 27 de outubro de 2019, o lote 02 em 27 de janeiro de 2020 e o lote 03 em 17 de novembro de 2020. Vale ressaltar que os lotes variaram suas concentrações de 1,3 a 6mg/mL. As amostras foram preparadas em eppendorfs numerados com a concentração e nanopartículas a serem analisadas, cujas concentrações para DOTS, DLAR e DCIT foram de 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL, respectivamente e apenas no DCRA os valores foram diferentes, sendo estes de 25,

12,5, 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$, devido esta formulação não ter sido possível detectar nos mesmo valores já citados das formulações anteriores. Foram adicionadas pequenas alíquotas da solução de DPPH 950 μL na concentração de 500 μmol nos eppendorfs contendo as amostras testes. Após 50 minutos em contato com a solução, em temperatura ambiente, longe de luz, pois estas são fotossensíveis, as amostras foram transferidas para capilares de vidro num volume final de, aproximadamente, 50 μL , para serem depositadas em recipiente térmico, contendo nitrogênio líquido, até a sua leitura no espectro de EPR.

5.7.3 Leitura das amostras

Foi utilizado um espectrômetro EMX Plus (Bruker Bio Spin, Alemanha), operando em banda X de 9,35 GHz, com campo de modulação de 10G e 100 kHz, potência de micro-ondas 20 mW, e largura de varredura de 100G. A amplitude das medidas foi determinada pela integral dupla dos dados dos espectros coletados.

5.7.4 Interpretação de resultados e plotagem de gráficos

Após a leitura os dados foram tratados no Excel para que se possa, com auxílio de programa estatístico, avaliar sua repetição e visualizar a evolução dos resultados, nos tempos e concentrações estudadas. Todos os ensaios foram realizados com triplicata de leitura de cada amostra, em todas as concentrações analisadas. E os dados analisados em programa origin 9.0

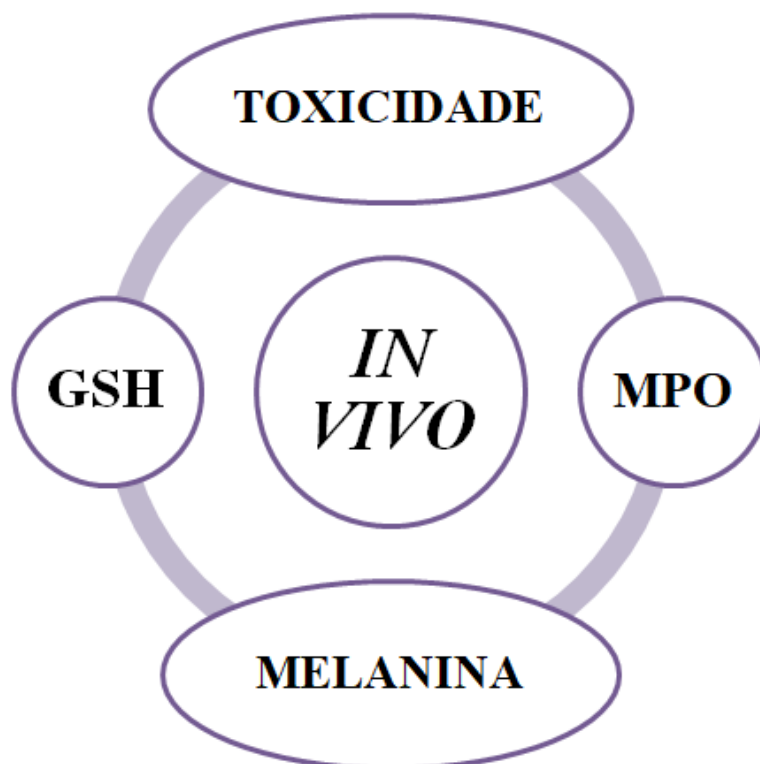
5.7.5 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada com base em triplicata de concentração para cada formulação, sendo obtidos a média \pm e desvio padrão (SD) para o parâmetro antioxidante radicalar avaliados neste estudo. Os dados foram apresentados por meio de recursos gráficos.

5.8 Ensaios *in vivo*

A **Figura 23** apresenta o desenho experimental realizado para a avaliação por ensaios *in vivo*, das formulações obtidas do produto carbon dots funcionalizado com os óleos essenciais, onde estudou-se a toxicidade e potenciais antioxidantes.

Figura 23: Esquema da avaliação *in vivo* do produto carbon dots e óleo essencial.



Fonte: Própria do autor

5.8.1 Ensaio *in vivo* com Larvas de *Zophobas morio* Tenebrio Gigante

5.8.1.2 Obtenção das Larvas de *Zophobas morio* Tenebrio Gigante

As larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, foram obtidas no Laboratório de Ciências Fisiológicas, do Departamento de Morfofisiologia Veterinária, do Centro de Ciências Agrárias do Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, do Bairro Ininga da Universidade Federal do Piauí (UFPI) - Teresina - PI - CEP: 64049-550.

Todo o experimento foi supervisionado pelos professores Dr Michel Muálem de Moraes Alves e Dr Daniel Dias Rufino Arcanjo e os colaboradores Doutorando Leonardo Rocha e Graduando em Farmácia José Otavio Almeida. O preparo da amostra para o experimento foi realizado no Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMMOL) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Para a realização deste ensaio o protocolo utilizado foi de RIBEIRO et al, 2022 com adaptações.

5.8.1.3 Cultivo das Larvas de *Zophobas morio* Tenebrio Gigante

O cultivo, e manutenção das larvas, foram realizadas em caixas de Polipropileno de 30 L nas seguintes dimensões: A: 28cm X L:47cm X C:34cm. As caixas possuem travas em sua tampa, localizadas na parte externa, e a coloração do recipiente é escura. No interior da caixa foi colocada uma forragem feita de polpa de papelão, que serve para acomodar as larvas durante todo o processo de desenvolvimento, que vai desde a fase larval até o besouro. No meio de cada camada do papelão, é colocado um pedaço de chuchu, para manter a umidade do sistema, e a alimentação é composta por farelo de milho. Este recipiente é mantido em ambiente controlado de temperatura ambiente entre $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi realizado um acompanhamento frequente observando o desenvolvimento e a manutenção de limpeza do ambiente, promovendo qualidade no crescimento das larvas. Ao atingir o estágio larval que vai de 06 a 08 meses, foram selecionadas as larvas com peso entre 400 e 500 mg, com algumas características específicas dentre elas cor clara e uniforme. Em seguida foram divididos os grupos para o experimento, em duplicata, contendo 05 animais por grupo.

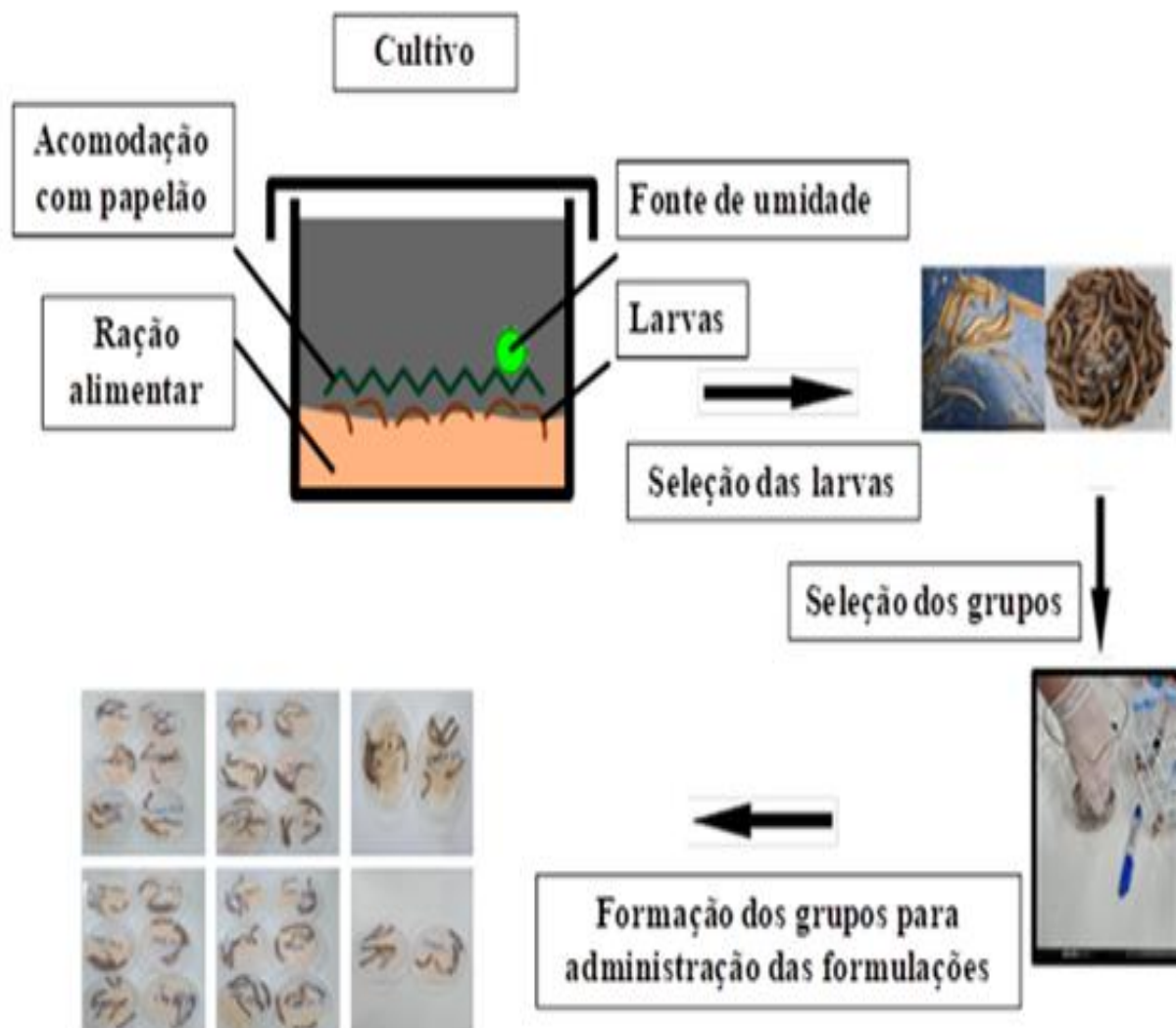
5.8.1.4 Seleção dos grupos para avaliar dose de toxicidade nas Larvas de *Zophobas morio* Tenebrio Gigante

O ensaio para avaliação da toxicidade com larvas de Tenebrio seguiu o protocolo de ALMEIDA (2021), adaptado. O material biológico utilizado neste ensaio para avaliação da toxicidade *in vivo* foram larvas de Tenebrio, e todo o preparo da amostra para o experimento foi realizado no Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMMOL) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Foram selecionados um total de 140 Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, para a realização desse estudo. Foi realizada duplicata de experimento contendo 05 animais por grupo de concentração a ser avaliada de cada molécula do estudo. As larvas foram separadas em placas de Petri, contendo, em cada uma, um pouco de ração para consumo até o final do experimento.

As doses a serem avaliadas foram de 25, 50 e 100 mg/g de DOTS, DCRA, DLAR e DCIT, tendo DMSO 1% como controle positivo e, no mesmo volume, água destilada, como controle negativo. A **Figura 24** apresenta todo o processo realizado de cultivo à seleção dos grupos.

Figura 24: Cultivo, obtenção e seleção das Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, para administração das formulações DOTS, DCRA, DLAR e DCIT nas doses de 25, 50 e 100 mg / g , tendo DMSO 1% como controle positivo e, no mesmo volume, água destilada como controle negativo.



Fonte: Própria do autor

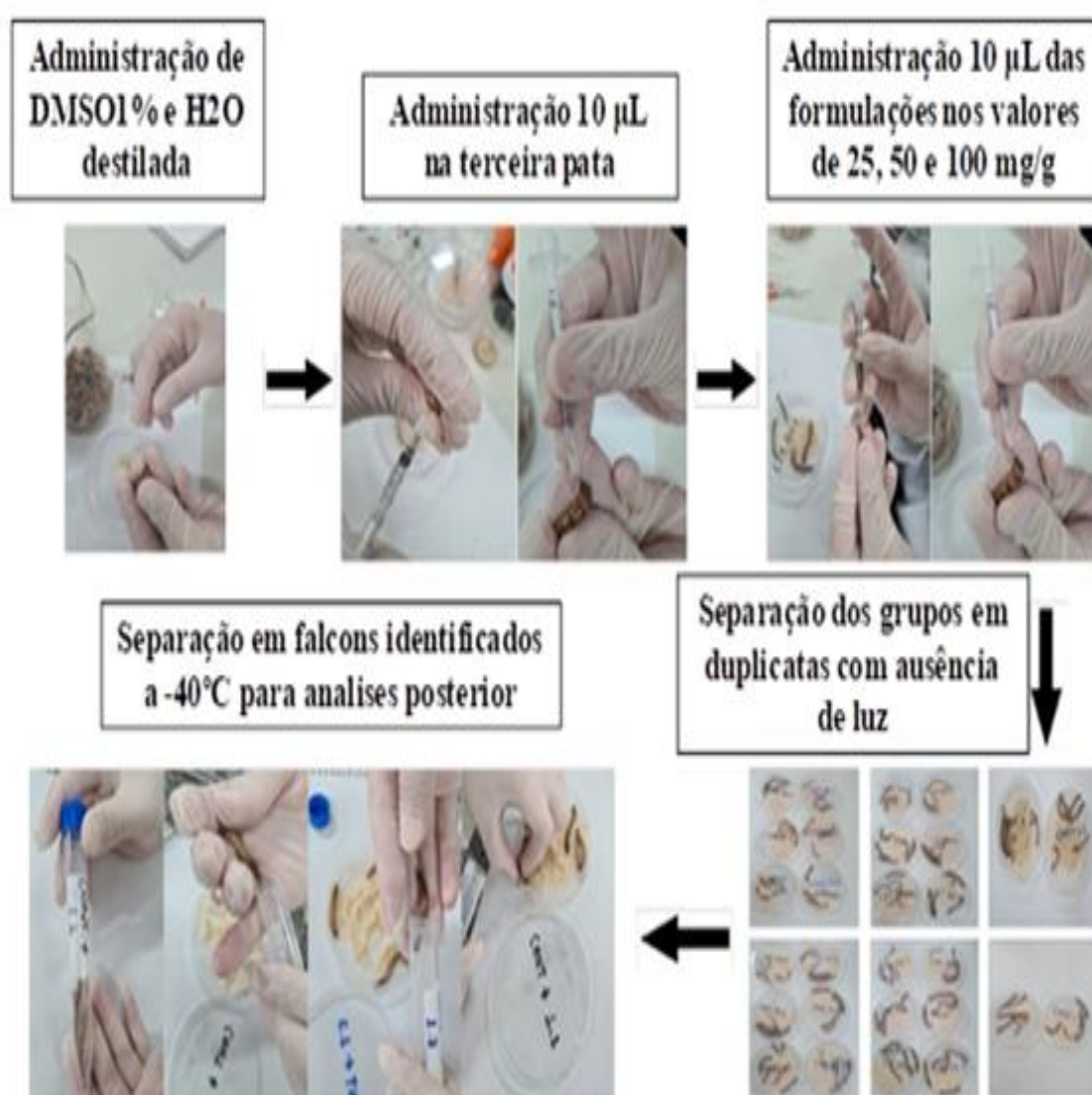
5.8.1.5 Administração das formulações nos grupos, para avaliar a dose de toxicidade nas Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante.

Foram administrados, com auxílio de seringa de insulina de 1mL, 10 μ L de cada formulação na terceira pata de cada larva, as doses foram nos valores de 25, 50 e 100 mg / g correspondente a cada formulação das nanopátulas deste estudo, e o mesmo volume para o controle positivo DMSO 1% e, mesmo volume, para o controle negativo que foi água destilada. Após a administração, as larvas foram acondicionadas em placas de Petri, onde permaneceram em observação por até 48h. Imagens fotográficas foram registradas nos tempos de 24 e 48h para registro de alteração no

comportamento e avaliação da toxicidade. As placas foram mantidas, com ausência de luz e em temperatura ambiente sem refrigeração.

Após 48h as larvas foram identificadas em tubos Falcon individuais e colocadas sob refrigeração a -40°C para posterior análise de atividade antioxidante. A **Figura 25** apresenta o esquema do ensaio, com detalhes, da administração e preparo da amostra para os ensaios dos parâmetros já mencionados anteriormente.

Figura 25: Administração, separação de grupos e congelamento das Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, das formulações a serem avaliadas nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/g de DOTS, DCRA, DLAR e DCIT tendo DMSO 1% como controle positivo e, no mesmo volume, água destilada como controle negativo.



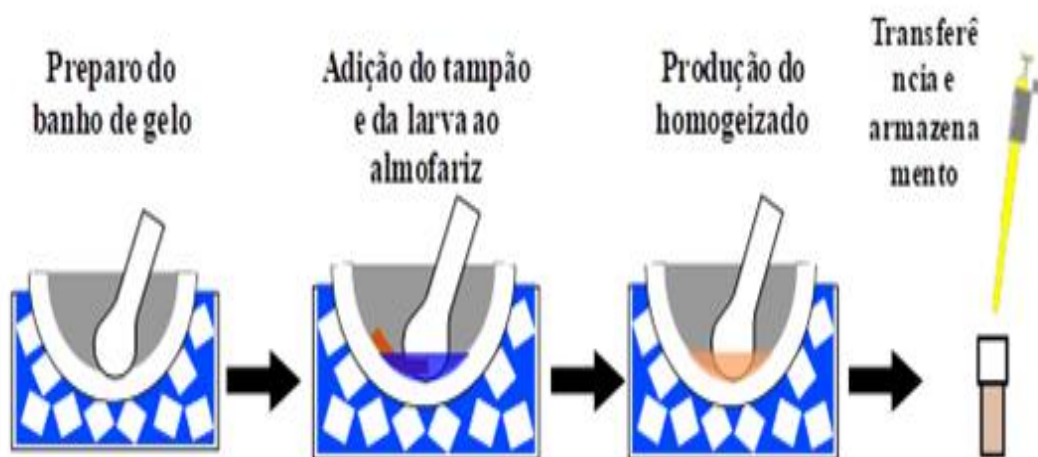
Fonte: Própria do autor

5.8.1.6 Preparo do homogenato das Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, para avaliação dos parâmetros antioxidantes.

O material biológico utilizado, das larvas do Tenebrio, foi extraído do preparo de um homogenizado, onde foi possível quantificar alguns parâmetros, com marcadores específicos deste material, contendo a molécula na concentração em análise. Com isso foi realizado um homogenizado de cada larva, individual, e a triplicata de cada concentração.

No preparo do homogenizado, colocou-se a larva no almofariz. Em seguida, este foi acondicionado em recipiente com banho de gelo, com a larva acrescentando 3mL de tampão fosfato de sódio 0,5M de pH 7,4 e realizou-se o processo de homogeneização do material biológico até um perfeito estado homogêneo. Em seguida, transferiu-se para um eppendoff de 2 mL, seguido de centrifugação a 1.460 rpm por 30 minutos em 4 °C em centrífuga SIGMA® 4K15. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado, e novamente centrifugado, mas desta vez a 1.370 rpm por 30 minutos a 4 °C (LI *et al*, 2016). O preparo do material está ilustrado na **Figura 26**.

Figura 26: Esquema do preparo do homogenizado das Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante.



Fonte: Própria do autor

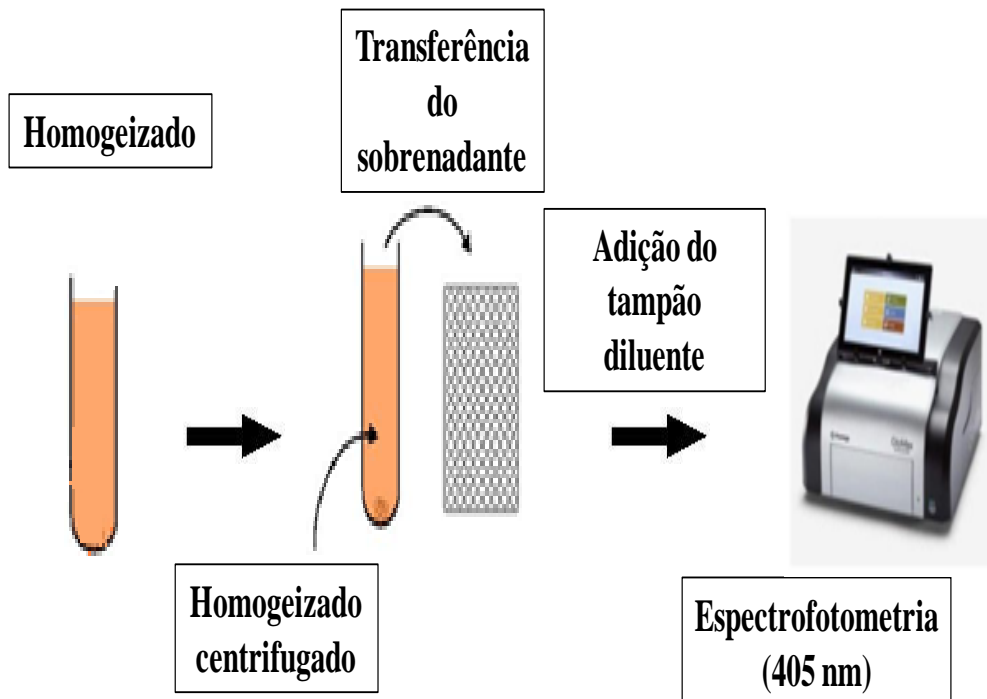
5.8.1.7 Determinação de parâmetros de antioxidantes em Larvas de *Zophobas morio* Tenebrio Gigante

5.8.1.7.1 Avaliação da quantificação da Melanização

Para o ensaio de quantificação do teor de melanização das larvas de Tenebrio foi realizada uma homogeneização do material biológico em 2 mL de tampão fosfato, e realizou-se centrifugação a 3000 rpm, por 10 minutos em centrífuga SIGMA® 4K15. Em seguida, aliquotou-se 10µL do sobrenadante, dessa centrifugação, em duplicata, em uma microplaca e adicionou-se 190µL de tampão Fosfato de Sódio, pH 7,4. Após todo o

preparo da amostra em placas, prosseguiu-se a realização da leitura em espectrofotômetro GloMax a 405nm, sendo obtidas as absorbâncias para cada amostra. Todo o ensaio foi realizado com base nos protocolos de AYRES, (2008) e GORTNER, (1910) adaptados para este estudo. Um resumo ilustrativo deste ensaio está apresentado na **Figura 27**.

Figura 27: Esquema da quantificação da melanização das Larvas de *Zophobas morio*, *Tenebrio Gigante*.

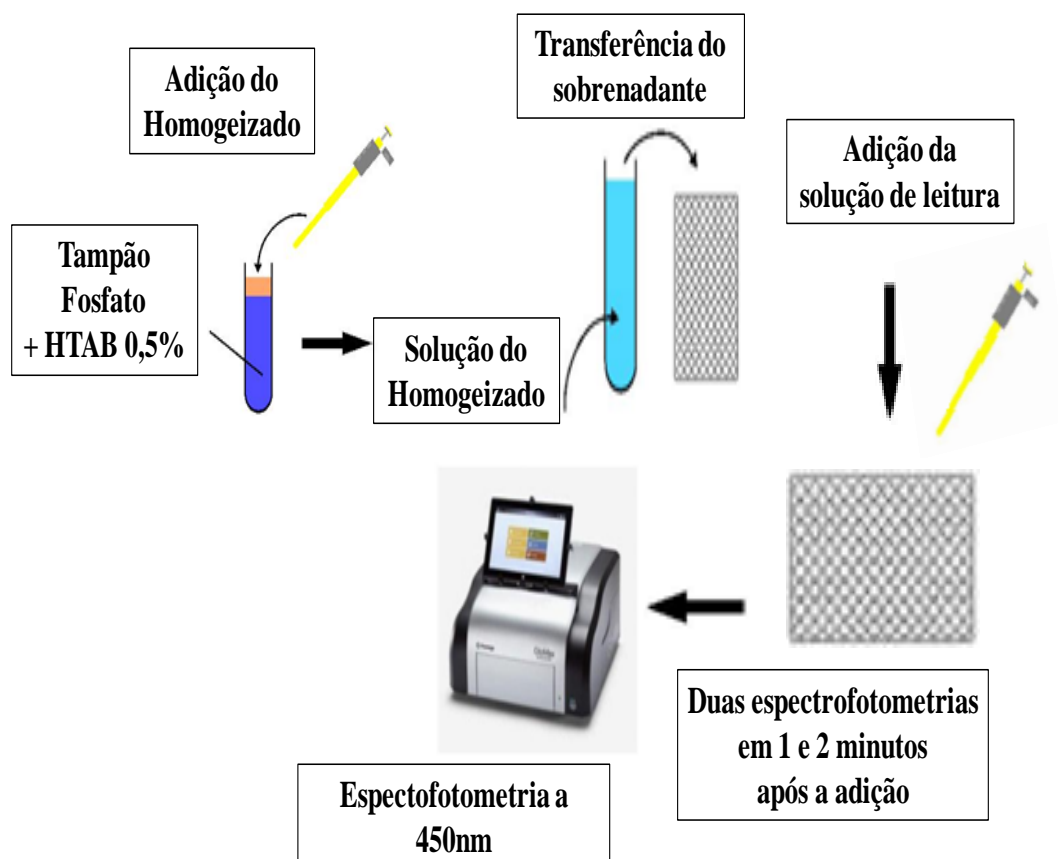


Fonte: Própria do autor

5.8.1.7.2 Avaliação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

O ensaio desta atividade enzimática é efetivado pelo método da velocidade de oxidação do substrato o-dianisidina na presença de H_2O_2 . Para este ensaio a solução tampão utilizada, para a produção do homogeneizado das larvas, na quantificação da atividade do MPO, foi o tampão fosfato de potássio 0,5% hexadeciltrimetilamônio (HTAB) de pH 6,0, com proporção de 50 mg por 1 mL de tampão. Para realização da leitura, adicionou-se 10 μ L do sobrenadante, em poço de microplaca, seguido de 200 μ L da solução de leitura em duplicata (3 mL de tampão fosfato pH 6,0, 15 mL de peróxido de hidrogênio a 1%, 5 mg de o-dianisidina, e água destilada em q.s.p. 50mL de solução). Foram realizadas duas leituras espectrofotométricas em 450 nm para que fosse possível observar a diferença, uma após um minuto da adição da solução de leitura e a outra dois minutos após. Os resultados foram expressos em unidades de MPO por mg de tecido (BRADLEY et al., 1982). Para facilitar a compreensão organizou-se uma ilustração que está apresentada na **Figura 28**.

Figura 28: Esquema da avaliação da atividade mieloperoxidase (MPO) em Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante.



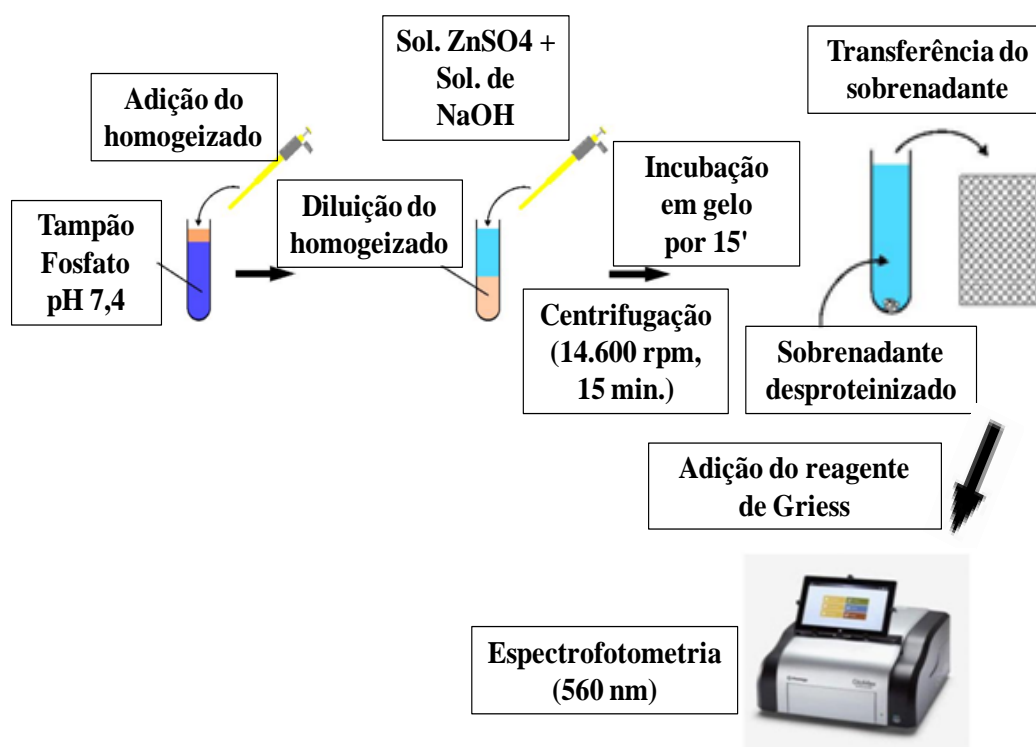
Fonte: Própria do autor

5.8.1.7.3 Avaliação de Nitrito por método de Griess

Para a determinação das concentrações de nitrito, foi utilizado o método de Griess, conforme descrito por Green et al (1982). Para a realização deste ensaio, homogenatos de larvas de *Z. morio* passaram, antes, por um processo de desproteinização, onde foi adicionado uma solução de sulfato de zinco, de acordo com o protocolo de Romitelli et al (2007) e Moshage et al. (1995). A solução tampão fosfato pH 7,4 foi utilizada para a produção do homogêneo das larvas na proporção de 50 mg por 1 mL de tampão. Com a coleta do sobrenadante do homogêneo, e posterior desproteinização, foi adicionado em eppendorf 180 μ L de solução de Sulfato de Zinco ($ZnSO_4$) a 0,15 M, 3 μ L, de solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) a 10 M, e 300 μ L de amostra, sendo incubada em gelo por 15 minutos para posterior centrifugação dessa solução a 14.600 rpm, por 5 minutos, e obter um sobrenadante desproteinizado. Em uma microplaca, adicionou-se 100 μ L do sobrenadante, desproteinizado, em duplicata, por poço, juntamente com 100 μ L do reagente de Griess, aguardou-se por 10 minutos enquanto a reação acontecia para, então, realizar a leitura em espectrofotômetro GloMax a 560 nm. Os valores de concentração foram calculados usando uma curva de calibração obtida através da leitura espectrofotométrica (560 nm) de diluições seriadas (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 μ M) de uma solução mãe de Nitrito de Sódio

(NaNO_2) a 10 mM que reagiu com o reagente de Griess sobre as mesmas condições que as amostras reagiram. Para o branco utilizou-se água destilada de amostra, seguindo o mesmo método. Todo o experimento pode ser melhor visualizado por meio da ilustração apresentada na **Figura 29** abaixo.

Figura 29: Esquema do protocolo da avaliação de Nitrito pelo método de Griess modificado das Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante.



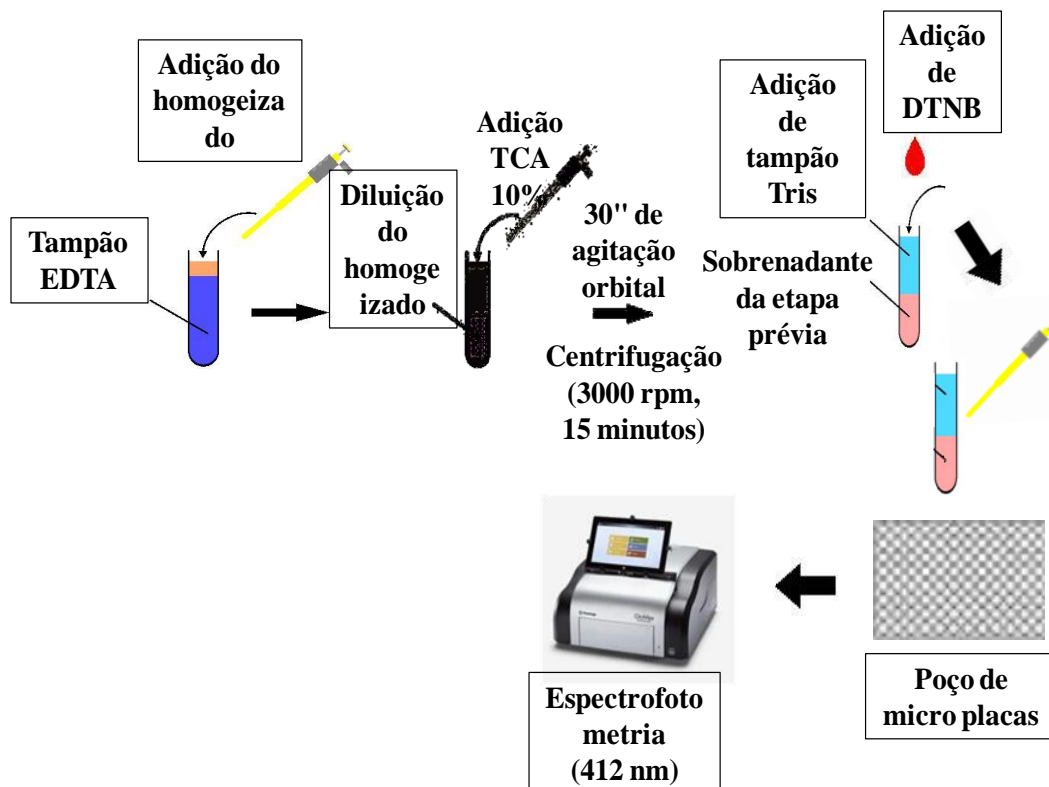
Fonte: Própria do autor

5.8.1.7.4 Avaliação da concentração de grupos sulfidrila não proteicos reduzidos - Glutathiona reduzida (GSH).

Para avaliar as concentrações de GSH, as larvas de *Z. morio* foram homogeneizadas em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0,02 M, com proporção de 100 μL da amostra por 1mL de tampão. Obtido o sobrenadante, da segunda centrifugação do homogeizado, esse foi diluído com igual volume de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Essa mistura foi agitada por 30 segundos, e em seguida centrifugada a 3000 rpm no tempo de 15 minutos. Em seguida alíquotou-se parte do sobrenadante, com intuito de misturá-lo com dois volumes de solução, identificada como tampão Tris, sendo composto por tris (hidroximetil) aminometano (Tris) a 0,4 M EDTA a 0,2 M tamponado em pH 8,9. Para a realização da leitura adiciona-se 50 μL de ácido 5,5-dítio-bis-(2-nitobenzoico) (DNTB) a 0,01 M para cada 3 mL de solução a ser analisada, ajusta-se o espectrofotômetro para o comprimento de onda de 412 nm zerando-o com um Branco (2 mL de água destilada, 4 mL de tampão Tris e 100 μL de DNTB a 0,01M) e realiza-se a leitura da amostra em espectrofotômetro GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader. As concentrações

em μM , de grupamentos sulfidríla reduzidos, são dadas pela multiplicação da absorbância obtida no teste pelo fator 317,8 (HABEED, 1972). Uma forma mais didática para a compreensão do ensaio esta apresentada na **Figura 30**.

Figura 30: Esquema da avaliação de grupos sulfidríla não proteicos reduzidos-Glutationa reduzida (GSH) das Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante.



Fonte: Própria do autor

5.9 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos neste estudo foram realizados em duplicata de experimento e triplicata de concentração para cada formulação, sendo obtidos a média \pm e desvio padrão (SD) para os parâmetros antioxidantes avaliados neste estudo. A análise estatística e a obtenção dos gráficos foram realizadas pelo *software* Graph Pad Prism 8.0.1™ (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, EUA), sendo consideradas significativas as diferenças quando $p < 0,05$. E a avaliação para as possíveis diferenças significativas foi realizada através de testes paramétricos; já para a diferença de variância utilizada, por sua vez, foi one-way ANOVA, seguido por teste estatístico de Tukey para todos os experimentos. Os dados foram apresentados com recursos gráficos

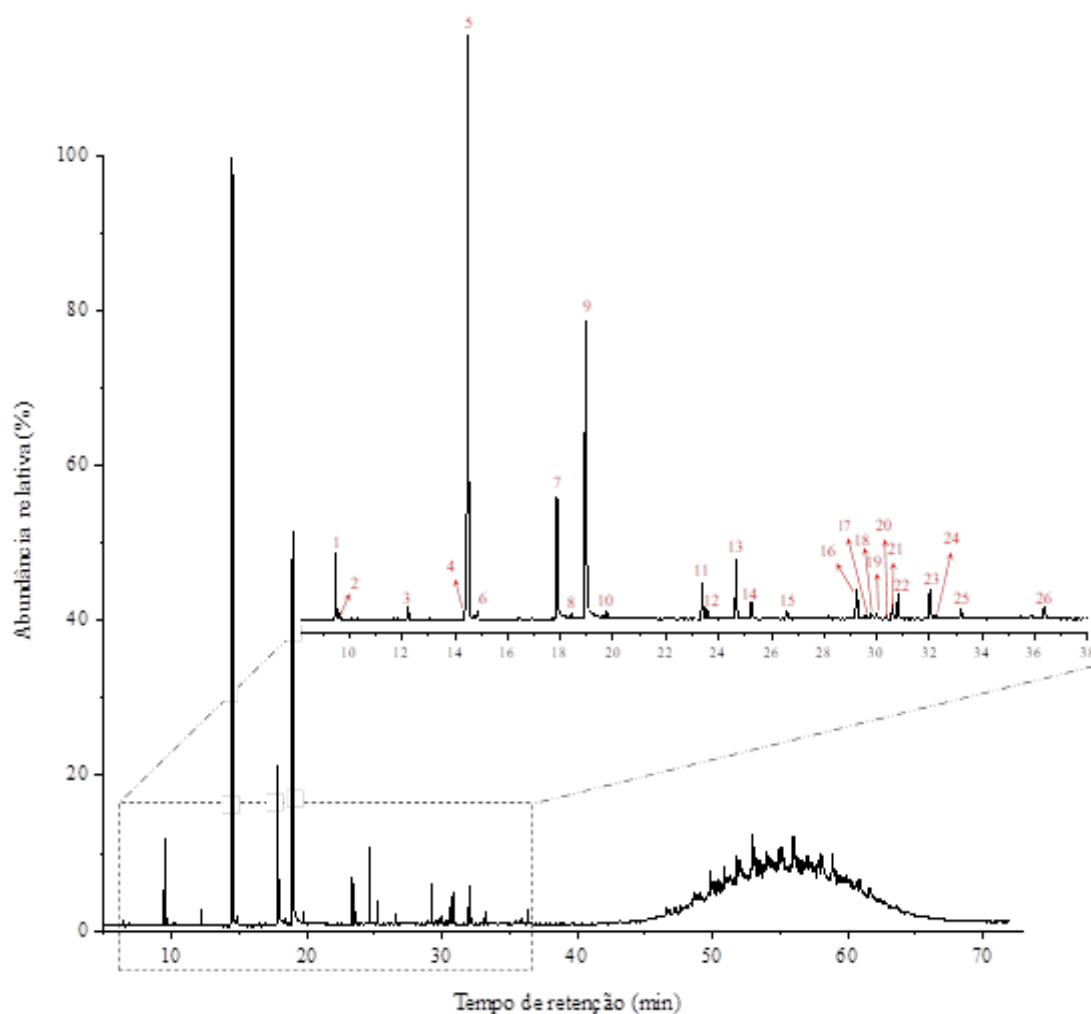
6 Resultados e Discussão

6.1 Caracterização das formulações

6.1.1 Detecção e quantificação da composição química dos óleos por Cromatografia gasosa acoplada por espectrometria de massas (CG-EM)

O perfil cromatográfico obtido do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* está apresentado na **Figura 31**. Os compostos majoritários identificados no óleo essencial foram: o citronelal ($41,047 \pm 0,1866$ %), o geraniol ($23,733 \pm 0,1173$ %) e citronelol ($8,610 \pm 0,2238$ %).

Figura 31: Cromatograma de íons totais do óleo de *Cymbopogon winterianus*.



Fonte: Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), 2020.

Na análise do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, foi possível identificar a presença de 26 compostos (**Tabela 4**), sendo distribuídos em monoterpenoides (87,16%), sesquiterpenoides (10,58%), e fenilpropanoides (0,96%) e ainda a presença de éster (0,27%).

Tabela 4 – Composição do óleo de *Cymbopogon winterianus*

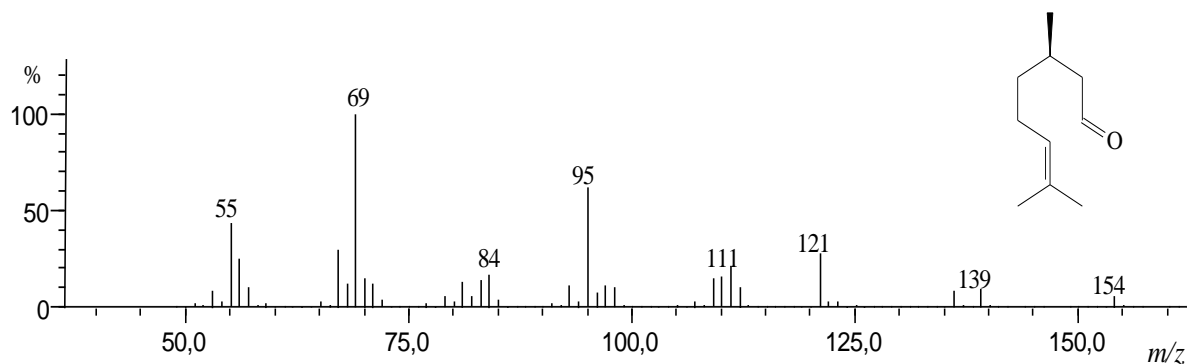
Pico	Nome	I.R. _(liter.)	I.R. _(calc.)	Tempo de retenção (min) ± DP	Abundância relativa (%) ± DP
1	limoneno	1029	1054	9,48 ± 0,0037	3,860 ± 0,1236
2	β -ocimeno	1050	1058	9,65 ± 0,0043	0,247 ± 0,0170
3	linalol	1096	1125	12,22 ± 0,0029	0,723 ± 0,0386
4	isopulegol	1149	1176	14,41 ± 0,0090	0,967 ± 0,1181
5	citronelal	1153	1187	14,49 ± 0,0037	41,047 ± 0,1866
6	neo(iso)isopulegol	1171	1187	14,85 ± 0,0066	0,327 ± 0,0330
7	citronelol	1225	1255	17,86 ± 0,0029	8,610 ± 0,2238
8	citral	1238	1268	18,41 ± 0,0029	0,180 ± 0,0000
9	geraniol	1252	1280	18,95 ± 0,0037	23,733 ± 0,1173
10	geranial	1267	1298	19,75 ± 0,0046	0,470 ± 0,0283
11	acetato de citronelila	1352	1381	23,38 ± 0,0029	2,623 ± 0,0330
12	eugenol	1359	1385	23,56 ± 0,0022	0,693 ± 0,0759
13	acetato de geranila	1381	1410	24,65 ± 0,0037	4,377 ± 0,0660
14	β -elemeno	1390	1424	25,24 ± 0,0045	1,140 ± 0,0990
15	β -cariofileno	1419	1456	26,59 ± 0,0062	0,600 ± 0,0216
16	germacreno-D	1485	1520	29,23 ± 0,0048	2,387 ± 0,0613
17	α -cis-bergamoteno	1412	1528	29,56 ± 0,0077	0,267 ± 0,0047
18	cis-metil-isoeugenol	1453	1533	29,78 ± 0,0066	0,263 ± 0,0386
19	α -muuroleno	1500	1538	29,98 ± 0,0062	0,313 ± 0,0471
20	Não identificado	-	1547	30,35 ± 0,0057	0,200 ± 0,0294
21	γ -cadineno	1513	1553	30,59 ± 0,0026	0,890 ± 0,0616
22	δ -cadineno	1523	1558	30,80 ± 0,0033	1,833 ± 0,1173
23	elemol	1549	1588	32,01 ± 0,0034	2,273 ± 0,1482
24	butirato de geranila	1564	1594	32,22 ± 0,0083	0,270 ± 0,0356
25	Não identificado	-	1619	33,19 ± 0,0037	0,833 ± 0,0694
26	α -cadinol	1654	1701	36,35 ± 0,0061	0,873 ± 0,0591

Fonte: Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), 2020.

Na **Figura 32** estão apresentados os espectros de massas dos compostos majoritários.

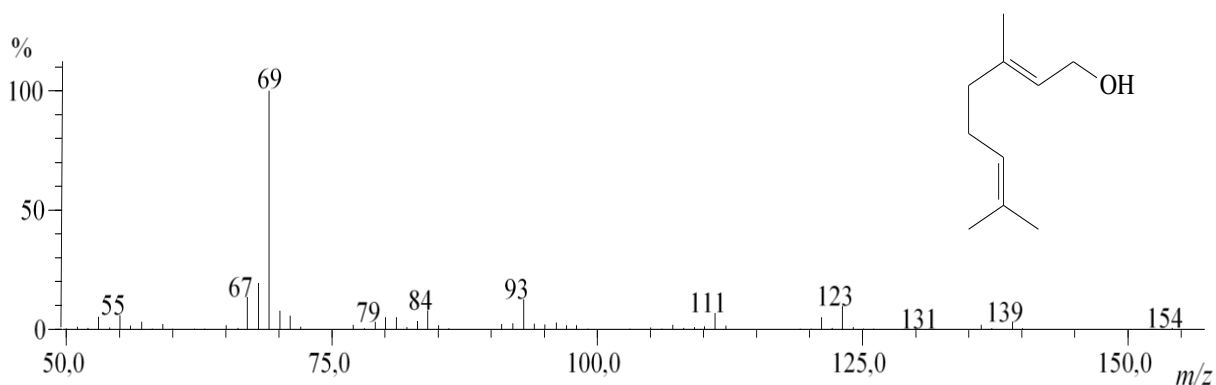
Figura 32: Espectro de massas dos compostos majoritários identificados no óleo de *Cymbopogon winterianus*.

a) Citronelal ($41,047 \pm 0,1866 \%$)



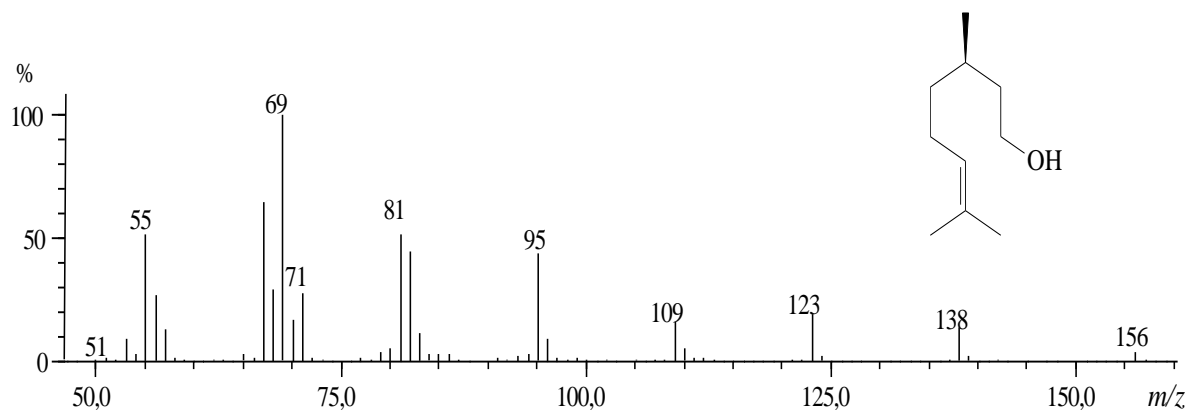
Fonte: Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), 2020.

b) Geraniol ($23,733 \pm 0,1173\%$)



Fonte: Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), 2020.

c) Citronelol ($8,610 \pm 0,2238\%$)



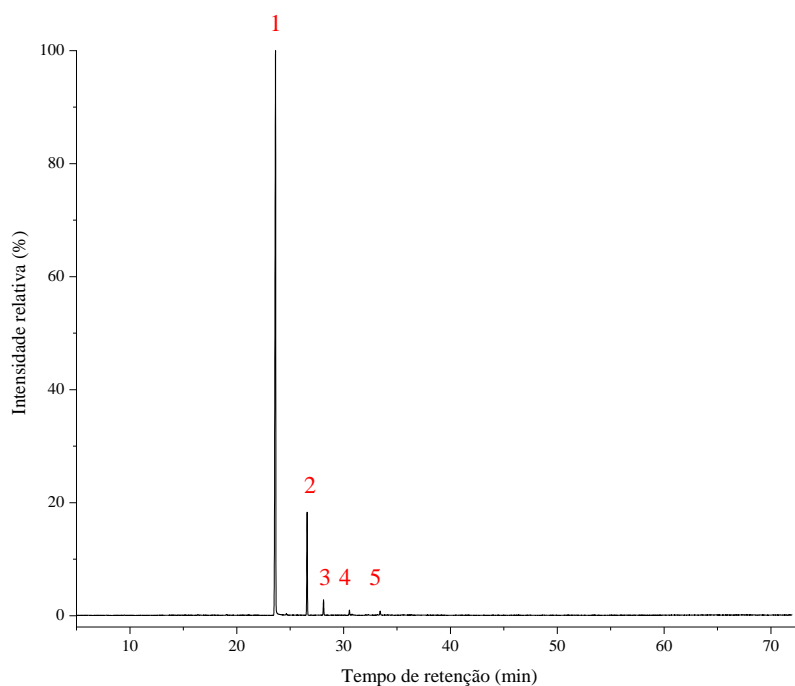
Fonte: Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), 2020.

A citronela, ou capim citronela (*Cymbopogon winterianu.*), é conhecida pelo seu aroma e, principalmente, pelas suas diversas aplicações, como flavorizante, essência em produtos alimentares, aplicações em cosmética e, usualmente, em produtos de repelência de insetos (NAKAHARA et al., 2003). Dentre essas aplicações estudos comprovaram a eficácia do óleo essencial como antimicrobiano, antifúngico e anticâncer, dentre outras. (CUNHA et al., 2020; NAKAHARA et al., 2003; SUJATHA; SIRISHA, 2019).

Por ser um óleo rico em monoterpenoides, Sinha et al., (2014) avaliaram a toxicidade dos óleos essenciais de *Cymbopogon martini* (palmarosa), *Cymbopogon winterianus* Jowitt (citronela Java) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão), aplicados a linfócitos humanos. Essa atividade foi relacionada com a quantidade de geraniol, acetato de geranila, citronelol e citrolenal e citral. Dessa forma os óleos essenciais de palmarosa possuem 65-85% de geraniol e 5-20% de acetato de geranila como componentes majoritários, já o óleo essencial de citronela Java, é composto de geraniol (20-40%), citronelal (20-30%) e citronelol (10-15%). E o óleo essencial de capim-limão é composto basicamente por citral (50-88%). Com base nisso, foi observado que os óleos essenciais testados mostraram-se citotóxicos, genotóxicos e ainda provocaram a apoptose das células, sendo o óleo essencial de capim-limão o mais tóxico, sendo essa toxicidade atribuída ao citral (SOUZA et al, 2020) , que contribui em uma maior geração de espécies reativas a oxigênio (oxidantes), já os demais óleos essenciais possuem uma toxicidade mais baixa devido a maior concentração de geraniol.

O perfil cromatográfico do óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*), obtido está apresentado na **Figura 33**. Os compostos majoritários identificados no óleo essencial foram: o eugenol ($85,387 \pm 0,1922\%$) e o β -cariofileno ($11,793 \pm 0,1841\%$).

Figura 33: Cromatograma de íons totais do óleo de *Eugenia caryophyllus*.



Fonte: Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), 2020.

Na análise do óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*), foi possível identificar a presença de 5 compostos (**Tabela 5**), que estão distribuídos em compostos fenilpropanoides (85,39%), sesquiterpenoides (14,08%) e éster (0,53%).

Tabela 5– Composição do óleo de *Eugenia caryophyllus*.

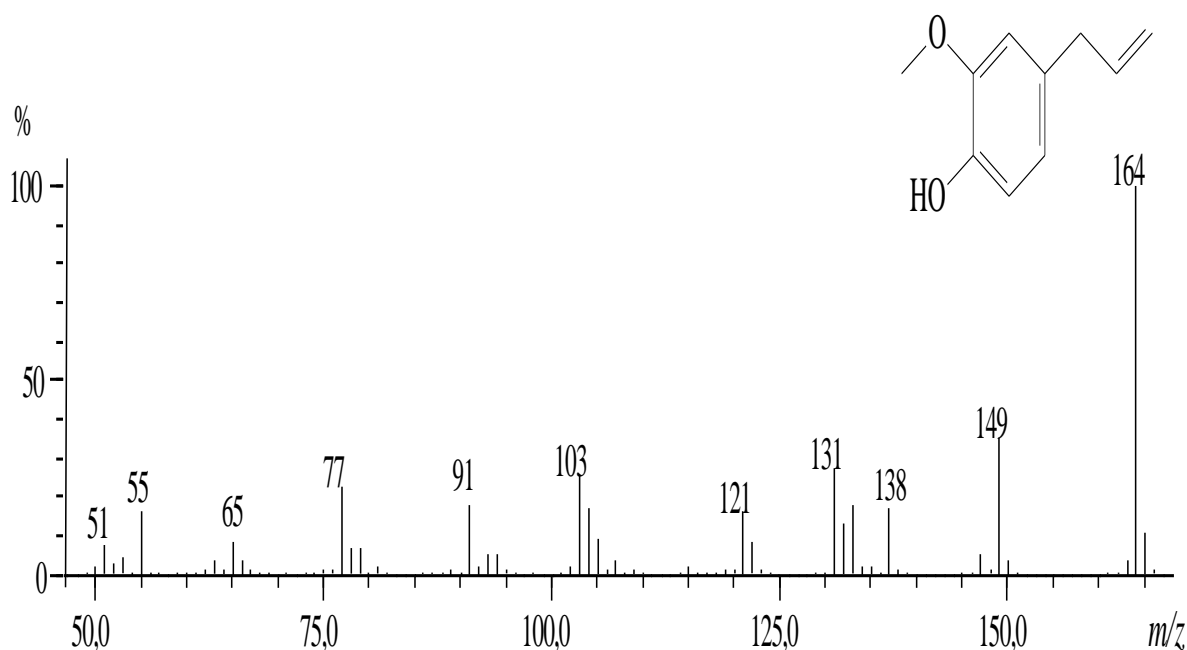
Pico	Nome	I.R. _(liter.)	I.R. _(calc.)	Tempo de retenção (min) ± DP	Abundância relativa (%) ± DP
1	Eugenol	1359	1387	23,63 ± 0,0066	85,387 ± 0,1922
2	β-cariofileno	1419	1456	26,58 ± 0,0033	11,793 ± 0,1841
3	alfa-humuleno	1454	1492	28,12 ± 0,0041	1,750 ± 0,0294
4	acetato de eugenila	1522	1552	30,54 ± 0,0025	0,530 ± 0,0163
5	óxido de cariofileno	1583	1625	33,42 ± 0,0041	0,540 ± 0,0408

Fonte: Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), 2020.

Na **Figura 34** estão apresentados os espectros de massas dos compostos majoritários.

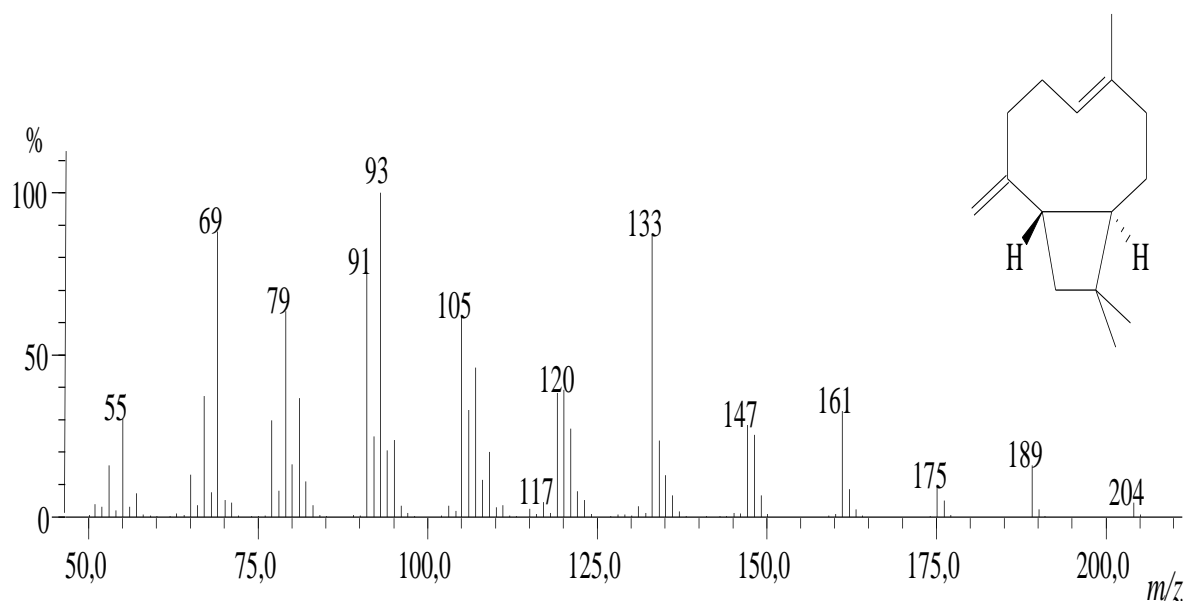
Figura 34: Espectro de massas dos compostos majoritários identificados no óleo de *Eugenia caryophyllus*.

a) Eugenol (85,387 ± 0,1922%)



Fonte: Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), 2020.

b) β -cariofileno ($11,79 \pm 0,1841\%$)



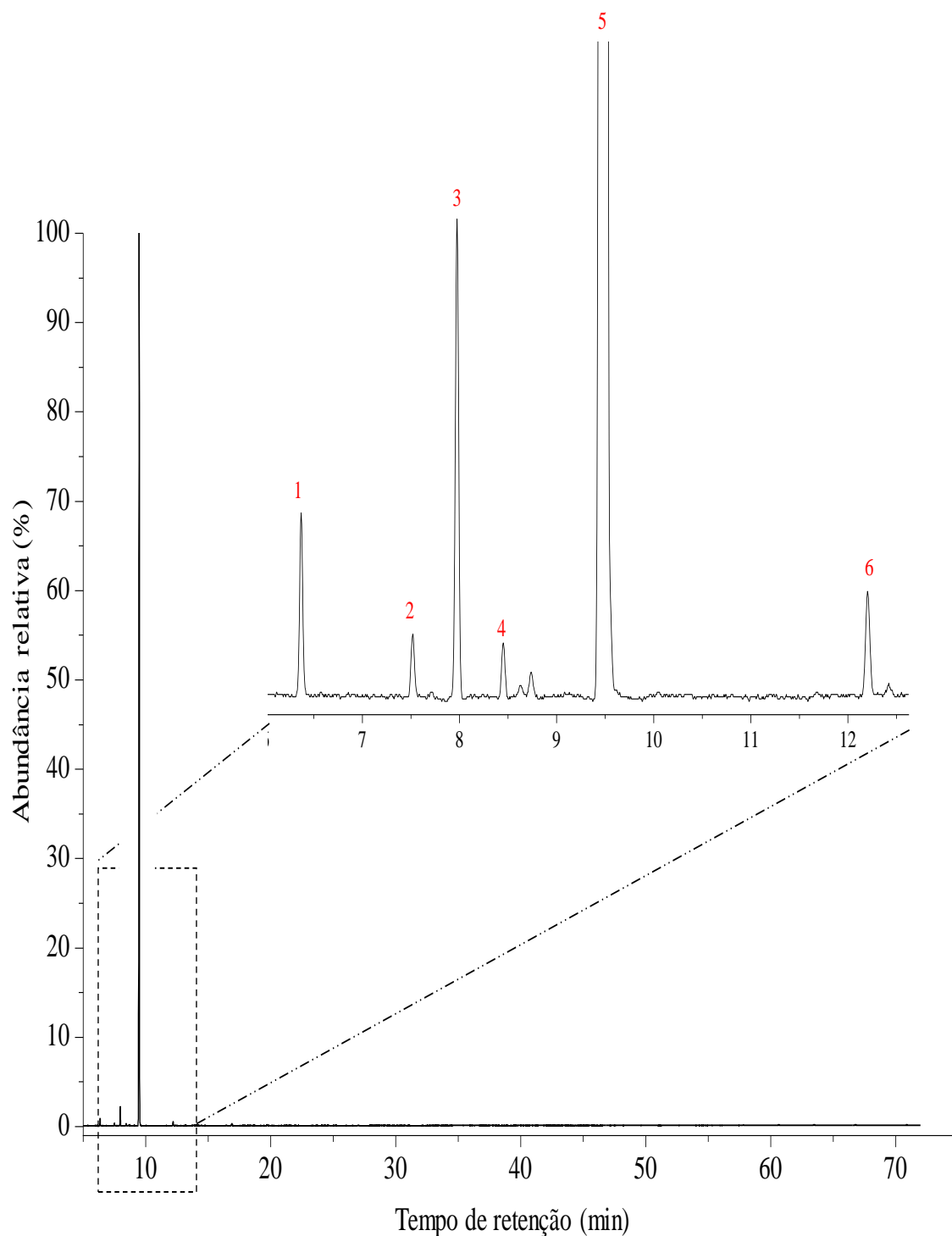
Fonte: Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), 2020.

O cravo da Índia ou cravo, *Syzygium aromaticum*, *Eugenia caryophyllus*, é uma das especiarias mais difundidas no comércio mundial, tendo aplicação na medicina popular. Estudos comprovam a utilização do cravo da Índia nos tratamentos de doenças fúngicas, microbianas e bacterianas, e o consumo regular dessa especiaria promove, a portadores de diabetes, o controle da doença, resultando em uma melhor qualidade de vida. As atividades biológicas atribuídas ao consumo do cravo da Índia estão relacionadas principalmente ao seu óleo essencial, por ser rico em um antioxidante natural, eugenol (DE OLIVEIRA et al., 2009).

O eugenol é um composto fenólico, que possui propriedades antioxidantes, anticâncer, antifúngica, antibacteriana entre outras (GÜLÇİN, 2011; HE et al., 2007; MARCHESE et al., 2017). Sujatha e Sirisha (2019), avaliaram a atividade citotóxica do óleo essencial de cravo frente às seguintes linhagens tumorais: MCF-7 (câncer de mama), HeLa (carcinoma cervical) e K-562 (leucemia miéloide). O óleo essencial mostrou-se citotóxico em todas as linhagens testadas, possuindo maior porcentagem de inibição para a linhagem K-562 (aproximadamente 60%), essa inibição foi relacionada ao eugenol, componente majoritário do óleo essencial.

A distribuição dos compostos está apresentada no cromatograma de íons totais (**Figura 35**). O composto majoritário identificado no óleo essencial foi o limoneno ($97,107 \pm 0,0205\%$).

Figura 35: Cromatograma de íons totais do óleo de *Citrus sinensis*.



Fonte: Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), 2020.

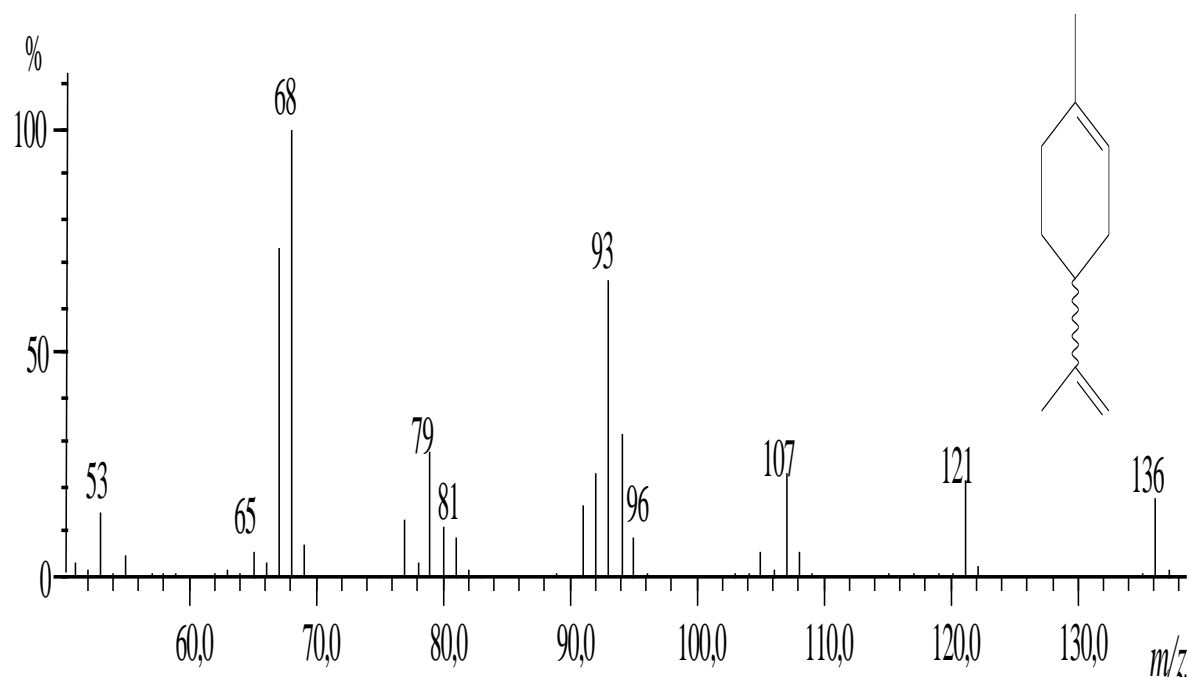
Na análise do óleo essencial de laranja *Citrus sinensis*, foi possível identificar a presença de 6 compostos (**Tabela 6**), que estão distribuídos em monoterpênicos (99,82%) e aldeído (0,18%)

Tabela 6– Composição do óleo de *Citrus sinensis*.

Pico	Nome	I.R. _(liter.)	I.R. _(calc.)	Tempo de retenção (min) ± DP	Abundância relativa (%) ± DP
1	alfa-pineno	939	958	6,37 ± 0,0005	0,547 ± 0,0125
2	sabineno	975	1000	7,52 ± 0,0009	0,193 ± 0,0170
3	mirreno	990	1012	7,97 ± 0,0005	1,577 ± 0,0094
4	n-octanal	998	1025	8,45 ± 0,0005	0,177 ± 0,0047
5	limoneno	1029	1054	9,49 ± 0,0008	97,107 ± 0,0205
6	linalol	1096	1124	12,20 ± 0,0009	0,400 ± 0,0141

Fonte: Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), 2020

Na **Figura 36** está apresentado o espectro de massas do óleo de *Citrus sinensis* para componente majoritário limoneno.

Figura 36: Espectro de massas do limoneno (composto majoritário do óleo de *Citrus sinensis*).

Fonte: Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), 2020.

O limão doce ou mousambi, *Citrus sp.*, limão, é conhecido por diversas aplicações, desde aplicações na farmácia, indústria cosmética e indústria gastronômica. O óleo essencial da casca do limão doce possui atividades antimicrobianas, anticâncer, antioxidantes e antifúngica, dentre outras (JAVED et al., 2013).

Miller et al., (2018), avaliaram a atividade anticâncer do óleo essencial de *Citrus limetta* e outras plantas, frente às linhagens de câncer de língua (ATCC CRL-2095), de pele (ATCC CRL-1619) e de estômago (ATCC CRL-1739), no ensaio *C. limetta* mostrou atividade moderada com IC₅₀ de 0,18, 0,62 e 0,13 µg mL⁻¹, respectivamente. Por ser um óleo rico em monoterpenoides, principalmente limoneno, a atividade anticâncer pode estar relacionada à quantidade deste composto no óleo essencial.

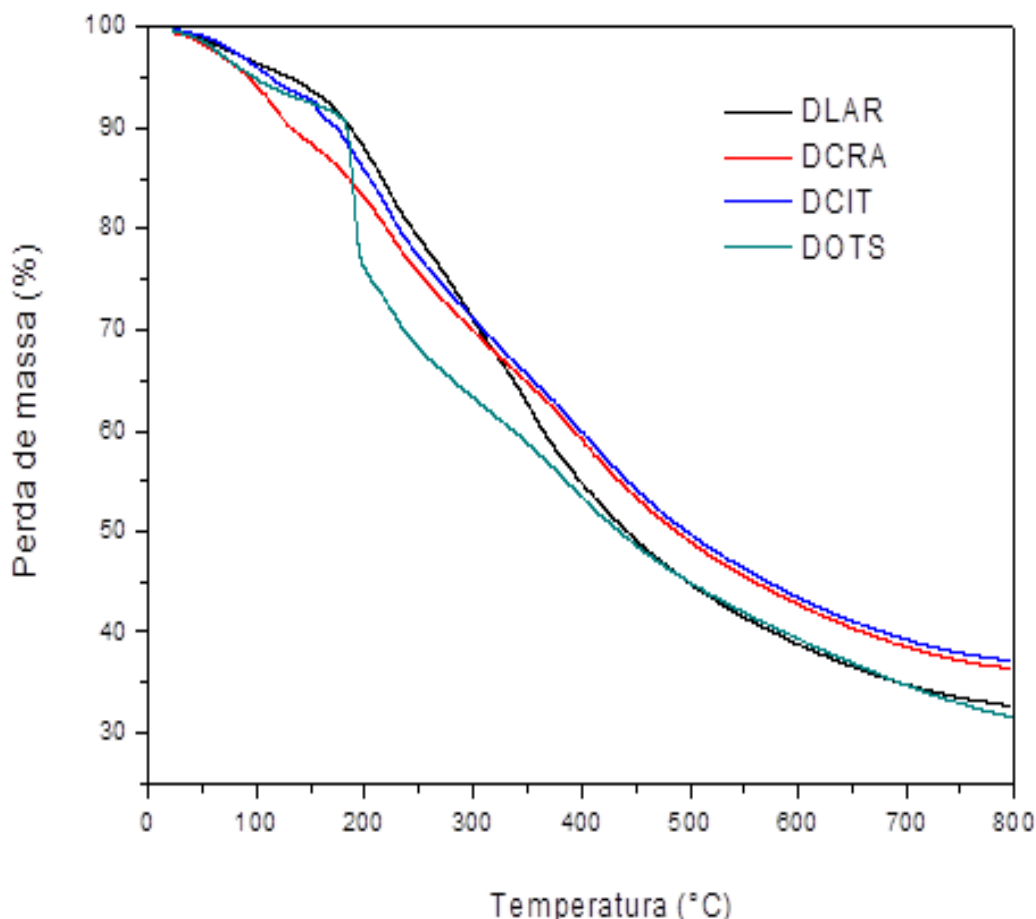
Lu et al., (2004), administraram limoneno (97% de pureza) em tumores gástricos transplantados e observaram que a administração de limoneno, contribuiu na diminuição da metástase e ainda na diminuição do tamanho do tumor.

6.1.2 Termogravimetria (TG)

O intuito de realizar a termogravimetria (TG) é observar se ocorreu uma degradação da amostra, ou seja, a perda de massa da amostra, pois o princípio desta técnica consiste em avaliar uma variação de perda, ou ganho de massa, em função da temperatura à qual o material é exposto. Com isso é possível estabelecer até que temperatura o material é estável, podendo verificar uma decomposição dele, bem como reações de oxidação, perda por combustão e decomposição.

Os dados obtidos com as formulações demonstraram que é possível observar quanto de óleo foi incorporado ao DOTS, observando a diferença de massa final entre a amostra pura e as amostras com os óleos, assim é notada uma diferença de massa final de aproximadamente 5,54%, aproximadamente, entre as amostras de DOTS e as amostras de DCIT e DCRA. Evidenciando que o DLAR não teve alteração. A **Figura 37** apresenta as curvas termogravimétricas.

Figura 37: Gráfico da análise termogravimétrica das amostras de DOTS (Carbon dots), DLAR (DOTS Laranja), DCRA (DOTS Cravo), DCIT (DOTS Citronela) que mostra a perda de massa do material em função da variação de temperatura de 25 a 800°C.



Fonte: Laboratório de Desenvolvimento de Processos Químicos (LDPQ) 2020.

A análise termogravimétrica é bastante utilizada em materiais que seguem o mesmo tipo de funcionalização, como os nanocompósitos de óxido de ferro sintetizados (NETO et al., 2018; NEVES et al., 2011). Essa técnica pode ser utilizada para avaliar a estabilidade térmica do material, uma vez que monitora a perda de massa do material em função da variação de temperatura.

É observado ainda que o material não perde estabilidade térmica com a incorporação dos óleos e que os óleos de DCRA E DCIT apresentam comportamento semelhante. Vale ressaltar que todas as análises foram realizadas sob atmosfera inerte de nitrogênio, que evita a oxidação dos nanocompósitos e, conseqüentemente, elimina um potencial aumento de peso como resultado da oxidação dos óleos essenciais.

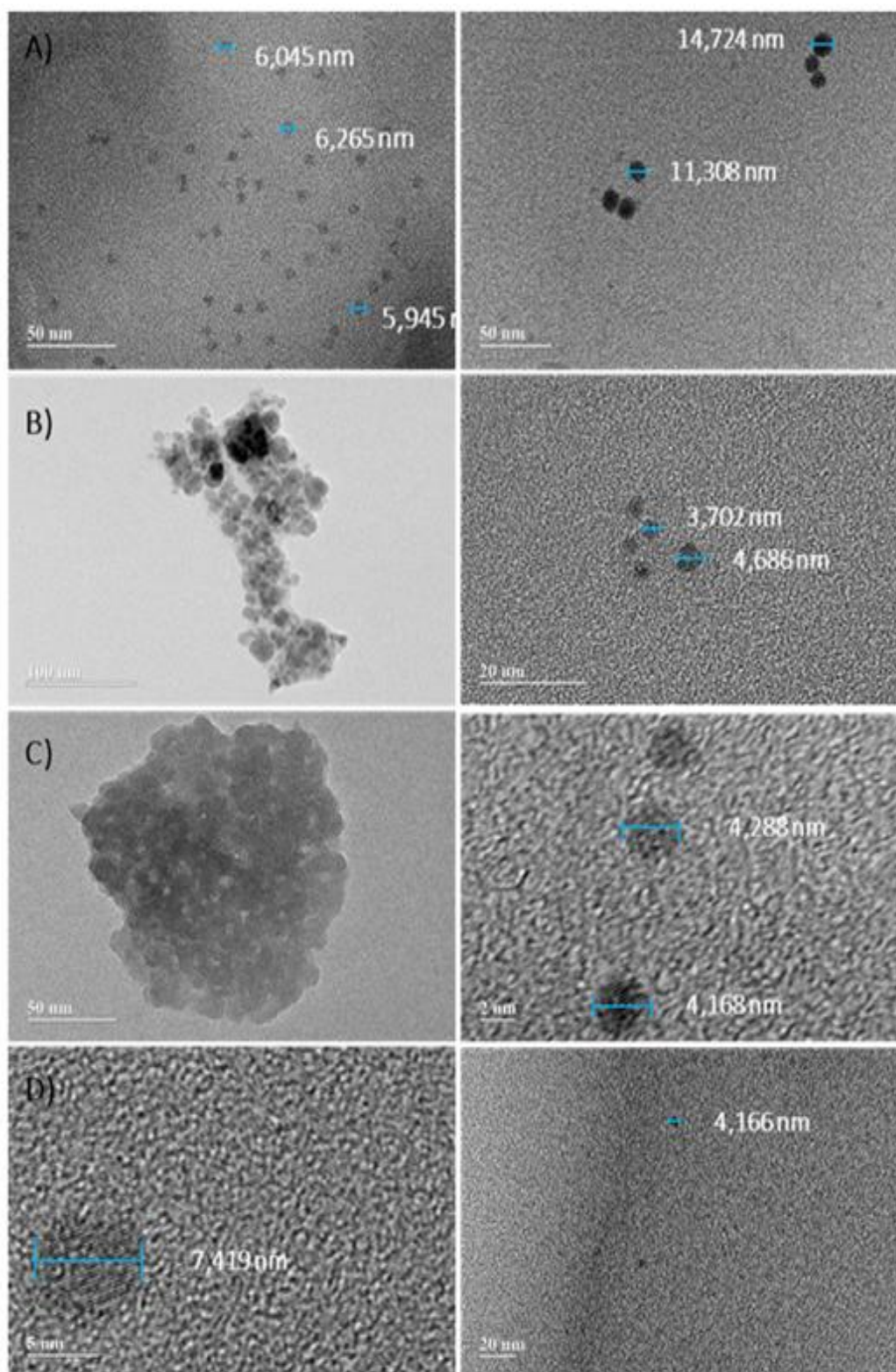
Dados da literatura corroboram com os resultados obtidos em que formulações de filmes contendo óleos essenciais apresentaram o mesmo comportamento da matriz do filme puro (LIU et al, 2016) contribuindo assim com os resultados de DOTS E DLAR utilizando este ensaio, bem como em outro estudo foi possível observar uma degradação da massa de uma formulação na faixa de 100 a 150°C, confirmando assim, a perda da massa dos óleos essenciais presentes (DA COSTA LIMA et al, 2021),

evidenciando que para as formulações DCRA e DCIT o resultado corresponde aos dados já registrados por outros estudos.

6.1.3 Análise morfológica da partícula do Carbon Dots

A Microscopia eletrônica de transmissão (MET) é utilizada para obter informações da morfologia da partícula, em estudos das formulações analisadas, onde são determinados o tamanho, o formato e o tamanho de nanoestruturas. Para este estudo foi possível observar a morfologia esférica e o tamanho das partículas que estão apresentadas na **Figura 38**. O tamanho das partículas foi obtido pelo software ImageJ e assim foi possível observar uma variação de tamanho de 4 a 6 nm sendo algumas partículas isoladas com o tamanho maior. Além disso, é possível notar que o procedimento experimental adotado para modificação superficial das DOTS não altera significativamente o tamanho e a morfologia das partículas precursoras.

Figura 38: Imagens de MET das amostras A) DOTS (Carbon dots), B) DCIT(DOTS Citronela), C) DCRA (DOTS Cravo) e D) DLAR (DOTS Laranja).



Fonte: Laboratório de Desenvolvimento de Processos Químicos (LDPQ) / Laboratório Multiusuário de Microscopia de alta resolução (LabMic) 2020.

Devido ao índice de refração dos óleos e do C-dots serem muito próximos, não é possível observar, visualmente, em todas as partículas, a formação da funcionalização da superfície da partícula, porém na imagem em B é possível notar a formação de uma camada de óleo sobre as partículas (ARAUJO et al, 2015).

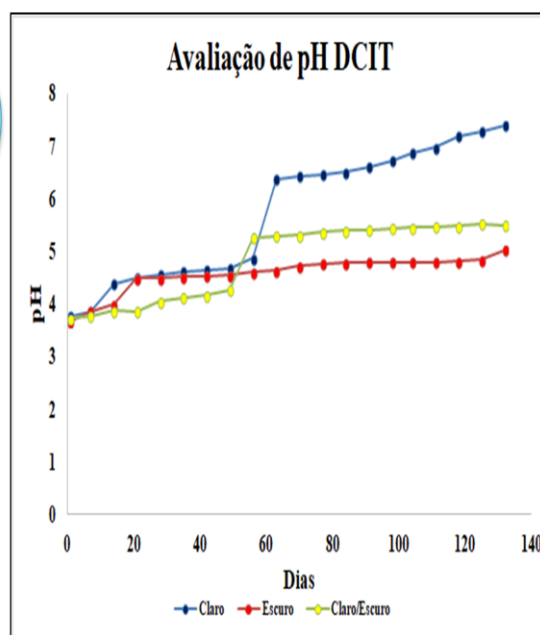
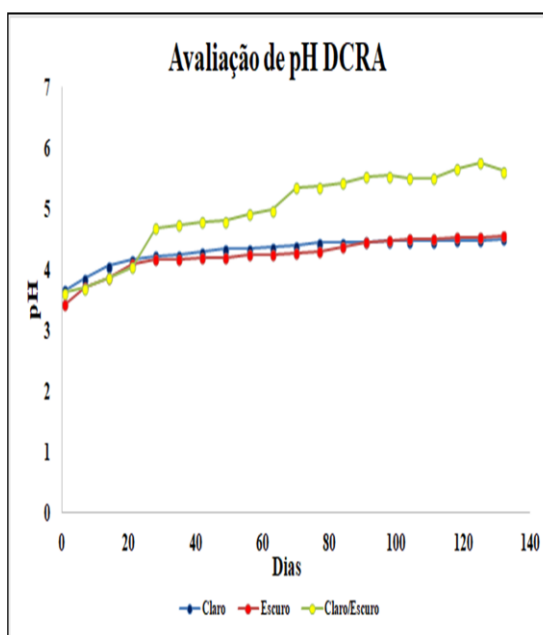
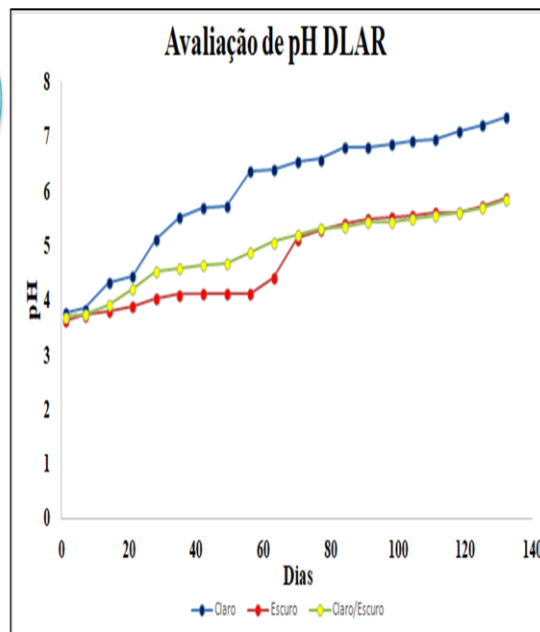
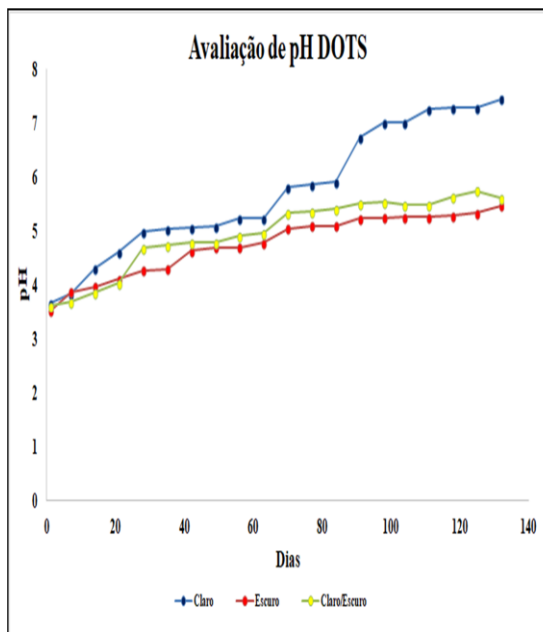
As morfologias esféricas, detectadas pelas imagens, corroboram com dados da literatura que reportam as características dimensionais e cristalográficas dos C-dots. Isso foi confirmado por microscopia eletrônica de transmissão (MET), onde foi observado que os C-dots exibem uma morfologia quase esférica (DE OLIVEIRA, 2021).

O tamanho, em sua maioria, apresentou entre 4 a 6 nm e está de acordo com dados da literatura que obtiveram resultados após uma purificação de nanotubos de carbonos em que os pontos de carbono possuíam uma estrutura de nanoesferas, com um diâmetro inferior a 10nm (RODRÍGUEZ-VARILLAS et al, 2022).

6.1.4 Estabilidade físico-química por ensaio de pH em exposição diferentes de luz

Todas as formulações mostraram-se homogêneas, com coloração escura, bem concentrada, sem divisão de fases, com odor bem característico de cada formulação, em todo o período de armazenamento e tipo de exposição às quais foram avaliadas. A **Figura 39** abaixo mostra os resultados que foram possíveis observar, onde cada formulação apresentou resultados individuais. A formulação de DOTS, quando exposta a luz mostrou uma estabilização para meio básico, e em ambiente escuro, e com 12h escuro e 12h luz o valor médio foi de 5,45 tendenciado para neutro. Para o DCRA não ocorreu alteração em nenhum dos ambientes expostos sendo o valor obtido mais ácido. Quanto a DLAR, em ambos os ambientes, apresentou a mesma média de valores para meio básico. Por último a formulação DCIT, para a exposição no escuro mostrou valores ácidos, com final dando indicativo para básico, e nos outros dois meios, luz e 12h de luz e 12 h escuro, foi totalmente alcalino.

Figura 39: Valores de pH para as formulação DOTS, DCRA, DLAR e DCIT nos tempos de 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 77, 84, 91, 97, 104, 111, 118, 125 e 132 dias após a obtenção dos materiais.



— Claro — Escuro — Claro/Escuro

Legenda: Grupo A : DOTS; B: DCRA; C: DLAR; D: DCIT. Laboratório de Genética e Morfologia (LAGEM), UnB – 2021.

O ensaio de pH é muito utilizado para avaliar a estabilidade de uma formulação, considerando fatores extrínsecos ou intrínsecos, mas também com base nos valores do pH de uma formulação é possível determinar a via de administração para uso de fármacos. Nos extrínsecos a formulação pode sofrer interferência na composição com variáveis de tempo, temperatura, luz, umidade e oxigênio. Nos fatores intrínsecos é a própria composição natural que pode reagir com ela própria sofrendo alterações no pH, na densidade e na viscosidade, dentre outros (MAIA, 2002).

Pode se observar também que da estabilidade de um produto pode vir a ser afetada pela presença de cargas microbianas, podendo assim degradar o princípio ativo da formulação, o pH vem a ser modificado e a formulação pode ficar anulada (VILLANOVA DE SÁ, 2009). Baseado neste contexto, estudos mostram que em formulações com 180 dias, cuja alteração nas medidas do pH é pequena a probabilidade de alteração nestes valores, por contaminação de microrganismo, é quase nula (ALMEIDA, 2021), com isso observamos que os componentes presentes nas formulações como DCRA, DLAR e DCIT, que apresentam propriedades antimicrobianas, se mostraram com potencial ativo.

É de fundamental importância o estudo da estabilidade de um produto, pois através destes resultados pode-se assegurar segurança, qualidade e eficácia para o consumidor. Para que se possa ter todos estes parâmetros são necessário as avaliações em meios de exposição, que podem sofrer alteração. Para isso fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz, além dos fatores intrínsecos, como propriedades físico-químicas substâncias ativas, excipientes, fórmulas farmacêuticas e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais usados (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL., 2019) necessitam ser analisadas.

Para justificar o parâmetro de estabilidade por meio da avaliação de pH, estudos mostram que quando ocorrem alterações nos valores de pH, a qualidade do sistema da reação indica comprometimento, podendo estar relacionado a afastamento dos ativos da formulação de encapsulados das nanopartículas, que podem desestabilizar a formulação. O mesmo estudo observou que quando existe uma redução do pH, ao longo do tempo, em sistema como os coloidais, associa-se a uma deterioração dos elementos presentes na formulação, levando a uma acidificação da mesma (GONZÁLEZ-REZA et al., 2018).

6.1.5 Propriedades ópticas

6.1.5.1 Espectroscopia Raman

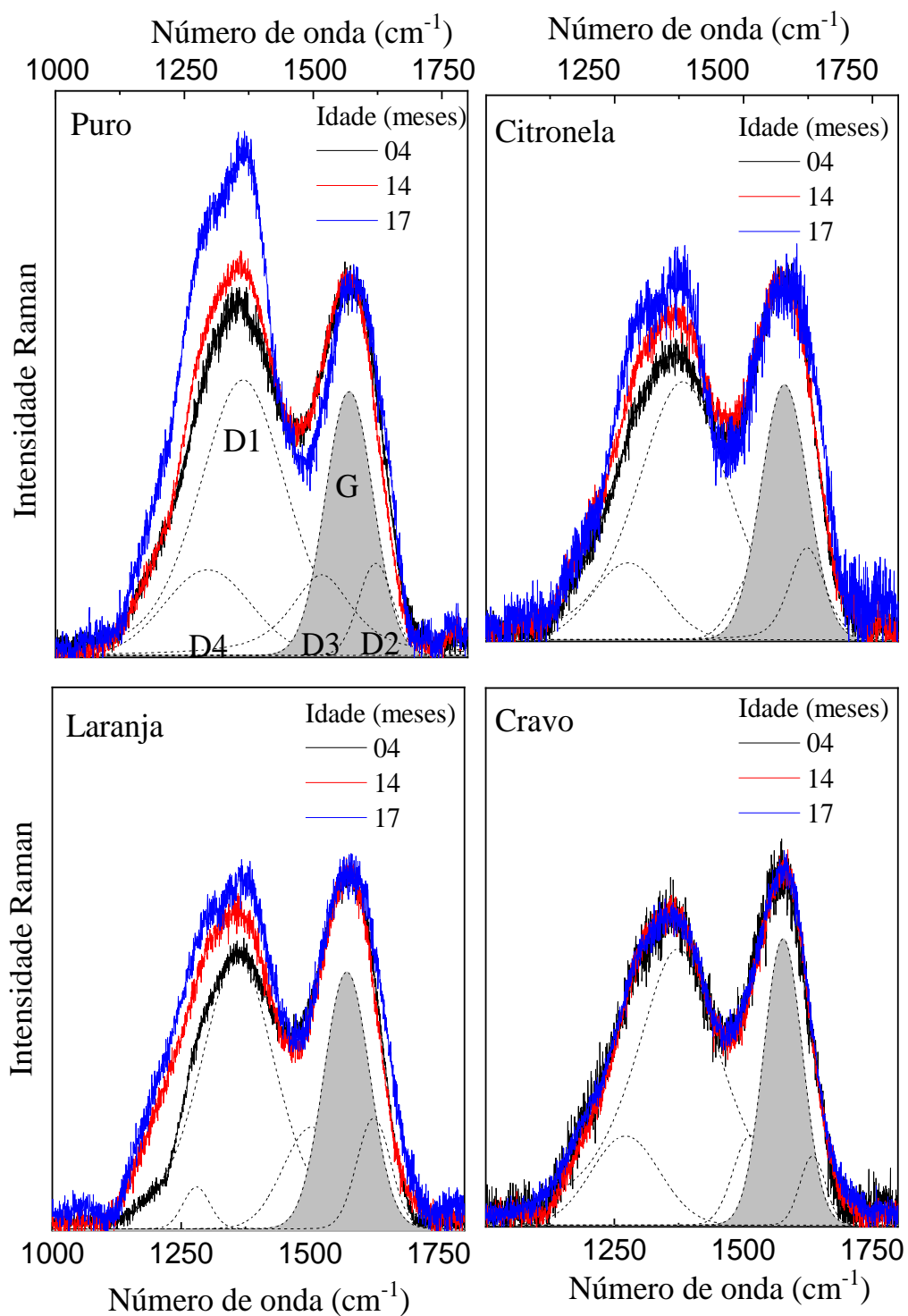
A espectroscopia Raman é uma das ferramentas mais bem estabelecida para a caracterização estrutural de materiais a base de carbono. Além de determinar o estado cristalino, é também útil para investigar a pureza, defeitos e desordem destes materiais (KAR, MAITI, 2021). Assim, neste trabalho a espectroscopia Raman é utilizada para investigar os efeitos do recobrimento com diferentes óleos essenciais no processo de envelhecimento de pontos quânticos de carbono.

A **Figura 40** mostra os espectros Raman das amostras de Carbon Dots puro (como preparado – DOTS) (a) e recobertos com óleos essenciais de citronela (DCIT) (b), laranja (DLAR) (c) e cravo (DCRA) (d) com idades de 4, 14 e 17 meses. Os espectros Raman dos Carbon dots são caracterizados por duas bandas intensas

localizadas em ~ 1365 (banda D) e $\sim 1585 \text{ cm}^{-1}$ (banda G). As características espectrais indicam que os DOTS apresentam um grau significativo de desordem que se reflete no aumento da largura e da intensidade da banda D. A banda G representa a hibridização sp^2 , associada um modo Raman ativo duplamente degenerado da rede cristalina, enquanto a banda D representa a hibridização sp^3 ou regiões de desordem e defeitos de rede, particularmente na superfície do DOTS (PAPAIIOANNOU et al, 2018). A presença ou ausência dessas bandas e suas posições, intensidades e formas relativas fornecem informações sobre a existência e a natureza dos defeitos nos derivados de grafeno. Por esta razão, a banda D aumenta em intensidade com relação a banda G, sempre que o grau de desordem na estrutura do material carbonáceo aumenta.

A literatura tem mostrado que a banda D se divide em outras bandas, geralmente encontradas em aproximadamente 1280, 1360, 1500 e 1625 cm^{-1} , associados às bandas D4, D1, D3 e D2 respectivamente. Assim como a banda G, a banda D2 corresponde a vibrações da rede com simetria E_{2g} enquanto as bandas D1 e D4 corresponde a vibrações da rede com simetria A_{1g} (SADEZKY et al, 2005; LÓPEZ-DÍAZ et al, 2017)

Figura 40: Espectros Raman dos Carbon Dots: DOTS (a), DCIT (b), DLAR (c) e DCRA (d) para diferentes idades.



Fonte: Laboratório de Espectroscopia Óptica (LEO) 2020.

É bem estabelecido que a razão entre as intensidades das bandas D e G (I_D / I_G) é um bom parâmetro para estimar o grau de desordem/presença de defeitos estruturais nos materiais carbonáceos. Contudo, nos espectros Raman a presença das bandas D(1 - 4) influenciam não somente a relação de intensidade relativa da razão I_D / I_G , mas também suas posições e larguras de linha. Para eliminar esta contribuição, calculamos as intensidade integradas relativa das bandas D e G considerando os valores após ajustar o espectro de primeira ordem a cinco funções Lorentzinas + Gaussianas, de modo que a razão I_D/I_G é calculada com base na soma das intensidades integradas relativas das bandas D's dividida pela intensidade integrada da banda G. Os DOTS como preparados apresentam razões de intensidade de 1,90, 2,10, e 2,70, para as amostras com idades de 4, 14 e 17 meses, respectivamente. Este comportamento indica que há um aumento no teor de defeitos nos DOTS de com o decorrer do tempo, provavelmente devido a processos oxidativos induzidos pelo oxigênio do meio. Procedimentos semelhantes foram adotados para as amostras DCIT, DLAR e DCRA. Os valores das razões I_D/I_G encontrados para as idades de 4, 14 e 17 meses, podem ser encontrados na **Tabela 7**.

Tabela 7: Valores da razão I_D/I_G encontrados para as idades de 4, 14 e 17 meses, determinados para as formulações DOTS, DCIT, DLAR e DCRA.

Amostra	(I_D / I_G)			$I_{C=O} / I_{C=C}$		
	4	14	17	4	14	17
DOTS	1,90	2,10	2,70	1,05	1,06	1,48
DCIT	1,60	1,80	2,00	1,14	1,38	1,51
DLAR	1,60	1,78	1,98	1,18	1,25	1,37
DCRA	1,74	1,75	1,76	1,01	1,62	1,65

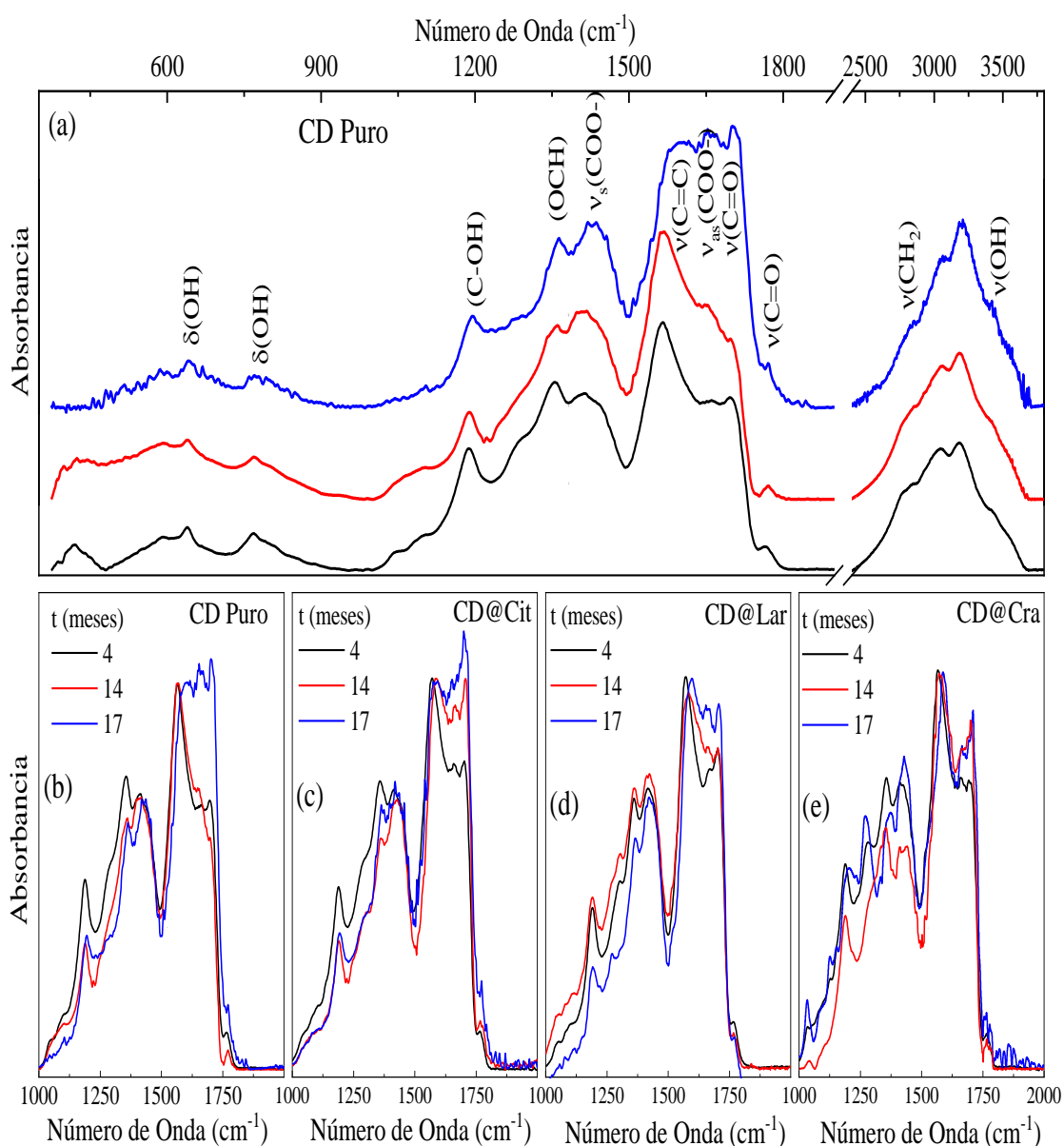
Fonte: Laboratório de Espectroscopia Óptica (LEO) 2020.

6.1.5.2 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi também usada para estudar o efeito da presença dos diferentes óleos essenciais nos processos oxidativos dos DOTS. Os espectros FTIR (**Figura 41**) mostram a presença de vários grupos oxigenados na superfície dos DOTS as quais sofrem significativas mudanças com a idade da amostra. Vibrações de grupos hidroxila ligados às bordas dos grupos fenóis e éteres nas estruturas aromáticas podem ser encontradas em torno 650 e 780 cm^{-1} ($\delta(OH)$) e 3400 cm^{-1} ($\nu(OH)$). Uma combinação de bandas de absorção O-C-H e C-O-H ocorre na região de $1350 - 1500 \text{ cm}^{-1}$. Os espectros de absorção exibem também uma forte banda em $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$, associada com modos de estiramento simétrico da carboxila. Modos vibracionais $\nu_{as}(COO^-)$ e $\nu(C=O)$ podem ser encontrados em 1670 e 1715 cm^{-1} , respectivamente.

Em 1565 cm^{-1} aparece o estiramento C=C, característico da ligação dupla do anel aromático policíclico da estrutura do CD (BEZBARUAH et al, 2014). Uma análise cuidadosa dos espectros de FTIR mostra que as intensidades relativas das bandas $\nu(\text{C}=\text{O})$ e $\nu(\text{COO}-)$ aumentam com o aumento da idade das amostras assim como energia vibracional da banda $\nu(\text{C}=\text{C})$ desloca-se para maiores número de onda. O deslocamento para maiores energias assim como o aumento das intensidades dos modos associados aos grupos oxigenados sugere mais uma vez a oxidação da superfície dos DOTS, concordando com os dados de espectroscopia Raman.

Figura 41: (a) Espectros de FTIR das amostras de Carbon Dots puro DOTS com idades de 4, 14 e 17 meses. Ampliações dos espectros de FTIR das amostras de carbon Dots puro DOTS (b), DCIT (c), DLAR (d) e DCRA (e) para as deferentes idades.



Fonte: Laboratório de Espectroscopia Óptica (LEO) 2020.

Todas as atribuições utilizadas neste estudo são baseadas nos protocolos de ARAUJO et al, (2020) e SZLACHETKA, (2020).

6.1.5.3 Espectroscopia de absorção molecular (UV-VIS)

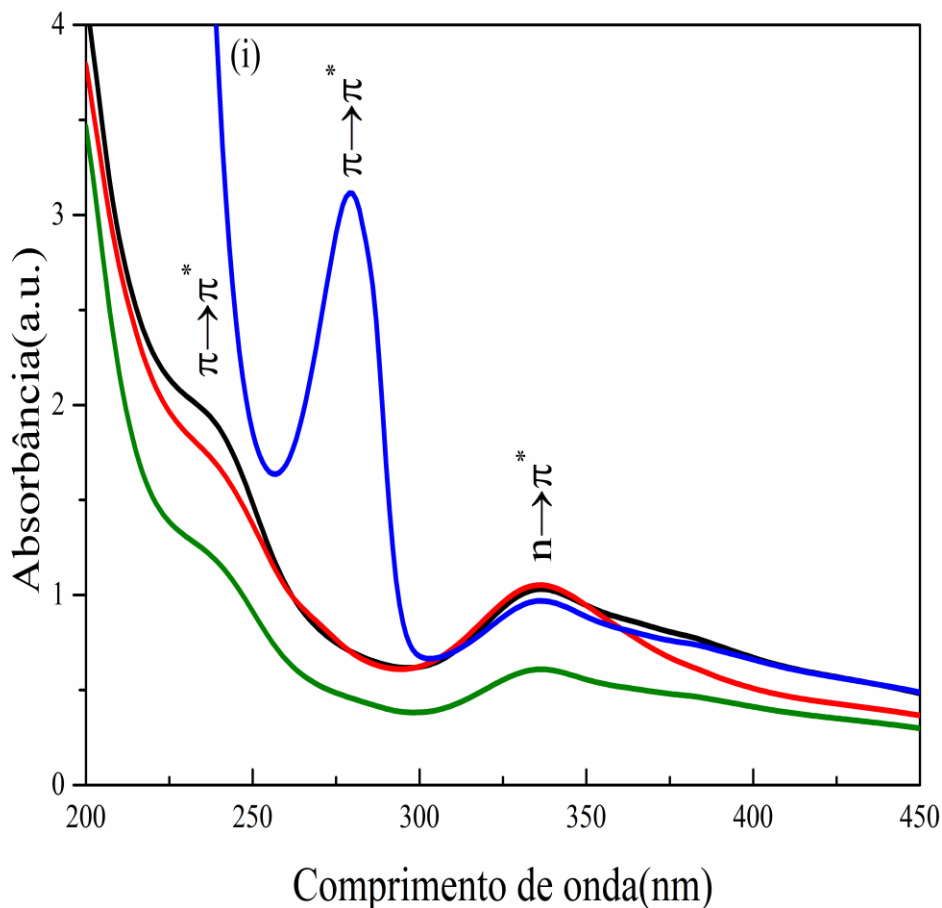
Quando trabalhamos partículas, cuja carga e diâmetro, possuem dimensões próximas do valor estimado da metade do comprimento de onda a ser utilizado para uma fotoativação, obtemos um aumento de dispersão da luz, e isso faz com que na transmissão desta tenda a ocorrer uma redução, devido a ampliação do tamanho da partícula, ou mesmo de sua morfologia irregular. Outro fator observado por pesquisadores é que quando existe uma presença elevada de carga ocorre um processo de redução de transmissão de luz, em consequência da diferença de índice de refração da luz, presente na interface entre partícula de carga e um componente associado como, por exemplo, resina (VICENZI, BENETTI, 2018).

Sendo a espectroscopia um parâmetro utilizado capaz de fornecer dados que identifiquem substâncias, como sua composição química, por meio do comprimento de onda absorvido na análise, e registrado no espectro de emissão ou absorção, este ensaio demonstra a interação dos elementos na radiação eletromagnética com as formulações em estudo, onde dados mais precisos são apresentados, como a presença do elemento, concentração, com base em medidas obtidas de absorção/transmissão de radiação eletromagnética, nas regiões ultravioleta e visível do espectro eletromagnético em uma região ampla que vai desde 190 até 1100nm (GUO et al, 2020).

Foi possível detectar, com base nos resultados analisados por espectroscopia de UV/Vis, cujo espectro é apresentado na figura abaixo, duas bandas na região do ultravioleta em 250nm e 288 nm, correspondentes às transições $p \rightarrow p^*$ dos anéis aromáticos, que constituem o núcleo de carbono que, caracteristicamente, não emitem fluorescência (DING, XIONG, 2015). Foi observado também na região de 380 a 450nm uma menor energia tendenciado a grupos químicos em estado de superfície, com ligações de C=O e C=N na superfície dos Carbon dots no processo de funcionalização da partícula, como pode ser observado na figura abaixo.

Conforme amplamente relatado na literatura, os espectros de absorção UV-Vis dos DOTS, DLAR e DCIT, mostrados na **Figura 42** (i), possuem uma banda de absorção típica em 337 nm, atribuída a transição $n \rightarrow \pi^*$ (ligações C=O) e um ombro em torno de 240 nm, atribuído a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C ligações com hibridização sp^2), estando em concordância com trabalho já publicado por Panniello et al., (2018) . O espectro UV-Vis do DCRA difere dos outros DOTS, pois o ombro em torno de 238 nm, atribuído as transições $\pi \rightarrow \pi^*$, não foi observado. No entanto, além do pico de absorção em 337 nm, como observado nos demais DOTS, esta amostra apresentou um pico atípico, em 279 nm, atribuído às transições $\pi \rightarrow \pi^*$.

Figura 42: Espectros UV-Vis das amostras DCIT, DLAR, DCRA e DOTS com curvas de cores verde, vermelho, azul e preto respectivamente.



Fonte: Laboratório de Desenvolvimento de Processos Químicos (LDPQ) / Laboratório de Espectroscopia Óptica (LEO) 2020.

A adsorção de moléculas orgânicas, na superfície de materiais carbonáceos, pode ocorrer principalmente por ligações de hidrogênio e interações $n - \pi$ e $\pi - \pi$ (SZLACHETKA, 2020), nas interações $n - \pi$, os grupos de oxigênio na superfície do material carbonáceo atuam como doadores de elétrons, enquanto os anéis aromáticos da molécula orgânica, atuam como aceitadores de elétrons. Já as interações $\pi - \pi$ ocorrem entre os elétrons de π de um material carbonáceo e os elétrons π dos anéis aromáticos da molécula orgânica. Com base nos resultados expostos é possível inferir que, todas as interações descritas acima estão presentes no sistema estudado, podendo ser confirmadas também na **Figura 42**.

6.2 Avaliação de atividade antiradicalar DPPH com técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

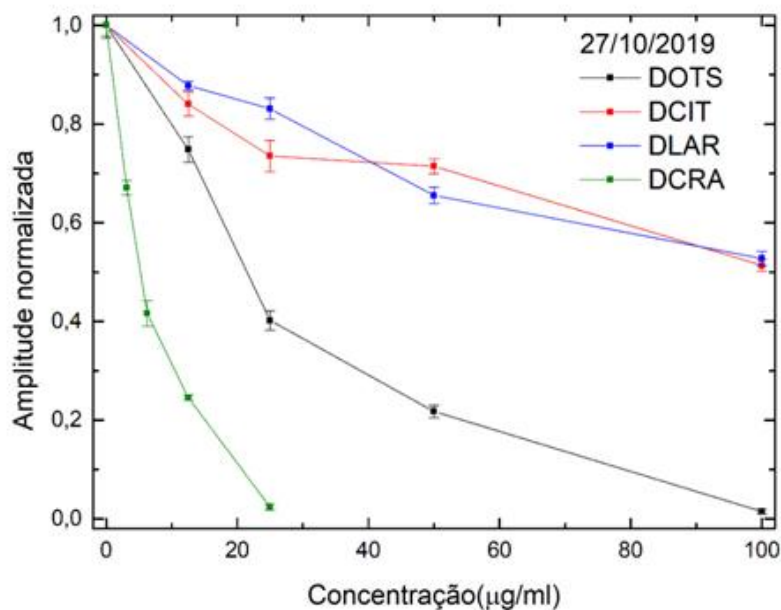
A técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica EPR, que vem sendo bastante utilizada por grupos de pesquisa, em uma variedade de ensaios físicos e biológicos, tem a finalidade de quantificar moléculas com potencial antioxidante, mesmo que numa proporção baixa devido à sensibilidade tecnológica da técnica aqui apresentada.

Sendo os óleos possuidores de ação antioxidantes, a técnica de EPR apresentou resultados onde foram avaliados seu potencial, ao longo do tempo, em concentrações diferentes, para as formulações apresentadas, como mostra a **Figura 43**, onde A representa o lote 01, B o lote 02 e C o lote 03.

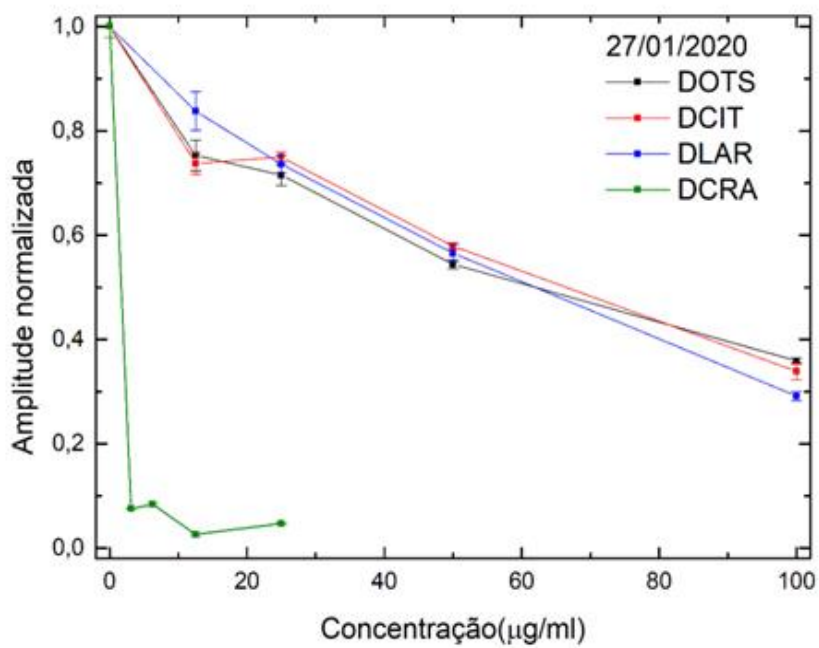
Os resultados obtidos por RPE estão apresentado nos gráficos da **Figura 43**.

Figura 43: Avaliação da atividade antioxidante de óleos essenciais acoplados a carbon-dots tendo como radical livre o DPPH com etanol.

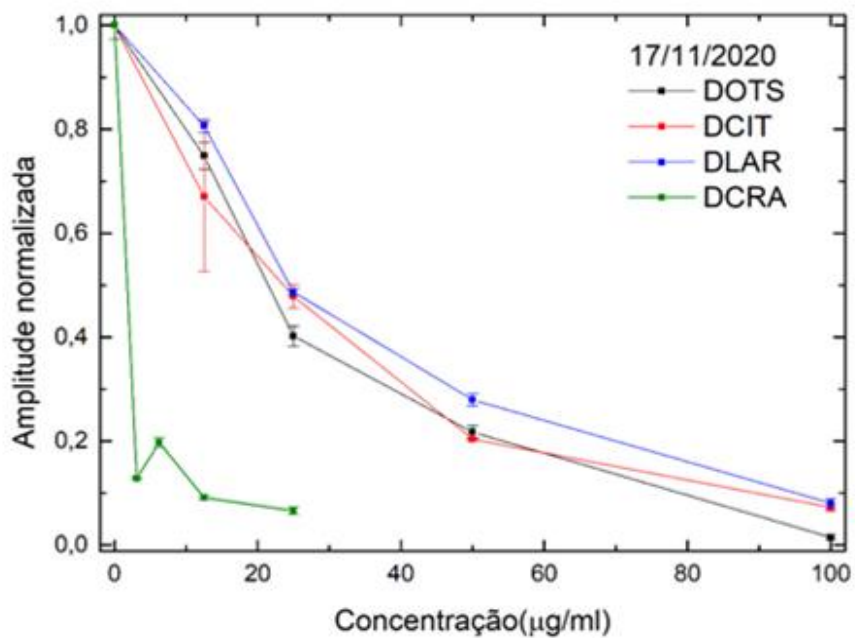
A



B



C



Fonte: Laboratory of Electron Paramagnetic Resonance-Lab EPR 2021

Os resultados obtidos, com a técnica de EPR, demonstraram que sendo o radical livre estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) como já descrito anteriormente, também possui propriedades antioxidantes que tendem a sequestrar radicais livres. A mesma molécula possui características de uma constante, quando é avaliada por não possuir um decaimento expressivo em relação a outras moléculas. Neste estudo o DPPH foi avaliado com etanol, sendo atribuído o valor 0 de concentração e 100% de amplitude, sendo este dividido pelo valor obtido das demais amplitudes obtidas das formulações em análise.

As amplitudes obtidas foram baseadas na proporção em que a presença de DPPH é mais acentuada, ou seja, à medida que se apresenta antioxidante na amostra analisada, o consumo da mesma vai se caracterizando, ampliando o sinal do decaimento e aumentando assim a amplitude, como pode ser observado nos gráficos que estão na mesma escada de todas as moléculas deste ensaio.

Os resultados apresentados das formulações de carbon dots, acoplados a óleos essenciais, são de grande importância para este ensaio, pois é exposto na literatura que esta atividade antioxidante tem papel fundamental na saúde, agindo como um neutralizador de danos do sistema biológico (DA SILVA et al, 2017; MIRANDA et al., 2010).

Vale ressaltar que, nos gráficos da **Figura 43**, a concentração de valor 0%, no eixo das abscissas, representa a amplitude de RPE da amostra com DPPH puro, significando que temos uma amplitude de 1.0 (ou 100%) do sinal máximo possível de ser detectado, ou seja, naquela amostra está presente uma quantidade elevada de radicais livres. Quando adicionamos a amostra de DPPH a uma molécula na qual pretendemos avaliar, a presença de antioxidante, de forma quantitativa, ou qualitativa, ou mesmo determinar sua ausência, é possível observar o decaimento deste sinal, ou mesmo sua elevação, ou permanência constante, nos gráficos.

No ensaio realizado com as amostras DCRA, DOST, DLAR e DCIT foi possível observar que à medida que a presença do DPPH foi sendo determinada, ocorreu uma perda de sinal para a amostra de DCRA, ou seja, ficou mais fraco. Para o DCRA houve uma menor quantidade de radical livre e um número elevado de antioxidantes. DOTS, DLAR e DCIT, tiveram o mesmo comportamento, e esse decaimento foi considerado pouco, caindo de uma média de 100 para 60%, mostrando um grau de eficácia inferior.

Tendo demonstrado toda esta capacidade de sequestrar os radicais livres, presentes na reação com o DPPH, a molécula de DCRA corrobora com a literatura que, através de ensaios científicos, demonstram que esta molécula, presente em maior concentração no óleo de cravo da Índia, tem esta propriedade de cancelar os radicais livres dependendo da concentração utilizada (SANTANA et al, 2021), mas estudos também demonstraram que o eugenol, quando utilizado de forma acentuada, ocasiona fenômenos paralelos de formação de radicais livres, podendo assim dar um indicativo do que pode ser atribuído na literatura para uma atividade pró-oxidante (RAJA et al., 2015).

O eugenol é a molécula cuja síntese natural, é originária do aminoácido fenilalanina, por meio da rota metabólica de fenilpropanóides, por meio da via chiquinato, fenilalanina e ácido unâmico (SENANAYAKE, 1977; NAGABABU et al., 2010; VASCONCELOS, 2020). Com todas estas propriedades o composto de eugenol tem, como característica, um resultado dobrado em condições de estresse oxidativo que atua como antioxidante, ou pró-oxidante. Estudos também apontam que este composto tem outras qualidades como anticancerígena, citotóxica e antitumoral (BEZERRA et al 2017; VASCONCELOS, 2020).

Os fenólicos são compostos antioxidantes, que extingem espécies de radicais livres por meio da reação onde ocorre uma doação de um átomo de hidrogênio, se transformando no radical fenoxila estável, devido à deslocalização de elétrons do anel benzeno adjacente, ou dimerização, sendo considerada uma reação pouco prejudicial, e fácil de ocorrer (NAGABABU et al., 2010).

O efeito da atividade antioxidante do DLAR, neste estudo, com seu poder de consumo de DPPH baixo, pode significar baixo índice de antioxidante nesta molécula, corroborando assim com relatos da literatura onde a mensuração da ação da atividade antioxidante, de uma molécula, é avaliada conforme uma série de parâmetros como a concentração de suas características físico-químicas, podendo obter resultados que confirmem, ou não, esses parâmetros avaliados no estudo (KULISIC et al., 2004; FERRONATTO, ROSSI 2018).

O resultado pode ser atribuído à presença de compostos, como os flavonoides, que se apresentam em substâncias, como limoneno, presentes em frutas cítricas (SILVEIRA, 2018) onde a molécula de flavonoide é responsável pelo potencial de atividade antioxidante, sendo um dos elementos característicos desta propriedade pela presença, em sua composição, de um elevado número de grupos hidroxilas que a literatura reporta como fonte de atividade antioxidante. No caso de uma glicosilação da molécula, ocorre uma queda nesta atividade, como no caso das agliconas (ZELADA, 2020). Estudos mostram que a variação da posição do grupo OH, nos compostos polifenóis, pode comprometer, significativamente, o potencial de atividade antioxidante de uma molécula (SALIM et al, 2022).

Ao comparar DLAR com a molécula de DCIT podemos observar que tivemos o mesmo comportamento de atividade antioxidante, como mostram os gráficos, em que em ambas o potencial foi discreto, sendo comparado ao da molécula de DCRA, que se mostrou bem representativo neste estudo.

Apesar de DCIT apresentar componentes como citronelal e geraniol, que são considerados fontes de alto teor de antioxidantes, os resultados não esperados obtidos neste ensaio, através de técnica de EPR pode ser justificado por estas moléculas serem da classe dos monoterpenos, considerados elementos de condição complexa (BARREIRO, 2019), não detectando moléculas suficientes para uma completa reação, mascarando os resultados.

Como em uma formulação podem ser encontradas diversas moléculas, nos óleos essenciais não seria diferente, com isso dado da literatura corroboram com o resultado obtido na formulação de DCIT, onde componentes encontrados na composição de óleo podem apresentar atividades isoladas, onde algumas tendem a potencializar, ou despotencializar ou reduzir seus efeitos, dentre eles a atividade antioxidante que, para reagir, precisa interagir com os constituintes presentes em sua estrutura, como a hidroxila, que apresenta maior atividade antioxidante (SANTOS, 2018; SOARE et al, 1997).

Mesmo apresentando atividade discreta de antioxidante DLAR, DCIT e DOTS, quando comparados com a molécula de DCRA, que se mostrou bem atuante, podemos considerar que, através de estudos científicos, os compostos antioxidantes são de grande importância para ambientes tanto externos, quanto internos, mesmo que em baixas concentrações, pois sua principal característica visa interromper, ou mesmo evitar, o processo de oxidação, responsável por originar substâncias tóxicas como cetonas, aldeídos, hidrocarbonetos e alcoóis, paralisando, ou prevenindo deterioração, de alimentos, e outros, oriundos do processo de oxidação (ROSAS, 2019, KAWASAKI, 2022).

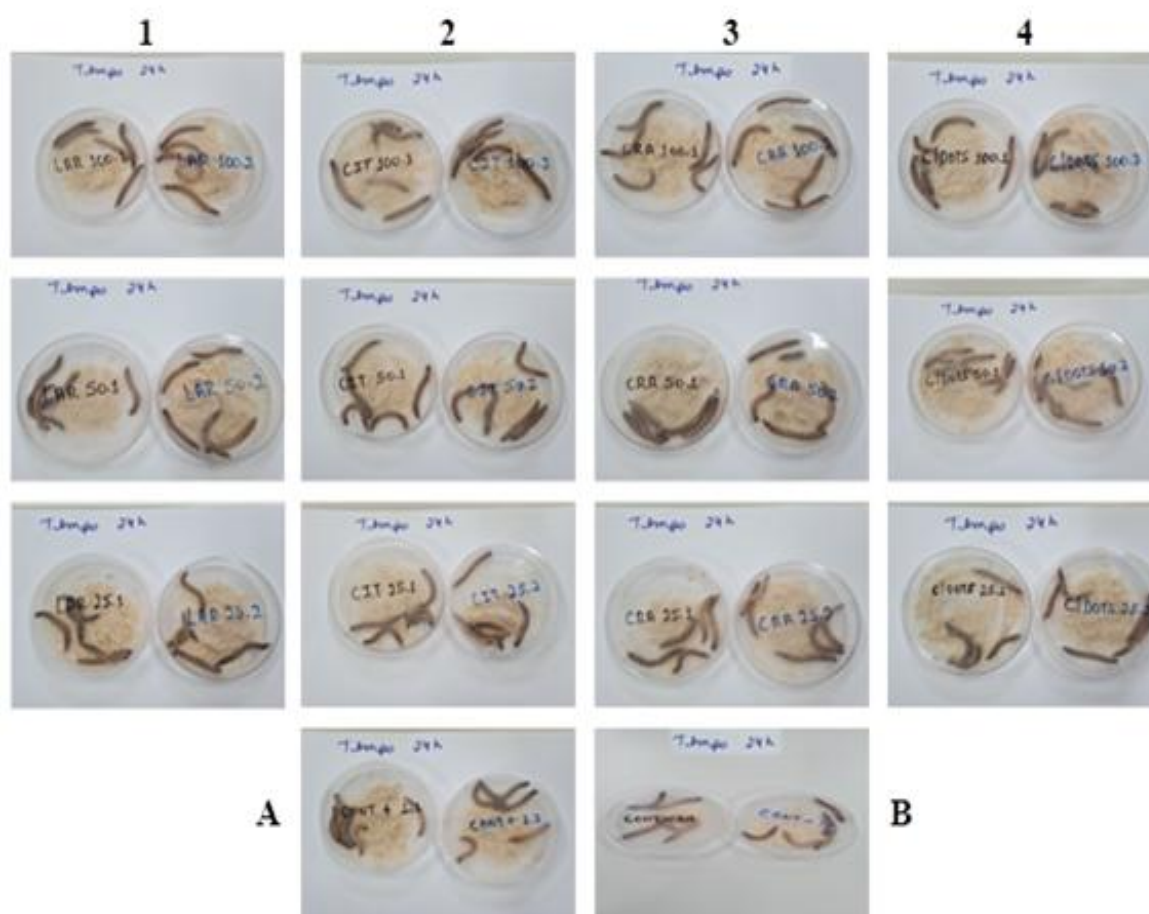
6.3 Ensaio *in vivo*

6.3.1 Avaliação da toxicidade nas Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante

Após a administração das formulações nas larvas foi utilizado o recurso de registro fotográfico, como é apresentado nas **Figuras 44 e 45**, para avaliar a toxicidade e o comportamento das Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante.

A determinação da viabilidade das Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, realizada neste estudo, com a duplicata do experimento sendo comparada com os controles apresentou 100% de viabilidade, sem mortes, e com comportamentos sem alterações que poderiam comprometer o experimento, como pode ser observado nas **Figuras 44 e 45** pelos períodos de 24 e 48h registrado, respectivamente.

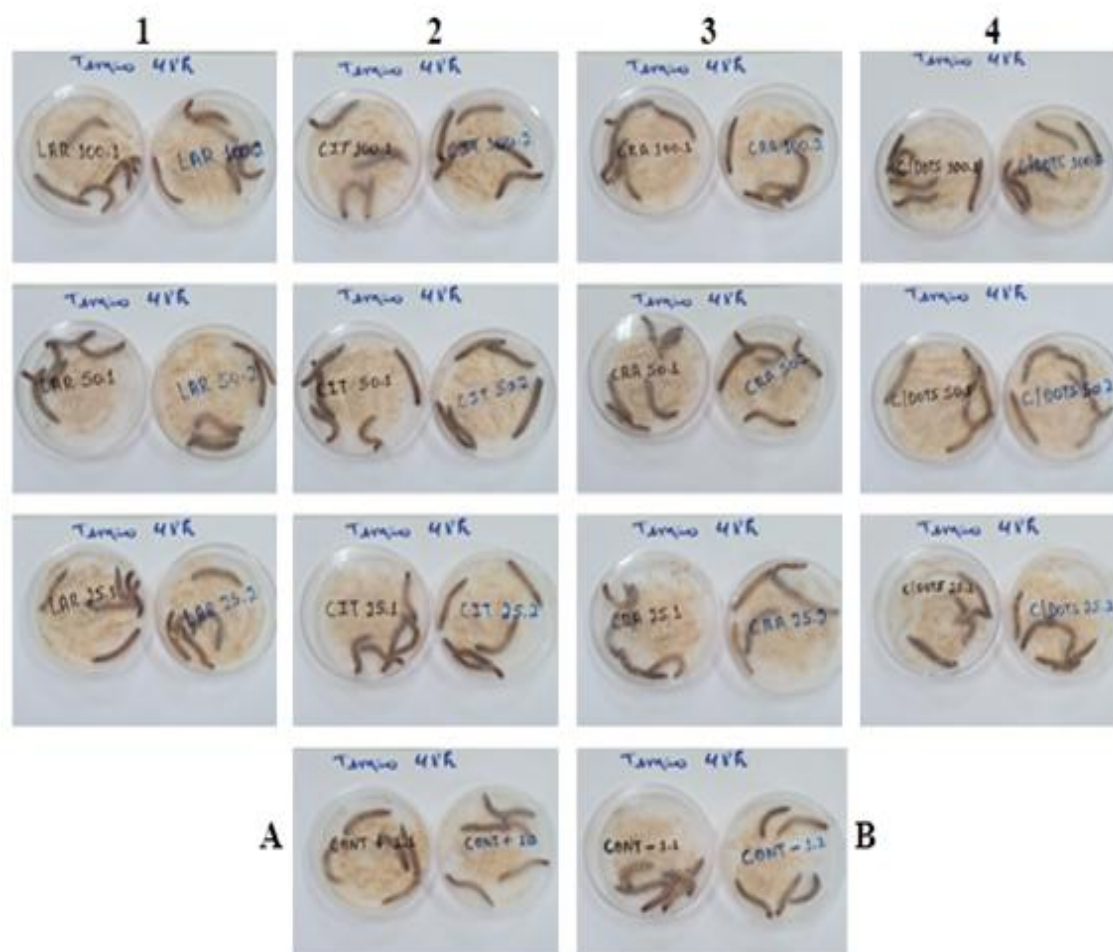
Figura 44: Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, avaliação de toxicidade em 24h das formulações em análise.



Legenda : 1 Grupo :DLAR 100, 50 e 25 mg/g duplicatas do experimento; 2 Grupo :DCIT 100, 50 e 25 mg/g duplicatas do experimento; 3 Grupo :DCRA 100, 50 e 25 mg/g duplicatas do experimento; 4 Grupo :DOTS 100, 50 e 25 mg/g duplicatas do experimento; **A** Controle positivo água destilada 10 µL; **B** controle negativo DMSO 1%. Tratamento com 24h de administração. Departamento de Morfofisiologia Veterinária - Laboratório de Ciências Fisiológicas, UFPI - 2021.

Fonte: Própria do autor

Figura 45: Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, avaliação de toxicidade em 48h das formulações em análise.



Legenda : 1 Grupo :DLAR 100, 50 e 25 mg/g duplicatas do experimento; 2 Grupo :DCIT 100, 50 e 25 mg/g duplicatas do experimento; 3 Grupo :DCRA 100, 50 e 25 mg/g duplicatas do experimento; 4 Grupo :DOTS 100, 50 e 25 mg/g duplicatas do experimento; A Controle positivo água destilada 10 µL; B controle negativo DMSO 1%. Tratamento com 48h de administração. Departamento de Morfofisiologia Veterinária - Laboratório de Ciências Fisiológicas, UFPI - 2021.

Fonte: Própria do autor

Pode ser observado que não ocorreu alteração no comportamento nas larvas de *Zophobas morio* que pudessem comprometer o experimento, sendo observados motilidade e aspectos normais nos períodos de 24 e 48h, e não havendo mortes, pode-se registrar uma viabilidade das formulações nas doses que foram avaliadas. Baseado neste ensaio de toxicidade é possível designar uma triagem de outros parâmetros para um possível produto de uma futura aplicação tecnológica, com toxicidade de margem de segurança aceitável. Portanto este é o melhor indicativo de segurança apresentado para aplicação futura deste produto em novos estudos.

Os dados da formulação de DOTS, obtidos neste ensaio, corroboram com os reportados na literatura, que enfatizam sobre sua utilização devido a suas características, como utilização em ramos tecnológicos. Suas propriedades de elevada solubilidade em água, inércia química, funcionalização, resistência à fotodegradação, baixa toxicidade, biocompatibilidade e intensa fluorescência e presença na região do azul do espectro

eletromagnético, fazem desta molécula um destaque para inúmeras aplicações em diversas áreas como carreador de drug delivery na área biomédica, uso em optoeletrônica, dispositivos fotovoltaicos, fotocatalise, uso na biotecnologia, sensores e outros (LIMA et al, 2021), devido não apenas ao seu baixo custo de aquisição mas, principalmente, a seu baixo potencial toxicológico como foi citado anteriormente.

Na formulação DCRA, os estudos apontaram que, em algumas concentrações, pode ser considerado tóxico, devido ao componente eugenol, que se encontra em maior proporção. Por outro lado, existem estudos que demonstram que o uso do óleo de cravo da Índia, em larvicidas, é considerado seguro e totalmente atóxico ao meio ambiente e à saúde humana, pois são biodegradáveis, sendo considerado economicamente viável, tendo visto, que em pequenas proporções, seu resultado é expressivo quando comparado a processos bioquímicos de outras espécies (MENDES, 2021). Com isso os resultados obtidos para esta formulação corroboram com os dados já descritos na literatura para esta molécula em possíveis aplicações.

A formulação de DLAR apresentou um índice atóxico, salientando assim a importância de ensaios toxicológicos, de qualquer natureza para futuras aplicações biológicas ou outros fins. Estudos com modelos alternativos corroboram com os resultados obtidos pela formulação de DLAR, que mostra em sua análise um teor atóxico do óleo essencial de laranja, quando foi avaliado, sendo significativo e apresentando propriedade que não intervêm na integridade fisiológica do organismo vivo (BARROS GOMES et al, 2020).

Para a formulação de DCIT, não ocorreu efeito tóxico para as Larvas de *Zophobas morio*. Isso demonstra que a mesma pode ser desenvolvida para aplicações biológicas em diversas áreas, desde as biomédicas até a agrícola. No setor agrícola pode ser incluído na fitotoxicidade, onde dados corroboram com os avaliados neste estudo demonstrando que o citrionelol presente no óleo de citronela, serve para aplicação de bioherbicida em episódios nomeados pós-germinativos onde o resultado foi expressivo (BORSATTI et al, 2021).

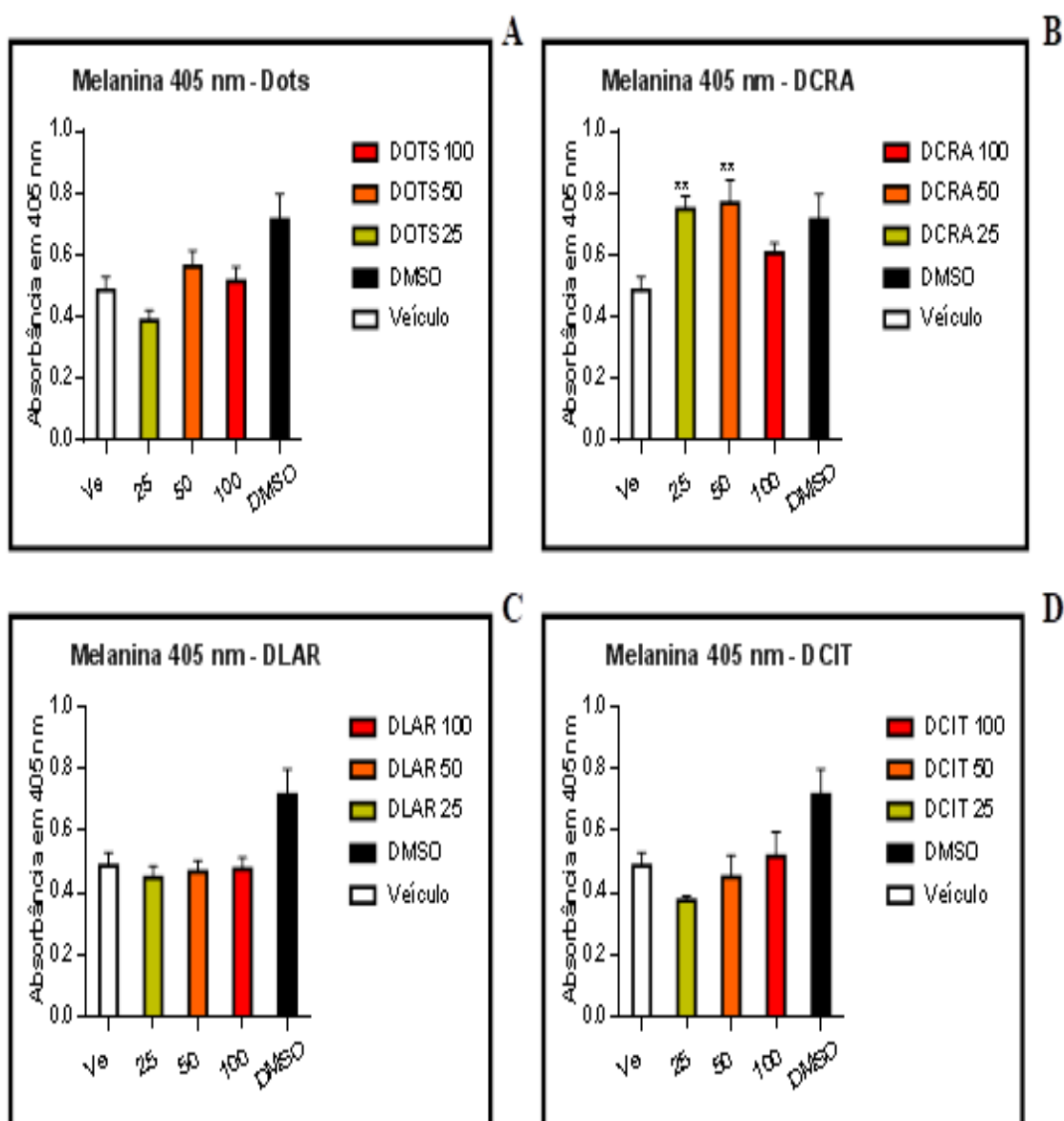
Para certificar a toxicidade dos óleos essenciais existe uma complexidade de fatores que devem ser avaliados até que, um novo produto, seja introduzido no mercado com a qualidade, acesso e segurança exigida, pelo consumidor final.

Estudos comprovam que muito tem se pesquisado, e comprovado, sobre a toxicidade dos óleos essenciais e que esta está diretamente relacionada à composição química dos óleos, que varia com o local de coleta, ciclo vegetativo, fatores ambientais e método de obtenção dos mesmos, sendo ao final o potencial alelopático anexo à habilidade de inibição da cadeia respiratória, da chamada matriz mitocondrial isolada e mitose, à alteração da integridade das membranas das células, à deterioração das ceras cuticulares, ao aumento da transpiração, à peroxidação lipídica e danos aos microtúbulos, que podem afetar a germinação e o desenvolvimento das plantas (BORSATTI et al, 2021).

6.3.2 Avaliação da quantificação da Melanização

A determinação da quantificação da melanização para as formulações DOTS, DCRA, DLAR e DCIT, nas concentrações 100, 50 e 25mg/g em triplicatas, bem como duplicata do experimento independente. São mostradas na **Figura 46**. O controle utilizado para comparação dos resultados foi água destilada como veículo utilizado como padrão representando viabilidade para este modelo biológico.

Figura 46: Quantificação da expressão de melanização em Larvas de *Zophobas morio*, *Tenebrio Gigante*, após administração das formulações DOTS, DCRA, DLAR e DCIT.



Legenda: Grupo A : DOTS 100, 50 e 25 mg/g ; B: DCRA 100, 50 e 25 mg/g ; C: DLAR 100, 50 e 25 mg/g ; D: DCIT 100, 50 e 25 mg/g duplicatas do experimento; Ve: veículo controle água destila 10 µL; controle negativo **DMSO 1%**. Tratamento com 48h de administração. P<0,05*; P<0,01**; P<0,001***; P<0,0001****. Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMOL), UFPI - 2021.

Com base nos dados obtidos pode-se observar que ocorreu um aumento significativo da melanização apenas com a formulação de DCRA nas concentrações de 50 e 25 mg/g quando comparados aos veículos e ao DOTS puro.

A quantificação da taxa da expressão da melanização, para este modelo experimental, tem um indicativo para um processo inflamatório. Os níveis de hormônio de melanina, quando expressos são reportados, por alguns autores, como sendo responsáveis pela liberação de hormônio cortisol, proveniente de uma resposta do organismo que está relacionada ao stress, como é verificado em alguns animais, por

exemplo, peixes (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014). A expressão da melanina, em agir como um elemento redox, que possui a competência de reduzir ou oxidar os radicais oxigênicos bem como outros sistemas químicos redox, também são uma de suas características primordiais, assim como a interação de funções de desempenho biológicos, considerados secundários, vinculados a características antioxidantes, que exercem extraordinária função de intercâmbio com os animais e o meio ambiente que habita (SILVA, 2018).

Por isso ao serem administradas as formulações em análise, foi possível observar alterações com base nos resultados, tendo como padrão o veículo (água) que foi utilizado para o preparo das mesmas e compara o que mais se expressou proporcionando este efeito inflamatório.

Diante dos resultados, o veículo (VE) obteve o mesmo valor 0,48 para todas as formulações, assim como o solvente DMSO, utilizado como controle, que foi de 0,71.

Para a formulação DOTS as concentrações maiores não tiveram diferença, variando entre 0,56 e 0,51, da menor para a maior, porém na menor concentração o valor determinado foi abaixo de 0,38, inferiores ao do VE. A DCRA apresentou resultado significativo para as menores concentrações, que foram de 0,75 e 0,76, na maior concentração o valor foi de 0,60. Com relação à formulação de DLAR não houve alteração significativa, variando de 0,44 a 0,47, em comparação ao veículo. A formulação DCIT apresentou valores variando de 0,37; 0,45 e 0,51, mas sem alterações estatísticas em relação ao VE.

Das formulações administradas apenas a DCRA, em algumas concentrações, apresentou alteração expressiva de melanização, como descrito anteriormente, podendo associar este resultado a relatos da literatura onde descrevem que, quando ocorre a síntese da melanina, em alguns microrganismos, considerados patógenos, esta é integrada a virulência de animais e plantas, podendo associar este estado a uma sensibilidade a mecanismos considerados antimicrobianos do hospedeiro, favorecendo assim uma resposta imune deste à infecção (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014). Corroborando assim, os resultados, deste ensaio do modelo biológico que foi utilizado.

Existem enzimas que são responsáveis por compartilhar os chamados peptídeos antimicrobianos, considerados fundamentais no processo de resposta imune por corroborar na etapa de coagulação da hemolinfa, e sua melanização, que são responsáveis pelo encapsulamento dos patógenos de seu ciclo natural (RIOS DÍEZ, 2018; HILLYER, 2016; AN et al., 2011).

Neste sentido, a imunidade celular é oriunda da atuação dos hemócitos, que são um tipo de célula de defesa, em resposta ao processo de fagocitose, agregação e encapsulação, enquanto que, em relação à imunidade humoral, pode-se relatar que são responsáveis por produzir peptídeos antimicrobianos (AMPs), espécies reativas de oxigênio (ROS) ou nitrogênio (RNS), complexos enzimáticos que regulam a cascata da melanização e da coagulação (GRAHL, 2018).

Sendo o modelo experimental utilizado neste estudo, como um sugestivo para avaliar indicativo de processo inflamatório, através da quantificação de melanização, podemos, através de embasamento teórico, afirmar que a inflamação é considerada uma resposta generalizada específica, porém benéfica, a danos teciduais, onde são obtidas respostas locais e sistêmicas consideradas adaptativas, em que as locais são responsáveis por recrutar células fagocitárias, bem como auxiliar na remoção de material endógeno e exógeno, enquanto que as sistêmicas são responsáveis por alterar o metabolismo, de maneira mais hábil (SOUSA, 2021).

Inúmeras moléculas tem sido estudadas com potencias para dermocosméticos e, até mesmo, potenciais antioxidantes, anti-inflamatórios e outros. Um grande destaque, nos últimos anos, são os óleos vegetais devido as suas propriedades, dentre elas o baixo peso molecular, viscosidade, menor oclusão que os minerais (CORTE, 2006), e por ser matéria prima primordial para a fabricação na indústria de cosmético e dermofarmacêutica, pois são promissores no poder de permeação (STORPIRTS et al, 2009).

A expressão de melanização para o DCRA, neste ensaio, corrobora com os dados da literatura, tendo visto que, de todas as formulações, ela foi a única que se expressou significativamente. Em estudos com camundongos foi observado que a atividade anti-inflamatória, bem como efeitos considerados antipiréticos, em ensaio de edema de pata induzido, e febre, tratados com levedura de cerveja, não foram significativos $p < 0,05$. Quando os animais eram tratados com óleo de cravo da Índia, numa dose considerada de DL50, sem induzir toxicidade (SOUZA, 2019), os resultados corroboram que a molécula, além de possuir todas as características já citadas anteriormente.

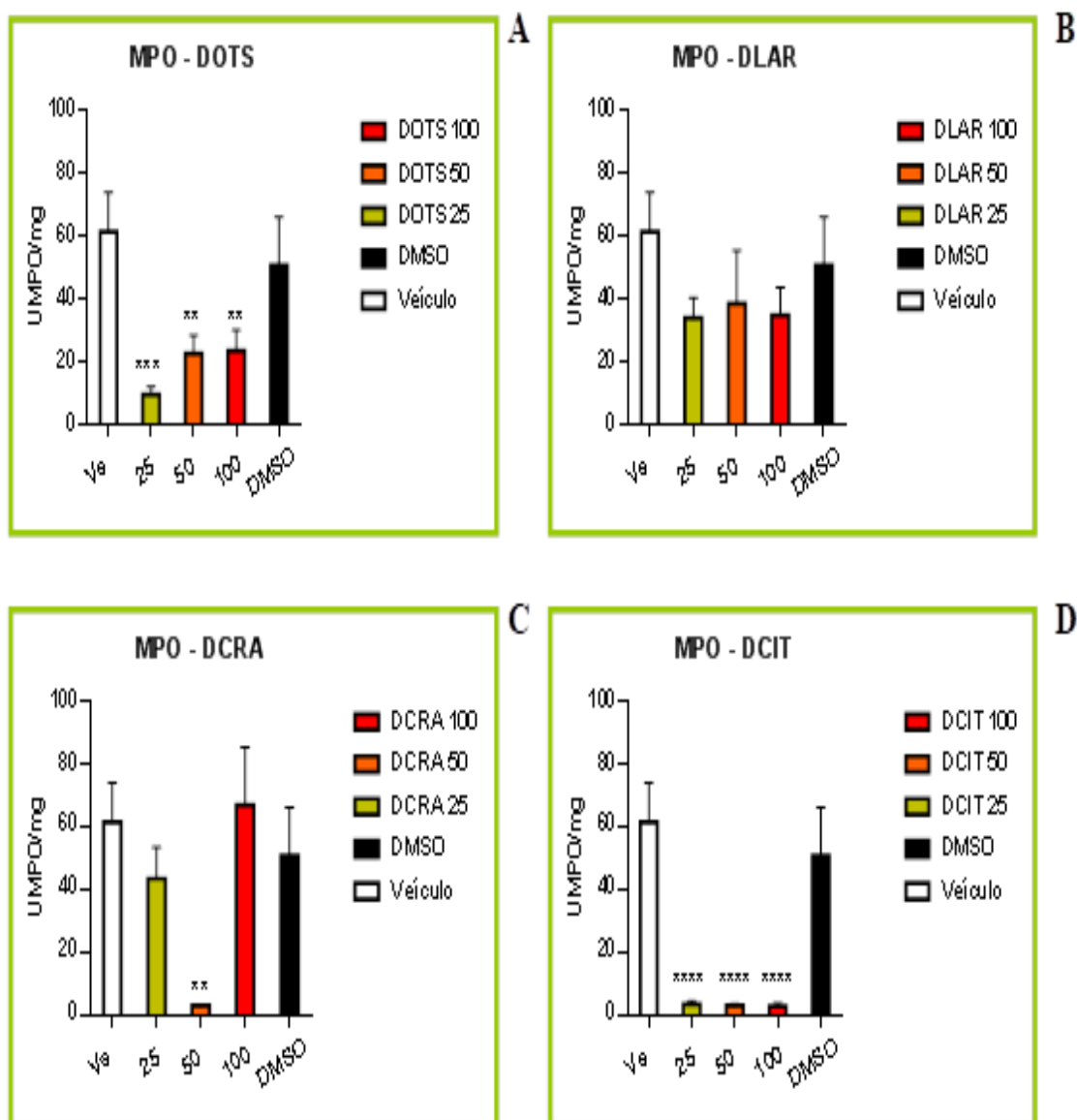
Alguns estudos demonstraram que a síntese das formulações farmacêuticas, em que o eugenol, como componente majoritário do óleo de cravo presente na formulação DCRA, em processos inflamatórios, fora do indicado, pode ocorrer toxicidade, dependendo do tipo de composição biológica ao qual for exposto, bem como sua concentração, gerando assim processo inflamatório oxidante, sendo seu uso considerado apenas terapêutico para que demonstre segurança para o fim desejado (BARBOZA, 2018).

As demais formulações testadas DOTS, DLAR e DCIT não apresentaram alteração para este parâmetro e, até o momento, não foram detectadas na literatura relatos sobre estas moléculas que possam vir a corroborar com estes resultados, tanto da expressão, quanto da não expressão, de melanização relacionada à inflamação.

6.3.3 Avaliação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO), quando avaliada neste estudo, após administração das formulações de DOTS, DCRA, DLAR e DCIT, apresentaram aumento significativo entre elas. Quando comparados ao veículo, o grupo DOTS obteve uma redução em todas as concentrações, o DCRA obteve uma diminuição na concentração intermediária e o aumento expressivo na maior concentração, o DLAR não mostrou alterações e o DCIT mostrou uma redução acentuada em todas as concentrações, como está demonstrado na **Figura 47**.

Figura 47: Unidades de atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) por MG de Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, após administração das formulações DOTS, DCRA, DLAR e DCIT.



Legenda: Grupo A : DOTS 100, 50 e 25 mg/g ; B: DCRA 100, 50 e 25 mg/g ; C: DLAR 100, 50 e 25 mg/g ; D: DCIT 100, 50 e 25 mg/g duplicatas do experimento; **Ve:** veículo controle água destilada 10 μ L; **DMSO 1%**. Tratamento com 48h de administração. $P < 0,05^*$; $P < 0,01^{**}$; $P < 0,001^{***}$; $P < 0,0001^{****}$. Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMOL), UFPI - 2021.

A enzima MPO é resultado de uma emanada de células de leucócitos que são responsáveis por catalisar espécies reativas oxidantes, como também fazem parte da composição da resposta imune inata, que reforça esses oxidantes no dano tecidual em processos inflamatórios (ROMAN, 2008). Com isso este parâmetro vem corroborar para dados como a melanização, citada anteriormente no texto que, através deste modelo experimental, propõe indicativos de inflamação quando exposta a moléculas em determinadas doses e tempos.

Para este estudo foram obtidos os dados na formulação VE, valor 61, usado como padrão igual ao de melanização, DMSO 50 para todos, DOTS os valores variaram de 9,57; 22,45 e 23,44, para DCRA variaram de 43; 2,89 e 66,71, em DLAR 33; 38 e 34 e, por último, DCIT 3,4; 2,8 e 2,8. Sendo bem evidente que as formulações que mais se expressaram foram DCRA com uma concentração em destaque de 50 e DCIT com todas as concentrações, quando comparadas ao VE.

A reação bioquímica das formulações e a enzima de MPO forneceu uma resposta sugestiva de processo de radicais livres, pois a bioquímica da própria enzima já é bem relatada quando demonstrando que, em processo de inflamação, e de doença cardiovascular, a reação com peróxido de hidrogênio, forma radicais livres e substâncias oxidantes, difusíveis com atividade antimicrobiana, que desencadeiam lesão oxidativa do tecido do hospedeiro, devido à função de desempenhar efeitos pleiotrópicos na vasculatura tendo, como efeito, o desenvolvimento de aterosclerose, disfunção endotelial, instabilidade de placa e resposta no remodelamento ventricular após injúria isquêmica (NICHOLLS, 2005).

Como as formulações analisadas se mostram, na literatura, como potencial para tratamento de algumas patologias, a importância de mensurar esta enzima é de grande valia, pois ao se produzir uma molécula, com intuito de aplicar um novo produto no mercado, e explorar todas as margens de eficácia e segurança que os modelos experimentais dispõem, podemos destacar que entre as peroxidases humanas a MPO se destaca, pois está na maior parte dos grânulos de neutrófilos, como também é exclusivamente ela que dispõe da capacidade de originar ácido hipocloroso (HClO), agente oxidante necessário no combate de patógenos invasores, em quantidades relevantes (VLASOVA, 2018).

Estudos demonstraram que quando a enzima de MPO se mostra bem expressa no organismo é considerado uma atribuição patológica a artifícios biológicos extracelulares de neutrófilos, conhecidos como NETs (do inglês neutrophil extracellular traps) (DAVIES; HAWKINS, 2020) e isso é detectado em doenças inflamatórias como artrite reumatoide, sua presença nas cartilagens inflamadas são consideradas também uma associação de doenças oriundas do estresse oxidativo, porém o mais evidente é que a evolução marcante da enzima MPO pode estar agregada a patologias citadas anteriormente com o transcorrer do tempo (KHAN; ALSAHLI; RAHMANI, 2018).

A técnica para avaliar MPO foi associada a processos inflamatórios devido esta enzima apresentar um processo de acúmulo de células, em especial os neutrófilos, em tecido inflamado, propiciando assim indicativos para uma marcação de migração leucocitária (BEZERRA, 2020). Com isso os resultados obtidos do DCRA corroboraram com a literatura, quando compara o resultado da molécula majoritária eugenol, visto que esta mostrou uma tendência a migrar, através de leucócitos, demonstrando que não ocorre efeito tóxico em modelo experimental utilizado para avaliar asma alérgica induzida por ovalbumina (OVA) e na presença do eugenol a taxa de eosinofilia é reduzida por OVA, presente no tecido pulmonar, sendo mais um relato que a presença da molécula de eugenol foi capaz de reduzir a resposta inflamatória, podendo proporcionar um efeito antiasmático tendo efeito terapêutico (BARBOZA, 2018). Baseado nestes relatos, e nos dados obtidos, a enzima MPO demonstra que a expressão acentuada desta, na presença desta molécula, tende a desencadear efeitos relatados na literatura.

O DCIT foi à formulação que mais demonstrou efeitos de expressão por esta enzima estar em todas as concentrações, com valores bem abaixo do VE. A literatura apresentou dados bem similares, em ensaio com animais ulcerados, tratados com o VE, onde estes apresentavam uma lesão com concentrado de neutrófilos, na área houve uma

diminuição da enzima MPO, quando incubada com óleo que continha o geraniol, que é um dos componentes do óleo de citronela, nos ensaio *in vitro* na maior concentração, com isso podemos corroborar que esta molécula possibilita diminuição do processo inflamatório com migração de neutrófilos (VENZON, 2020).

Para a formulação DOTS os valores foram alterados significativamente em relação a VE, mas não foram detectados, até o presente momento, na literatura, dados que pudessem corroborar com os obtidos neste estudo.

Como toda molécula pode atuar, a não expressão pode ser positiva como foi o caso da formulação de DLAR, que contém óleo de laranja, e um dos componentes presentes é o D-limoneno, sendo responsável por apresentar características como atóxica, antioxidantes, vasodilatadoras e anti-hipertensivas (NASCIMENTO, 2019).

Os dados desta formulação corroboram com os da literatura, que evidenciam esta molécula, enfatizando que a enzima MPO se destaca frente ao sistema imunológico, pois a mesma tende a originar uma progressão de series de patologias, associadas a processos inflamatórios, que lesam os tecidos, como acontece na hipertensão arterial pulmonar, na artrite reumatoide, nas doenças neurodegenerativas, na obesidade, na diabetes, nas doenças cardiovasculares e na aterosclerose (KHAN et al., 2018). Como a formulação DLAR se mostrou não expressiva desta enzima, devido ao D-limoneno, isto pode ser indicativo para tratamento das patologias citadas anteriormente no texto, baseado neste parâmetro avaliado. Isso também é sugestivo de estudos com dados relatando que a ação da enzima MPO também tem sido empregada como alvo terapêutico, por meio da utilização de inibidores desta enzima (CHAMI et al., 2018) um exemplo promissor na clínica é o biomarcador em doença cardiovascular (OMRAN et al. 2018).

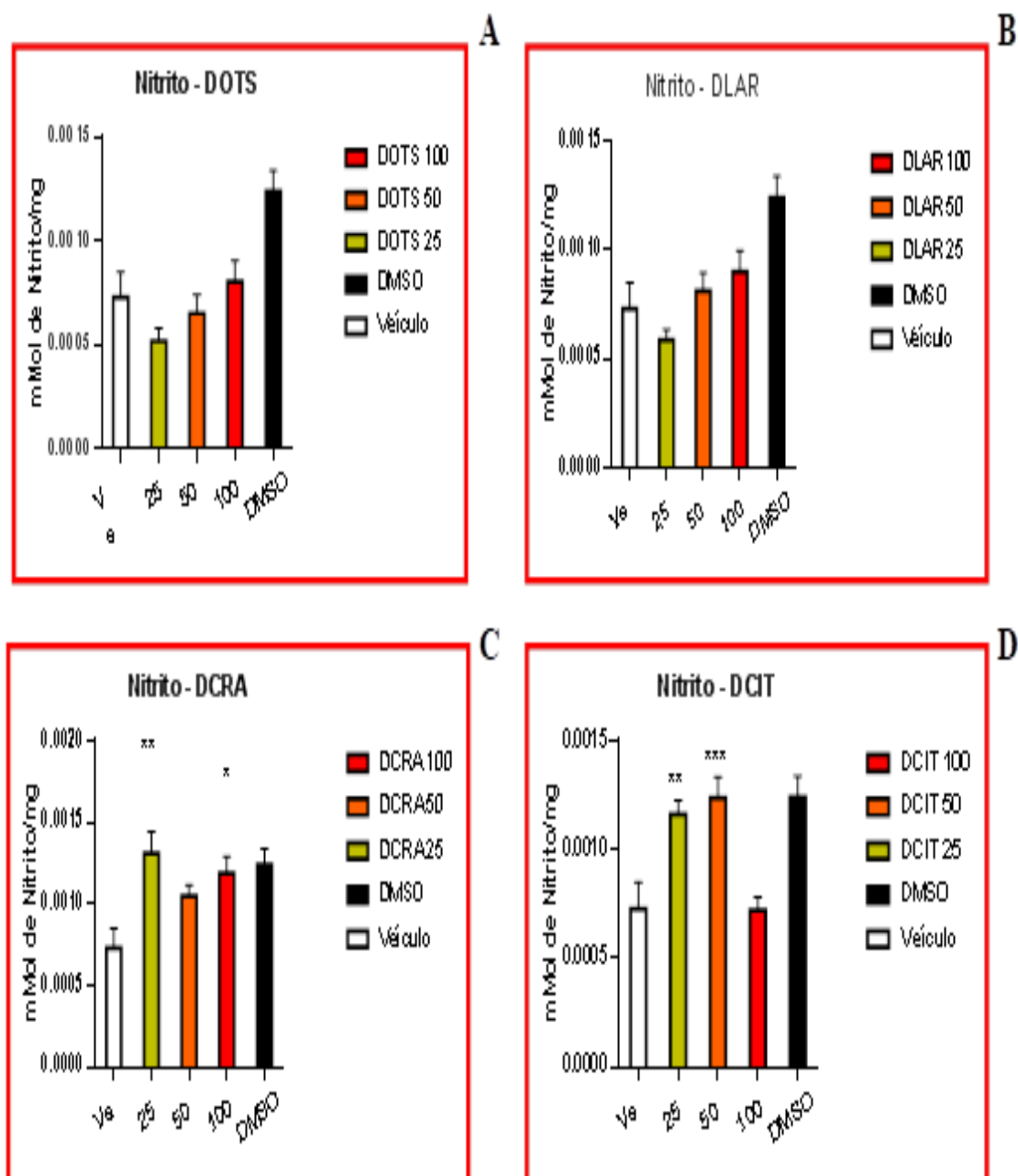
Não destacamos apenas o processo inflamatório para esta enzima, porém em estudos recentes ela também se mostrou um importante parâmetro promissor em outro ramo de pesquisa, os biomarcadores. Neles a MPO vem se destacando por avaliar toxicidade por nanomateriais, em estudos realizados em modelo animal com ratos, esta enzima apresentou resultados promissores, após um período de um mês de exposição, através da inspiração e da instilação de diferentes nanomateriais tóxicos (TOMONAGA et al., 2018).

Esta enzima, em alguns momentos, mostra uma patologia e em outros não, e interessante salientar que a MPO contém funções fisiológicas, agindo diretamente com o patógeno que é apresentado, realizando a defesa do organismo que diante disso, intensifica a geração dos chamados agentes oxidantes que são responsáveis pelo desencadeamento de processo inflamatório agredindo assim o tecido ao qual são expostos (KOCH, 2021).

6.3.4 Avaliação de Nitrito por método de Griess

A quantificação de Nitrito, pelo método de Griess, no homogenato das larvas, apresentou resultados significativos na relação veículo e formulação. Ao serem administradas as formulações, observou-se que para o DOTS nenhuma das amostras testadas apresentou diferença significativa quando comparadas ao veículo. Para o DCRA apenas as concentrações 25 e 100 mg / g apresentaram alteração significativa, quando comparada ao veículo. Para a formulação de DLAR não teve alteração e para a DCIT a alteração foi observada nas concentrações de 25 e 50 mg / g, como pode ser visto na **Figura 48**.

Figura 48: Valores de concentração de Nitrito em Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, após administração das formulações DOTS, DCRA, DLAR e DCIT.



Legenda: Grupo A: DOTS 100, 50 e 25 mg/g ; B: DCRA 100, 50 e 25 mg/g ; C: DLAR 100, 50 e 25 mg/g ; D: DCIT 100, 50 e 25 mg/g duplicatas do experimento; Ve: veículo controle água destila 10 μ L; controle negativo DMSO 1%. Tratamento com 48h de administração. P<0,05*; P<0,01**; P<0,001***; P<0,0001****. Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMOL), UFPI - 2021.

Os valores de Nitrito apresentaram uma particularidade para as formulações analisadas, o veículo VE é o padrão que foi comparado com todos os valores, DMSO foi igual para todas também. A concentração 25 teve valores iguais para as formulações

DOTS e DLAR, no entanto, nas formulações DCRA e DCIT, os valores foram bem próximos e ambas obtiveram resultados significativo. Com relação à concentração 50 as formulações DOTS, DCRA e DLAR foram bem próximas, mas não tiveram alterações significativas, sendo apenas DCIT a única que alterou estatisticamente e, por último, a concentração 100, em todas as formulações, apresentou valores bem próximos, mas não foram determinadas com alterações estatísticas significativas.

A avaliação do aumento de nitrito é, geralmente, reportado na literatura como associado a processos que desencadeiam condições patológicas que geram estresse oxidativo, com isso a liberação de radicais livres como, o óxido nítrico (NO), que é responsável por originar danos na célula (ARAÚJO et al, 2020).

Baseado na informação de que o NO tem esta particularidade, de permear, de forma inter e intracelular, sendo responsável por funções-chaves como metabolismo, morte e sobrevivência da célula, o NO também, no decorrer do processo inflamatório, é liberado, sendo responsabilizado por danos, mas também é responsável por ser forte vasodilatador em processo inflamatório, possuindo propriedade de aumentar e permeabilizar a vascularização, bem como induzir o edema (HASNAT et al., 2015).

A formulação DLAR, que tem o D-limoneno, componente do óleo de laranja, que é considerado uma molécula com potencial atóxico, antimicrobiano, antioxidante, antitumoral, inseticida, ansiolítico, antiparasitária e repelente, também possui elevada volatilidade e baixa solubilidade (SANTOS et al, 2020). Por ser considerado antioxidante tem sugestivo de uso terapêutico contra doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (DA), que estão ligadas a geração de estresse oxidativo (CARDOZO et al, 2021) e baseado em todo este contexto os dados obtidos corroboram com a literatura pois, para a formulação, contendo esta molécula, não foi observado discrepância nos valores, para esta variável analisada.

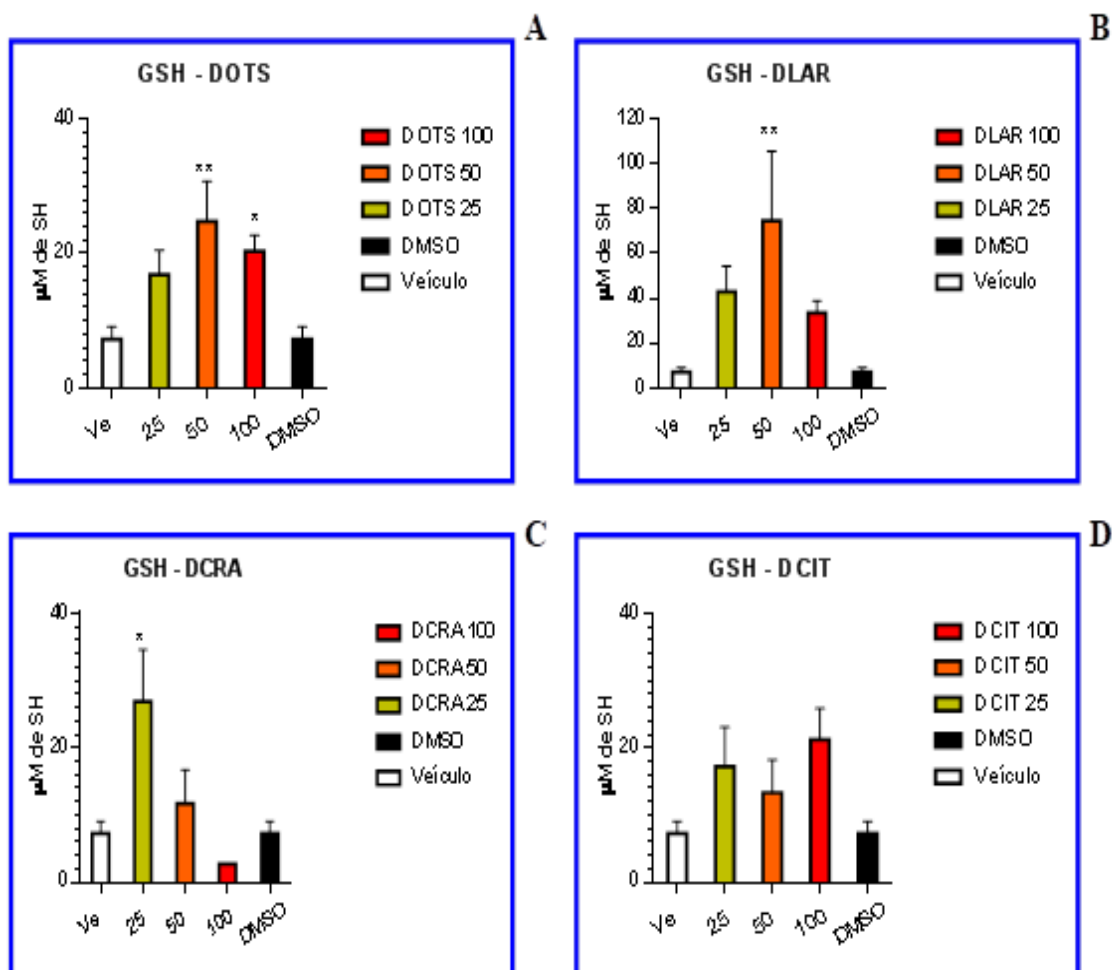
Com relação à fórmula DCRA pode ser observada uma alteração na menor e na maior concentração, e isso vem a corroborar, pois nela está presente o eugenol, uma molécula bem estudada, por diversos grupos, que já constataram seu potencial como atividade antioxidante. Ensaios, em diferentes modelos, apresentaram evidências de que o eugenol, além de possuir atividade antioxidante, cuja função é a proteção contra danos no tecido, também é considerado, em concentrações seguras, como atóxico, não mutagênico e carcinogênico segundo a Food and Drug Administration, e ainda é antimicrobiano, analgésico, anti-inflamatório, e em alguns relatos experimentais foi observado como citoprotetor, sendo considerado responsável por prevenir a peroxidação lipídica e a proteção de sistemas antioxidantes enzimáticos, e não enzimáticos (SAKAT et al, 2019). Com isso a expressão, nas concentrações citadas anteriormente, neste parâmetro, mostra que a formulação tem indicativo da presença desta molécula para uma possível terapia.

O DCIT apresentou alterações significativas na menor e na concentração intermediária, podendo ser atribuído ao componente citronelal, presente nesta formulação que, devido a propriedades farmacológicas deste, são oriundas de mecanismos de ação dos seus constituintes químicos. Estudos mostram que, como antimicrobiana, a concentração inibitória mínima, do óleo essencial de citronela, foi de 1,0% quando comparada a fármacos bem utilizados, como o antibiótico tetraciclina de 30µL/MI (SILVA, 2018). Com isso a ação, na maior expressão desta molécula, presente na formulação em análise, neste parâmetro corrobora com os dados reportados na literatura.

6.3.5 Avaliação de grupos sulfidrila não proteicos reduzidos - Glutathiona reduzida (GSH)

A avaliação da atividade antioxidante de grupos sulfidrila, não proteicos, reduzidos - Glutathiona reduzida (GSH), das moléculas avaliadas neste estudo, foi possível através do modelo de Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, após a administração das formulações, detectando, apenas no grupo DCIT, resultados não significativos, quando comparado ao veículo, já o grupo DOTS apresentou alterações nas concentrações de 50 e 100mg/g, no grupo DCRA apenas alterações na concentração de 25mg/g e no grupo DLAR apenas na concentração intermediária, como é demonstrado na **Figura 49**.

Figura 49: Valores de concentração de grupamentos sulfidrila não proteicos reduzidos - Glutathiona reduzida (GSH) em Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante, após administração das formulações DOTS, DCRA, DLAR e DCIT.



Legenda: Grupo A : DOTS 100, 50 e 25 mg/g ; B: DCRA 100, 50 e 25 mg/g ; C: DLAR 100, 50 e 25 mg/g ; D: DCIT 100, 50 e 25 mg/g duplicatas do experimento; Ve: veículo controle água destila 10 µL; controle negativo DMSO 1%. Tratamento com 48h de administração. P<0,05*; P<0,01**; P<0,001***; P<0,0001****. Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiopharmacologia (LAFMOL), UFPI - 2021.

O organismo possui uma defesa denominada antioxidante, não enzimática, que contém a glutathiona reduzida (GSH), que é constituída por alguns resíduos de aminoácidos, cisteína, glicina e glutamina e, através desta junção, ocorre a formação de um tripéptido que contém um grupo tiol SH e quando este se encontra no organismo, se apresenta como GSH reduzida e oxidada GSSG (ALMEIDA, 2021).

Para este parâmetro avaliar a relação de estresse oxidativo presente, por este marcador nas formulações em estudo obtivemos, como resultado, que o DOTS nas maiores concentrações apresentou maior nível de expressão, DCRA apenas na menor concentração, DLAR na concentração intermediária e DCIT não teve alteração significativa. Todos estes resultados foram comparados com o VE, valor de referência.

A formulação DOTS é uma fonte de espécies reativas de oxigênio, bem representativas, e isso corrobora com os dados obtidos no experimento mostrando que os carbon dots se prestam a outras aplicações, como a terapia fotodinâmica (PDT), por possuírem habilidade de originar espécies reativas de oxigênio ROS por meio de uma fonte de irradiação de luz com um determinado comprimento de onda (GETACHEW et al, 2021). Por isso a agregação de estados elevados de GSH, tende a aumentar o índice da razão que avalia as concentrações existentes da forma reduzida, e oxidada, com o estresse oxidativo elevado no organismo (ALMEIDA, 2021).

Podemos argumentar que quando glutathiona (GSH) está presente em formas reduzidas (GSH) e oxidadas (GSSG), compõem a primeira linha de defesa do organismo versus o cultivo demasiado de ROS, denominando como indicador para aptidão antioxidante em material biológico, contra radicais, a exemplo do peroxil, e também a quantificação destes radicais sulfidrilas, que funciona como um biomarcador de oxidação proteica em condições de estresse (WANG et al, 2018).

O DCRA foi bem representativo, na menor concentração, e isso corroborou com dados de um experimento, com animal, que demonstrou que o eugenol, que é o componente característico do óleo de cravo, é matéria prima para a formulação DCRA, é considerado composto fenólico que possui características anti-inflamatórias e antioxidantes e possui um dímero denominado bis-eugenol que possui todas as características citadas anteriormente e mais uma particularidade, que é ser atóxica e nos protocolos *in vitro*, cuja concentração de 25ug/mL, detectou o potencial antioxidante com mais predominância do que as outras concentrações avaliadas, tanto para o bis-eugenol, quanto para o eugenol, contribuindo para aplicações *in vivo* com efetividade (MACHADO, 2022).

Este fenômeno, com o eugenol, é possível devido a esta molécula ter em sua estrutura química, não só o anel fenólico, como uma cadeia lateral que proporciona a atividade antioxidante, e a habilidade de doar átomos de hidrogênio, facilitando assim a neutralização dos radicais livres e evitando a difusão do processo oxidativo (FARIAS et al, 2014).

Tendo a GSH uma função primordial no organismo, que é proteger as células, e mitocôndrias, de danos oxidativos e peroxidativos, foi comprovado que a molécula de eugenol tem esta capacidade, e os ensaios *in vitro* confirmaram a inibição da atividade desta enzima, quando exposta a extrato de cravo e eugenol purificado (OBOH et al, 2015), e estes mesmos compostos, em outros modelos *in vitro*, atuaram como antioxidante, com a capacidade de bloquear a glicação de proteínas e a peroxidação lipídica (PERERA, 2015). Outro estudo confirmou que o eugenol apresentou um elevado potencial para ser aplicado em ensaios clínicos, no desenvolvimento de um novo tratamento para diabetes (CARVALHO, 2020).

A formulação DLAR só apresentou alteração na concentração intermediária e isso pode ser uma reação devido a presença do limoneno, que contribuiu com achados

na literatura enaltecendo que, em determinados momentos, a presença de radicais livres se torna benéfica, pois induz a formação da chamada cascata de sinalização celular, e nas mudanças dos padrões de expressão gênica, podem contribuir para o conceito de radical livre que é a formação de moléculas, altamente reativas, por conter elétrons desemparelhados na sua última camada, e isso propicia desgaste celular em decorrência do estresse oxidativo (YAHYAPOUR et al., 2018). Em casos de tratamento para patologias, como câncer, esta particularidade pode ser benéfica.

Muitos autores enfatizam a presença de atividade antioxidante do composto limoneno, em seus estudos, como Yazgan et al. (2019), que relatou que o óleo essencial de limão, que contém limoneno, possui atividade biológica como agente antioxidante, outro trabalho foi de Moosavy et al. (2017) onde foi possível quantificar, em porcentagem, o valor de 55,09% em OE de C. limon para a atividade antioxidante e, em estudo mais recente, por Menezes (2021) foi constatado que, em valores cuja concentração é inferior a 5 mg mL^{-1} , não é possível detectar ação antioxidante, e em concentrações de 50 e 40 mg mL^{-1} não proporcionaram diferença significativa, contudo ainda foi possível observar elevada ação na redução do DPPH acima de 90% (MENEZES, 2021).

Com o DCIT não ocorreu nenhuma alteração significativa para este parâmetro avaliado, enfatizando que componentes desta formulação, como o geraniol, tem a propriedade farmacológica atóxica, em mamíferos, e facilidade biodegradável, podendo ser aplicado como uma molécula segura para humanos (DOBREVA et al., 2011).

Tendo o parâmetro de grupos sulfidril não proteicos reduzidos - Glutathiona reduzida (GSH) associado a estresse oxidativo, o estudo da formulação contribui para isso, pois o geraniol é indicado como atuante terapêutico, por possuir ação antimicrobiana, anti-inflamatória, neuroprotetor e um destaque principal como antioxidante (PRASAD; MURALIDHARA, 2014). Em outras pesquisas foi possível constatar que nesta mesma molécula de geraniol, ocorreu uma diminuição no nível dos marcadores para o estresse oxidativo e fosforilação oxidativa, em cérebro de ratos diabéticos (PRASAD; MURALIDHARA, 2014) associado a este ponto pesquisas foram mais investigativas e determinaram que níveis de glutathiona reduzida, em tecido renal, associada a condições diabéticas, conseguiram manter o balanço redox celular (CARMO, 2019).

Para corroborar, ainda mais, com todas as informações citadas anteriormente, Ahmad et al (2011) conseguiu determinar que a molécula de geraniol se mostrou eficaz por recompor níveis de GSH e, conseqüentemente, elevar atividades de enzimas antioxidantes no tecido renal de ratos diabéticos, e Prasad; Muralidhara (2014) contribuiu em seus estudos que o elevado níveis de GSH, induzido por componente geraniol, tende a conservar equilíbrio redox no tecido nervoso central e periférico, em modelo diabético.

Por isso estudos, que possibilitem controle, ou mesmo, no desenvolvimento de ROS, é de grande importância para novas moléculas, dependendo de sua aplicação, tendo visto que, quando esta taxa é considerada elevada, em comparação ao limiar homeostático, seu resultado é devastador, levando a ações de apoptose, senescência, inflamação ou liberação de mediadores inflamatórios (LEETHAM et al., 2016).

7 Conclusão

A avaliação da composição química dos óleos permitiu quantificar os compostos presentes, contribuindo para execução eficaz da funcionalização que se apresentou satisfatória, com o protocolo utilizado, sendo reproduzida, com qualidade, a formulação deste estudo por quatro vezes. No ensaio de TG foi evidenciado que não apenas se apresentou como avaliador de estabilidade térmica, mas um indicativo de que nas formulações DCRA e DCIT ocorreram a incorporação do óleo com DOTS.

A morfologia apresentada identificou dados semelhantes ao da literatura tanto no tamanho quanto na estrutura. A estabilidade avaliada pelo pH apresentou nas formulações resultados com tendência de pH ácido, que vai deteriorando os elementos presentes, e sua estabilidade vai diminuindo com o tempo, e isso foi observado no perfil da formulação de DCRA, sendo este parâmetro utilizado não apenas para analisar a estabilidade, como também o resultado obtido pode direcionar para tipos de vias de administração desta formulação quando usadas como fins farmacológicos.

Os espectros de UV-Vis se encontram no comprimento de onda de bandas sugestivas para as substâncias presentes, como mostra a literatura. Para o FTIR foi possível avaliar não apenas a estabilidade das formulações como também indicar que as bandas, apresentadas, das substâncias, estão iguais à literatura. Junto com as análises de RAMAN, que mostrou a ligação do DOTS com o óleo, foi possível evidenciar que as formulações apresentaram indicativos de estabilidade, em temperatura ambiente, para DCRA de seis meses, e as demais formulações DLAR, DCIT e DOTS de aproximadamente de doze meses, mas também evidenciar o processo de oxidação onde o óleo associado ao DOTS protege do efeito de oxidação criando um sistema casca núcleo.

Após a realização, e análise, dos dados das formulações, o protocolo utilizado no estudo, com a técnica de EPR, mostrou resultados que corroboram com alguns já apresentados na literatura, e outros, que demonstraram atenção especial quanto à técnica, ou mesmo a escolha da molécula a ser utilizada, para os ensaios, bem como aplicação para futuros produtos com potenciais de mercado. Sendo uma técnica bastante sensível pode ser demonstrada, neste estudo, que o EPR, quando avaliou as moléculas DOTS, DLAR, DCIT e DCRA verificou que seus componentes, presentes nos óleos, interagem de forma particular no meio ao qual é inserido, e pode ocorrer também de forma diferente em organismos vivos.

Na avaliação dos resultados obtidos com o modelo *in vivo*, concluiu-se que as formulações se apresentaram atóxicas, com base no parâmetro de letalidade, utilizado no modelo aplicado neste estudo. O indicativo de inflamação foi avaliado pela quantificação da melanização que, associada à produção de radicais livres, e antioxidantes, e associados aos demais parâmetros, como Nitrito, MPO e GSH, todos se correlacionaram, sendo a variação da concentração, em alguns casos, mais expressiva do que em outros, podendo ser evidenciado que a formulação que mais evidenciou presença em todas as concentrações para alguns parâmetros ou em algumas concentrações, foi o DCRA, e todos os resultados corroboraram com estudos já evidenciados na literatura, com base na formulação como um todo, ou um dos componentes em maior evidencia sendo o responsável por toda a reação obtida.

Conclui-se que a técnica utilizada para a funcionalização dos DOTS com os óleos essenciais usados neste estudo se mostrou eficaz, satisfatória, podendo cada vez mais ser aplicada a outros ramos de pesquisa, pois apresentou uma redução de toxicidade e aumento na capacidade antioxidante das formulações para uma melhor

aplicação em produtos biocompatíveis, e estes resultados podem ser associados a produtos visando um mercado futuro.

Sugere-se que as formulações possam ser estudadas com análises mais complementares, para que sejam aplicadas em uso humano, visto que no ocorreu morte no modelo experimental analisado.

Referências

- ADAMS, R.P. Identification of essential oils by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream: Allured Pub. Co., USA., 469 p., 1995.
- ADENUBI, O. T. et al. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and meta-analysis. *Industrial Crops and Products*, v. 123, n. August 2017, p. 779–806, 2018.
- AGUIAR, Bernardo Almeida et al. Avaliação do PH e liberação de íons cálcio de diferentes pastas de medicação intracanal. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 48967-48983, 2021. DOI:10.34117/bjdv7n5-344
- AHMAD, Shiekh Tanveer et al. Preclinical renal cancer chemopreventive efficacy of geraniol by modulation of multiple molecular pathways. **Toxicology**, v. 290, n. 1, p. 69-81, 2011.
- AIKEN III, John D.; FINKE, Richard G. A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 145, n. 1-2, p. 1-44, 1999. doi.org/10.1016/S1381-1169(99)00098-9
- AKDOGAN, Yasar et al. The solvation of nitroxide radicals in ionic liquids studied by high-field EPR spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 28, p. 7874-7882, 2010.
- AKSOY, Mustafa; ÇELİK, Hakim. Dynamic thiol/disulphide homeostasis in vitiligo patients. **Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 35, n. 5, p. 498–501, 2018. doi: 10.5114/ada.2018.72856
- ALMEIDA, Jose Otavio Carvalho Sena de. Nanopartículas lipídicas sólidas produzidas a partir da manteiga das sementes de bacuri (*Platonia insignis*) e sua atividade antioxidante em larvas de *Tenebrio molitor*. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Piauí-UFPI, Teresina - Piauí, 2021
- ALMEIDA, M. R.; MARTINEZ, S. T.; PINTO, A. C. Química de Produtos Naturais: Plantas que testemunham histórias. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1117-1153, 2017. DOI: 10.21577/1984-6835.20170068
- ALMEIDA, Diogo Filipe Loureiro dos Santos. **Estudo das vias metabólicas das plantas na síntese de pigmentos naturais**. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2017.
- ALVES, André Luíz et al. Antioxidant Activity and Stable Free Radicals in Robusta Green Coffee Genotypes. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 37312-37330, 2021. DOI:10.34117/bjdv7n4-275
- AN, Chunju; RAGAN, Emily J.; KANOST, Michael R. Serpin-1 splicing isoform J inhibits the proSpätzle-activating proteinase HP8 to regulate expression of antimicrobial

hemolymph proteins in *Manduca sexta*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 1, p. 135-141, 2011. doi:10.1016/j.dci.2010.09.004 2011.

ANAND, Utkarsh et al. Hydration layer-mediated pairwise interaction of nanoparticles. **Nano letters**, v. 16, n. 1, p. 786-790, 2016. doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b04808

ANDRADE, Mariana de. Avaliação do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) como agente alternativo na desinfecção de ovos incubáveis. Trabalho de Conclusão de curso (Bacharel em Zootecnia) – Universidade Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2018.

ARAÚJO DE, Larissa Carolina Ramos et al. Atividade do óleo de copaíba sobre radicais livres formados durante a resposta inflamatória. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 53538-53553, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n7-845

ARCANJO, Maria Cecília Nascimento et al. Utilização de resíduos de frutos típicos do Brasil na produção e composição nutricional da larva de *Tenebrio Molitor*. 2020.

ARAUJO, Robson T. et al. An experimental study on the synthesis of poly (vinyl pivalate)-based magnetic nanocomposites through suspension polymerization process. **European Polymer Journal**, v. 68, p. 441-459, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.05.015>

ARAUJO, Victor Hugo Sousa et al. The influence of NLC composition on curcumin loading under a physicochemical perspective and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 602, p. 125070 Oct. 2020, doi: 10.1016/j.colsurfa.2020.125070.

ASTROGILDO DE, Thales et al. Considerações sobre o conceito dos 3Rs e o potencial conflito com novas compreensões do animal experimental. **Revista Brasileira de zootecias**, v. 19, n. 2, p. 97-113, 2018. DOI: <https://doi.org/10.34019/2596-3325.2018.v19.24741>

AYALA, A. et al. Multiparametric automated system for sulfate, nitrite and nitrate monitoring in drinking water and wastewater based on sequential injection analysis. **Microchemical Journal**, v. 100, p. 55-60, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.09.004>

AYDIN, Suleyman et al. Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives. **Vascular health and risk management**, v 15, p. 1-10, 2019. doi: 10.2147/VHRM.S166157

AYRES, Janelle S.; SCHNEIDER, David S. A signaling protease required for melanization in *Drosophila* affects resistance and tolerance of infections. **PLoS biology**, v. 6, n. 12, p. e305, 2008. doi:10.1371/journal.pbio.0060305

BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição [online]**. 2010, v. 23, n. 4 [Acessado 29 Abril 2022], pp. 629-643. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415->

52732010000400013>. Epub 10 Dez 2010. ISSN 1678-9865.
<https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.

BARBOZA, Joice Nascimento et al. Potencial anti-inflamatório e perfil antioxidante do eugenol: Uma revisão. Trabalho de conclusão de curso, Centro de ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, 2018.

BARREIRO, Eliezer J. What is hidden in the biodiversity? The role of natural products and medicinal chemistry in the drug discovery process. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.

BARROS GOMES, Paulo Roberto et al. Estudo da composição química, toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas**, v. 49, n. 1, p. 28-43, 2020.
<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n1.87004>

BARRETO, Rosana SS et al. A systematic review of the wound-healing effects of monoterpenes and iridoid derivatives. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 846-862, 2014.
<https://doi.org/10.3390/molecules19010846>

BARUAH, J. et al. Genetic diversity study amongst *Cymbopogon* species from NE-India using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 235-243, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.022>

BASÍLIO, F. S.; SANTOS, J. M. dos; BRANCO, C. S. The role of oxidative stress in Crohn's disease: A narrative review. **Research, Society and Development [S. l.]**, v. 10, n. 4, p. e52910414445, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i4.14445. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/14445>. Acesso em: 30 apr. 2022.

BATIHA, Gaber El-Saber et al. "Syzygium aromaticum L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities." **Biomolecules** vol. 10,2 202. 30 Jan. 2020, doi:10.3390/biom10020202

BATISTA, Vitória et al. Uso de plantas como alternativa aos agrodefensivos sintéticos no cultivo de orgânicos em Goiás. Use of plants as an alternative to synthetic agrochemicals in the cultivation of organics in Goiás. **Research, Society and Development, [S. l.]**, v. 10, n. 4, p. e37910414191, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i4.14191

BERMÚDEZ-VÁSQUEZ, María José; GRANADOS-CHINCHILLA, Fabio; MOLINA, Andrea. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*. **Agronomía Mesoamericana**, v. 30, n. 1, p. 147-163, 2019. DOI 10.15517/AM.V30I1.33758

BERG, Kirsti et al. A high precision method for quantitative measurements of reactive oxygen species in frozen biopsies. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e90964, 2014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090964>

BEZBARUAH, Achintya N. et al. Ca–alginate-entrapped nanoscale iron: arsenic treatability and mechanism studies. **Journal of nanoparticle research**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2014. doi.org/10.1155/2014/178518

BEZERRA, R. G. Valiação pré-clínica do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) E emulsão a base deste para o tratamento da dermatite: formulação, caracterização e efeitos antimicrobiano e anti-inflamatório. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, 2020.

BEZERRA, Daniel Pereira et al. The dual antioxidant/prooxidant effect of eugenol and its action in cancer development and treatment. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1367, 2017. doi:10.3390/nu9121367

BIZZO, Humberto R.; HOVELL, Ana Maria C.; REZENDE, Claudia M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, p. 588-594, 2009. https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005

BORSATTI, Maicon et al. Potencial de controle do azevém (*Lolium multiflorum*) com óleos essenciais. XI Edição dos Anais da Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica da UFFS apresenta os Resultados da Pesquisas realizadas por estudantes bolsistas de Iniciação Científica e de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (UFFS/FAPESC/CNPq/FAPERGS/Fundação Araucária), das Ações Afirmativas (PIBIC-Af/CNPq), de Inclusão Social (PIBIS/Fundação Araucária). v. 1 n. 11 (2021): XI JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA. 2021.

BRADLEY, Peter P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of investigative dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, v. 28, p. 25-30, 1995.

BUCIOLI Sérgio Antônio, et al, Efeito dos agentes antioxidantes para manutenção saudável do organismo, **Medicina e Saúde**, Rio Claro, v. 2, n. 1, p. 9-22, jan./jun. 2019

BUSTAMANTE, Julen et al. Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste. **Journal of cleaner production**, v. 137, p. 598-605, 2016. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.108

CALEJA, Cristina et al. A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. **Food chemistry**, v. 216, p. 342-346, 2017.

CALIXTO, Mariana Gaião. Extração de metabólitos secundários da espécie *Schinopsis brasiliensis* Engler utilizando diferentes solventes. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em ciências Farmacêuticas- PPGCF) Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, 2022.

CAMARGOS, Heverton Silva; ALONSO, Antonio. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectral components of spin-labeled lipids in saturated phospholipid bilayers: effect of cholesterol. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 815-821, 2013.

CANTERI DE SOUZA, Patrícia et al. An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 125, 2018.

CARDOZO, Angela Góes Lara et al. Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-hil.): uma revisão abrangente sobre composição química, benefícios à saúde e recentes avanços. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e590101120036-e590101120036, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i11.20036>

CARLETTI, Giorgia; NERVO, Giuseppe; CATTIVELLI, Luigi. Flavonoids and melanins: a common strategy across two kingdoms. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 10, p. 1159, 2014.

CARMO, Nágilla Orleanne Lima do. Avaliação do metabolismo energético e estresse oxidativo em miocárdio de ratos com diabetes mellitus tipo 1, tratados com geraniol. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho-Botucatu-SP, 2019.

CARRIÓN, García; CAYETANO, Javier. Estudio de la interrelación entre potencial antioxidante de la dieta y biomarcadores de capacidad antioxidante, nutrientes antioxidantes e inflamación. Granada: Universidad de Granada, 2020.

CARVALHO, Renner Philipe Rodrigues. Efeitos do tratamento com eugenol em modelos murinos hiperglicêmicos. 2020. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2020.

CASSINELLI, Aline Barbosa et al. Atividade antifúngica in vitro dos óleos essenciais *Eugenia uniflora* e *Psidium cattleianum* contra o fitopatógeno *Thielaviopsis basicola*. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 5, n. 3, p. 250-256, 2019. <https://doi.org/10.21674/2448-0479.53.250-256>

CASTRO, Thalison de et al. Obtenção e análise da composição centesimal de farinha de larvas de *Tenebrio molitor*. 2021.

CHAIEB, Kamel et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007. <https://doi.org/10.1002/ptr.2124>

CHAMI, Belal et al. Myeloperoxidase in the inflamed colon: a novel target for treating inflammatory bowel disease. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 1, n. 645, p. 61-71, 2018. DOI: 10.1016/j.abb.2018.03.012.

CHAE, Jun-Ho et al. Purification and characterization of tenecin 4, a new anti-Gram-negative bacterial peptide, from the beetle *Tenebrio molitor*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 36, n. 3, p. 540-546, 2012.

CHEN, Thomas C.; DA FONSECA, Clovis O.; SCHÖNTHAL, Axel H. Preclinical development and clinical use of perillyl alcohol for chemoprevention and cancer therapy. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 5, p. 1580, 2015

CHIARELLI-NETO, Orlando et al. Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 6, p. 1195-1202, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.013>

CHUESIANG, Piyanan et al. Antimicrobial activity and chemical stability of cinnamon oil in oil-in-water nanoemulsions fabricated using the phase inversion temperature method. **LWT**, v. 110, p. 190-196, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.012>

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Análise Instrumental. Rio de Janeiro: Interciência, 2000

CLAVIJO-GIRALDO, Diana M. et al. Analysis of *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. **Journal of microbiological methods**, v. 122, p. 73-77, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.01.014>

CONCEA. Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Lei, decreto, portarias, resoluções normativas e orientações técnicas. 3a ed. 2016. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/arquivos/concea/240230.pdf> f>. Acesso em 01 de maio de 2022.

CORTE, T.W.F. Desenvolvimento e avaliação da eficácia de emulsões cosméticas para xerose senil. Porto Alegre, 2006. 143 p. Tese de Doutorado. Faculdade de Geriatria e Gerontologia. Pontifício Católico de Rio Grande do Sul

CORAZZA, Marcos L.; RODRIGUES, Dina G.; NOZAKI, Jorge. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química nova**, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.

COSTA, E. P.; SILVA, M. G. M. Degradação de poliestireno expandido por larvas de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae). **Rev. Bras. Gest. Amb. Sustent.** [online]. 2018, vol. 5, n. 9, p. 281-289. ISSN 2359-1412. DOI: 10.21438/rbgas.050919

CRUZ DE OLIVEIRA, Roberta Monteiro et al. Consumo de antioxidantes para práticas de exercícios físicos. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 5, p. S199-S202, 2017.

CRUZAT, V. F.; TIRAPEGUI, J. Estresse Oxidativo na Atividade Física. In: SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia Humana**. Uma Abordagem Integrada. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, Cap. 22. p. 291-306, 2017.

CUNHA, Bruno Guandalini et al. Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. **Archives of Oral Biology**, v. 109, p. 1-10, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104577>

D'ALESSIO A, Patrizia et al. Skin repair properties of d-Limonene and perillyl alcohol in murine models. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)**, v. 13, n. 1, p. 29-35, 2014.

DA COSTA LIMA, Jéssica Camilla et al. Study and influence of clove, cinnamon, and orange essential oils in the preparation of poly (lactic acid) films: Active packaging development . **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. e41810414340, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i4.14340. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/14340>. Acesso em: 12 nov. 2022.

DAMIANI, Elisabetta et al. Modulation of oxidative status by normoxia and hypoxia on cultures of human dermal fibroblasts: how does it affect cell aging?. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, p. 1-23, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5469159>

DAUDT, Renata M. et al. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e cultura**, v. 65, n. 3, p. 28-31, 2013. doi.org/10.21800/S0009-67252013000300011.

DAVIES, Michael J.; HAWKINS, Clare L. The role of myeloperoxidase in biomolecule modification, chronic inflammation, and disease. **Antioxidants Redox Signaling**, v. 32, n. 13, p. 957-981, 2020. doi: 10.1089/ars.2020.8030.

DA ROCHA, Cintia Hoffer et al. Óleo essencial de *Psidium cattleianum* no controle de fitopatógenos em sementes de feijão. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 15, n. 1, p. 14-19, 2020. doi: 10.18378/rvads.v15i1.7365

DA SILVA GÜNDEL, Samanta et al. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity of nanoemulsions containing Mancozeb and Eugenol. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 207-215, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.023>

DA SILVA OLIVEIRA, Eliane Lima et al. A importância da ação antioxidante de óleos essenciais em benefício da saúde. **Diversitas Journal**, v. 2, n. 1, p. 52-55, 2017.

DE SOUZA, Patrícia Canteri et al. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of microbiological methods**, v. 118, p. 182-186, 2015. doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.004

DE OLIVEIRA DAVI, Ledja Brittes et al. Síntese de Carbon Dots a partir de derivados de anilina a fim de avaliar o efeito dos substituintes nas propriedades fotofísicas e estruturais. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 2732-2743, 2021. DOI:10.34117/bjdv7n1-186

DE OLIVEIRA, L. J. D. G. APLICABILIDADES DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA DE ELÉTRONS (RPE): UM ESTUDO DE REVISÃO. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar - ISSN 2675-6218**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 112–121, 2021. DOI: 10.47820/recima21.v2i3.149. Disponível em: <https://recima21.com.br/index.php/recima21/article/view/149>. Acesso em: 9 abr. 2022

DE OLIVEIRA, Mateus Gomes; BATISTA, Maely Oliveira; RAMOS, Denny Vitor Barbosa. Avaliação da atividade antioxidante da Bauhinia splendens pelo método DPPH. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 12, p. 112714-112725, 2021.

DEPONTE, Marcel. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3217-3266, 2013.

DIAS, Bruna de Paula et al. A NANOTECNOLOGIA NO BRASIL E O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA. **Química Nova**, v. 44, p. 1084-1092, 2021. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170743>

DING, Hui; XIONG, Huan-Ming. Exploring the blue luminescence origin of nitrogen-doped carbon dots by controlling the water amount in synthesis. **Rsc Advances**, v. 5, n. 82, p. 66528-66533, 2015. DOI: 10.1039/C5RA11796H

DING, Hui et al. Luminescent carbon quantum dots and their application in cell imaging. **New Journal of Chemistry**, v. 37, n. 8, p. 2515-2520, 2013. doi: 10.1039/c3nj00366c

DOBREVA, Anna et al. Improvement of essential oil yield of oil-bearing (*Rosa damascena* Mill.) due to surfactant and maceration. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1649-1651, 2011.

DRAWANZ, Bruna Bento et al. Óleos essenciais e hidrolatos de orégano e cravo-da-índia sobre o desenvolvimento micelial de *Botrytis cinerea* isolado de morangos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 15, n. 4, p. 341-345, 2020. doi: 10.18378/rvads.v15i4.7952

ERDOĞAN, B. Y.; ONAR, A. Nur. Determination of nitrates, nitrites and oxalates in kale and sultana pea by capillary electrophoresis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, n. 2, p. 14, 2012. <https://doi.org/10.6227/jfda.2012200215>

EWEN, J. P.; HEYES, D. M.; DINI, Daniele. Advances in nonequilibrium molecular dynamics simulations of lubricants and additives. **Friction**, v. 6, n. 4, p. 349-386, 2018. doi.org/10.1007/s40544-018-0207-9

FANGJUN, Li; ZHIJIA, Yang. Tumor suppressive roles of eugenol in human lung cancer cells. **Thoracic cancer**, v. 9, n. 1, p. 25-29, 2018. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12508>

FAN, Hao et al. Authenticity analysis of citrus essential oils by HPLC-UV-MS on oxygenated heterocyclic components. **Journal of food and drug analysis**, v. 23, n. 1, p. 30-39, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.05.008>

FARIAS D'AVILA, Marília et al. Eugenol derivatives as potential anti-oxidants: is phenolic hydroxyl necessary to obtain an effect?. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 5, p. 733-746, 2014.

FATHY, Moustafa et al. Eugenol exerts apoptotic effect and modulates the sensitivity of HeLa cells to cisplatin and radiation. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3979, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24213979>

FEDOROW, H. et al. Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. **Progress in neurobiology**, v. 75, n. 2, p. 109-124, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.02.001>

FEIJÓ, Anamaria. M.G; MACEDO-BRAGA, L.M.G.; PITREZ, P.M. C. **Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos**. Porto Alegre EdiPUCRS, 2010.

FERNANDES, Pamela Rayssa Diógenes; BIZERRA, Ayla Márcia Cordeiro. Avaliação quantitativa de atividades antioxidantes das plantas nativas da Região do Alto Oeste Potiguar/RN. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 2, p. 76, 2020.

FERREIRA-NUNES, Ricardo et al. Incorporation of Eugenia dysenterica extract in microemulsions preserves stability, antioxidant effect and provides enhanced cutaneous permeation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 265, p. 408-415, 2018.

FERRONATTO, Andressa Neuhaus; ROSSI, Rochele Cassanta. Extração e aplicação do óleo essencial da casca da laranja como um ingrediente natural. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 12, n. 2, p. 78-93, 2018. doi: 10.4013/ete.2018.122.05

FERREIRA, F.M. Atividade acaricida do eugenol, do óleo essencial e do hidrolato de *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae) frente a espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Juiz de Fora, 2018.

FERREIRA, S Adriana et al. Physiological and sanitary quality *Leucaena leucocephala* (Lam.) from Wit.seeds treated with essential oil *Rosmarinus officinalis* L. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 78916-78928, 2020. DOI:10.34117/bjdv6n10-357

FERREIRA, V. B. Nanotecnologia e sua importância no contexto brasileiro. In: *Science e políticas públicas para ciência, tecnologia e inovação no Brasil* [online]. Salvador: EDUFBA, 2018, pp. 97- 106. ISBN: 978-85-232-1865-2. Disponível em: <<https://doi.org/10.7476/9788523218652.0007>> Acesso em: 15 maio. 2022

FORSTERMANN, Ulrich; MÜNZEL, Thomas. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708-1714, 2006. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532>

FRANÇA, Inácia Sátiro Xavier de et al. Medicina popular: benefícios y malefícios de las plantas medicinales. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

FREIRE, Nathalia Freitas. Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*). Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-graduação em Engenharia Industrial - PEI) Universidade Federal da Bahia, Escola politécnica, Salvador-BA, 2017.

FU, Lei; DRAVID, Vinayak P.; JOHNSON, D. Lynn. Self-assembled (SA) bilayer molecular coating on magnetic nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 181, n. 1-2, p. 173-178, 2001. doi.org/10.1016/S0169-4332(01)00388-9

FURLAN, ANA LAURA DINIZ; FISCHER, MARTA LUCIANE. Métodos Alternativos Ao Uso De Animais Como Recurso Didático: Um Novo Paradigma Bioético Para O Ensino Da Zoologia. **Educação em Revista**, v. 36, 2020. [Acessado 30 Abril 2022], e230590. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0102-4698230590>>. Epub 11 Set 2020. ISSN 1982-6621. <https://doi.org/10.1590/0102-4698230590>.

GALVÃO, J. G. et al. β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, p. 14-19, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2015.04.001>

GANESAN, Palanivel; CHOI, Dong-Kug. Current application of phytochemical-based nanocosmeceuticals for beauty and skin therapy. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 1987, 2016. doi: 10.2147/IJN.S104701

GETACHEW, Girum et al. ROS generation/scavenging modulation of carbon dots as phototherapeutic candidates and peroxidase mimetics to integrate with polydopamine nanoparticles/GOx towards cooperative cancer therapy. **Composites Part B: Engineering**, v. 226, p. 109364, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2021.109364>

GODOI, João Elias de. Animais no ensino de técnicas cirúrgicas durante a graduação médica: uma questão de custo-benefício. **Revista de Medicina**, v. 97, n. 4, p. 446-447, 2018. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v97i4p446-447>

GOLDENBERG, Saul. Aspectos éticos da pesquisa com animais. *Acta Cirúrgica Brasileira* [online]. 2000, v. 15, n. 4 [Acessado 1 Maio 2022] , Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-86502000000400001>>. Epub 08 Nov 2000. ISSN 1678-2674. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502000000400001>

GONG, F. et al. Bimetallic oxide MnMoOX nanorods for in vivo photoacoustic imaging of GSH and tumor-specific photothermal therapy. **Nano letters**, v. 18, n. 9, p. 6037-6044, 2018.

GONG, Jianxiao; LI, Guodong; TANG, Zhiyong. Self-assembly of noble metal nanocrystals: Fabrication, optical property, and application. **Nano Today**, v. 7, n. 6, p. 564-585, 2012. doi.org/10.1016/j.nantod.2012.10.008

GONZÁLEZ-REZA, R. M. et al. Effect of sucrose concentration and pH onto the physical stability of β -carotene nanocapsules. **LWT-- Food Science and Technology**, v. 90, p. 354-361, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.044>

GORTNER, Ross Aiken. The origin of the brown pigment in the integuments of the larva of *Tenebrio molitor*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 365-370, 1910.

GOULART, Ana Luisa Ribeiro Martins et al. Atividade antibacteriana do óleo essencial extraído da casca da laranja pêra frente às bactérias da família enterobactereacea. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 9, n. 2, p. 117-123, 2018. DOI: <https://doi.org/10.18571/acbm.178>

GRAHL, Matheus Vinicius Coste. A importância de ácidos nucleicos extracelulares para o sistema imune de *Rhodnius prolixus*: possível envolvimento na resposta contra a toxina derivada de urease, jaburetox. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2018.

GREEN, Laura C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-x.

GUAN Guiping, LAN, Shile. Implications of Antioxidant Systems in Inflammatory Bowel Disease. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018; 1290179. <https://doi.org/10.1155/2018/1290179>

GUIMARÃES, Guilherme Brillhante. Estudo teórico do composto N-Phenyl-1-Naphthylamine utilizando DFT para a dosimetria de radiação por EPR. 2019. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Física) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

GUIMARÃES, Adriana G.; QUINTANS, Jullyana SS; QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo J. Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. **Phytotherapy research**, v. 27, n. 1, p. 1-15, 2013. <https://doi.org/10.1002/ptr.4686>

GÜLÇİN, İlhami. Antioxidant activity of eugenol: A structure–activity relationship study. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 9, p. 975-985, 2011. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0197>

GUO, Yuchen et al. Advances on water quality detection by UV-vis spectroscopy. **Applied Sciences**, v. 10, n. 19, p. 6874, 2020. <https://doi.org/10.3390/app10196874>

HABEEB, A. F. S. A. Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. In: **Methods in enzymology**. Academic Press,. p. 457-464[37]. 1972

HAINES, Christopher Peter. **Insects and arachnids of tropical stored products: Their biology and identification (a training manual)**. NRI, 2. ed. Chatham, Kent: Natural Resources Institute, 1991.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HARISH, G. et al. Bioconjugates of curcumin display improved protection against glutathione depletion mediated oxidative stress in a dopaminergic neuronal cell line: implications for Parkinson's disease. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 7, p. 2631-2638, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.02.029>

HASNAT, Md Abul et al. Anti-inflammatory activity on mice of extract of *Ganoderma lucidum* grown on rice via modulation of MAPK and NF- κ B pathways. **Phytochemistry**, v. 114, p. 125-136, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.019>.

HE, Miao et al. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v. 163, n. 3, p. 137-143, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-0097-2>

HERMES, Carine Lima et al. Automação e validação do método de oxidação do nadph para a mensuração da atividade da glutathiona redutase: determinação dos limites de referência e avaliação da influência da lipemia, hemoglobina e bilirrubina. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria , RS, 2013.

HILLYER, Julián F. Insect immunology and hematopoiesis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 58, p. 102-118, 2016. DOI: 10.1016/j.dci. 2015.12.006. 2016.

HUANG, Ke-Jing et al. Spectrofluorimetric determination of trace nitrite in food products with a new fluorescent probe 1, 3, 5, 7-tetramethyl-2, 6-dicarbethoxy-8-(3', 4'-diaminophenyl)-difluoroboradiaza-s-indacene. **Talanta**, v. 69, n. 1, p. 73-78, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.062>

IAMARINO, Luciana Zancheta et al. Nitritos e nitratos em produtos cárneos enlatados e/ou embutidos. **Revista Gestão em Foco**, v. 7, p. 246-251, 2015.

JACKSON EM. Toxicological aspects of percutaneous absorption. *Cosmet Toilet*. 1990; 105 (9):135-47.

JAVED, Shabnam et al. Chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of *Citrus limetta* var. Mitha (sweet lime) peel in Pakistan. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 24, p. 3071-3077, 2013. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1254>

JAYAPRAKASHA, G. K. et al. Chemical composition of volatile oil from *Citrus limettioides* and their inhibition of colon cancer cell proliferation. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 200-207, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.020>

JOHNSTON, Paul R.; MAKAROVA, Olga; ROLFF, Jens. Inducible defenses stay up late: temporal patterns of immune gene expression in *Tenebrio molitor*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 4, n. 6, p. 947-955, 2014.

JURNO, A. Nano o quê? MINAS FAZ CIÊNCIA, 2016. Disponível em: <<https://minasfazciencia.com.br/2016/06/30/nano-o-que/>>. Acesso em 14 de maio de 2022.

KAR, Rajib; MAITI, Namita. Observation of D band splitting in vertically aligned graphene nanowalls and their evolution with laser power during Raman spectroscopy. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2021. doi.org/10.1007/s11051-021-05147-y

KAUFMAN, Teodoro S. The multiple faces of eugenol. A versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis and a convenient precursor toward bio-based fine chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 1055-1085, 2015. doi.org/10.5935/0103-5053.20150086

KAWASAKI, Fernanda Yumi et al. Estudos de liberação e atividade antioxidante do óleo essencial de orégano em filmes poliméricos à base de poli (hidroxitirato-co-hidroxitirato) e caulinita. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Santa Catarina-Campus Blumenau. Graduação em engenharia de Materiais, Blumenau-SC 2022.

KHAN, A; ALSAHLI, M; RAHMANI, A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: recent biochemical and pathological perspectives. **Medical Sciences (Basel)**, v. 33, n. 6, p. 01-21, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/medsci6020033>.

KHAN, Meraj A. et al. Regulating NETosis: increasing pH promotes NADPH oxidase-dependent NETosis. **Frontiers in medicine**, v. 5, p 1-15. 19, 2018. DOI: [10.3389/fmed.2018.00019](https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00019)

KIM, Dae-Hee et al. Internalization of tenecin 3 by a fungal cellular process is essential for its fungicidal effect on *Candida albicans*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 16, p. 4449-4458, 2001.

KOCH, Mariana Schechtel et al. Aspectos gerais da Mieloperoxidase e seu envolvimento em doenças: Uma breve revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p 28677-28691, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-536>

KODAMATANI, Hitoshi et al. Rapid method for simultaneous determination of nitrite and nitrate in water samples using short-column ion-pair chromatographic separation, photochemical reaction, and chemiluminescence detection. **Analytical Sciences**, v. 27, n. 2, p. 187-187, 2011. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.187>

KRINGEL, D. H. Encapsulação do óleo essencial de laranja na β -ciclodextrina: Ação antifúngica e aplicação em bolos. 2019. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food chemistry**, v. 85, n. 4, p. 633-640, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.024>

LANNELONGUE, Gustavo; GONZALEZ-BENITO, Javier; QUIROZ, Idaisa. Environmental management and labour productivity: The moderating role of capital intensity. **Journal of environmental management**, v. 190, p. 158-169, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.051>

LARA de, A. C., Oliveira, C. M., Mendes, V. A., Stocco, P., Hein, M. M. F., & Lisboa, H. C. F. Avaliação do consumo de produtos naturais por usuários de estratégias de saúde da família do município de Rondonópolis – MT. **Revista Univap**, 25(47), 98–109. (2019). <https://doi.org/10.18066/revistaunivap.v25i47.2071>

LAURENT, Sophie et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **Chemical reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064-2110, 2008. doi.org/10.1021/cr068445e

LEE, Young-Tae et al. Structural characteristics of tenecin 3, an insect antifungal protein. **IUBMB Life**, v. 47, n. 3, p. 369-376, 1999.

LEETHAM, M. et al. Oxidative stress and lung pathology following geogenic dust exposure. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 10, p. 1276-1283, 2016.

LEHANE, Adele M. et al. Degrees of chloroquine resistance in Plasmodium—Is the redox system involved?. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 47-57, 2012.

LEITE, Bárbara Lima Simioni. Estudo das propriedades farmacológicas e toxicológicas do óleo essencial de cymbopogon winteranus em roedores. Tese de Doutorado, Renorbio, universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2012.

LI, Xingyue et al. Activity changes of antioxidant and detoxifying enzymes in Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae infected by the entomopathogenic nematode Heterorhabditis beicherriana (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Parasitology research**, v. 115, n. 12, p. 4485-4494, 2016. doi.org/10.1007/s00436-016-5235-7

LI, Bo et al. Ultra-thin tubular graphitic carbon Nitride-Carbon Dot lateral heterostructures: One-Step synthesis and highly efficient catalytic hydrogen generation. **Chemical Engineering Journal**, v. 397, p. 125470, 2020. doi.org/10.1016/j.cej.2020.125470

LIMA, Maria GA; MARTINELLI, Nilza M.; MONTEIRO, Renata C. Ocorrência de Frankliniella schultzei (TRYBOM)(THYSANOPTERA: THRIPIDAE) em plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 18, p. 367-372, 2000. doi.org/10.1590/S0100-83582000000200017.

LIMA, André Felipe de Castro. Atividade anestésica de óleo essencial de Citrus sp. e parâmetros de qualidade de água em juvenis de Tambatinga. Trabalho de Conclusão de Curso, Curso de Zootecnia, universidade Federal do Maranhão, Chapadinha - MA, 2018.

LIMA, Sarah et al. Luminescent carbon dots based on ovalbumin applied as biological markers. *Matéria* (Rio de Janeiro) [online]. 2021, v. 26, n. 02 [Accessed 25 April 2022] e12996. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S1517-707620210002.1296>>. Epub 24 May 2021. ISSN 1517-7076. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620210002.1296>

LISBOA, Antonio Ricardo. Uso do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) no controle biológico do pulgão preto do feijoeiro (*Aphis craccivora*) (Hemiptera: Aphididae), 29f Artigo (Mestrado Profissional em Sistemas Agroindustriais)- Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, Paraíba, 2018.

LIU, Dong et al. Characterization of active packaging films made from poly (lactic acid)/poly (trimethylene carbonate) incorporated with oregano essential oil. *Molecules*, v. 21, n. 6, p. 695, 2016. doi.org/10.3390/molecules21060695

LÓPEZ-DÍAZ, David et al. Evolution of the Raman spectrum with the chemical composition of graphene oxide. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 121, n. 37, p. 20489-20497, 2017. DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b06236

LOWRING, Lauren Mosshart. Using therapeutic essential oils to support the management of anxiety. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, v. 31, n. 10, p. 558-561, 2019. doi: 10.1097/JXX.0000000000000227

LU, Xiao-Guang et al. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 10, n. 14, p. 2140, 2004. doi: 10.3748/wjg.v10.i14.2140

MACHADO, Júlia Bárbara da Silva. Efeitos do eugenol e deidrodieugenol no estresse oxidativo em modelo experimental de enfisema pulmonar. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de São Paulo, SANTOS – SP, 2022.

MAGALHÃES, Washington Luiz Esteves. Metodologia científica: determinação da capacidade antioxidante de lignina pela captura do radical livre DPPH. *Embrapa Florestas-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, 2018.

MAHAT, Roshan Kumar; SINGH, Neelima; RATHORE, Vedika. Association of myeloperoxidase with cardiovascular disease risk factors in prediabetic subjects. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, v. 13, n. 1, p. 396-400, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.016>

MAIA, Adriana Moura. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo ácido ascórbico**. 2002 Tese de Doutorado (Mestrado em Produção e controle Farmacêuticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002. Doi : 10.11606/D.9.2002tde-14012015-150722. Acesso em : 14-05-2022.

MAK, Kit-Kay et al. A comprehensive review on eugenol's antimicrobial properties and industry applications: A transformation from ethnomedicine to industry. *Pharmacognosy Reviews*, v. 13, n. 25, p. 1-9, 2019. Doi : 10.4103/phrev.phrev_46_18

MANEA, Florica et al. Simultaneous electrochemical determination of nitrate and nitrite in aqueous solution using Ag-doped zeolite-expanded graphite-epoxy electrode. **Talanta**, v. 83, n. 1, p. 66-71, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.08.042>

MARCHESE, Anna et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical reviews in microbiology**, v. 43, n. 6, p. 668-689, 2017. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1295225>

MARÍ, Montserrat et al. Mitochondrial glutathione: Recent Insights and Role in Disease. **Antioxidants**, Basel, v. 9, n. 10, p. 909, 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9100909>

MARTINS, Rosana Mendonça; CORTEZ, Lúcia Elaine Ranieri; FELIPE, Daniele Fernanda. < b> Desenvolvimento de Formulações de Uso Tópico Empregando o Óleo Essencial Extraído do Cravo-da-Índia. **Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 259-263, 2008.

MATOS, Francielle Miranda de e Castro, Ruann Janser Soares deInsetos comestíveis como potenciais fontes de proteínas para obtenção de peptídeos bioativos. **Brazilian Journal of Food Technology** [online]. 2021, v. 24 [Acessado 4 Maio 2022] , e2020044. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1981-6723.04420>>. Epub 23 Jul 2021. ISSN 1981-6723. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.04420>.

MEDEIROS, Amanda da Silva et al. Biodegradação de poliestireno expandido utilizando *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Zophobas morio* Fabricius, 1776 (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 5, n. 9, p. 271-279, 2018. <https://doi.org/10.21438/rbgas.050918>

MENDES, V. C.; BARROS, M. G. de; AGUIAR, V. S. BOTÕES FLORAIS DO CRAVO-DA-ÍNDIA: EXTRAÇÃO E APLICAÇÃO DE SEU ÓLEO ESSENCIAL COMO AGENTE LARVICIDA NO COMBATE À DENGUE. **Journal of Innovation and Science: research and application**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 12 p., 2021. Disponível em: <https://joins.emnuvens.com.br/joins/article/view/18>. Acesso em: 25 abr. 2022.

MENDES, Luiza Alves et al. Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 684-689, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.034>

MENDES, V. A., Stocco, P., Lara, A. C. de, Oliveira, C. M. de, & Lisboa, H. C. F. Avaliação do uso de produtos naturais na prática do profissional de saúde. **Saúde (Santa Maria)**, 44(1). (2018). <https://doi.org/10.5902/2236583419092>

MENÉNDEZ, Pilar et al. Enzymatic systems involved in D-limonene biooxidation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 2, p. 111-114, 2002.

MENEZES FILHO DE, Antônio Carlos Pereira. AVALIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DOS FRUTOS VERDES E MADUROS DE *Citrus limonia* Osbeck.(LIMÃO-CHINA). 2021.

MILADI, Hanene et al. Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. **Microbial pathogenesis**, v. 112, p. 156-163, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.057>

MILLER, Andrew Byron et al. Evaluation of essential oils from 22 Guatemalan medicinal plants for in vitro activity against cancer and established cell lines. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 3, p. 42-49, 2018. <https://doi.org/10.5897/JMPR2017.6528>

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. Resolução nº 318, de 6 de novembro de 2019. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília (DF), p. 1–17, 2019.

MIRANDA, CASF. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de diversas plantas**. 2010. 2010. Tese de Doutorado. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de lavras.

MOOSAVY, M. H. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of lemon (*Citrus limon*) peel in vitro and in a food model. **Journal of Food Quality and Hazards Control**, v. 4, n. 2, p. 42-48, 2017.

MOSHAGE, Han et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Automation and Analytical Techniques Clinical chemistry**, v. 41, n. 6, p. 892-896, 1995.

MORAIS, P. C.; LIMA, E. C. D. Técnicas de preparação de nanopartículas magnéticas e fluidos magnéticos. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. (Orgs.). **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. 1 Ed. São Paulo: Artliber Editora Ltda., v.1 p. 83-99, 2006

MOTA, Débora Silva Araujo. Efeitos do D-limoneno incorporado em membranas bioativas de colágenos sobre a cicatrização de feridas cutâneas. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, 65f, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2019.

MOTA, Lidiane Rocha; ROCHA, Ieda Cristine Silva Santos; LANGELLA, Luciana Gonçalves. A PERMEAÇÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO DE TERCEIRA GERAÇÃO E PRINCÍPIOS ATIVOS CLAREADORES ATRAVÉS DO MICROAGULHAMENTO`DRUG DELIVERY NO TRATAMENTO DO MELASMA. ESTUDO DE CASO, 2019.

MOTTIN, Camila. Mix de óleos de cravo, mamona e caju e composto microencapsulado de eugenol, timol e vanilina na suplementação de bovinos terminados em pastagem de aveia e azevém : desempenho e qualidade da carne. 86 [21]f. Tese (doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2019.

MULLA M., Ahmed J. et al, Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging. **Food Control**, v 73, B 663-671.2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.018>

MURCIA, M. D. et al. Kinetic modelling and kinetic parameters calculation in the lipase-catalysed synthesis of geranyl acetate. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 138, p. 135–143, 2018.

MURTHY, Kotamballi N. Chidambara; JAYAPRAKASHA, Guddadarangavvanahally K.; PATIL, Bhimanagouda S. D-limonene rich volatile oil from blood oranges inhibits angiogenesis, metastasis and cell death in human colon cancer cells. *Life Sciences*, v. 91, n. 11-12, p. 429-439, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.08.016>

NAGABABU, Enika et al. Assessment of antioxidant activity of eugenol in vitro and in vivo. In: **Free radicals and antioxidant protocols**. Humana Press, 2010. p. 165-180.

NAKAHARA, Kazuhiko et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (citronella grass). **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 37, n. 4, p. 249-252, 2013. <https://doi.org/10.6090/jarq.37.249>

NASCIMENTO DA SILVA, Luis Claudio et al. In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products. **Free Radical Research**, v. 50, n. 8, p. 801-812, 2016. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1193668>

NASCIMENTO, Vanessa dos Santos Alcantara. Sistemas microemulsionados contendo óleo essencial de *Lippia gracilis*: obtenção, caracterização e potencial ação amebicida. 2016. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2017.

NASCIMENTO, Gildenisson Araújo do et al. Bradycardic and Antiarrhythmic Effects of the D-Limonene in Rats. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* [online]. 2019 v. 113, n. 5 [Acessado 26 Abril 2022], pp. 925-932. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/abc.20190173>>. Epub 02 Set 2019. ISSN 1678-4170. <https://doi.org/10.5935/abc.20190173>

NAWAZ, Ahmad; SARAVANAN, Pichiah. C-Dot TiO₂ nanorod composite for enhanced quantum efficiency under direct sunlight. **RSC Advances**, v. 10, n. 33, p. 19490-19500, May 2020, doi: 10.1039/d0ra03157g.

NDREPEPA, Gjin. Myeloperoxidase–A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 493, p. 36-51, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.02.022>

NEJAD, Solmaz Mohammadi; ÖZGÜNEŞ, Hilal; BAŞARAN, Nursen. Pharmacological and toxicological properties of eugenol. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 201, 2017. doi: 10.4274/tjps.62207

NETO, Weslany Silverio et al. Superparamagnetic nanoparticles stabilized with free-radical polymerizable oleic acid-based coating. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 739, p. 1025-1036, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.12.338>

NEVES, Juliete Silva et al. Preparation of terpolymer capsules containing *Rosmarinus officinalis* essential oil and evaluation of its antifungal activity. **RSC advances**, v. 9, n. 39, p. 22586-22596, 2019. DOI: 10.1039/C9RA02336D

NEVES, Juliete S. et al. In situ production of polystyrene magnetic nanocomposites through a batch suspension polymerization process. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 296, n. 12, p. 1107-1118, 2011. <https://doi.org/10.1002/mame.201100050>

NICHOLLS, Stephen J.; HAZEN, Stanley L. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 25, n. 6, p. 1102-1111, 2005.

OBOH Ganiyu, et al. Essential Oil from Clove Bud (*Eugenia aromatica* Kuntze) Inhibit Key Enzymes Relevant to the Management of Type-2 Diabetes and Some Pro-oxidant Induced Lipid Peroxidation in Rats Pancreas in vitro. **Journal of oleo science**. 2015;64(7):775-82. doi: 10.5650/jos.ess14274. Epub 2015 May 21. PMID: 25994557.

OESTREICHER, Julian; MORGAN, Bruce. Glutathione: Subcellular distribution and membrane transport. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 97, n. 3, p. 270-289, 2019. <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0189>

OKADA, Sabrina Sayori et al. Myeloperoxidase in human peripheral blood lymphocytes: production and subcellular localization. **Cellular immunology**, v. 300, p. 18-25, 2016. DOI: 10.1016/j.cellimm.2015.11.003

OLIVEIRA DE, Jéssica Fernandes et al. Determinação espectrofotométrica de nitrito em produtos cárneos embutidos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 1, p. 19-31, 2017. <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.201703>

OLIVEIRA, C. G. M de; CARVALHO. V, M. Avaliação fármaco-toxicológica do emprego de N-acetilcisteína no manejo da COVID-19. **Revista Brasileira Análises Clínica**, A tempestade “*in vitro*” O diagnostico de uma pandemia, COVID, EDIÇÃO ESPECIAL v. 53, n. 2, p. 131-137, 2021. 10.21877/2448-3877.202100960

OLIVEIRA, G. P. de; GOMES, L. da S. S.; VENÂNCIO, G. N.; LIMA, E. S.; SOUZA, T. P. de; BANDEIRA, M. F. C. L.; TODA, C.; CONDE, N. C. de O. Citotoxicidade de uma formulação em orabase de Libidibia Ferrea. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. e133101018713, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i10.18713. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/18713>. Acesso em: 19 mar. 2022.

OLIVEIRA, Marcia Cristina C.; BARBOSA, Rodrigo César F.; FLORES, Danilo C. Atividade antioxidante de frutas cítricas: adaptação do Método do DPPH para experimentação em sala de aula. **Química Nova Escola**, v. 10, 2021.

OLIVEIRA, Lanussy et al. Estudo da atividade antioxidante do extrato bruto hidroalcoólico do capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) pelo método DPPH. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 16, n. 29, 2019.

OLIVEIRA, Rosilene Aparecida de et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

OLIVO, R.; RIBEIRO, L. G. T. Novos conceitos sobre nitratos e nitritos. 2018. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research (BJSCR)*. vol.24, n.3, pp.115- 125, 2018.

OMRAN, Mohamed M. et al. Role of myeloperoxidase in early diagnosis of acute myocardial infarction in patients admitted with chest pain. **Journal Of Immunoassay And Immunochemistry**, v. 39, n. 3, p. 337-347, 2018. DOI: 10.1080/15321819.2018.1492423.

PAL, Amit et al. Towards a unified vision of copper involvement in Alzheimer's disease: a review connecting basic, experimental, and clinical research. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 44, n. 2, p. 343-354, 2015. Doi: 10.3233/JAD-141194

PAL, Archana; KAMTHANIA, Mohit Chandra; KUMAR, Ajay. Bioactive compounds and properties of seaweeds—a review. **Open Access Library Journal**, v. 1, n. 4, p. 1-17, 2014. DOI:10.4236/oalib.1100752

PANNIELLO, Annamaria et al. Luminescent oil-soluble carbon dots toward white light emission: a spectroscopic study. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 122, n. 1, p. 839-849, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b09788>

PAPAIOANNOU, Nikolaos et al. Structure and solvents effects on the optical properties of sugar-derived carbon nanodots. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018. doi.org/10.1038/s41598-018-25012-8

PASCUZZI, Robert M. et al. A phase II trial of talampanel in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. **Amyotrophic Lateral Sclerosis**, v. 11, n. 3, p. 266-271, 2010. <https://doi.org/10.3109/17482960903307805>

PATEL, Chandrabhan et al. S, N Co-Doped Carbon Dot-Functionalized WO₃ Nanostructures for NO₂ and H₂S Detection. **ACS Applied Nano Materials**, 2022. doi: 10.1021/acsanm.1c04174.

PAULA SILVA, T DE.; SCOMBATTI PINTO, G. . NANOTECNOLOGIA E SUA INFLUÊNCIA NA EVOLUÇÃO DA MEDICINA. **Revista Interface Tecnológica, [S. l.]**, v. 17, n. 2, p. 269–280, 2020. DOI: 10.31510/infa.v17i2.982. Disponível em: <https://revista.fatectq.edu.br/interfacetecnologica/article/view/982>. Acesso em: 17 maio. 2022.

PAULIN, João V. et al. Melanina, um pigmento natural multifuncional. **arXiv preprint arXiv:2107.12481**, 2021. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2107.12481>

PEREIRA, Márcio; DE MOURA, Cátia Jacira Martins. Entendendo alguns mecanismos de resistência a inseticidas tendo como exemplo o pulgão-verde *Myzus persicae* (SULZER, 1776)(HEMIPTERA: APHIDIDAE). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 6813-6839, 2021. DOI:10.34117/bjdv7n1-461

PEREIRA, Ricardo Borges et al. Citronella essential oil in the control and activation of coffee plants defense response against rust and brown eye spot. **Ciência e Agrotecnologia** [online]. 2012 v. 36, n. 4 [Accessed 16 May 2022], pp. 383-390. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S1413-70542012000400001>>. Epub 13 Aug 2012. ISSN 1981-1829. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542012000400001>.

PERERA, H. K. I.; WIJETUNGE, D. C. R. Strong protein glycation inhibitory potential of clove and coriander. **British J Pharmaceutical Res**, v. 6, n. 5, p. 306-12, 2015.

PINHEIRO, Patrícia Fontes et al. Insecticidal activity of citronella grass essential oil on *Frankliniella schultzei* and *Myzus persicae*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, p. 138-144, 2013. doi.org/10.1590/S1413-70542013000200004

PINTO TJA, Kaneko TM, Ohara MT. Controle biológico de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. São Paulo: Ateneu; 2003.

PONTES, Maria Alana Neres et al. Efeito inibitório de monoterpenos frente a *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 22, n. 1, p. 51-56, 2018. DOI: <https://doi.org/10.22478/ufpb.2317-6032.2018v22n1.28085>

PRASAD, Ram; BHATTACHARYYA, Atanu; NGUYEN, Quang D. Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1014, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01014>

PRASAD, S.N.; MURALIDHARA. Protective effects of geraniol (a monoterpene) in a diabetic neuropathy rat model: attenuation of behavioral impairments and biochemical perturbations. **Journal of neuroscience research**, v. 92, n. 9, p. 1205-1216, 2014.

QADDOUMI, Mohammad G. et al. Investigating the role of myeloperoxidase and angiopoietin-like protein 6 in obesity and diabetes. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020. DOI: [10.1038/s41598-020-63149-7](https://doi.org/10.1038/s41598-020-63149-7)

QING ZX, Zhao H, Tang Q, Mo CM, Huang P, Cheng P, Yang P, Yang XY, Liu XB, Zheng YJ, Zeng JG. Systematic identification of flavonols, flavonol glycosides, triterpene and siraic acid glycosides from *Siraitia grosvenorii* using high-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with a screening strategy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 138, May 10, p. 240-248, 2017. doi: [10.1016/j.jpba.2017.01.059](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.059). Epub 2017 Feb 16. PMID: 28226282.

QNEIBI, Mohammad; JARADAT, Nidal; EMWAS, Nour. Effect of geraniol and citronellol essential oils on the biophysical gating properties of AMPA receptors. **Applied Sciences**, v. 9, n. 21, p. 4693, 2019. <https://doi.org/10.3390/app9214693>

QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo José et al. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 619-624, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.09.018>

RADI, Rafael. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2018; 115 (23): 5839–5848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>

RAJA, MR Charan et al. Versatile and synergistic potential of eugenol: a review. **Pharm. Anal. Acta**, v. 6, n. 5, p. 1-6, 2015.

RAMOS, Luiz Antônio; CAVALHEIRO, Carla Cristina Schmitt; CAVALHEIRO, Éder Tadeu Gomes. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, p. 1114-1120, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000500037>

REZENDE, Fernanda M *et al.* Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. *In: VI BOTÂNICA NO INVERNO 2016*. [S. l.: s. n.], **Laboratório de Ensino de Botânica**. V 93 p.104. 2016

REZENDE, Larissa Cavalcante de. Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA. 2010.

RIOS DÍEZ, Juan Diego. Sistema imune de insetos: caracterização de inibidores de proteases do tipo SERPIN e análise proteômica da hemolinfa de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). 2018. 65 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2018.

RIBEIRO, Iuliana Marjory Martins et al. Antileishmania and immunomodulatory potential of cashew nut shell liquid and cardanol. **Toxicology in Vitro**, p. 105524, 2022. doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105524

ROCHA, Luciane de Melo; MOREIRA, Lilia Maria de Azevedo. Diagnóstico laboratorial do albinismo oculocutâneo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 1, p. 25-30, 2007. DOI: 10.1590/S1676-24442007000100006

RODRÍGUEZ-VARILLAS, Sandra et al. Biocompatibility and Antioxidant Capabilities of Carbon Dots Obtained from Tomato (*Solanum lycopersicum*). **Applied Sciences**, v. 12, n. 2, p. 773, 2022. <https://doi.org/10.3390/app12020773>

ROESLER, Roberta et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 53-60, 2007.

ROGINSKY, Vitaly; LISSI, Eduardo A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

ROH, Kyung-Baeg et al. Proteolytic cascade for the activation of the insect toll pathway induced by the fungal cell wall component. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 29, p. 19474-19481, 2009.

ROMAN, Raquel Melchior; WENDLAND, Andrea Elisabet; POLANCZYK, Carisi Anne. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, n. 1, p. e12-e19, 2008. [Acessado 26 Abril 2022], pp. e12-e19. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0066->

782X2008001300015>. Epub 25 Jul 2008. ISSN 1678-4170. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2008001300015>.

ROMITELLI, Federica et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC–MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.**, v. 851, n. 1-2, p. 257-267, 2007. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.02.003.

ROSAS, Michele Ribeiro. Desenvolvimento de embalagem biodegradável contendo compostos bioativos das cascas de *Euphorbia umbellata* (PAX) BRUYNS (JANAÚBA). 2019. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2019.

ROUCOUX A, Schulz J, Patin H. Reduced transition metal colloids: a novel family of reusable catalysts? **Chem Rev.** 2002 Octb: 102 (10): 3757-78. Doi: 10.1021/cr010350j.PMID:12371901

ROY, Jérôme et al. Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. **The FASEB Journal** official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology., v. 31, n. 9, p. 3729-3745, 2017. <https://doi.org/10.1096/fj.201700170R>

RUIZ, B.; FLOTATS, X. Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview. **Waste management**, v. 34, n. 11, p. 2063-2079, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.06.026>

RUNKANA, Venkataramana; SOMASUNDARAN, P.; KAPUR, P. C. A population balance model for flocculation of colloidal suspensions by polymer bridging. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 1, p. 182-191, 2006. doi.org/10.1016/j.ces.2005.01.046

SADEZKY, Alexa et al. Raman microspectroscopy of soot and related carbonaceous materials: Spectral analysis and structural information. **Carbon**, v. 43, n. 8, p. 1731-1742, 2005. doi:10.1016/j.carbon.2005.02.018

SAKAT, Muhammed Sedat et al. The effectiveness of eugenol against cisplatin-induced ototoxicity Please cite this article as: Sakat MS, Kilic K, Akdemir FN, Yildirim S, Eser G, Kiziltunc A. The effectiveness of eugenol against cisplatin-induced ototoxicity. **Braz J Otorhinolaryngol.** 2019;85:766–73. . *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* [online]. 2019, v. 85, n. 6 [Acessado 28 Abril 2022] , pp. 766-773. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2018.07.007>>. Epub 13 Dez 2019. ISSN 1808-8686. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2018.07.007>.

SALIM, M. et al. Phytochemical screening and evaluation of antioxidant, total phenolic and flavonoid contents in various weed plants associated with wheat crops. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2022.

SÁNCHEZ-MORENO, Concepción. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food science and technology international**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SANTANA DE, Merielly Saeli et al. Propriedades funcionais do eugenol e sua aplicação em alimentos. *Avanços em ciência e tecnologia de alimentos - volume 04*, Cap 03- Pag 59-73. Publicado: 01/04/2021. Doi : 10.37885/210303527. Acesso em 11 de abril de 2022.

SANTOS GONZALEZ DOS, Beatriz et al. Estudo da influência do ácido cítrico e limoneno na blenda de PEBD/ATP/Study of the influence of citric acid and limonene on the LDPE/ATP blend. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 22414-22425, 2020. DOI:10.34117/bjdv6n4-417

SANTOS, Anai Loreiro dos. Caracterização química por GC/qMS e GC× GC/TOF-MS e avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais de campomanesia guazumifolia (Cambess.) O. Berg. e Piper regnellii (Miq.) C. DC. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2018. <http://hdl.handle.net/10183/180653>

SANTOS, Adevailton Bernardo dos et al. Antioxidant properties of plant extracts: an EPR and DFT comparative study of the reaction with DPPH, TEMPOL and spin trap DMPO. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1483-1492, 2009.

SANTOS, Mirelli Papalia dos. O papel das vitaminas antioxidantes na prevenção do envelhecimento cutâneo. UNIJUÍ, 2013.

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

SANTOS, Patricia de Souza. Avaliação in vitro da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *Cryptococcus neoformans* TT - In vitro evaluation of antifungal activity of essential oils of *Eugenia* ca. [*S. l.: s. n.*], 2016. Disponível em: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2016/ses-33753/ses-33753-6249.pdf>. Acesso em: 31 març. 2022.

SARAIVA, Luana Carvalho et al. Atividade inseticida e repelente do óleo essencial de *Pelargonium graveolens* em *Musca domestica* e *Lucilia cuprina*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria -UFSM, RS 2018.

SCHARFFETTER-KOCHANNEK, Karin et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Experimental gerontology**, v. 35, n. 3, p. 307-316, 2000. doi: 10.1016/s0531-5565(00)00098-x. PMID: 10832052.

SCHERER, R. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa essential oils **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, p. 442-449, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000400013>

SCHMIDT, Lukas; GÖEN, Thomas. R-Limonene metabolism in humans and metabolite kinetics after oral administration. **Archives of toxicology**, v. 91, n. 3, p. 1175-1185, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1751-6>

SENANAYAKE, U. M.; WILLS, R. B. H.; LEE, T. H. Biosynthesis of eugenol and cinnamic aldehyde in *Cinnamomum zeylanicum*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 12, p. 2032-2033, 1977.

SHARMA, Vinay et al. Tribological interaction of plasma-functionalized polytetrafluoroethylene nanoparticles with ZDDP and ionic liquids. **Tribology Letters**, v. 66, n. 3, p. 1-11, 2018. doi.org/10.1007/s11249-018-1060-8

SHAW, Pallab; CHATTOPADHYAY, Ansuman. Nrf2–ARE signaling in cellular protection: Mechanism of action and the regulatory mechanisms. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 4, p. 3119-3130, 2020. <https://doi.org/10.1002/jcp.29219>

SIES, Helmut; STAHL, Wilhelm. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American journal of clinical nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315S-1321S, 1995.

SIES, Helmut. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 122-126, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>

SILINA, E. V. et al. Regularities of free radical processes and involucional changes of face and neck skin in different age groups. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 11, p. 515–520, 2018. doi: 10.2147/CCID.S181093

SILVA, Érika Oliveira da. Termoterapia e óleos essenciais no controle de *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, Botucatu-SP 2018.

SILVA, F. C. O.; Ferreira, M. K. A.; Silva, A. W.; Matos, M. G. C.; Magalhães, F. E. A.; Silva, P. T.; Bandeira, P. N.; de Menezes, J. E. S. A; Santos, H. S, Bioatividades de Triterpenos isolados de plantas: Uma breve revisão. **Rev. Virtual Quim**, v. 12, n. 1, 2020. DOI: 10.21577/1984-6835.20200018

SILVA, Joyce Naiara; PINTO, Monalisa. AÇÃO ALELOPÁTICA DE FOLHAS SECAS DE UMBU, EM PROCESSO DE DECOMPOSIÇÃO, SOBRE O POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE FEIJÃO CAUPI. **Agrarian Academy**, v. 4, n. 08, 2017. DOI: 10.18677/Agrarian_Academy_2017b2

SILVA, Stefany Anastácio da et al. Caracterização de pigmentos escuros tipo melanina produzidas por bactérias isoladas de milho. Dissertação de mestrado, programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS, Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, ANÁPOLIS – GO 2018.

SILVA, Nathália Lucca et al. TRIAGEM FITOQUÍMICA E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE DAS FOLHAS E DOS FRUTOS DE MORINDA CITRIFOLIA L. (“NONI”). **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 17, n. 4, 2021.

SILVA, Thamilly De Paula; PINTO, Giuliano Scombatti. Nanotecnologia e sua influência na evolução da medicina. **Revista Interface Tecnológica**, v. 17, n. 2, p. 269-280, 2020. DOI: 10.31510/infa.v17i2.982

SILVA-MATOS, R. R. S. da, Pereira, R. Y. F., & Oliveira, P. S. T. de. Ciências Agrárias: Conhecimentos Científicos e Técnicos e Difusão de Tecnologias. 2020.

SILVA, A. C. C. Nanotecnologia em Diagnóstico e Terapia no Brasil. Orientador: Nélida Lúcia Del Mastro. 2015. 128 p. Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) - IPEN Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-15092015-125401/publico/2015SilvaNanotecnologia.pdf>. Acesso em 17 de maio de 2022.

SILVA, F. F. M. et al. Análise da composição química do óleo essencial de capim santo (*Cymbopogon citratus*) obtido através de extrator por arraste com vapor d água construído com materias de fácil aquisição e baixo custo. **Holos**, v. 4, p. 144-152, 2014. DOI: 10.15628/holos.2014.1762

SILVEIRA, Sheila Mello et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 471-480, 2012. DOI: <https://doi.org/10.53393/rial.2012.v71.32453>

SILVEIRA, Rebeca Cavalcanti. **Avaliação da atividade antioxidante e determinação do conteúdo de flavonoides em chás comercializados na cidade do Recife**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, 2018.

SINHA, Sonali et al. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 71-77, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.036>

SHARMA, Shelja et al. Photoluminescent C-dots: An overview on the recent development in the synthesis, physiochemical properties and potential applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 748, p. 818-853, 2018. doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.03.001

SLULLITEL, Julián. Valoración de la importancia nutricional del consumo de antioxidantes en personas de 40 a 50 años. Rosário: Universidade Aberta Interamericana. 2012. 56 p. Trabalho de Conclusão de Curso.

SMIRNOVA, Tatyana I. et al. Local polarity and hydrogen bonding inside the Sec14p phospholipid-binding cavity: high-field multi-frequency electron paramagnetic resonance studies. **Biophysical journal**, v. 92, n. 10, p. 3686-3695, 2007.

SOUZA, Ana CS et al. Citral presents cytotoxic and genotoxic effects in human cultured cells. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 435-440, 2020. doi.org/10.1080/01480545.2019.1585445

SOUSA, J. di P. dos S.; FEITOSA, R. S. .; LIRA, B. S. de M. M.; MEDEIROS, M. das G. F. de; CARVALHO, A. L. M. . Vegetable oils as skin penetration enhancer in topical and transdermal anti-inflammatory formulations: an integrative review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. e541101220308, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i12.20308. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/20308>. Acesso em: 25 apr. 2022.

SOUZA, E. R. L. de, Gomes, N. M. L., Cruz, J. H. de A., Santos, J. F. D. dos, & Oliveira Filho, A. A. de. Propriedades farmacológicas do Sesquiterpeno α - Bisabolol: uma breve revisão. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, v. 10. n. 1, p. 18–23, 2021. <https://doi.org/10.21270/archi.v10i1.3183>

SOUZA DE, Keicy Sandy Silvestre. Perfil glicêmico, expressão de marcadores inflamatórios e metabolismo hepático de camundongos alimentados com bebida láctea fermentada adicionada de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*. Dissertação de mestrado, Programa de produção animal, Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.

SOARE, Joào R. et al. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. **Free radical research**, v. 26, n. 5, p. 469-478, 1997.

STAN, Corneliu S. et al. One step synthesis of fluorescent carbon dots through pyrolysis of N-hydroxysuccinimide. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 3, n. 4, p. 789-795, Jan. 2015, doi: 10.1039/c4tc02382j

STEFFENS, Andréia Hoeltz. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

STORPITIS, S. et al. ciencias farmaceutica: Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

SUJATHA, K.; SIRISHA, K. Bala. Anti-cancer and Anti-oxidant activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis*, *Azadirachta indica*, *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon nardus*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 3, p. 4493-4498, 2019.

SUN, Jidong. D-Limonene: safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 259, 2007.

SZLACHETKA, Ísis Oliveira. Estudo das interações entre moléculas bioativas e sistemas nanoestruturados por meio da espectroscopia vibracional. 2020. xv 95 f., il. Tese (Doutorado em Física)—Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

TANG, Zhi-Long et al. The study of the microbes degraded polystyrene. **Adv. Technol. Innov**, v. 2, n. 4, p. 13-17, 2017. Disponível em: <http://ojs.imeti.org/index.php/AITI/article/view/204/324>

TASCA, Silvio et al. Pterostilbeno Reduz o Estresse Oxidativo no Pulmão e no Ventrículo Direito Induzido por Infarto do Miocárdio Experimental. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia [online]**. 2022, v. 118, n. 2 [Acessado 30 Abril 2022] , pp. 435-445. Disponível em: <<https://doi.org/10.36660/abc.20201155>>. Epub 07 Mar 2022. ISSN 1678-4170. <https://doi.org/10.36660/abc.20201155>.

TAUC, J.; GRIGOROVICI, Radu; VANCU, Anina. Optical properties and electronic structure of amorphous germanium. **physica status solidi (b)**, v. 15, n. 2, p. 627-637, 1966. <https://doi.org/10.1002/pssb.19660150224>

TAVARES, M. et al. Trends in insect repellent formulations: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 539, n. 1-2, p. 190– 209 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.046>

TELSER, Joshua; KRZYTEK, J.; OZAROWSKI, Andrew. High-frequency and high-field electron paramagnetic resonance (HF-EPR): a new spectroscopic tool for bioinorganic chemistry. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 297-318, 2014.

TEXEIRA, Ewerton Richard Fernandes. Veiculação de óleos obtidos de *Syzigium aromaticum* L. em sistema microemulsionado e suas derivatizações: avaliação da viabilidade celular, atividade antioxidante e antinociceptiva. 150f. Tese (Doutorado em Química)-Centro de Ciências Exatas e da Terra ,Universidade Federal do rio Grande do Norte, Natal, 2017.

TOMONAGA, Taisuke et al. Usefulness of myeloperoxidase as a biomarker for the ranking of pulmonary toxicity of nanomaterials. **Particle and fibre toxicology**, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2018. DOI: 10.1186/s12989-018-0277-x

TRAJANO, Vinicius Nogueira et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 542-545, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000300014>

TRAN, Hai Nguyen et al. Insights into the mechanism of cationic dye adsorption on activated charcoal: The importance of π - π interactions. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, p. 168-180, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.02.010>

TU, Zhiqiang et al. Tribological behaviors of Ni-modified citric acid carbon quantum dot particles as a green additive in polyethylene glycol. **Friction**, v. 8, n. 1, p. 182-197, 2020. doi.org/10.1007/s40544-019-0272-8

TUERHONG, Mhetaer; YANG, X. U.; XUE-BO, Y. I. N. Review on carbon dots and their applications. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 139-150, 2017. [doi.org/10.1016/S1872-2040\(16\)60990-8](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(16)60990-8)

ULANOWSKA, Magdalena; OLAS, Beata. Biological Properties and prospects for the application of eugenol—A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3671, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22073671>

UPADHYAY, Rakesh Kumar et al. New agrotechnology for quality planting material production of rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens* L. Herit.). **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 3, p. 128-130, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.05.004>

VALKO, Marian et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VANHAMME, Luc et al. The other myeloperoxidase: Emerging functions. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 649, p. 1-14, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.03.037>

VAN GROENIGEN, J. W. et al. The soil N cycle: new insights and key challenges. **Soil**, v. 1, n. 1, p. 235-256, 2015. doi.org/10.5194/soil-1-235-2015

VARANDA, L. C.; JAFELICCI JR.; BECK JR.. Magnetic and multifunctional magnetic nanoparticles in nanomedicine: challenges and trends in synthesis and surface engineering for diagnostic and therapy applications. **Biomedical Engineering, Trends in Materials Science**, p. 397-424, 2011.

VASCONCELOS. E. M. Avaliação dos efeitos do eugenol e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* durante o cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos. 2020. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2020.

VASCONCELOS, Thiago Brasileiro et al. Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo?. **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 3, 2014.

VELLOSA, José Carlos Rebuglio et al. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10152-10168, 2021.

VENZON, LARISSA. Avaliação do modo de ação cicatrizante gástrico do geraniol em roedores. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, SC, 2020.

VENDRUSCOLO, Giovana Secretti; RATES, Stela Maris K.; MENTZ, Lilian Auler. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 15, p. 361-372, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400018>

VICTORIA, Henrique Fernandes Vieira. Ressonância paramagnética eletrônica de radicais nítróxidos e nanobastões de ouro funcionalizados com marcadores de spin. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais- Belo Horizonte MG, 2018.

VICENZI, Cristina Balensiefer; BENETTI, Paula. Características mecânicas e ópticas de resinas bulk-fill: revisão de literatura. **Revista Da Faculdade De Odontologia-UPF**, v. 23, n. 1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5335/rfo.v23i1.7675>

VIEIRA, Ana Julia et al. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 97-106, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.007>

VIEZBICKE, Brian D. et al. Evaluation of the Tauc method for optical absorption edge determination: ZnO thin films as a model system. **physica status solidi (b)**, v. 252, n. 8, p. 1700-1710, 2015. <https://doi.org/10.1002/pssb.201552007>

VIGNERON, Aurélien et al. Immune defenses of a beneficial pest: the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 138, 2019.

VINCI, John C. et al. Spectroscopic characteristics of carbon dots (C-dots) derived from carbon fibers and conversion to sulfur-bridged C-dots nanosheets. **Applied Spectroscopy**, v. 69, n. 9, p. 1082-1090, 2015. Sep. 2015, doi: 10.1366/14-07749.

VILLANOVA, Janaina Cecília Oliveira; DE SÁ, Vania Regina. **Excipientes: guia prático para padronização: formas farmacêuticas orais sólidas e líquidas**. Pharmabooks, 2009.

VLASOVA, Irina I. Peroxidase activity of human hemoproteins: keeping the fire under control. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2561, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23102561>

WANG, Qiangqiang et al. Bioactive peptides from *Angelica sinensis* protein hydrolyzate delay senescence in *Caenorhabditis elegans* through antioxidant activities. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016. doi.org/10.1155/2016/8956981

WANG, Xiaoxia et al. Reduced glutathione supplementation in practical diet improves the growth, anti-oxidative capacity, disease resistance and gut morphology of shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 73, p. 152-157, 2018. doi 10.1016/j.fsi.2017.11.043

WELCH, A. S. Consumir carne processada e outros alimentos ricos em nitrito ou nitrato faz mal à saúde? BBC Future, News Brasil. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/vert-fut-47926874>. 2019

WILCOX, Christopher S.; PEARLMAN, Adam. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. **Pharmacological reviews**, v. 60, n. 4, p. 418-469, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1124/pr.108.000240>

WILCOX, Christopher S. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension?. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n. 4, p. R913-R935, 2005, <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00250.2005>

WOLPE SIMAS, L. A.; GRANZOTI, R. O.; PORSCH, L. Estresse oxidativo e o seu impacto no envelhecimento: uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. página 80, 2019. DOI: 10.31415/bjns.v2i2.53. Disponível em: <https://bjns.com.br/index.php/BJNS/article/view/53>. Acesso em: 29 abr. 2022.

WU, Junzhen et al. The role of oxidative stress and inflammation in cardiovascular aging. Hindawi Publishing Corporation **BioMed research international**, Article ID 615312, pg. 1-13, 2014.v. 2014, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/615312>

XIA, Chunlei et al. Evolution and synthesis of carbon dots: from carbon dots to carbonized polymer dots. **Advanced Science**, v. 6, n. 23, p. 1901316, 2019. <https://doi.org/10.1002/advs.201901316>

XIYAN, LI; LIU, Xiaowang; LIU, Xiaogang. Self-assembly of colloidal inorganic nanocrystals: nanoscale forces, emergent properties and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 3, p. 2074-2101, 2021. DOI: 10.1039/D0CS00436G

XU, Tian, et al. Cinnamon and clove essential oils to improve physical, thermal and antimicrobial properties of chitosan-gum arabic polyelectrolyte complexed films. **Carbohydrate polymers**, v. 217, p. 116-125, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.084>

YAHYAPOUR, R. et al. Reduction–oxidation (redox) system in radiation-induced normal tissue injury: molecular mechanisms and implications in radiation therapeutics. **Clinical and Translational Oncology**, v. 20, n. 8, p. 975-988, 2018.

YANG, Yu et al. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 20, p. 12080-12086, 2015. . <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02661>

YANG, Chao et al. Antioxidant and anticancer activities of essential oil from Gannan navel orange peel. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1391, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22081391>

YAQOOB, Mohammad et al. Determination of Nitrite and Nitrate in Freshwaters using Flow Injection Luminol Chemiluminescence Detection. **Acta Chimica Slovenica**, v. 58, n. 3, 2011.

YAZGAN, Hatice; OZOGUL, Yesim; KULEY, Esmeray. Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 306, p. 108266, 2019.

YOO, Chae-Bin et al. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Cancer letters**, v. 225, n. 1, p. 41-52, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.11.018>

YORDANOV, N. D. Is our knowledge about the chemical and physical properties of DPPH enough to consider it as a primary standard for quantitative EPR spectrometry. **Applied Magnetic Resonance**, v. 10, n. 1, p. 339-350, 1996.

YORDANOV, N. D.; CHRISTOVA, A. DPPH as a primary standard for quantitative EPR spectrometry. **Applied Magnetic Resonance**, v. 6, n. 1, p. 341-345, 1994.

YORK-DURAN, Maria Jose et al. A dual-component carrier with both non-enzymatic and enzymatic antioxidant activity towards ROS depletion. **Biomaterials science**, v. 7, n. 11, p. 4813-4826, 2019. DOI: 10.1039/C9BM00913B

YU, Lihua; YAN, Jing; SUN, Zhiguang. D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways. **Molecular medicine reports**, v. 15, n. 4, p. 2339-2346, 2017. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6241>

ZELADA CASAS, Deysi Marisol; NOVOA CERQUÍN, Felicita. Actividad antioxidante in vitro de hesperidina aislada del mesocarpo de la cáscara de Citrus sinensis “naranja” de venta ambulatoria en el mercado San Antonio del distrito de Cajamarca. Trabajo de conclusión de curso, Faculdade de Ciências da Saúde “Dr. WILMAN RUIZ VIGO” Escola Profissional de Farmácia e Bioquímica, Cajamarca – Peru, 2020

ZHANG, Ju et al. Antioxidant and neuroprotective effects of Dictyophora indusiata polysaccharide in Caenorhabditis elegans. **Journal of ethnopharmacology**, v. 192, p. 413-422, 2016. doi.org/10.1016/j.jep.2016.09.031

ZHENG, Shizhong; YUMEI, F. U.; CHEN, Anping. De novo synthesis of glutathione is a prerequisite for curcumin to inhibit hepatic stellate cell (HSC) activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 3, p. 444-453, 2007

ZHIXIONG , LI. et al. Natural organic matter (NOM) imparts molecular-weight-dependent steric stabilization or electrostatic destabilization to ferrihydrite nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 11, p. 6761-6770, 2020. doi.org/10.1021/acs.est.0c01189

ZHOU, Weiwei; BURKE, Peter J. Versatile bottom-up synthesis of tethered bilayer lipid membranes on nanoelectronic biosensor devices. **ACS applied materials & interfaces**, v. 9, n. 17, p. 14618-14632, 2017. doi: 10.1021/acsami.7b00268

ZHU, Jia-Ying et al. Parasitization by Scleroderma guani influences expression of superoxide dismutase genes in Tenebrio molitor. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 87, n. 1, p. 40-52, 2014. doi.org/10.1002/arch.21179

ANEXOS

Anexo 01

	<p>National Organic Program Certificate of Compliance Certified Organic</p>
<p>Number: <u>C0031562-NOPHDLR-4</u></p>	
<i>Certified Operation</i>	<p>NOW Foods, Inc. 395 S. Glen Ellyn Rd Bloomingdale, IL 60108 USA</p>
<i>Type of Operation</i>	<p>Handler</p>
<i>Certified Products</i>	<p>Per Attached NOP Organic System Plan Summary</p>
<i>Identification Marks</i>	<p>Per Attached NOP Organic System Plan Summary</p>
<i>Location Inspected</i>	<p>NOW Foods, Inc. 395 S. Glen Ellyn Rd Bloomingdale, IL 60108 USA</p>
<i>Effective Date</i>	<p>29-Apr-2002</p>
	
<p>Scan this QR code to validate certificate authenticity on the QAI website</p>	
<p><small>Quality Assurance International, upon providing this certification, states that it has reviewed the Certified Entity's application, reviewed its records, inspected its field and/or facilities and has determined that the certified entity identified above is certified to the USDA organic regulations, 7 CFR Part 205. In its acceptance of this certification, the certified entity warrants, that it is so, and will remain in full compliance with the Terms and Conditions of the Certification Agency and in accordance with general guidelines established by the USDA's National Organic Program. Once certified, a producer or handling operation's organic certification continues in effect until surrendered, suspended or revoked.</small></p>	<p>Signed on behalf of QAI Inc  Allison McLeod March 30, 2002</p>
<p>Quality Assurance International 4370 La Jolla Village Drive, Suite 300, San Diego, CA 92122, USA Tel: (858) 792-3531 • Fax: (858) 792-8665 www.qai-inc.com</p>	
<p>Page 1 of 1</p>	

Anexo 02

	<p>National Organic Program Certificate of Compliance</p> <h1>Certified Organic</h1>
<p>Number: <u>C0227569-NOPHDLR-3</u></p>	
<i>Certified Operation</i>	<p>NOW Foods 575 Vista Blvd. Sparks, NV 89434 USA</p>
<i>Type of Operation</i>	<p>Handler</p>
<i>Certified Products</i>	<p>Per Attached NOP Organic System Plan Summary</p>
<i>Identification Marks</i>	<p>Per Attached NOP Organic System Plan Summary</p>
<i>Location Inspected</i>	<p>NOW Foods 575 Vista Blvd. Sparks, NV 89434 USA</p>
<i>Effective Date</i>	<p>26-Dec-2014</p>
	
<p>Scan this QR code to validate certificate authenticity on the QAI iVerify website</p>	
<p><small>Quality Assurance International, upon providing this certification, states that it has received the Certified Entity's application, reviewed its records, inspected its fields and/or facilities, and has determined that the certified entity identified above is certified to the USDA organic regulations, 7 CFR Part 205. In its acceptance of this certification, the certified entity warrants, that it is, and will remain in, full compliance with the Terms and Conditions of the Certification Agency and in accordance with general guidelines established by the USDA's National Organic Program. Once certified, a producer or handling operation's organic certification continues in effect until suspended, suspended or revoked.</small></p>	<p>Signed on behalf of QAI Inc  Stephen Gealy November 3, 2021</p>
<p>Quality Assurance International 4370 La Jolla Village Drive, Suite 300, San Diego, CA 92122, USA Tel: (858) 792-3531 • Fax: (858) 792-8665 www.qai-inc.com</p>	
<p>Page 1 of 1</p>	