

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

**Nanopartículas poliméricas preenchidas com óleo essencial de
Piper nigrum: Caracterização Química e Morfológica**

ÍTALO CARVALHO DA COSTA

Manaus

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

ÍTALO CARVALHO DA COSTA

**Nanopartículas poliméricas preenchidas com óleo essencial de
Piper nigrum: Caracterização Química e Morfológica**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Em Ciência e Engenharia de Materiais, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Henrique D. Fonseca Filho

Manaus

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Costa, Italo Carvalho da

C837n Nanopartículas poliméricas preenchidas com óleo essencial de
Piper nigrum: caracterização química e morfológica / Italo Carvalho
da Costa. 2020

82 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Henrique Duarte da Fonseca Filho

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Piper nigrum. 2. Nanoencapsulamento. 3. Morfologia. 4. Peak-
Force Tapping. I. Fonseca Filho, Henrique Duarte da II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe e minha irmã, que fornecem toda força necessária para vencer os obstáculos dessa jornada, com muito amor, e à minha avó, que em vida se doou inteiramente para o sucesso dos seus filhos e netos.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por mais uma vitória.

Ao Prof. Dr. **Henrique Duarte da Fonseca Filho**, pela orientação, pela amizade e pelo esforço em proporcionar uma direção na aprendizagem desde o início do curso.

Ao Prof. Dr. **Edgar A. Sanches** pela grande colaboração na efetivação desse trabalho e principalmente pelas palavras de apoio.

Ao M.Sc. **Sidney Azevedo** por estar sempre à disposição no Laboratório de Polímeros Nanoestruturados - NANOPOL, na realização de ensaios e sintetização.

Ao **Carlos Costa** e sua equipe do Laboratório LNNano do CNPEM.

À minha mãe **Vânia Maria** por sempre acreditar em mim e por me incentivar a trilhar esse caminho sempre com muita fé e disciplina.

À minha irmã **Thalita Carvalho** por trazer motivação diariamente com seu amor.

À querida **Heloísa Judite** por sua amizade, suas palavras positivas e por disponibilizar seu tempo e seu conhecimento.

Aos queridos **Andréia Cavalcante** e **Edenilson Pires** pela amizade e por facilitarem a rotina diária para que eu pudesse ter mais tempo para estudar.

Aos meus irmãos do coração **Edenilson Filho** e **Nicolas Pires** pelo apoio e por todo carinho e respeito durante essa jornada.

Aos meus familiares **Luana Brenda, Gabriel Duarte, Ricardo Souza, Elci Carlos, Eliana Carvalho, Luiz Carlos** e **Mácia Carvalho** pelos momentos de consolo e de diversão.

Aos queridos **Ayná Caroline, Joab Arouche, Matheus Biondo e Laiane Silva** por se mostrarem sempre prestativo no NANOPOL e pelas palavras de otimismo.

Aos discentes desse curso **Alex Gomes, Sabrina Santana, Camila Pinto, Ituanly Melo, Ricardo Ito, Alexandra Lizandra, Cristyana Pontes, Rosana Carvalho e Matheus Fonseca** em que tive a honra de fazer amizade e que sempre se propuseram em ajudar nas diversas atividades realizadas nas disciplinas do curso.

À **FAPEAM** pela concessão da bolsa, auxiliando o desenvolvimento da pesquisa.

À todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste trabalho e que, por descuido, tenha esquecido de mencionar.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”
(José de Alencar)

RESUMO

Os compostos bioativos encontrados no óleo essencial (OE) de *Piper nigrum* apresentam diversas atividades biológicas, como atividade anti-inflamatória, antioxidante, antibactericida, antifúngica e inseticida. No entanto, os compostos são limitados pela volatilidade e rápida degradação do OE. Para superar esses e outros obstáculos e prolongar a eficácia dos compostos ativos, o OE de *Piper nigrum* foi encapsulado em nanopartículas biodegradáveis, que tinham como material de parede a gelatina e a poli- ϵ -caprolactano (PCL). Desse modo, o objetivo deste trabalho é caracterizar as nanopartículas poliméricas biodegradáveis, sintetizadas no intuito de servirem de nanocarreadores do OE de *Piper nigrum*. Primeiramente, extraiu-se o OE por hidrodestilação e realizou-se um estudo de cinética de extração e de suas propriedades físicas. A análise de CG/EM do OE *in natura* revelou uma composição majoritariamente constituída por *E*-cariofileno (34,87%), sabineno (14,96%), silvestreno (14,17%) e α -pineno (5,28%). As técnicas de DLS, MEV e AFM foram utilizadas para realizar a caracterização morfológica das nanopartículas. Por DLS as nanopartículas carregadas e vazias apresentaram um tamanho médio de 316 nm e 285 nm respectivamente. Por AFM as nanopartículas carregadas e vazias apresentaram um tamanho médio de 208 nm e 196 nm. A espectroscopia UV-Vis foi utilizada para determinar a eficiência do encapsulamento medida em concentração absoluta de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (95,8%) e para os ensaios de liberação controlada do OE em diferentes pH. Através das análises de Potencial Zeta constatou-se uma ótima estabilidade das nanopartículas. Por meio dos espectros de FTIR, Raman e AFM-IR, realizou-se uma análise química. O AFM-IR mostrou-se ser uma técnica eficaz na caracterização de nanocápsulas, conseguindo verificar o encapsulamento do OE e chegar na identificação de um valor aproximado da espessura do material de parede das nanopartículas carregadas (<25nm). As medidas de *Peak-Force Tapping* forneceram uma análise da área superficial das nanopartículas por meio de imagens de adesão. Portanto, esses dados fornecem um amplo entendimento das características das nanopartículas contendo OE, mostrando que a formulação de nanopartículas representa uma alternativa eficaz no uso do OE de *Piper nigrum*.

Palavras-chave: *Piper nigrum*. Nanoencapsulamento. Morfologia. *Peak-Force Tapping*.

ABSTRACT

The bioactive compounds found in the essential oil (EO) of *Piper nigrum* present biological activities, such as anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, antifungal and insecticide activities [1]. However, the compounds are limited by the volatility and rapid degradation of the EO. To avoid this and prolong the efficacy of the active compounds, the EO of *Piper nigrum* was encapsulated in biodegradable nanoparticles, which had as wall material gelatin and poly- ϵ -caprolactan (PCL). Thus, the objective of this research is to characterize the biodegradable polymeric nanoparticles, synthesized as nanocarriers of Piper nigrum EO. Firstly, the EO was extracted by hydrodistillation and a study was made of its extraction kinetics and its physical properties. The GC/MS analysis of OE *in natura* revealed a composition mostly consisting of *E*-caryophyllene (34.87%), sabinene (14.96), silvestrene (14.17) and α -pinene (5.28%). The DLS, SEM and AFM techniques were used to perform a morphological characterization of nanoparticles. By DLS the charged and empty nanoparticles had an average size of 316 nm and 285 nm respectively. By AFM the charged and empty nanoparticles had an average size of 208 nm and 196 nm. The UV-Vis spectroscopy was used to determine the encapsulation efficiency measured at an absolute concentration of 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (95.8%) and for the controlled release of EO at different pH. Through Zeta Potential analysis, an excellent stability of the nanoparticles was found. Using the FTIR, Raman and AFM-IR spectra, a chemical analysis was performed. The AFM-IR proved to be an effective technique for nanocapsule characterization, being able to verify the encapsulation of the EO and to identify an approximate value of the thickness of the wall material of the nanoparticles (<25nm). The *Peak-Force Tapping* measurements provided an analysis of the surface area of nanoparticles by adhesion images. Therefore, these data provide a broad understanding of the characteristics of OE-containing nanoparticles, showing that nanoparticle formulation represents an effective alternative in the use of *Piper nigrum* OE.

Keywords: *Piper nigrum*. Nanocapsulation. Morphology. *Peak-Force Tapping*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto da espécie <i>Piper nigrum</i>	18
Figura 2: Foto de Sementes e OE de pimenta preta.	19
Figura 3: Representação Esquemática de Nanocápsulas e Nanoesferas.	25
Figura 4: Técnicas de Obtenção de NPPs.	26
Figura 5: Ilustração dos Mecanismos de Liberação Controlada.	33
Figura 6: princípio de funcionamento do AFM-IR em análises de Nanopartículas.	41
Figura 7: Representação Esquemática da Formulação de Nanopartículas.	46
Figura 8: Gráfico da Curva de Calibração do OE de <i>Piper nigrum</i>	48
Figura 9: Ensaio de Liberação Controlada do OE <i>in vitro</i>	49
Figura 10: Gráfico da Cinética de Extração do OE de <i>P. nigrum</i>	52
Figura 11: Estruturas químicas dos constituintes voláteis do OE de <i>P. nigrum</i>	55
Figura 12: Imagens de MEV do Filme de NPPs na escala de: (a) 10 μm ; e (b) 5 μm	57
Figura 13: Imagens de topografia 2D e 3D de AFM e gráfico de Polidispersão: (a) NPPs com OE de <i>P. nigrum</i> ; (b) NPPs vazias.	59
Figura 14: Imagens de Topografia de NPPs carregadas: (a) Nanopartículas Dispersas; (b) Nanopartículas Aglomeradas.	60
Figura 15: Gráfico do Monitoramento da EE da Síntese em Função do Tempo.	61
Figura 16: Gráfico da Liberação Controlada do OE de <i>P. nigrum</i>	62
Figura 17: Espectros de FTIR (a) Nanopartículas Carregadas com OE de <i>P. nigrum</i> ; (b) Nanopartículas vazias; (c) Gelatina tipo B; (d) PCL; (e) OE de <i>P. nigrum</i>	63
Figura 18: Espectros de Raman de NPPs Carregadas (NPP-PN) e NPPs Vazias (NPP-V).	65
Figura 19: Espectros de AFM-IR das NPPs e FTIR do OE da <i>Piper nigrum</i>	67
Figura 20: Ilustração do IR na Identificação da Espessura da Nanocápsula na Análise Química.	69
Figura 21: Medidas de <i>Peak-Force Tapping</i> das NPPs carregadas de OE: (a) Imagem Topográfica, (b) Imagem de Adesão.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferentes Atividades Biológicas do OE de <i>P. nigrum</i>	22
Tabela 2: Lista de Polímeros Naturais e Sintéticos Utilizados para a Naoencapsulação.	31
Tabela 3: Concentrações Utilizadas para a Síntese de 150 mL.	45
Tabela 4: Composição Química do OE das sementes de <i>P.nigrum</i>	54
Tabela 5: Potencial Zeta das Nanopartículas em Diferentes pH.	56
Tabela 6: Principais Grupos encontrados no espectro de gelatina, PCL e OE de <i>P. nigrum</i>	64
Tabela 7: Principais Grupos encontrados nos Espectros de Raman de NPPs.	66

LISTA DE SIGLAS

AFM – Microscopia de Força Atômica

AFM-IR – Microscopia de Força Atômica acoplado a um Infravermelho

BHL – Balanço Hidrofílico/Lipofílico

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de massas

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz

EE – Eficiência de Encapsulamento

FDA – Food and Drug Administration

FTIR – Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier

MEV – Microscopia de Varredura Eletrônica

NE – Fenoxietanol/2-metil-2H-isotiazolin-3-ona

NLS – Nanopartículas Lipídicas Sólidas

NPP – Nanopartículas Poliméricas

NPP-PN – Nanopartículas Poliméricas carregadas com óleo essencial de *Piper nigrum*

NPP-V – Nanopartículas Poliméricas Vazias

PCL – Poli (ϵ -caprolactano)

PDI – Índice de Polidispersão

PLA – Ácido Polilático

OE – Óleo Essencial

SPAN - Monoestearato de sorbitano

TACC – Triglicerides do Ácido Cáprico e Caprílico

TWEEN 80 – Monolaurato de polioxietilenosorbitano

UV-Vis – Espectrofotômetro no Ultravioleta Visível

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1. <i>Piper nigrum</i>	17
3.1.1. Óleo Essencial de <i>Piper nigrum</i>	18
3.1.2. Composição Química do Óleo Essencial de <i>P. nigrum</i>	20
3.1.3. Propriedades Biológicas do Óleo Essencial de <i>P. nigrum</i>	21
3.2. Nanoencapsulamento de Óleos Essenciais	22
3.3. Nanopartículas Poliméricas.....	24
3.3.1. Métodos de obtenção de Nanopartículas Poliméricas.....	26
3.3.2. Uso de Polímeros como Material de Parede	30
3.4. Liberação Controlada de Ativos	33
3.4.1. Modelos de Liberação Controlada.....	35
3.5. Caracterização de Nanopartículas Poliméricas.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. Óleo Essencial da <i>Piper nigrum</i>	43
4.1.1. Extração do Óleo Essencial	43
4.1.2. Determinação das Propriedades Físicas do Óleo Essencial.....	43
4.1.3. Identificação Química dos Componentes Voláteis por CG/EM.....	44
4.2. Síntese de Nanopartículas Poliméricas Carreadas.....	44
4.3. Caracterização das Nanopartículas por Diferentes Técnicas.....	47
4.3.1. DLS e Potencial Zeta.....	47
4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura – MEV	47
4.3.3. Microscopia de Força Atômica - AFM	47
4.3.4. Eficiência de Encapsulamento por UV-Vis.....	48
4.3.5. Liberação Controlada do Óleo Essencial Nanoencapsulado	49
4.3.6. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho -FTIR	49
4.3.7. Espectroscopia Raman.....	50
4.3.8. Microscopia de Força Atômica com Infravermelho – AFM-IR.....	51
4.3.9. Medidas de <i>Peak-Force Tapping</i>	51

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. Caracterização do Óleo Essencial de <i>Piper nigrum</i>	52
5.1.1. Determinação das Propriedades Físicas	52
5.1.2. Determinação dos Constituintes Químicos do Óleo Essencial	53
5.2. Caracterização das Nanopartículas Poliméricas	56
5.2.1. Análise de DLS e Potencial Zeta	56
5.2.2. Análise Morfológica e Estrutural via MEV	57
5.2.3. Análise Morfológica e Estrutural via AFM	58
5.2.4. Eficiência de Encapsulamento	60
5.2.5. Liberação Controlada do OE Encapsulado <i>in vitro</i>	61
5.2.6. Análise Química via FTIR	63
5.2.7. Análise Química via Raman	65
5.2.8. Análise Qualitativa via AFM-IR	66
5.2.9. Medidas de <i>Peak-Force Tapping</i>	69
6. CONCLUSÃO	72
6.1. Perspectivas futuras	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO

A pimenta preta (*Piper nigrum*), conhecida popularmente como pimenta-do-reino, é uma planta trepadeira, pertencente à família *Piperaceae* (RAVINDRAN *et al.*, 2012). Essa planta é composta de terpenos de grande aplicabilidade e suas diferentes partes podem ser usadas como cosméticos, remédios, conservantes, inseticidas e larvicidas, impulsionando a utilização de produtos naturais nos mais diversos setores e a pesquisa científica em torno de plantas medicinais.

O óleo essencial (OE) extraído da *Piper nigrum* é uma mistura de um grande número de compostos químicos voláteis e devido a grande diversidade química de componentes, este óleo apresenta uma gama de atividades biológicas, bem como: atividade antifúngica, anti-inflamatória (AHMAD *et al.*, 2012), antimicrobiana (PRAKASH *et al.*, 2018), antioxidante (BAGHERI, MANAP e SOLATI, 2014) e até mesmo atividade larvicida (Samuel *et al.*, 2016), tornando-se uma boa alternativa de compostos naturais a serem utilizados pela indústria farmacêutica.

No entanto, propriedades do OE como volatilidade, fotodegradação, biodisponibilidade e solubilidade, podem ser um empecilho para determinadas aplicações. Em consequência disso, surge a necessidade de apegar-se a estratégias de encapsulação do bioativo em nanopartículas poliméricas (NPP).

As NPPs são sistemas amplamente utilizados como veículos de liberação de fármacos, principalmente por melhorar a estabilidade e absorção dos componentes bioativos, por meio de uma liberação controlada e protegida de reações adversas. Deste modo, as NPPs exercerão a tarefa de preservar as propriedades do bioativo até o momento de sua exposição ao meio.

Dentre os diversos polímeros utilizados como material de parede de NPPs, tem-se um grande interesse na gelatina e na poli- ϵ -caprolactano (PCL), ambas aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA). O interesse no uso desses polímeros para materiais é baseado no fato de que: a gelatina é biodegradável, não-tóxica, fácil de reticular e tem um imenso potencial a ser usado para a preparação de sistemas coloidais de liberação de fármacos (GHASEMISHAHRESTANI *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2018). Já a PCL é um excelente polímero para encapsulação de OE por ser um poliéster alifático semicristalino, que é considerado um material biocompatível e bio-reabsorvível com alta permeabilidade às drogas (XIAO, XU e ZHU, 2017).

A associação de tais polímeros como materiais de parede está diretamente ligada ao tamanho de nanopartículas que se formam por meio desta junção, acarretando em modificações em todo sistema. Com isso, no sentido de relatar as características dessas nanopartículas no intuito de auxiliar a empregabilidade das mesmas, é de extrema importância conhecer a concentração liberada do OE em diferentes meios, informações morfológicas, químicas e até mecânicas.

Essa dissertação explora uma compreensão das características das nanopartículas de gelatina do tipo B e PCL, tendo em vista a aplicabilidade futura dessas nanopartículas de controle sustentáveis baseadas em OE.

Desse modo, um estudo de cinética de extração do OE foi realizado e os seus componentes voláteis foram determinados e quantificados, utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM). Após a formulação das NPPs, medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e potencial Zeta foram realizadas, trazendo informações de tamanho, índice de polidispersão (PDI) e carga das nanopartículas. A caracterização das nanopartículas via Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM) considerou os aspectos morfológicos das NPPs carregadas e vazias. Realizou-se uma análise quantitativa de eficiência de encapsulamento (EE) e também um estudo de liberação controlada do OE em diferentes pH, utilizando um espectrofotômetro no Ultravioleta Visível (UV-Vis). Por meio de uma análise qualitativa de Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Raman e Infravermelho acoplado a Microscopia de Força Atômica (AFM-IR) constatou-se a presença do OE no núcleo das NPPs e também identificou-se os grupos funcionais presente nos espectros destas nanopartículas. Por fim, medidas de *Peak-Force Tapping* foram obtidas no intuito de avaliar a adesividade da área superficial das nanopartículas. As técnicas utilizadas trouxeram informações que correlacionaram-se durante o estudo de caracterização desses nanocarreadores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar nanopartículas poliméricas biodegradáveis, sintetizadas no intuito de servirem de nanocarreadores do óleo essencial de *Piper nigrum*.

2.2. Objetivos Específicos

- i. Extrair o OE das sementes de *Piper nigrum* pelo método de hidrodestilação;
- ii. Caracterizar as propriedades físicas do óleo essencial *in natura*;
- iii. Identificar e quantificar os constituintes voláteis do OE por meio de Cromatografia Gasosa (CG/EM);
- iv. Sintetizar nanopartículas poliméricas biodegradáveis carregadas do OE de *Piper nigrum* e não carregadas;
- v. Determinar o tamanho médio, o índice de polidispersão (PDI) e a carga das nanopartículas via DLS e Potencial Zeta.
- vi. Caracterizar a morfologia das nanopartículas via MEV e AFM;
- vii. Avaliar a Eficiência de Encapsulamento (EE) e a liberação do óleo essencial via Espectroscopia UV-Vis;
- viii. Realizar a caracterização química das nanopartículas através da Espectroscopia de FTIR, de Raman e de uma análise local por Infravermelho através de um AFM-IR;
- ix. Fazer medidas de *Peak-Force Tapping* para o estudo de Adesão das nanopartículas carregadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O óleo essencial (OE) de *Piper nigrum* tem sido apontado como um composto de grande potencial para aplicações promissoras em diferentes áreas, tais como na indústria de alimentos, cosmética, agrícola e farmacêutica. Porém, mesmo apresentando diversas atividades biológicas de grande interesse, o OE ainda possui empecilhos para determinadas aplicações, consequência de algumas de suas propriedades, tais como: baixa solubilidade em água, alta volatilidade, baixa biodisponibilidade, e instabilidade no sistema alimentar. Com isso, é necessário o desenvolvimento de alguns sistemas de transporte para o OE, como o sistema de nanopartículas poliméricas (NPP) desenvolvidas neste trabalho. Atualmente, existem inúmeras técnicas que auxiliam no estudo da caracterização dessas NPPs carregadas, que investigam a morfologia, a liberação do agente ativo e algumas propriedades determinantes para criação de novos produtos. A seguir, uma breve revisão bibliográfica sobre (i) o OE de *Piper nigrum*, (ii) o nanoencapsulamento de OEs, (iii) as particularidades das NPPs, (iv) os mecanismos de liberação controlada desse sistema e (v) alguns tipos de caracterização físico-química das nanopartículas.

3.1. *Piper nigrum*

O gênero *Piper*, pertencente à família *Piperaceae*, é um gênero que consiste em cerca de 2.000 espécies (GULZAR *et al.*, 2013). Sua importância no setor alimentício e na medicina tradicional expressa-se na alta produção mundial de algumas de suas espécies, dentre elas, destaca-se a *Piper nigrum*, uma das especiarias mais conhecida do mundo (ZHU, MOJEL e LI, 2017).

A pimenta preta (*Piper nigrum*), conhecida popularmente como pimenta-do-reino, é uma planta trepadeira, arbustífera perene (Figura 1), amplamente cultivada em regiões tropicais (RAVINDRAN *et al.*, 2012). Suas sementes são utilizadas há séculos como condimento no preparo de alimentos, e na medicina popular, em preparações do tipo cataplasmas, pomadas e cremes para o tratamento de diversos agravos na saúde (AHMAD *et al.*, 2012).



Figura 1: Foto da espécie *Piper nigrum*.
Fonte: (REYES, 2008)

A *Piper nigrum* é nativa do sul da Índia e do Sri Lanka, porém, hoje já se encontra distribuída nos dois hemisférios. De acordo com Khan *et al.* (2020) tanto a autopolinização quanto a polinização cruzada podem ocorrer em *P. nigrum* e os frutos maduros e verdes desta espécie são a fonte de pimenta branca e pimenta preta, respectivamente.

Atualmente, a pimenta preta é o alimento principal para temperos, capaz de propor um sabor muito peculiar de ardência, cuja principal substância envolvida na ardência desta pimenta é a piperina. Essa substância é um alcalóide pungente da pimenta preta, sua molécula apresenta, sobretudo, carbonos e hidrogênios, com duas funções éter e uma função amida. Isso quer dizer que a molécula é quase apolar e, portanto, quase insolúvel em água (CARNEVALLI e ARAÚJO, 2013).

Assim como as sementes da pimenta preta, o OE desta espécie também apresenta uma infinidade de atividades biológicas devido aos seus multicomponentes. O OE produzido pela espécie de *Piper nigrum*, varia de 1,2% a 3,5% de sua totalidade, rico em monoterpenos e sesquiterpenos (TRAN, *et al.*, 2019).

3.1.1. Óleo Essencial de *Piper nigrum*

Os OEs são compostos derivados de material vegetal com grande complexidade de hidrocarbonetos (terpenos e sesquiterpenos), sendo detentor de uma gama de variedade de componentes em diferentes concentrações. Estes óleos são líquidos voláteis, extraídos

das plantas (folhas, raízes, sementes, frutos, flores ou troncos), dotados de aroma intenso, coloração incolor ou ligeiramente amarelada (HOSSEINI *et al.*, 2013; PATHANIA *et al.*, 2018).

Existem diversas técnicas de extração de OE, como a hidrodestilação, a microextração em fase sólida, a extração de fluido supercrítica, a evaporação de sabor assistida por solvente e a técnica de purga e armadilha. A hidrodestilação é um dos métodos mais utilizados para a extração de OEs (MYSZKA, LEJA e MAJCHER, 2018).

No entanto, há a necessidade de medidas cautelosas durante a extração e armazenamento do OE, tendo em vista que estes óleos estão suscetíveis a uma rápida degradação. Conforme Paredes *et al.* (2016), os compostos ativos encontrados em OE, em sua maioria, são sensíveis à modificação química sob efeito de alguns fatores externos, bem como: temperatura, luz, oxigênio etc.

O OE de *P. nigrum* (Figura 2) é comumente empregado na indústria de alimentos, bebidas e cosméticos. Alguns de seus componentes voláteis incluindo α - e β -pineno, limoneno, mirceno, linalol, α -felandreno, sabineno, *E*-cariofileno e germacreno-*D* são responsáveis pelo sabor e aroma, dando ênfase em características químicas e sensoriais bem particulares que ganham notoriedade dos tais setores (TRAN *et al.*, 2019).



Figura 2: Foto de Sementes e OE de pimenta preta.

Fonte: (Adaptado de Lopes, 2015)

Segundo Abdulazeez *et al.* (2016), o OE de pimenta preta, desempenha um papel significativo no processamento de alimentos, saúde e nutrição ao prevenir ou retardar a deterioração de alimentos devido às propriedades antioxidantes e antimicrobianas apresentadas por alguns de seus constituintes químicos que se sobressaem.

3.1.2. Composição Química do Óleo Essencial de *P. nigrum*

Os OEs são uma soma de constituintes voláteis e, portanto, os efeitos destes óleos devem ser uma totalidade de efeitos de todos os componentes e suas interações. No entanto, 2 ou 3 componentes podem ser responsáveis por até 85% da mistura total em comparação com os menores e, assim, contribuir para a principal propriedade da mistura (ZHAI *et al.*, 2018).

De acordo com Islam *et al.* (2015), o OE da pimenta preta é uma mistura de 20 a 50 componentes em concentrações bastante diferentes; seus hidrocarbonetos monoterpênicos são responsáveis por cerca de 70 a 80% dos voláteis, com quantidades menores de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (20 a 30%) que parecem possuir os principais atributos desejáveis do sabor da pimenta. Embora os terpenos oxigenados sejam constituintes relativamente menores, compreendendo menos de 4%, contribuem para o odor característico do óleo.

Porém, Costa *et al.* (2010), na identificação da composição química do OE de *P. nigrum*, verificou que os constituintes compõem 42,5% de monoterpênicos não oxigenados e 3,2% de monoterpênicos oxigenados, 31,5% de sesquiterpênicos não oxigenados e 20,1% de não-oxigenados. Isto indica que existe uma variação grande entre a presença de alguns constituintes voláteis, bem como as suas concentrações.

No OE analisado por Costa *et al.* (2010), obtido por hidrodestilação, 17 constituintes voláteis foram identificados, tendo como componentes majoritários, o *E*-cariofileno (24,2%), o óxido de cariofileno (20,1%), o sabineno (19,9 %) e limoneno (13,0%). Já Menon *et al.* (2002), que obteve OE de *Piper nigrum* também por hidrodestilação, encontraram 55 constituintes voláteis, tendo como majoritários o sabineno (26,8%), o β -pineno (3,8%), o mirceno (8,3%), o limoneno (20,2 %) e o *E*-cariofileno (21,7%). Para Wang (2018), no seu OE obtido por extração assistida através microondas ultrassônica verde e sem solventes (UMAE), 30 constituintes voláteis foram identificados, e os majoritários foram o 3- Δ -careno (33,2%), o limoneno (19,2%), o β -pineno (14,0%), o α -pineno (8,6%) e o *E*-cariofileno (13,0%).

Com a observação da composição química do OE de pimenta preta obtida por diferentes autores, constatou-se que a variação dos constituintes voláteis é comum devido a fatores que vão do cultivo a extração. De acordo com Pedro *et al.* (2013), vários fatores podem afetar a composição final do OE, como o processo de extração, tanto o tipo como as condições deste processo, a seção da planta (órgão) utilizada para extração, a variação

sazonal de fatores ambientais bem como: as condições da natureza durante o ano e o período em que a planta é colhida. Os nutrientes disponíveis para o crescimento das plantas também têm um papel crucial na definição da bioquímica. Todas essas incógnitas justificam a existência de OEs com diferentes composições do mesmo material (mesma planta).

3.1.3. Propriedades Biológicas do Óleo Essencial de *P. nigrum*

Normalmente as propriedades biológicas apresentadas pelos OEs são determinadas pela sinergia de seus componentes e nem sempre são ditadas pelos compostos majoritários.

A família *Piperaceae*, fornece desde muito tempo, uma fonte de medicamentos e temperos alimentares. Os metabólitos secundários de diferentes espécies do gênero *Piper* têm sido utilizados para várias atividades biológicas, incluindo até atividades repelentes de insetos (COSTA *et al.*, 2010).

Na espécie de *P. nigrum*, os princípios ativos encontrados, especialmente a piperina, possuem ação anti-inflamatória, antioxidante, analgésica dentre outras capazes de otimizar processos cicatriciais, circulação sanguínea, bem como combater os sinais do envelhecimento ocasionados por radicais livres quando consumida em quantidades apropriadas (RAKMAI *et al.*, 2016).

Para Myszka, Leja e Majcher (2018), os metabólitos secundários de *P. nigrum* desempenham um ótimo papel defensivo contra infecções por micróbios, insetos e animais. As Piperamidas apresentam ação inseticida, o β -cariolofileno apresenta atividade anestésica, o nerolidol que é um famoso metabólito secundário, pode ser usado até mesmo para controlar ácaros.

Para Samuel (2016), diferentes partes de *P. nigrum* podem ser usadas como agentes de controle de drogas, conservantes e biocidas. A pimenta-do-reino ou o OE dessa espécie pode ter potencial larvicida para o controle do vetor da malária em locais onde o manejo da fonte larval acrescenta benefícios sob os auspícios do controle integrado do vetor.

Conforme Carnevalli e Araújo (2013, apud CHAUDHRY; TARIQ, 2006) O OE da pimenta preta pode ainda vir a formar uma importante plataforma para o desenvolvimento barato, seguro e eficaz de medicamentos naturais, no controle de bactérias resistentes que são constantemente uma ameaça a saúde humana.

Devido a grande diversidade química de componentes, várias funções biológicas importantes são atribuídas aos OEs. Na tabela 1, uma lista de atividades biológicas da *P. nigrum* é apresentada.

Tabela 1: Diferentes Atividades Biológicas do OE de *P. nigrum*.

Atividades	
antiapoptótico	antispermatogênico
antibacteriano	antiespasmódico
atividade inseticida	anti-inflamatório
atividade larvicida	atividade anti-metastática
antifúngico	antioxidante
analgésico	antirritico

Fonte: (AHMAD *et al.*, 2012) com modificações.

Dessa forma, é nítida a diversidade de atividades biológicas apresentadas pelo OE de pimenta preta, possibilitando aplicações promissoras no setor alimentício, como conservantes naturais, na produção de inseticidas menos danoso ao ambiente e até mesmo na produção de novos medicamentos.

3.2. Nanoencapsulamento de Óleos Essenciais

Os OEs têm sido tradicionalmente usados em diferentes aplicações, incluindo tratamento de várias doenças. Seus constituintes químicos e características físico-químicas os possibilitam a apresentar diversas atividades biológicas (ZHAI, LIU, *et al.*, 2018; ABDULAZEEZ, SANI, *et al.*, 2016). No entanto, esses óleos são voláteis e quimicamente instáveis na presença de ar, luz, umidade e altas temperaturas. Com isso, a nanoencapsulação desses óleos é um procedimento promissor, fornecendo uma liberação lenta e controlada do agente ativo.

A nanoencapsulação é uma abordagem viável e eficiente da nanotecnologia que tem recebido muita atenção de pesquisadores, especialmente no campo farmacêutico e da biotecnologia. A nanoencapsulação envolve o uso de serviço de entrega, conhecido como nanotransportadores ou nanocarreadores para encapsular substâncias ou moléculas bioativas, fornecendo a funcionalidade de liberação controlada do núcleo. Os nanocarreadores protegem os bioativos de fatores ambientais como pH, oxigênio, luz etc., preservando suas propriedades organolépticas e físico-químicas, servindo como barreira

entre o bioativo e o meio ambiente. Além disso, os nanocarreadores podem aumentar o potencial antimicrobiano de compostos bioativos, como OE, aumentando as interações celulares entre eles e os micróbios como resultado do tamanho muito pequeno que melhora a captação celular (IDRIS *et al.*, 2015).

O sistema de entrega é capaz de transportar o OE (agente ativo que estará encapsulado) através da membrana celular e liberar para atuar no lado interno da membrana citoplasmática. Além disso, os materiais encapsulantes fazem uma blindagem entre o OE e a matriz alimentar e o entrega em locais direcionados específicos (fases ricas em água, onde os microorganismos proliferam preferencialmente) com estabilidade e dispersabilidade aprimoradas (PAREDES *et al.*, 2016).

De acordo com Rao e Sowbhagya (2017) a nanoencapsulação fornece várias vantagens sobre a microencapsulação, dentre elas, o aumento da dispersibilidade em água, limitando o sabor e a degradação e/ou evaporação do aroma e contornando as interações de moléculas de aroma volátil na matriz alimentar sem afetar as propriedades organolépticas do produto alimentar.

Suscintamente, as vantagens da nanoencapsulação de OEs são: facilidade de manuseio, estabilidade, proteção contra oxidação, melhor distribuição, solubilidade, liberação controlada, com menos ou nenhum efeito adverso sobre as propriedades organolépticas de itens alimentares aplicáveis com maior biodisponibilidade e aumento da área de superfície por unidade de volume. Portanto, as nanopartículas interagem com mais eficiência com a célula. (PRAKASH *et al.*, 2018).

No entanto, há também uma preocupação relacionada ao tamanho das nanopartículas carreadoras. Esses nanotransportadores podem obter acesso a ambientes indesejados com consequências prejudiciais, podendo atravessar o envelope nuclear de uma célula e causar dano genético não intencional e mutações (RAWAT *et al.*, 2006).

Consideram-se técnicas de nanoencapsulação, as que produzem carreadores na escala nanométrica (10-1000 nm), destacando-se a emulsificação, coacervação, complexação e nanoprecipitação (ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). Os veículos comumente preparados para encapsulamento de OE, são as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), lipossomos e as nanopartículas poliméricas (NPP) (ASBAHANI *et al.*, 2015).

As NLS representam uma classe de partículas coloidais compostas por lipídios sólidos na temperatura ambiente e corporal. São os portadores coloidais usados como um sistema alternativo aos portadores tradicionais existentes, como emulsões, lipossomas e

micro e nanopartículas poliméricas. Este sistema tem sido amplamente utilizado como agente transportador para compostos hidrofóbicos instáveis. O diâmetro médio das NLS está na faixa de 50 a 1000 nm. (GESZKE-MORITZ e MORITZ, 2016)

Os lipossomas são estruturas esféricas compostas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, moléculas anfifílicas que possuem cabeça hidrofílica e duas cadeias hidrofóbicas apolares em forma de vesículas que rodeiam uma fase aquosa. Os lipossomas são bicamadas lipídicas globulares de 50 a 1000 nm em diâmetro que servem como veículos de entrega convenientes para compostos biologicamente ativos. Eles podem ser usados como agentes transportadores para moléculas lipofílicas e hidrofílicas. (BOZZUTO e MOLINARI, 2015; DARAEI et al., 2014)

As NPPs são sistemas coloidais compostos por polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos. Considerando os mecanismos de encapsulamento, o OE pode ser aprisionado, disperso, dissolvido dentro ou adsorvido nas nanopartículas. Seu diâmetro médio está na faixa de 50 a 1000 nm. (GUTERRES, ALVES e POHLMANN, 2007)

Todos esses veículos carreadores são promissores no encapsulamento de bioativos, promovendo a liberação controlada e a entrega no sítio de ação específico, com uma eficiente absorção através das células, cada um com limitações específicas. As NLS, por exemplo, possuem alta polidispersividade, baixa capacidade de carregamento e aglomeração; os lipossomas, dos três veículos, possuem a menor estabilidade. Já as NPPs apesar da capacidade de encapsular diferentes tipos de substâncias e da capacidade de proteção, podem apresentar algum grau de citotoxicidade dependendo do polímero.

3.3. Nanopartículas Poliméricas

Como relatado anteriormente, as NPPs são partículas coloidais de tamanho submicrométrico, amplamente utilizadas para a proteção de agentes ativos dos interferentes externos, por meio de um material de parede, permitindo o direcionamento para sítios específicos desses ativos liberados controladamente.

As NPPs são consideradas veículos de encapsulamento simples para aplicações de administração de medicamentos devido a ampla aplicabilidade em todos os aspectos do campo e ao desenvolvimento de síntese menos complexo. Banik, Fattahi e Brown (2015) relatam que as NPPs são uma das estratégias orgânicas mais estudadas para nanomedicina. Para Pascoli *et al.* (2018) Esses nanoproductos são adequados como portadores de agroquímicos devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa

toxicidade, podendo transportar muitas classes de agroquímicos, incluindo herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas, e fertilizantes.

Conforme Pedro *et al.* (2013), o encapsulamento de OE em NPPs apresenta várias vantagens, como: liberação controlada, maior solubilidade aparente em água, citotoxicidade reduzida e atividade antimicrobiana aprimorada dentre outras.

De acordo com Soppimath *et al.* (2001) as NPPs são classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas. As nanocápsulas apresentam dois compartimentos, uma parede polimérica e um núcleo, geralmente oleoso, ou seja, o óleo estará confinado pela parede polimérica. Já as nanoesferas são sistemas matriciais, nesse caso o óleo encontra-se disperso na partícula polimérica, não sendo possível identificar um núcleo diferenciado. A figura 3 ilustra essas classificações das NPPs.

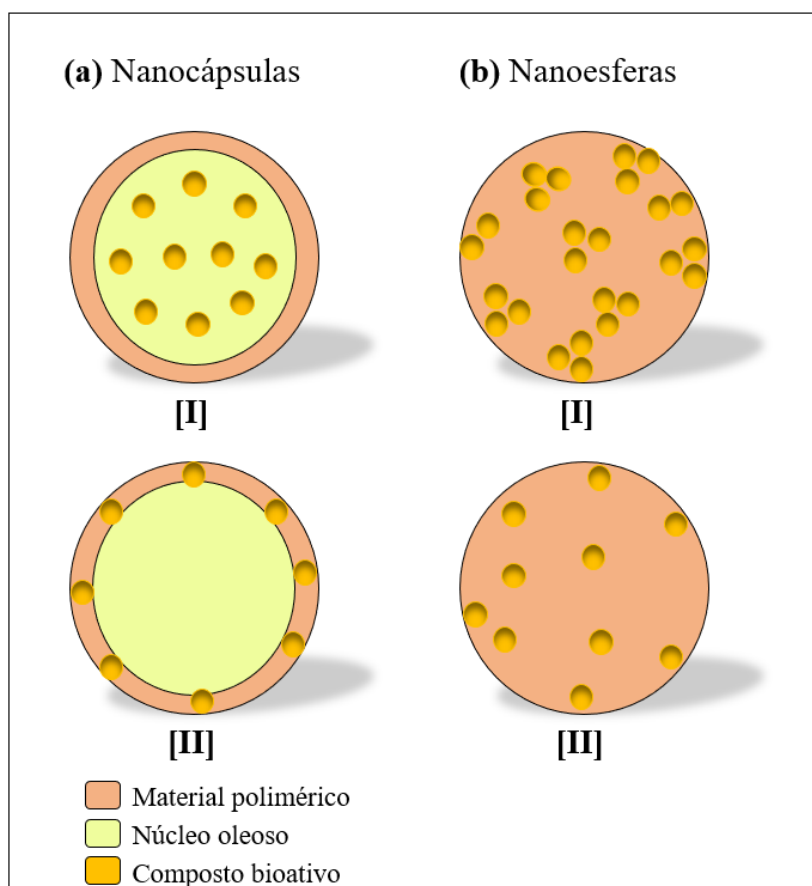


Figura 3: Representação Esquemática de Nanocápsulas e Nanoesferas. (a) nanocápsula I - ativo dissolvido exclusivamente no núcleo; nanocápsula II - ativo adsorvido na membrana polimérica, contendo também um núcleo oleoso. (b) nanoesfera I - ativo retido na matriz polimérica, não há presença de um núcleo oleoso; nanoesfera II - ativo adsorvido ou disperso na matriz polimérica.

Fonte: (Adaptado de Delgado, 2013).

3.3.1. Métodos de obtenção de Nanopartículas Poliméricas

Várias técnicas podem ser usadas para a produção de NPPs. Conforme Rao e Geckeler (2011), a escolha do método depende de uma série de fatores como tamanho de partícula, distribuição de tamanho, área de aplicação, mecanismo de liberação e etc. Segundo Crucho e Barros (2017) os métodos de preparação podem ser divididos em dois grupos: os baseados na polimerização de monômeros e os que se aproveitam de polímeros pré-formados (Figura 4).

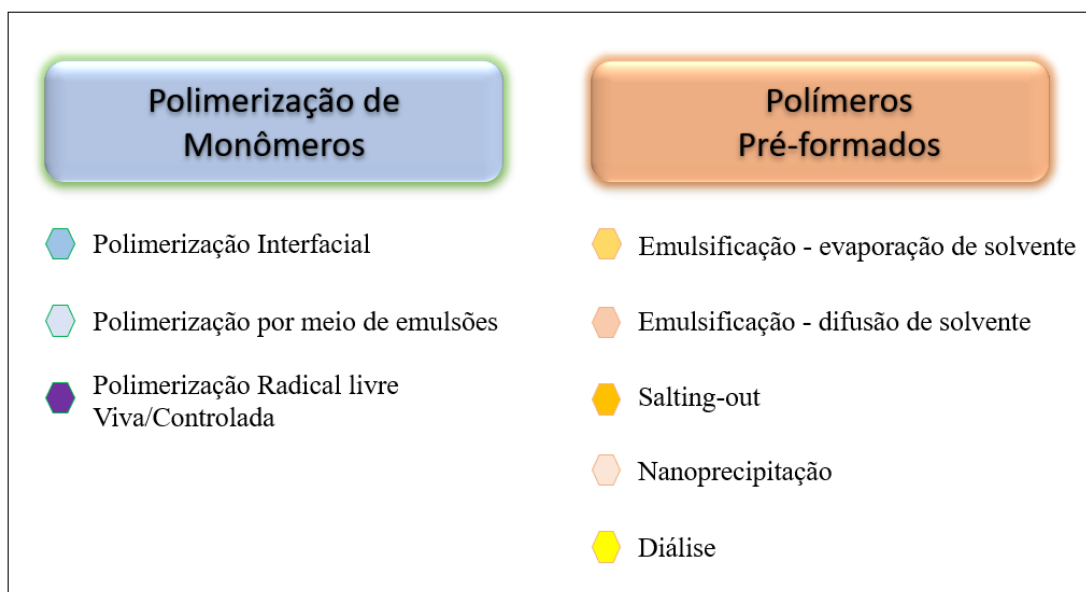


Figura 4: Técnicas de Obtenção de NPPs.

Fonte: Autor

O método usado na formação das NPPs deste trabalho pode ser considerado uma combinação de várias metodologias, se aproximando do sistema de emulsificação por evaporação do solvente, com algumas contribuições do sistema de nanoemulsão. Com isso, reuniu-se algumas informações da literatura, desses métodos de desenvolvimento de nanopartículas, que foram divididas conforme a classificação apresentada na figura 4.

3.3.1.1. Obtenção por Polimerização de Monômeros

1) Polimerização Interfacial

A polimerização interfacial envolve a polimerização por etapa de dois monômeros ou agentes reativos, que são dissolvidos respectivamente em duas fases imiscíveis e a reação ocorre na interface dos dois líquidos (GAO *et al.*, 2004).

Para Fernandes (2016) a polimerização interfacial consiste em um método de preparação de NPPs, onde a polimerização do monômero ocorre apenas na interface da gota. Geralmente esta polimerização é uma reação de policondensação entre dois monômeros altamente reativos que são dissolvidos em dois líquidos imiscíveis como mostram Raaijmakers e Benes (2016). Xu *et al.* sintetizaram com êxito nanopartículas hidrofóbicas de Polianilina por este método de polimerização interfacial.

2) Polimerização por Meio de Emulsões

Esse sistema pode ser dividido em macroemulsões, microemulsões e nanoemulsões, que são dispersões coloidais (tamanho de gota <100 nm) (ESFANJANI e JAFARI, 2017). Para Rao e Sowbhagya (2017) as nanoemulsões são sistemas de não-equilíbrio com uma tendência espontânea a separar-se nas fases constituintes. No entanto, as nanoemulsões possuem uma estabilidade cinética relativamente alta, mesmo durante vários anos, devido ao seu tamanho muito pequeno, essencialmente a consequência da estabilização estérica significativa entre gotículas.

Conforme Pathania *et al.* (2018) as nanoemulsões são emulsões ativamente estáveis nas quais moléculas de surfactantes são usadas para estabilizar fases Água/Óleo ou Óleo/Água, reduzindo sua tensão superficial e às vezes usando co-surfactante. O sistema é obtido através de um equipamento de alto cisalhamento. Existem inúmeras razões pela utilização de nanoemulsões, dentre elas, destaca-se a alta estabilidade e a baixa taxa de turbidez, o que torna atraente esses sistemas de entrega. Benjemaa *et al.* (2018) nanoencapsulou o OE de *Thymus capitatus* como conservante natural de alimentos por meio do método de nanoemulsão. Já Ghasemishahrestani *et al.* (2015) sintetizaram nanopartículas de gelatina com extrato de plantas sintonizáveis também por este método.

A produção de nanoemulsões pode ser amplamente classificada como abordagens de alta energia ou baixa energia, dependendo do princípio subjacente. De acordo com Anandharamkrishnan (2014), as abordagens de alta energia interrompem as fases oleosa e aquosa em minúsculas gotículas usando dispositivos mecânicos como homogeneizadores de alta pressão, microfluidificadores e sonificadores. Em abordagens de baixa energia, as condições ambientais (temperatura ou composição) são alteradas, por exemplo: métodos de inversão de fase e emulsificação espontânea.

3) Polimerização Radical Livre Viva/Controlada

Conforme Oliveira (2011) as reações de polimerização via radicais livres ocorrem basicamente ao longo de três etapas:

Iniciação - são gerados os radicais livres que dão início à reação de polimerização;

Propagação - ocorre o crescimento da cadeia polimérica, por intermédio de seguidas incorporações de monômeros à espécie ativa em crescimento;

Terminação - ocorre a perda de atividade da espécie ativa em crescimento.

Farcet, Nicolas e Charleux (2002) por meio deste método sintetizaram NPPs de poli-(butil acrilato). De acordo com Allouche (2013), propriedades adequadas de nanopartículas podem ser obtidos através da otimização de diferentes parâmetros nesse método, como a natureza e a concentração do monômero, surfactante e iniciador, mas acima de tudo o tipo e concentração do agente mediador (controle).

3.3.1.2. Obtenção por Polímeros Pré-formados

1) Emulsificação - Evaporação de Solvente

O método de emulsificação - evaporação de solvente envolve a emulsificação da solução polimérica em uma fase aquosa e a evaporação do solvente polimérico. Desta forma, um ativo é disperso na rede da matriz polimérica (PAREDES, ASECIO, *et al.*, 2016).

Allouche (2013) relata que solventes como diclorometano e clorofórmio são os mais utilizados, mas podem ser substituídos por acetato de etila, que possui um teor tóxico menor, podendo adaptar-se de maneira mais eficiente à síntese de sistemas de liberação controlada aonde o encapsulamento de fármacos geralmente está envolvido. Nanopartículas poliméricas contendo ciclosporina foram desenvolvidas com êxito utilizando este método por Jaiswal, Gupta e Kreuter (2004).

2) Emulsificação – Difusão de Solvente

Consiste na formação de uma emulsão convencional O/A entre um solvente parcialmente miscível em água contendo o polímero e a droga e uma solução aquosa contendo um surfactante. (CRUCHO e BARROS, 2017). Nanopartículas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) contendo o estradiol foram sintetizadas por meio deste método (ESMAEILI, ATYABI e DINARVAND, 2008)

Nesta técnica, a fase orgânica composta pelo solvente miscível em água com o polímero já dissolvido é previamente saturada em água, e a fase aquosa saturada com

solvente. Ao adicionar água neste sistema, as NPPs precipitam, permitindo a difusão do solvente para a fase aquosa. (FERNANDES, 2016)

3) Salting-out

Nanopartículas podem ser preparadas usando esta técnica de emulsão que evita surfactantes e solventes clorados e envolve processo entre dois solventes miscíveis para separação de fases (D'MELLO, SUDIP e DAS, 2009).

A emulsão, pode portanto, ser formada com um polímero dissolvido nas gotículas de solvente. A precipitação de partículas é induzida, como no processo de difusão de solvente, diluindo a emulsão e adicionando uma grande quantidade de água na fase contínua para reduzir a concentração de sal e causar a extração do solvente das gotículas (ALLOUCHE, 2013). Por meio deste método, nanopartículas de poli (óxido de etileno) foram desenvolvidas por Jaeghere *et al.* (1999).

4) Nanoprecipitação

O método de nanoprecipitação baseia-se na emulsificação espontânea da fase interna orgânica que contém o polímero dissolvido, o fármaco e o solvente orgânico na fase externa aquosa. A técnica de nanoprecipitação envolve a precipitação de um polímero a partir de uma solução orgânica e a difusão do solvente orgânico no meio aquoso. (PAREDES *et al.*, 2016). Esta técnica é baseada na deposição interfacial devido ao deslocamento de um solvente com o não solvente (HORNIG, HEINZE, *et al.*, 2009).

O método de nanoprecipitação, cuja vantagem é a formação espontânea, simples, eficiente e reproduzível de pequenas partículas que exibem uma alta capacidade de carga de drogas, é muito usado para formular NPPs destinadas a aplicações cutâneas, (GUTERRES, ALVES e POHLMANN, 2007). Usando o método de nanoprecipitação, com algumas modificações, Silva *et al.* (2018) encapsulou o OE de *Piper aduncum* e *Piper hispinervum* em nanopartículas de gelatina, tendo um excelente resultado contra *Aedes aegypti* Linn.

5) Diálise

Neste método, tubos de diálise ou membranas semipermeáveis (matriz de polímeros reticulados esponjosa) são usados como barreira física para o polímero. Geralmente, o polímero é dissolvido em um solvente orgânico, colocado dentro da membrana de diálise (CRUCHO e BARROS, 2017).

Em seguida, a solução polimérica é alimentada numa membrana de diálise que é colocada em contato com água. Esta água é permeada pela membrana, provocando o deslocamento do solvente através da membrana para a fase aquosa. A troca de compostos pela diálise causa a redução da solubilidade do polímero na mistura resultante, favorecendo a precipitação do mesmo na forma de nanopartículas (FERNANDES, 2016). NPPs de poli(estireno-coácido acrílico) e poli(acetato de vinila usando Dimetilacetamida como solvente, foram sintetizadas por Horning *et al.* (2019) utilizando este método.

3.3.2. Uso de Polímeros como Material de Parede

Os polímeros naturais são aqueles derivados de plantas e animais. Polímeros naturais tais como proteínas, enzimas, amidos e celulose são importantíssimos em processos biológicos e fisiológicos. Os polímeros sintéticos podem ser produzidos economicamente e suas propriedades podem ser determinadas (CALLISTER e RETHWISCH, 2012).

Materiais de encapsulamento, como os polímeros quitosana, ciclodextrina, albumina, globulina, maltodextrina e amido, etc., têm sido utilizados nos diferentes sistemas de entrega para proteger os OEs de fatores intrínsecos e extrínsecos como pH, atividade da água, degradação enzimática, temperatura e umidade relativa e ambiente de armazenamento. Para Esfanjani e Jafari (2017), algumas propriedades principais de biopolímeros, como as atividades antimicrobianas, atividades antioxidantes e seu papel na melhoria do valor textural e nutricional de produtos alimentícios oferecem a possibilidade de aplicá-los como uma boa nanoencapsulação em formulações alimentares.

Polímeros biocompatíveis podem ser de origem sintética, como a poli- ϵ -caprolactano (PCL), ou origens naturais, como a gelatina. Essas partículas são preparadas por diversas técnicas (PEDRO *et al.*, 2013). Uma série de técnicas para a obtenção de NPPs encontra-se discutida de forma extensiva na literatura, como a emulsificação/evaporação ou difusão de solvente, nanoprecipitação, a formação de partículas com fluidos supercríticos, polimerização em miniemulsão dentre outras (BUZANELLO, 2013). No entanto, antes da formulação do material de encapsulação, alguns fatores a saber, como a polaridade dos compostos ativos, a solubilidade, a volatilidade, a disponibilidade e a composição da matriz devem ser levados em consideração.

De acordo com Naidu e Paulson (2011) as NPPs preparadas com polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, como o ácido polilático (PLA), o ácido poliglicólico (PGA) e a PCL, podem ser capazes de controlar a liberação do fármaco, promovendo um alto encapsulamento e melhorando a biodisponibilidade.

A quitosana vem recebendo muito interesse no encapsulamento de compostos bioativos devido a sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade (HOSSEINI *et al.*, 2013). Assim, como a quitosana, a gelatina também tem sido usada com sucesso nas NPPs portadoras de drogas e moléculas bioativas. O interesse no uso de gelatina como material biodegradável é baseado no fato de que a gelatina é aprovada pela Food and Drug Administration (FDA), biodegradável, não-tóxica, de fácil reticulação e de modificação química (SILVA *et al.*, 2018). A gelatina é obtida pela hidrólise do colágeno, que é encontrada como o principal componente da pele, ossos e tecido conjuntivo é um dos materiais protéicos. A gelatina de natureza polianfolítica tem uma ampla gama de pesos moleculares e, portanto, é difícil preparar nanopartículas monodispersas estáveis (GHASEMISHAHRESTANI *et al.*, 2015). Os três tipos de gelatina, são: Gelatina Tipo A, obtido de fontes de suínos, Gelatina Tipo B obtido de origem bovina e um terceiro tipo de gelatina de fontes marinhas (XIAO, XU e ZHU, 2017). Na tabela 2, apresenta-se alguns dos principais polímeros usados como material de parede.

Tabela 2. Lista de Polímeros Naturais e Sintéticos Utilizados para a Nanoencapsulação.

Polímeros Naturais	Monómeros/Polímeros Sintéticos
Quitosana	Polietilenoglicol (PEG)
Alginato	Polietilenoglicolide (PEGA)
Fibrina	Polioxietileno/Polipropileno
Colágeno	Poli- ϵ -caprolactano (PCL)
Gelatina	Poli-ácido ι -lático (PLA)
Dextrano	Poli- β -hidroxibutirato (PHB)

Fonte: (RAWAT *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006)

As NPPs também podem ser formadas promovendo a autoassociação ou agregação de biopolímeros, podendo levar como componentes funcionais, vitaminas, agentes antimicrobianos, beta-caroteno como corante e muitos outros componentes diferentes (PAREDES *et al.*, 2016).

Conforme Li *et al.* (2012), as NPPs com revestimento autoassociado apresenta alta capacidade de carga no núcleo hidrofóbico e liberação controlada da carga útil do

revestimento hidrofílico, juntamente com os atributos exclusivos de estabilidade e transporte controlado que surgem da reticulação (LI, *et al.*, 2012). Ryu *et al.* (2010) associou o nanogel de polímero precursor a um copolímero aleatório que contém oligoetilenoglicol e piridildissulfeto como funcionalidades da cadeia lateral, que podem encapsular não-covalentemente moléculas hóspedes lipofílicas. Os autores analisaram o controle de tamanho e avaliação desses nanogéis como potenciais veículos de entrega de medicamentos dessas nanopartículas. Li *et al.* incorporaram a poli-(carboxibetaína), um novo material polimérico não incrustante, como revestimento auto-associado na poli-(ácido acrílico), de núcleo poli-(ácido láctico), para comparar a farmacocinética *in vivo* com os seus análogos funcionalizados.

Um agente que também tem um papel fundamental em muitas formulações de nanopartículas biopoliméricas é o emulsificante, agente de interface, tensoativo, conhecido também encontrado como surfactante.

Os agentes emulsificantes têm como função reduzir a tensão interfacial, por isso, são considerados tensoativos. Estes agem reduzindo essa resistência e facilitando a fragmentação em partículas menores agindo contra a coalescência das gotículas (BASTO *et al.*, 2016). Uma seleção cuidadosa do tipo de emulsificante permite controlar as propriedades interfaciais como carga, espessura (dimensões), reologia e resposta a estresses ambientais (como pH, força iônica, temperatura e atividade enzimática (MAHMOUD, RAMADAN e ASHOUSH, 2014). Os surfactantes das séries TWEEN e SPAN são comuns para estabilização de nanoemulsões (FRANZOL e REZENDE, 2015).

O monoestearato de sorbitano (SPAN 60), é um éster obtido pela reação de sorbitano (derivado do sorbitol) com o ácido esteárico. Este é um tensoativo não iônico que segundo apresenta um valor de BHL de 4,7. Já o Monolaurato de polioxietilenosorbitano (TWEEN 80), é um éster de sorbitano etoxilado, resultante da reação de um éster de sorbitano com o óxido de eteno. Trata-se de um tensoativo não iônico, solúvel em água e com um valor de BHL de 15,0. (DELGADO, 2013)

Deste modo, a seleção do constituinte da matriz e do tensoativo depende de muitos fatores, incluindo tamanho, propriedades do fármaco, carga e permeabilidade; grau de biodegradabilidade, biocompatibilidade e toxicidade (GHASEMISHAHRESTANI *et al.*, 2015). As matrizes são usadas com vários métodos para criar o encapsulamento de OE com diferentes estruturas, capacidades e perfis de liberação. (MAES, BOUQUILLON e FAUCONNIER, 2019). Para a síntese de tais nanopartículas biodegradáveis, é necessário procurar um método verde de síntese e uso de estabilizadores que sejam biogênicos e não

tóxicos para o desenvolvimento do sistema de liberação. Os métodos convencionais utilizam substâncias químicas tóxicas, como o álcool polivinílico, o polietilenoglicol, etc., como estabilizadores (GARCÍA-ESTEPA, 2018; NASROLLAHZADEH *et al.*, 2019).

3.4. Liberação Controlada de Ativos

Os sistemas de liberação controlada são dispositivos capazes de fornecer ao local de ação certa quantidade de uma substância biologicamente ativa, visando altos efeitos, controlando a taxa de liberação e o tempo de liberação. O objetivo principal dos sistemas de liberação controlada é manter uma concentração constante do composto biologicamente ativo, que deve ser a concentração desejada (que está entre a concentração efetiva mínima e a concentração tóxica mínima) por um tempo estabelecido (ROGOBETE *et al.*, 2016).

Um sistema de liberação controlada ideal deve apresentar características mínimas, tais como: rápido alcance da concentração terapêutica e manutenção dentro desta, não deve ser sensível ou com possibilidade de bloqueio por fatores ambientais (NICOLETTI e FRASSON, 2006)

Existem alguns tipos de liberação controlada apresentada por encapsulantes poliméricos. Estes encapsulantes, normalmente, podem liberar o agente ativo através de tais mecanismos (Figura 5):

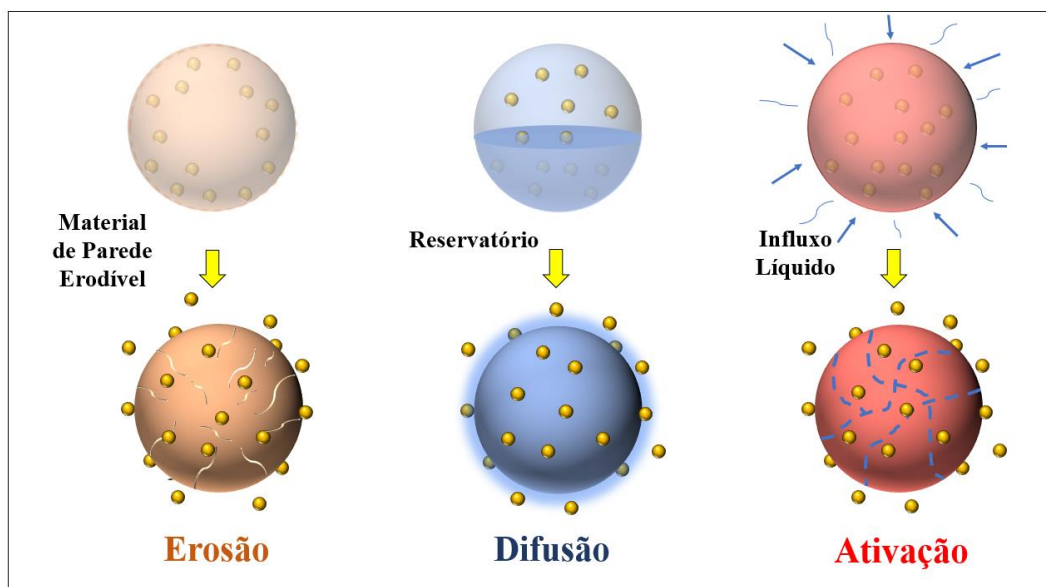


Figura 5: Ilustração dos Mecanismos de Liberação Controlada.

Fonte: Autor

- Liberação ativada por degradação/erosão

Neste mecanismo, os polímeros são transformados em pequenas e solúveis moléculas pela clivagem de suas cadeias. Durante este processo de degradação eles permitem a liberação da substância ativa. Este mecanismo é o que está relacionado à definição de biodegradável, onde a taxa de liberação é dependente do material de parede escolhido. Os principais polímeros que sofrem este mecanismo de erosão são os poliésteres (PCL, PLA e PLGA), as poliamidas, os poliaminoácidos, os polialquilacrilatos e os poliortoésteres. (FIALHO e CUNHA JR, 2007)

- Liberação controlada por difusão

A difusão controlada pode ocorrer a partir de um reservatório, em que o fármaco fica envolto por um filme polimérico ou pela distribuição uniforme do fármaco em uma matriz, difunde-se lentamente através de um gradiente de concentração (SOUZA, 2007). Se a concentração externa do fármaco for constante e não saturada, haverá um diferencial fixo de concentração entre o interior e o exterior. Desse modo, uma taxa constante de difusão K do fármaco ocorrerá no dispositivo, onde K é uma constante que variará com a geometria do dispositivo e a composição do polímero a partir do qual foi feito (GRAHAM, 1978).

- Ativação

Um terceiro tipo de mecanismo envolve o processo de ativação por solvente. Neste caso as cadeias poliméricas são quebradas pela clivagem de suas ligações intermoleculares, de modo que durante essa degradação ocorre a liberação do agente ativo (SILVA, 2019). A liberação do agente ativo nesse sistema, normalmente é induzida pela taxa de intumescimento do polímero. Dependendo da magnitude relativa da taxa de intumescimento do polímero e da taxa de difusão do agente ativo, é possível obter diferentes perfis de liberação (CHIEN, 1992).

O mecanismo de liberação escolhido também interfere na escolha do polímero usado para o material de parede. Para se chegar ao mecanismo desejado de liberação do agente ativo, os polímeros (sintéticos) podem ter suas propriedades moldadas ou pode-se trabalhar com uma mistura de polímeros (natural e sintético) que apresentam propriedades diversas (OLIVEIRA e LIMA, 2006).

As taxas de liberação de sistemas poliméricos podem ser controladas pela natureza e formato do material de parede. Sistemas do tipo reservatório são adequados para liberar o agente ativo a uma taxa quase constante, enquanto que sistemas matriciais são menos uniformes. Os sistemas controlados quimicamente resultam geralmente na degradação total da matriz, enquanto os sistemas ativados por solvente têm taxa de liberação independentes do pH (BIZERRA e SILVA, 2016).

3.4.1. Modelos de Liberação Controlada

Os materiais poliméricos geralmente liberam o agente ativo através de mais de um mecanismo de liberação, tais mecanismos podem atuar simultaneamente. Podem-se identificar os mecanismos atuantes, por meio de alguns modelos propostos por matemáticos, que descrevem as características de liberação do sistema.

- Cinética de ordem zero

A liberação do agente ativo acontece lentamente a partir de matrizes que não desagregam, desde que a sua área não se atinjam condições de equilíbrio (MANADAS *et al.*, 2002). Este modelo pode ser representado pela seguinte equação:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (1)$$

Onde:

Q_t é a quantidade do agente ativo liberado no tempo t ;

Q_0 é a quantidade inicial do ativo no meio de liberação;

K_0 é a constante de liberação de ordem zero.

Este modelo é geralmente utilizado para descrever a liberação por vários tipos de formas farmacêuticas de liberação controlada, como é o caso das cápsulas matriciais, dos sistemas osmóticos e das formas revestidas (VARELAS, DIXON e STEINER, 1995).

- Cinética de primeira ordem

A cinética deste modelo apresenta um perfil de liberação do agente ativo proporcional à quantidade interna da matriz, de tal modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui (MANADAS *et al.*, 2002). A equação que representa este modelo é:

$$\log Q_t = \log Q_{Q_0} + \frac{K_1 t}{2,303} \quad (2)$$

Onde:

Q_t é a quantidade do agente ativo liberado no tempo t ;

Q_0 é a quantidade inicial do ativo no meio de liberação;

K_1 é a constante de liberação de primeira ordem.

Esse modelo é indicado para descrever a cinética de liberação de sistema transportador “revestimento-núcleo não saturado”, pois o transporte molecular do agente ativo não é constante através da membrana polimérica JAIN e JAIN (2016, apud CASTRO, 2018).

- Equação de Higuchi

A equação de Higuchi (1961) é utilizada para representar a velocidade de liberação controlada do agente ativo a partir de um sistema matricial. A equação de Higuchi é expressa pela seguinte forma:

$$f_t = K_H t^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

Onde:

f_t é a quantidade do agente ativo liberado;

K_H é a constante de liberação de Higuchi.

Este modelo pode-se aplicar com maior exatidão a matrizes unidimensionais pouco solúveis, que não apresentem capacidade de intumescimento (LOPES, LOBO e COSTA, 2005).

- Korsmeyer-Peppas

O modelo matemático elaborado por Korsmeyer-Peppas (1983) é relacionado com a liberação do agente ativo ao longo do tempo. Esta equação é geralmente utilizada para interpretar e descrever a liberação do agente ativo quando o mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes (LOPES, LOBO e COSTA, 2005). A equação que representa este modelo é:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad (4)$$

Onde:

M_t é a quantidade do agente ativo liberado no tempo t ;

M_∞ é a quantidade total do agente ativo em um tempo infinito;

$\frac{M_t}{M_\infty}$ é a fração do agente ativo liberado ao longo do tempo t ;

K é a constante de difusão;

n é o expoente de liberação que caracteriza o mecanismo de liberação.

O valor n pode ser variado, em que $n = 0,43$ apresenta um mecanismo de difusão Fickiano, $n = 0,89$ apresenta um intrumescimento do polímero e $0,43 < n < 0,89$ apresenta um mecanismo de difusão anômala (difusão e erosão).

Este modelo é geralmente utilizado para descrever de forma simplificada os mecanismos de liberação onde ocorre uma difusão do agente ativo (transporte Fickiano) controlada pelo relaxamento das cadeias poliméricas (SILVA, 2019 apud RITGER; PEPPAS, 1987).

3.5. Caracterização de Nanopartículas Poliméricas

A caracterização é importante para determinar a forma, tamanho, estrutura, carga e etc. A caracterização de nanopartículas pode ser amplamente dividida em dois domínios. A primeira classificação é aquela que trata da determinação das propriedades físicas das nanopartículas, como: forma, tamanho, estrutura ou dispersão. A outra envolve a determinação de características químicas, como a presença de uma molécula conjugada ou ligantes e a estabilidade de um sistema coloidal.

O avanço da nanociência e da nanotecnologia nos trouxe uma grande variedade de técnicas analíticas para a caracterização de sistemas particulados. Atualmente, existem inúmeras técnicas aplicadas na caracterização de NPP. Os métodos descritos abaixo são os mais comuns na rotina de desenvolvimento, controle ou manipulações de propriedades desse nanossistema.

- Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica amplamente utilizada para investigar a estrutura superficial das micro e nanoestruturas. Conforme Paredes et al. (2016), nesta técnica um feixe de elétrons de uma fonte (geralmente tungstênio) sob a influência de um campo eletromagnético (gerado pelas lentes eletrostáticas) atinge a superfície da amostra. Depois disso, os elétrons são difratados em diferentes direções e geram uma série de sinais que podem ser visualizados na tela.

- Microscopia de Força Atômica – AFM

A microscopia de Força Atômica (AFM) é capaz de produzir até imagens em escala subnanométrica e de topografias tridimensionais, demonstrando uma ampla gama de aplicações na investigação das características físicas e propriedades mecânicas de sistemas particulados. A compreensão das características físicas e mecânicas desse sistema é crucial para o entendimento do carregamento, das condições ambientais suportáveis, para prever o comportamento e a integridade durante o manuseio, armazenamento e transporte, considerando que as NPPs usadas como transportadores de bioativo devem ser projetadas para se romperem comedidamente sob o estímulo de uma mudança nas condições ambientais, sendo capaz de entregar uma medida ponderada do bioativo ao alvo. A investigação das características físicas de NPPs por meio de um AFM se dá por meio de uma abordagem morfológica completa. No entanto, estudos de propriedades mecânicas de NPPs ainda são escassos. Alguns estudos de propriedades mecânicas de diferentes tipos de nanopartículas já foram relatados, com auxílio de curvas de indentação (Curvas de Força x Distância) extraídas de um AFM. Recentemente, surgiu um novo método conhecido como *Peak-force Tapping* que pode ser uma alternativa para a compreensão de algumas dessas propriedades, como a força de adesão e a deformação.

Na técnica de AFM, a ponta que compõe o sistema se aproxima da amostra a uma distância muito pequena, em que os primeiros átomos da ponta interagem com os átomos que compõem a superfície da amostra. Com relação à geração de imagens em AFM, existem três modos de operação: o modo contato, o modo *tapping* e o modo não contato. No modo de contato, a sonda e a superfície da amostra entram em contato com a distância de separação mínima. No modo não contato, o cantilever AFM e a superfície da amostra não entram em contato e mantêm uma distância de $0,1 \times 10^9$ nm. No modo *tapping* o regime ora é atrativo, ora é repulsivo, conhecido como contato intermitente.

Ao longo da varredura, o *cantilever* (ponteira/haste que sustenta a ponta do AFM) sofre deflexões por causa da interação atômica, desviando o laser que incide sobre ele. O laser é detectado por um fotodiodo que envia essas informações de desvio do *cantilever* para o controle de realimentação que ajusta a posição da amostra (e/ou da ponteira) e para o computador onde é construída a topografia digitalizada da superfície da amostra (PINTO, RAMOS e FONSECA FILHO, 2013; KHAN, WANG e FITZPATRICK, 2016; JOHNSON, OATLEY-RADCLIFFE e HILAL, 2017).

- Espectroscopia no Ultravioleta Visível - UV-Vis

Utilizando a técnica de espectroscopia Ultravioleta Visível (UV-Vis) há a possibilidade de constatar a eficiência de encapsulamento de um agente ativo em NPPs carregadas e a liberação desses ativos encapsulados neste sistema, facilitando o estudo de desenvolvimento de novos sistemas particulados. Nesta técnica são medidas a absorvância, propriedade que representa a fração de luz absorvida pela amostra, ou a transmitância, que é a fração de luz que atravessa a amostra (lei de Lambert-Beer). Conforme Sur *et al.* (2019) para calcular a eficiência do encapsulamento de fármacos, uma quantidade especificada de nanopartículas carregadas com fármacos é dissolvida em solvente por centrifugação ou sonicação. A amostra obtida é então filtrada usando a técnica de filtração por membrana, a concentração da amostra deve estar em mg/ml.

- Espalhamento Dinâmico de Luz - DLS

Para analisar o tamanho e distribuição das partículas em nanoescala, tanto o AFM quanto o espalhamento dinâmico de luz (DLS) são comumente utilizados. De acordo com Hoo *et al.* (2008), o princípio básico desse método é observar o movimento das partículas e medir seu movimento browniano. A velocidade das partículas é inversamente proporcional ao tamanho das partículas e é denominada coeficiente de difusão. Os coeficientes de difusão das nanopartículas são determinados primeiro e os diâmetros médios das partículas são calculados a partir desses coeficientes usando a relação de Stokes-Einstein.

- Potencial Zeta

O potencial zeta assume um papel importante na preparação ou destruição de dispersões coloidais, empregado em setores industriais e acadêmicos para monitorar e

ajustar o comportamento dos sistemas coloidais. O potencial zeta é a medida da carga geral que uma partícula adquire em um meio específico e fornece uma indicação da estabilidade potencial de um sistema coloidal. A interação de repulsão eletrostática é usada para medir e controlar a estabilidade da solução. (PAREDES *et al.*, 2016)

- Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica ideal para estudos de sistemas biológicos e médicos, onde há a possibilidade de obter espectros em diferentes estados físicos, o que permite comparar as suas estruturas. Se uma onda eletromagnética atinge a superfície de um meio, uma fração da luz é refletida enquanto que o resto é transmitido para dentro do material. Da parcela da radiação transmitida através da superfície, uma fração desta é absorvida na forma de calor e outra é retransmitida na forma de luz espalhada. A luz emergente apresenta em seu bojo uma pequena parcela composta de frequências diferentes daquela incidente; o processo que rege este fenômeno recebe o nome de espalhamento Raman (RODRIGUES e GALZERANI, 2012). O princípio desta técnica, sucintamente, está baseado no espalhamento inelástico (espalhamento Raman) de uma luz monocromática incidente com a matéria, gerando ou eliminando um fônon de energia, sendo possível, desta forma, fornecer um espectro vibracional característico do material de análise.

- Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR

Nanopartículas com absorções inerentes ao infravermelho ou grupos funcionais presentes em sua superfície podem ser diretamente caracterizadas via espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O entendimento das posições das bandas de absorção IR no espectro como números de onda pode ser utilizada para a identificação dos vários componentes químicos, que podem não ser detectáveis em espectros de espectroscopia de fotoelétrons de raios-X. Os espectros são normalmente representados como o inverso do comprimento de onda, expresso em cm^{-1} . A espectroscopia de infravermelho (IR) fornece informações altamente discriminatórias devido à excitação de transições vibracionais fundamentais específicas das espécies moleculares (LÓPEZ-LORENTE e MIZAIKOFF, 2016; MOHAMED *et al.*, 2017).

- Microscopia de Força Atômica com Infravermelho – AFM-IR

É uma técnica espectroscópica recente que combina a espectroscopia de infravermelho com AFM, podendo ser amplamente inserido nos estudos de nanopartículas poliméricas. Nela, pode-se fazer uma análise IR local de uma amostra; em particular, uma análise IR em uma única partícula de um sistema coloidal, fornecendo ainda uma imagem topográfica. A figura 6 apresenta uma ilustração do princípio de funcionamento do AFM-IR no estudo de nanopartículas.

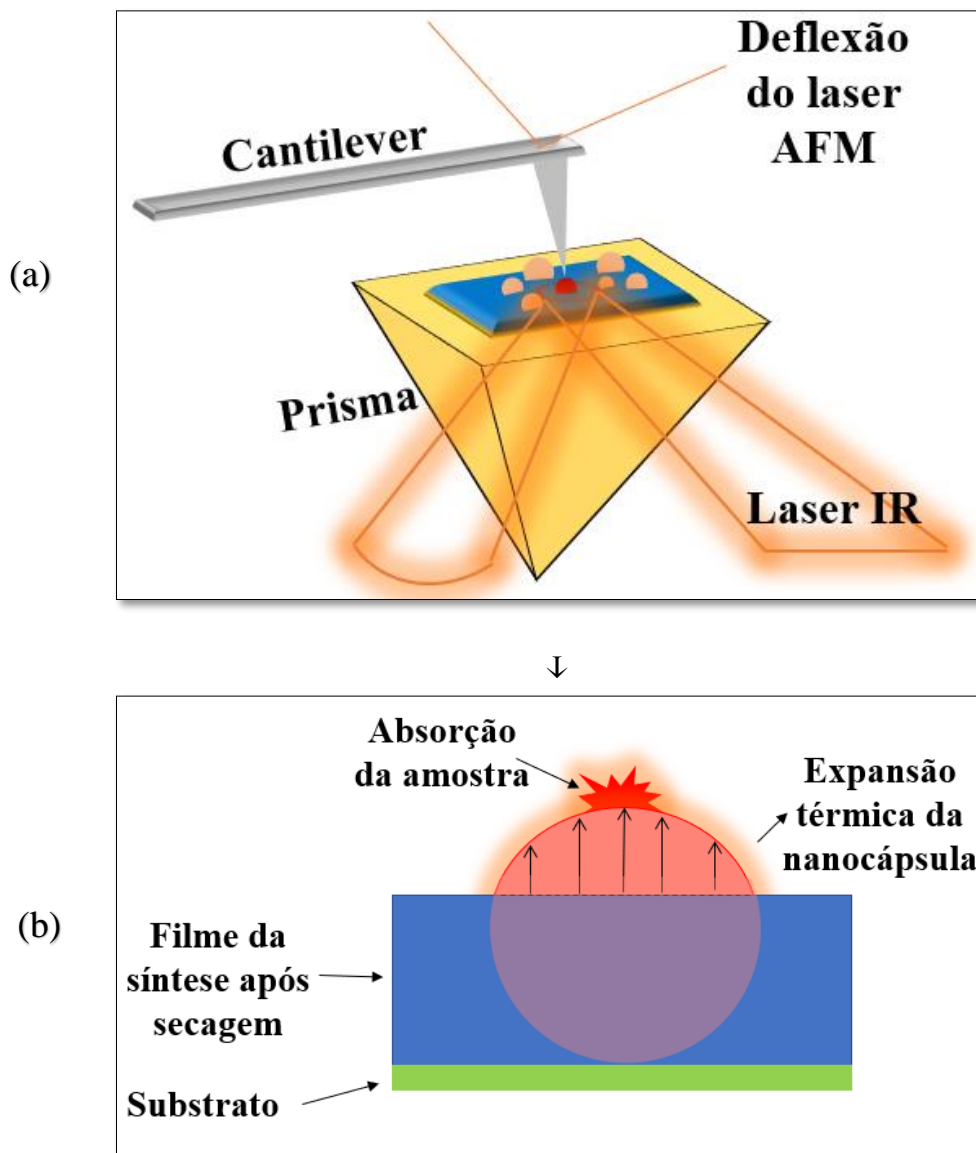


Figura 6: princípio de funcionamento do AFM-IR em análises de Nanopartículas.
Fonte: Autor

O princípio de funcionamento, sucintamente está baseado da seguinte forma: uma região é irradiada por radiação infravermelha pulsada (IR) com uma ponta AFM na

proximidade de sua superfície como visto na figura 6 (a), à medida que o laser varre sua faixa de sintonização, a região da amostra se expande com base em quão bem seus componentes absorvem em diferentes comprimentos de onda. A expansão da região da amostra faz com que a ponta oscile; essas oscilações correspondem diretamente ao espectro de IR da amostra. Consequentemente, o AFM-IR é capaz de fornecer informações químicas e topográficas sobre a superfície da amostra (DAZZI *et al.*, 2007; MORSCH *et al.*, 2017). A figura 6 (a) aborda o funcionamento simplificado do AFM-IR em análises de nanopartículas, contando com o trabalho mútuo de AFM e um IR. A figura 6 (b) mostra o comportamento da nanocápsula mediante o IR. Quando goteja-se uma pequena quantidade da síntese de nanopartículas no substrato de vidro para a análise, forma-se um filme de nanopartículas no substrato. Ao observar tais nanopartículas com o AFM na superfície do filme, estima-se que pouco mais da metade do tamanho das nanopartículas ficam escondidas como observado na figura 6 (b). O IR ao atingir a nanopartícula provoca uma expansão térmica em sua estrutura, devido a absorção da radiação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os procedimentos experimentais que estão divididos em três etapas: os materiais e métodos utilizados na: (i) caracterização do OE de *Piper nigrum*; (ii) síntese das nanopartículas e (iii) caracterização das nanopartículas.

4.1. Óleo Essencial da *Piper nigrum*

4.1.1. Extração do Óleo Essencial

As sementes de *Piper nigrum* foram obtidas no mercado local da cidade de Manaus (norte do Brasil). Elas foram cuidadosamente selecionadas, limpas e lavadas com água para remover as impurezas e depois foram secas em um forno a uma temperatura não superior a 40 ° C. Após a secagem, as sementes foram armazenadas em um frasco selado, longe da luz e da umidade até o momento da extração do OE, antecedido por um processo de trituração para obtenção de sementes em pó.

Uma porção de 300 g de sementes em pó foi submetida à hidrodestilação usando um aparelho do tipo Clevenger modificado por 4 horas a 100° C (BAGHERI, MANAP e SOLATI, 2014) no Laboratório de Polímeros Nanoestruturados- NANOPOL. Após a extração, o volume do OE foi quantificado com o auxílio de uma micropipeta, armazenado em um frasco âmbar e mantido a -18°C.

4.1.2. Determinação das Propriedades Físicas do Óleo Essencial

Para a definição mais adequada do tempo de hidrodestilação, observou-se a variação do volume do OE obtido a cada 30 min. O rendimento do OE foi expresso pela relação entre a massa do óleo obtido após o processo de extração e o material vegetal (GIRARD, 2007). O índice de refração foi obtido utilizando um refratômetro da marca Atago Master Refractometer. A densidade relativa do óleo essencial foi estimada em temperatura ambiente utilizando dois tubos capilares lavados e secos. Um deles foi preenchido com água destilada (m^1) e o outro com óleo essencial (m^2), tendo suas massas determinadas. Outro tubo capilar permaneceu vazio (m) para obter a diferença de massa dos tubos capilares cheios e vazios. O valor da densidade foi obtido de acordo com a equação 5:

$$d = \frac{(m^2 - m^1)}{(m^1 - m)} \quad (5)$$

4.1.3. Identificação Química dos Componentes Voláteis por CG/EM

A cromatografia gasosa (CG/EM) foi realizada no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) - Central Analítica/UFAM, utilizando um instrumento Thermo, modelo Trace GC Ultra, coluna capilar Tr-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) utilizando hélio como gás de arraste a 1.0 mL.min⁻¹. O volume injetado foi de 2 μL de óleo puro diluído em 1 mL de acetato de etila. A temperatura foi de 250°C no injetor e a temperatura do forno foi programada em 40°C (4min), aumentando até 240°C, com acréscimo de 4°C a cada minuto e, em seguida aumentando até 280°C a uma taxa de 10°C durante 2 min. Utilizou-se a Equação de van der Dool-Kratz para os cálculos dos índices aritméticos e a identificação dos compostos do OE foi confirmada usando dados publicados por MCLAFFERTY (1991), bem como através do Registro Wiley 7.0 de Dados Espectrais de Massa por Adams (2007).

4.2. Síntese de Nanopartículas Poliméricas Carreadas

As NPPs podem ser obtidas por diferentes métodos. Dentre as diversas metodologias, o método usado pelo grupo de pesquisa NANOPOL na formação das NPPs pode ser considerada uma combinação de várias metodologias. Este método, leva o desenvolvimento de veículos eficientes para formulações contendo OE.

Nas primeiras formulações, somente o polímero sintético PCL foi utilizado, dando origem a nanopartículas de tamanhos abaixo de 50 nm. Como esta síntese tinha o intuito de ser aplicada como sistema biodefensivo em plantas, tal tamanho de nanopartículas acarretaria em problemas para o metabolismo dessas plantas, podendo adentrar em seus poros. Com isso, a associação da PCL junto a gelatina mostrou resultados promissores, sem aglomeração imediata, viabilizando um possível aumento de tamanho e maior proteção do ativo. Entre a gelatina e a PCL existe um agente de *cross-linking* que é a transglutaminase. A tabela 3 a seguir, apresenta as concentrações de cada item utilizado no desenvolvimento desta formulação.

Tabela 3: Concentrações Utilizadas para a Síntese de 150 mL

Fases	Componentes	Concentração
Orgânica	Gelatina Tipo B	1,0 g
	TWEEN 80	0,3 g
	Água Destilada	150 mL
Aquosa	PCL	0,05 g
	Óleo Essencial	500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$
	SPAN 60	0,1 g
	TACC	0,1 g
	Diclorometano	10 mL
Outros	Transglutaminase	0,0935 g
	NE	0,75 mL

Fonte: Autor

A gelatina e a PCL foram utilizados como material de parede para o aumento de tamanho das nanopartículas e para obter maior proteção do OE, sendo essencial o uso da transglutaminase para ligar os dois polímeros no encapsulamento. TACC, SPAN 60 e TWEEN 80 foram utilizados como surfactantes e o conservante de fenoxietanol/2-metil-2H-isotiazolin-3-ona (NE) para aumentar a durabilidade dessas nanopartículas. A tabela 3 apresenta as concentrações de cada item utilizado.

O encapsulamento do OE foi realizado em duas fases separadas, com base na metodologia de Silva *et al.*, (2018), com algumas modificações.

- **Descrição dos Procedimentos das Fases**

Fase Aquosa: Em um béquer, a gelatina tipo B foi solubilizada em água destilada e aquecida até 50 ° C sob agitação constante (solução I). Em outro béquer, o surfactante TWEEN 80 foi solubilizado em água destilada (solução II). Então, quando a temperatura da solução I diminuiu para 43 ° C, verteu-se a mesma na solução II.

Fase Orgânica: Em um béquer solubilizou-se a PCL em diclorometano (solução III). Em outro béquer, solubilizou-se também em diclorometano, o emulsificante SPAN 60 e o TACC – Triglicérides do Ácido Cáprico e Caprílico (solução IV). Nesta fase, para as sínteses de nanopartículas carregadas, foi adicionado o OE. Previamente solubilizadas, verteu-se a solução III na solução IV.

Após a solubilização, a fase orgânica foi adicionada à fase aquosa usando um ultra-dispersor (10.000 rpm) por 30 segundos. Em seguida, adicionou-se a transglutaminase à solução final sob agitação constante. A solução final foi mantida sob

agitação constante (25 ° C) até evaporação total do solvente. A síntese foi filtrada e o pH final foi ajustado para 8,0. Para as sínteses que seriam analisadas ao longo do tempo, foi adicionado o conservante NE. A seguir, a figura 7 traz uma representação esquemática da metodologia da síntese.

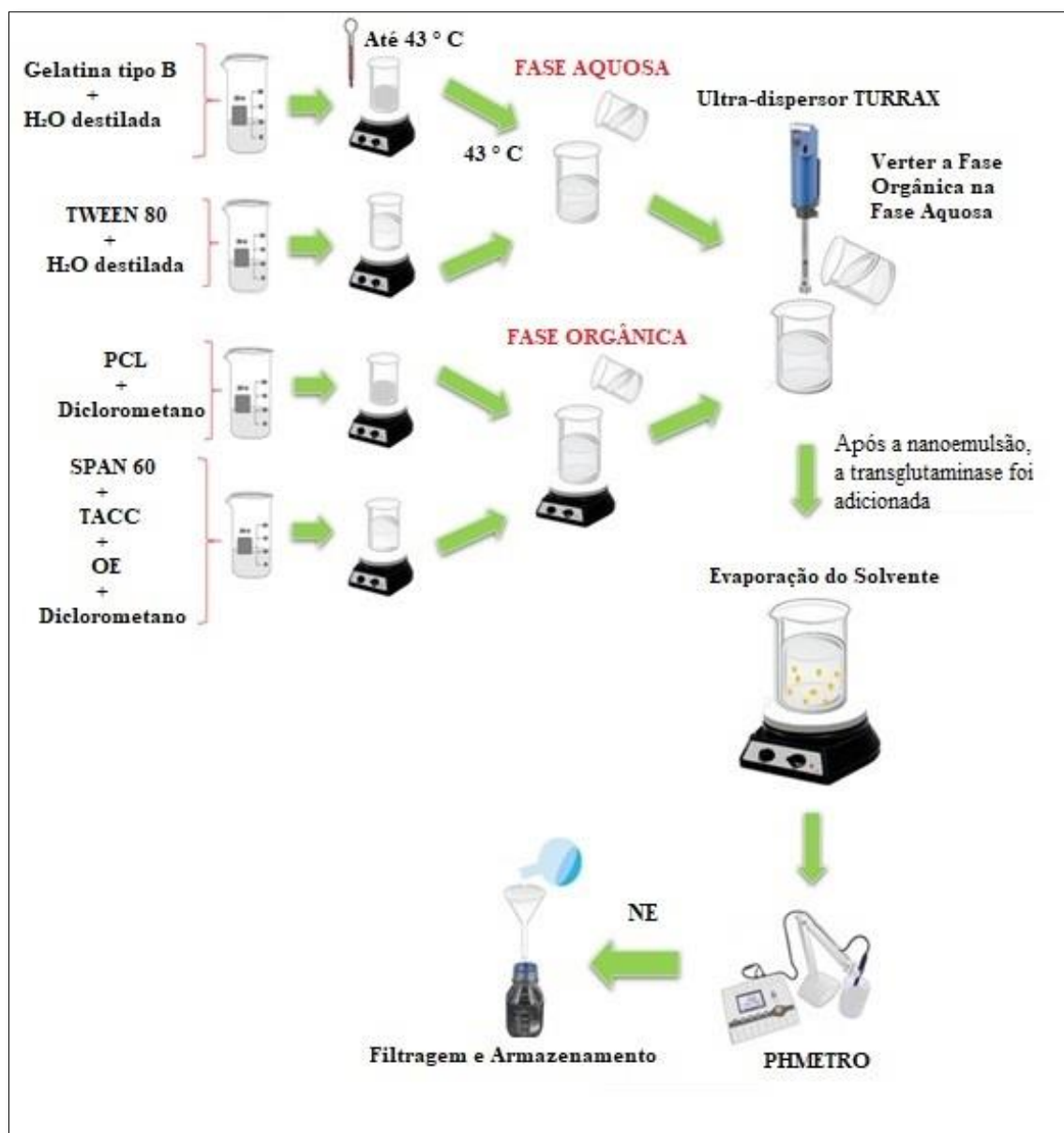


Figura 7: Representação Esquemática da Formulação de Nanopartículas.

4.3. Caracterização das Nanopartículas por Diferentes Técnicas

4.3.1. DLS e Potencial Zeta

As análises de DLS e Potencial Zeta foram realizadas no Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica – LIDETEF da UFAM, utilizando um equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

O diâmetro médio e o índice de polidispersão (PDI) das NPP foram obtidos por meio da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz, sendo que as leituras foram realizadas em triplicata e as medidas efetuadas sob ângulo de espalhamento de 90°. Os valores do potencial Zeta (em mV) foram determinados pela análise de mobilidade eletroforética, em triplicata, a 25°C. A síntese foi diluída em água em uma proporção de 1:100 [v/v].

4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura – MEV

Para a análise de MEV, uma síntese contendo as NPPs foi depositada em abundância numa placa de vidro e seca à temperatura ambiente, criando-se um filme. O filme com as nanopartículas foi então revestido por uma fina camada de material condutor (processo de metalização) sob alto vácuo e depois examinadas. Nesta análise, utilizou-se um MEV da marca Tescan, modelo VEGA3 do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

4.3.3. Microscopia de Força Atômica - AFM

Utilizando uma pipeta, extraíram-se pequenas quantidades das amostras contendo as nanopartículas e gotejou-se em substratos de vidro para o processo de secagem à temperatura ambiente por 3 horas. Em seguida, o substrato contendo a amostra foi fixado gentilmente em um suporte de amostra do AFM usando uma fita adesiva dupla face e levada ao AFM para a análise.

A análise morfológica e estrutural foi realizada no laboratório de Óptica de Materiais – (Optima) na UFAM. As imagens de topografia das NPP foram obtidas por meio de um AFM Innova, Bruker, operando em modo tapping, equipado com uma ponta de silicone e cantilever revestido de Al e com uma constante de mola de 42 N/m (Tap190AL-G da BudgetSensors™, Sofia, Bulgária). As varreduras foram realizadas

em áreas de $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ com 512×512 pixels a uma taxa de varredura de 1Hz. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) e $60 \pm 1\%$ de umidade relativa.

O controle de realimentação foi ajustado à superfície das amostras para obter as melhores imagens possíveis, sendo analisadas e tratadas no software WSXM 5.0 Development 9.1 (Horcas *et al.*, 2007). As imagens de topografia foram ajustadas no plano, para ajuste de iluminação, e a altura média das linhas da imagem foi ajustada com um filtro “flatten” de ordem zero. Além disso, o *software* imageJ foi usado para contabilizar e analisar o tamanho das nanopartículas com base no estudo das aplicações de tratamento de imagens segundo Schneider *et al.*, (2012).

4.3.4. Eficiência de Encapsulamento por UV-Vis

Para estimar a eficiência de encapsulamento (EE) dos OEs (%) nas nanopartículas biodegradáveis de gelatina e PCL, foi utilizado no NANOPOL - UFAM um espectrofotômetro UV-Vis (Global Trade Technology), com base em outro trabalho (GHASEMISHAHRESTANI, MEHTA, *et al.*, 2015) com algumas modificações.

Inicialmente foi realizada uma varredura com o OE da *Piper nigrum*, obtendo o pico máximo de absorção em $\lambda = 229 \text{ nm}$. A curva de calibração foi previamente desenvolvida com diferentes concentrações do ativo em metanol ($1,9$ a $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). As soluções foram analisadas em triplicata e as médias das áreas dos picos referentes a cada concentração foram ajustadas em um gráfico de absorbância versus concentração. A equação da reta e o coeficiente de correlação linear foram calculados pela análise da regressão linear para a obtenção da curva de calibração, como mostrado na figura 8.

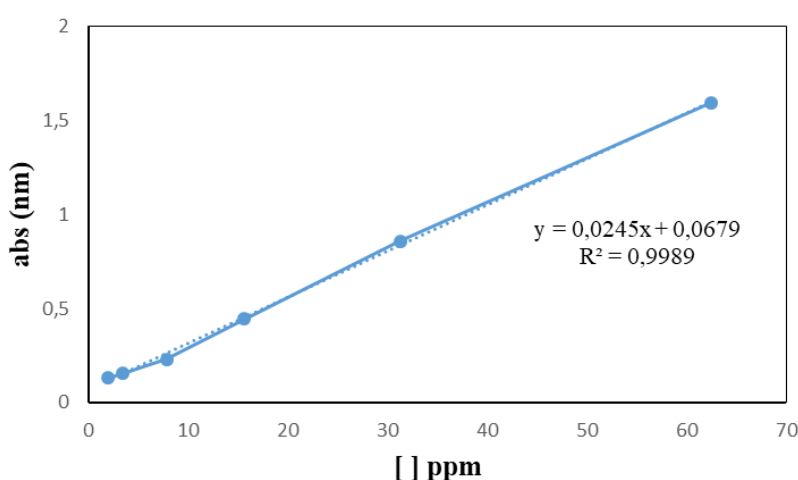


Figura 8: Gráfico da Curva de Calibração do OE de *Piper nigrum*.

O OE encapsulado nos transportadores foi separado dentro da dispersão coloidal. A dispersão fornecida foi centrifugada a 10.000 rpm (DAIKI, modelo DTR20.000) por 10 min e a absorvância do sobrenadante foi usada para determinar a quantidade de OE livre. A EE foi calculada usando a fórmula:

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade de OE encapsulado}}{\text{concentração absoluta de OE utilizada na formulação}} \times 100 \quad (6)$$

4.3.5. Liberação Controlada do Óleo Essencial Nanoencapsulado

Estudos de liberação de OE *in vitro* foram realizados em membrana de celulose contendo 10 mL do sistema coloidal, e suspensa em água a 25°C em diferentes pH (4, 6,10). Porções de 2 mL foram retiradas em diferentes intervalos de tempo, e a concentração do OE nesta alíquota foi medida por absorvância usando o UV-vis.

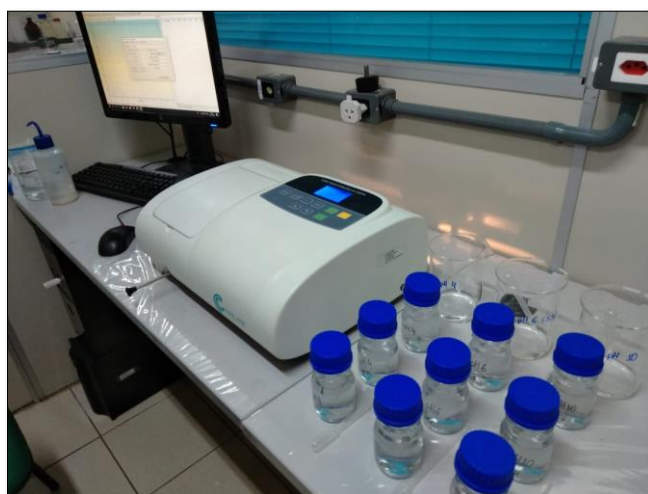


Figura 9: Ensaio de Liberação Controlada do OE *in vitro*.

A quantidade de OE liberado foi determinada através da curva de calibração. Os experimentos foram realizados em triplicata, como mostra a figura 9. A partir dos dados de liberação obtidos, foi realizada a análise dos mecanismos envolvidos no processo de liberação.

4.3.6. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho -FTIR

Os espectros de FTIR das amostras foram obtidos em um Espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier, da marca SHIMADZU e modelo IR

Prestige-21 com software Irsolution versão 1.6. As análises foram realizadas no Laboratório HUB de Tecnologia e Inovação da Escola Superior de Tecnologia – EST (UEA).

Foram realizadas a análise dos materiais de parede, do OE de *P. nigrum* e das sínteses contendo as NPPs carregadas e as NPPs vazias, utilizando somente 1 ml de cada amostra, colocado diretamente na cubeta de quartzo do espectrômetro de infravermelho com pressão constante aplicada, e dados de transmitância infravermelha, coletados sobre o número de ondas que variaram de 3750 cm^{-1} a 500 cm^{-1} e computados para análise. Os espectros de referência foram adquiridos a partir do cristal em branco limpo antes da apresentação de cada amostra replicada. Todos os espectros foram coletados com uma resolução de 1 cm^{-1} e, para melhorar a relação sinal-ruído, 64 varreduras foram co-adicionadas e calculadas a média. As amostras foram realizadas em triplicado e todas foram realizadas dentro de um período de um dia. Nas análises utilizou-se o modo transmitância e apodização Happ-Genzel.

4.3.7. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram produzidos em um espectrômetro Horiba Scientific, modelo Xplora PLUS com um laser Nd: YAG bombeado por diodo, emitindo a 532 nm e um detector de germânio resfriado com nitrogênio líquido, no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – CNPEM.

O instrumento possui uma resolução espacial de $< 1\mu\text{m}$ (XY) e $< 2\mu\text{m}$ (Z), uma objetiva de espelho 100X (LWD NIR), usando filtro de 1%. Comparado com o padrão vertical (arranjo de amostragem), as amostras de nanopartículas carregadas e de nanopartículas vazias foram colocadas horizontalmente no meio de um anel de metal. Diferentemente do das análises de FTIR, nessa análise, amostras precisaram passar pelo processo de secagem. Os espectros foram acumulados a partir de 128 digitalizações medidas com uma resolução de 4 cm^{-1} na faixa de 1800 cm^{-1} a 400 cm^{-1} com potência de laser de 150 mW fornecidos por um feixe de laser sem foco.

4.3.8. Microscopia de Força Atômica com Infravermelho – AFM-IR

As medidas de AFM-IR foram realizadas em um sistema NanoIR2-s (Anasys Instruments) no Laboratório Nacional de Nanotecnologia – LNNano do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM.

As sínteses tiveram que ser diluídas com água destilada, para reduzir a concentração e aumentar a dispersão das nanopartículas. As amostras foram depositadas em substrato de mica e de ouro e secadas à nitrogênio durante 15 min.

As imagens de AFM foram realizadas em modo contato a uma taxa de varredura de 0,1-1 Hz usando uma sonda de nitreto de silício revestida a ouro ContGB-G (BudgetSensors, Bulgária) com 25nm de diâmetro, constante de mola de 0,2N / m e frequência de ressonância nominal de 13 kHz à temperatura ambiente (23 ± 1 °C) e $50 \pm 1\%$ de umidade relativa. Os espectros de nanoescala-IR foram coletados na faixa de 1550 a 1820 cm^{-1} , com uma resolução espectral de 2 cm^{-1} / ponto. Os mapas de topografia foram processados usando o software Gwyddion, versão 2.51.

Os espectros de infravermelho em nanoescala foram coletados diretamente do centro das NPPs, em regiões diferentes de diversas amostras das sínteses com NPPs carregadas e das não carregadas, entre uma faixa de $1850\text{-}1530 \text{ cm}^{-1}$, a uma resolução espectral de 4 cm^{-1} , 256 co-médias, com pelo menos 10 medições.

4.3.9. Medidas de *Peak-Force Tapping*

O método *Peak-Force Tapping* foi utilizado para medir qualitativamente a força de adesão das nanopartículas carregadas, em um instrumento AFM MultiMode8 da BRUKER.

Para esta medida, usou-se um *cantilever* específico (particularmente sondas ScanAsyst-Fluid+ - $kN = 0,7 \text{ N / m}$; Bruker). A temperatura da sala é fixa em torno de 23°C , dentro da caixa do equipamento costuma estar levemente acima, cerca de 23°C , com umidade relativa abaixo de 20%. Esse método opera em modo *tapping* para adquirir informações de algumas propriedades mecânicas (TRTIK, KAUFMANN e VOLZ, 2012). Os mapas de topografia e de adesão foram processados usando o software Gwyddion, versão 2.51.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nessa dissertação foram divididos em duas etapas: (i) caracterização do OE, na qual se apresenta a cinética de extração, o índice de refração, o rendimento e os constituintes voláteis do OE da *P. nigrum*, e (ii) caracterização das NPPs, apresentando a análise morfológica, a eficiência de encapsulamento, a liberação do OE *in vitro*, a análise química das bandas de absorção e uma análise qualitativa das propriedades mecânicas.

5.1. Caracterização do Óleo Essencial de *Piper nigrum*

5.1.1. Determinação das Propriedades Físicas

Com a extração do OE da *P. nigrum* foi possível verificar a cinética de extração (Volume x Tempo), apresentada no gráfico da figura 10, encontrando o tempo ideal do processo de hidrodestilação.

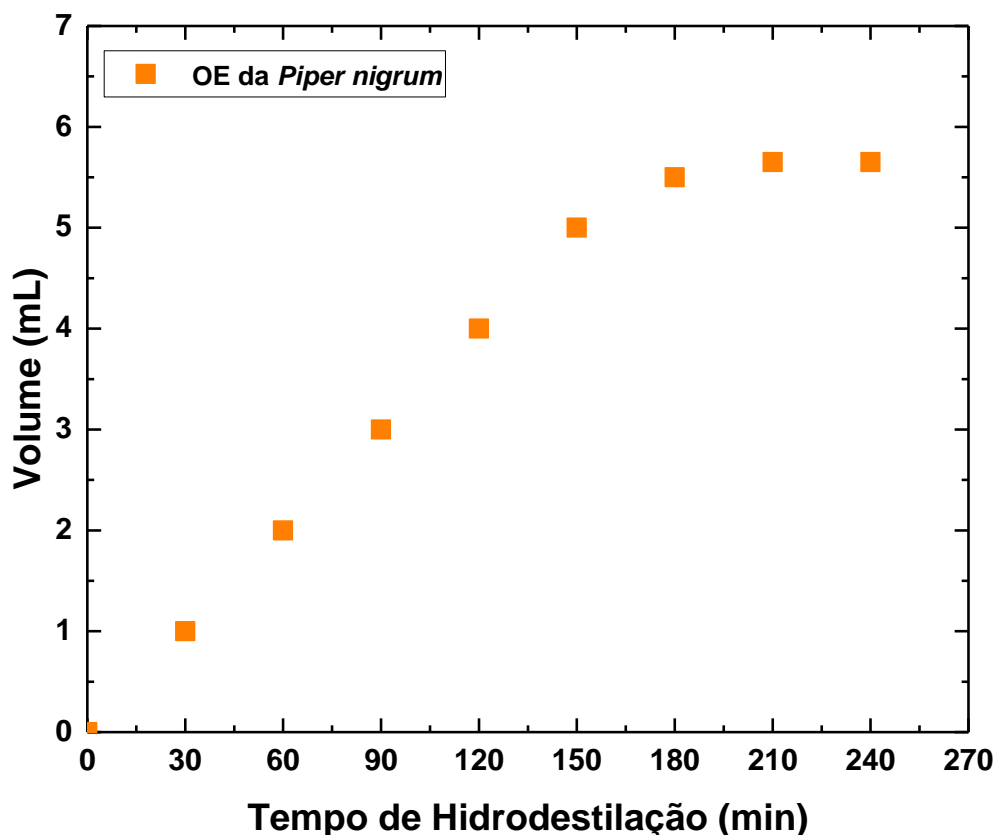


Figura 10: Gráfico da Cinética de Extração do OE de *P. nigrum*.

No estudo da cinética de extração, pode-se verificar que no tempo de 180 min até o tempo máximo observado de 270 min, não houve variação de volume. Logo, o tempo ideal de hidrodestilação está em torno de 180 min, tempo em que o volume ficou constante e sugere-se então o término do processo. O tempo estabelecido neste trabalho é considerado ideal para a extração dos componentes voláteis presente neste OE, tendo em vista que não há alterações no rendimento no tempo de 180 min como já reportado em outras pesquisas conforme Igwe e colaboradores (2010).

O rendimento do OE após processo de hidrodestilação foi de 2,6 %, de acordo com a quantidade de massa vegetal utilizada. Igwe e colaboradores (2010) utilizaram a mesma quantidade de sementes da mesma espécie e encontraram um rendimento de 2,4% demonstrando que ele pode variar devido aos fatores genéticos e ambientais. A densidade do OE foi calculada em 0,780 g/cm³. O índice de refração foi de 1,48, estando dentro da faixa prevista por Farmacopeia brasileira (2010) e pelo trabalho de Abdulazeez e colaboradores (2016).

5.1.2 Determinação dos Constituintes Químicos do Óleo Essencial

Por meio do perfil cromatográfico do OE de *P. nigrum*, foi possível realizar uma caracterização química, identificando 29 componentes voláteis.

Os componentes do OE são apresentados na tabela 4 e as estruturas químicas dos metabolitos identificados estão na figura 11, com destaque para a composição majoritária que está apresentada na cor azul. Alguns dos constituintes majoritários, como o *E*-cariofileno, sabineno, β -pineno, δ -3-careno e α -pineno, são atribuíveis à oxidação lipídica retardada (TONGNUANCHAN e BENJAKUL, 2014). Encontrou-se uma porcentagem significativa dos constituintes ρ -cimeno, α -terpineol, considerados para Brewer (2011), ativos antioxidante, dos constituintes α -pineno, β -pineno, δ -3-careno, limoneno e terpinen-4-ol que segundo Dorman e Deans (2000) inibem o crescimento bacteriano, e do *E*-cariofileno considerado para Santra e seus colaboradores (2005), um constituinte que possui atividades anésteicas.

Tabela 4: Composição Química do OE das sementes de *P.nigrum*.

Nº	Componentes	Fórmula	Área (%)	IR _{lit}	IR _{exp}
1	α -tujeno	C ₁₀ H ₁₆	2,92	924	925
2	α -pineno	C ₁₀ H ₁₆	5,28	932	931
3	Sabineno	C ₁₀ H ₁₆	14,96	969	971
4	β - Pineno	C ₁₀ H ₁₆	3,19	974	972
5	Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	0,87	988	991
6	α - felandreno	C ₁₀ H ₁₆	0,50	1002	1001
7	δ -3-careno	C ₁₀ H ₁₆	2,09	1008	1007
8	ρ -cimeno	C ₁₀ H ₁₄	0,51	1020	1022
9	Silvestreno	C ₁₀ H ₁₆	14,17	1025	1026
10	γ -terpineno	C ₁₀ H ₁₆	2,14	1054	1057
11	Terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	0,56	1086	1087
12	<i>E</i> - hidrato sabineno	C ₁₀ H ₁₈ O	0,15	1098	1100
13	Dehidro sabina cetona	C ₁₀ H ₁₈ O	0,16	1117	1119
14	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	3,95	1174	1176
15	α -terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,21	1186	1190
16	δ -elemeno	C ₁₅ H ₂₄	1,30	1335	1339
17	α - copaeno	C ₁₅ H ₂₄	0,20	1374	1377
18	β -Elemeno	C ₁₅ H ₂₄	0,63	1389	1393
19	<i>E</i> - cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	34,87	1417	1421
20	γ - Elemeno	C ₁₅ H ₂₄	0,29	1434	1436
21	α -guaieno	C ₁₅ H ₂₄	0,14	1437	1440
22	α -humuleno	C ₁₅ H ₂₄	1,70	1452	1455
23	Germacreno D	C ₁₅ H ₂₄	0,20	1480	1482
24	β -selineno	C ₁₅ H ₂₄	1,24	1489	1487
25	α -selineno	C ₁₅ H ₂₄	0,52	1498	1497
26	Germacreno A	C ₁₅ H ₂₄	0,11	1507	1506
27	δ - cadineno	C ₁₅ H ₂₄	0,05	1522	1525
28	Germacreno B	C ₁₅ H ₂₄	1,84	1559	1558
29	Óxido de cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	0,57	1582	1583
Total identified			95,32		
Total de monoterpenos			51,66		
Monoterpenos hidrocarbonetos			47,35		
Monoterpenos oxigenados			4,31		
Total de sesqueterpenos			43,66		
Sesqueterpenos hidrocarbonetos			43,09		
Sesqueterpenos oxigenados			0,57		
Outros			4,68		

Nota: IR_{exp} = Índice de retenção experimental; IR_{lit} = índice de retenção da literatura Adams (2007).

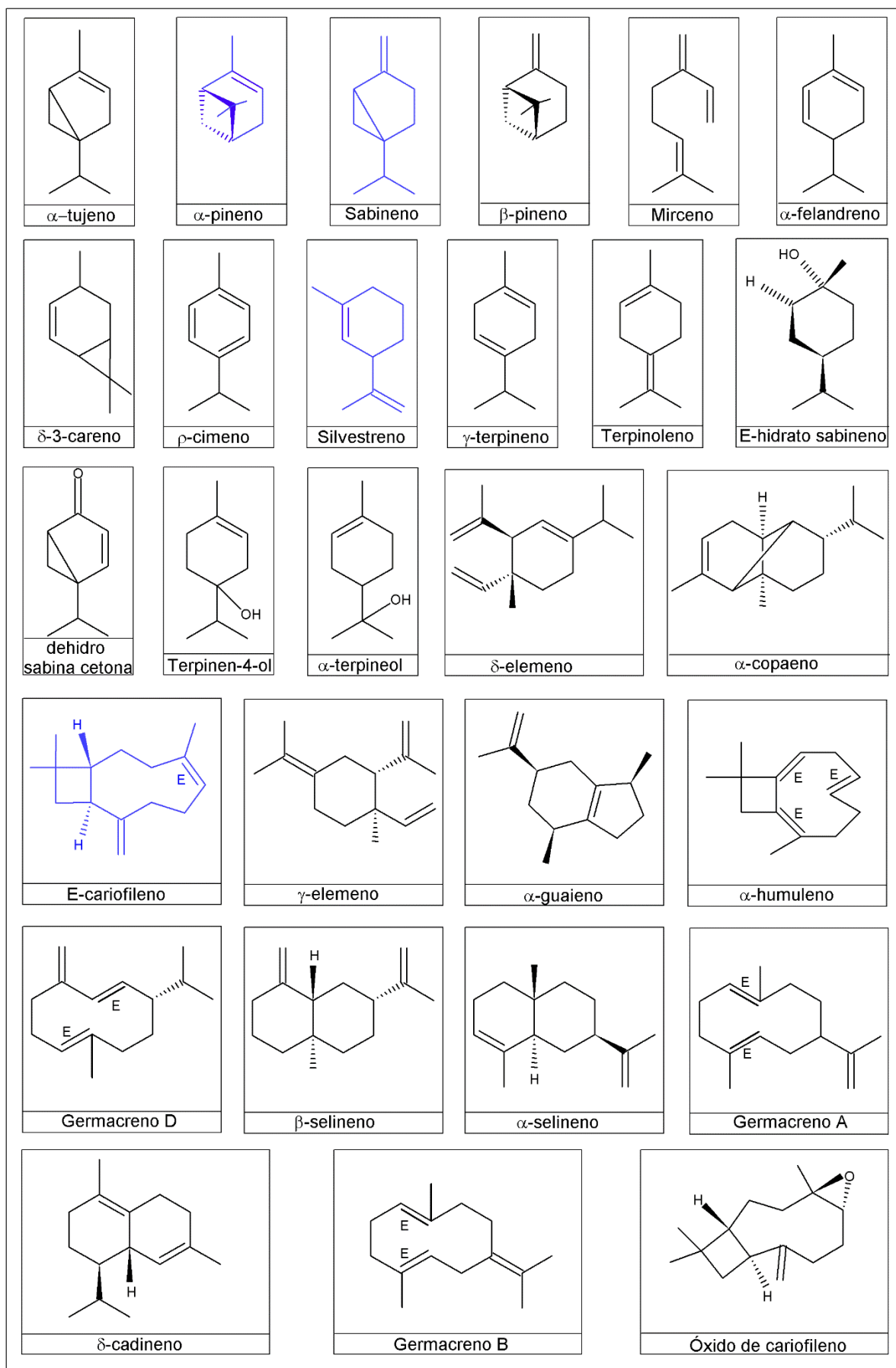


Figura 11: Estruturas químicas dos constituintes voláteis do OE de *P. nigrum*.

A porcentagem de caracterização tem destaque para os monoterpenos com 51,66% sendo os principais representantes o sabineno (14,96%), silvestreno (14,17%) e α -pipeno (5,28%). O componente majoritário foi o *E*-cariofileno (34,87%), sesquiterpeno comum à espécie. Apesar da composição dos OEs na literatura ser muito variada, os principais constituintes encontrados estão de acordo com outras pesquisas, como as de Myska e Majcher (2018), de Bagheri, Manap e Solati (2014), de Rouatbi, Duquenoy e Giampaoli (2007) e Singh e colaboradores (2004) com poucas variações de porcentagem, tendo assim um resultado coerente.

5.2. Caracterização das Nanopartículas Poliméricas

5.2.1. Análise de DLS e Potencial Zeta

A análise por DLS foi utilizada com o intuito de avaliar o diâmetro médio e o índice de polidispersividade (PDI) das nanopartículas. Os valores de PDI estão relacionados a homogeneidade da distribuição do tamanho das nanopartículas, quanto mais próximo de zero, mais uniforme é a distribuição (CAMPELO *et al.*, 2017).

As NPPs vazias apresentaram um tamanho médio de 285 nm com PDI de 0,18. Já as NPPs carregadas com OE apresentaram tamanho médio de 316 nm com PDI de 0,2. Esses valores encontrados, estão de acordo com os valores citados por Schaffazick (2003), que estabelece que nanopartículas que apresentam diâmetros médios inferiores a 300 nm e PDI iguais ou abaixo de 0,2 apresentam uniformidade e uma boa estabilidade na forma de sistema coloidal.

A análise do Potencial Zeta foi utilizada com o intuito de avaliar a estabilidade eletrostática do sistema de nanopartículas vazias (NPP-V) e de nanopartículas carregadas com OE da *P. nigrum* (NPP-PN). A tabela 5 apresenta os valores de carga superficial (Potencial Zeta e Condutividade) com variação de pH.

Tabela 5: Potencial Zeta das Nanopartículas em Diferentes pH

	NPP-V			NPP-PN		
pH	4	6	10	4	6	10
Potencial Zeta (mV)	-36,5	-35,1	-33,6	-36,3	-36,8	-43,5
Condutividade (ms/cm⁻¹)	0,052	0,051	0,049	0,045	0,056	0,058

A análise do Potencial Zeta em função do pH mostrou que as nanopartículas carregadas possuem, em módulo, maior carga superficial no pH básico, já as vazias, no pH

ácido. Assim, a maior carga superficial (em módulo) das nanopartículas carregadas pode ser atribuída à presença do OE, contribuindo para sua estabilização.

Os valores negativos do Potencial Zeta é devido à presença de radicais carbonílicos presentes na estrutura polimérica DA ROSA *et al.*, (2015 apud SILVA, 2019). Conforme Roland *et al.* (2003), valores iguais ou maiores a 30 mV (em módulo) são importantes para a estabilidade físico-química de uma solução coloidal, pois indica que a força repulsiva da dupla camada iônica é superior à força atrativa de van der Waals, evitando uma possível floculação. Logo as partículas que apresentam um valor em módulo de Potencial Zeta elevado, repelem-se com muita força, evitando a agregação no sistema.

5.2.2. Análise Morfológica e Estrutural via MEV

As imagens de MEV das NPPs carregadas foram analisadas no intuito de obter seus aspectos morfológicos. As imagens de MEV das NPPs carregadas estão apresentadas na figura 12 nas escalas de 10 e 5 μm e ampliadas 7 kX e 13 kX, respectivamente. Por meio das imagens, notou-se que havia a presença de algumas micropartículas com uma distribuição irregular e não de nanopartículas como era previsto, e como foi apresentado nas análises de DLS.

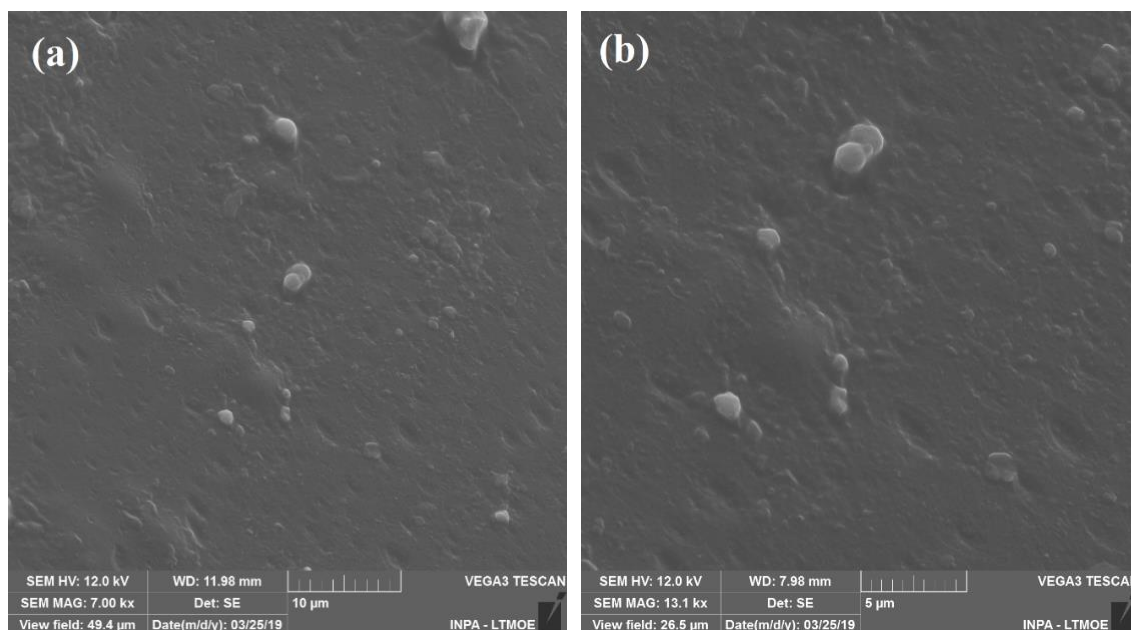


Figura 12: Imagens de MEV do Filme de NPPs na escala de: (a) 10 μm ; e (b) 5 μm .

Tais micropartículas encontram-se dispersas, e algumas aglomeradas, com alta variação de tamanho, e, apesar dessas partículas apresentarem um formato quase esférico, as mesmas apresentaram características divergentes das características de um nanocarreador. No entanto, Paredes *et al.* (2016) relata que o MEV é, até certo ponto, uma ferramenta limitada para caracterizar NPPs, pois as vezes não é possível diferenciar claramente as nanopartículas do substrato, o feixe de elétrons também pode danificar o polímero e haver formação de aglomerados.

5.2.3. Análise Morfológica e Estrutural via AFM

A técnica de AFM também foi utilizada para analisar a morfologia das nanopartículas biodegradáveis. Durante as primeiras varreduras, poucas regiões com a ausência das nanopartículas ou com a presença de nanopartículas rompidas foram localizadas.

O tamanho médio das NPPs carregadas foi de 196 ± 2 nm e das vazias 208 ± 5 nm com índice de polidispersividade de 0,17 e 0,21 respectivamente. Os valores de tamanho de NPPs obtidos por AFM, são mais coerentes com valores obtidos por DLS. O tamanho médio das NPPs carregadas apresenta um valor maior que o tamanho médio das NPPs vazias, devido ao carregamento. No entanto, foi possível detectar que essa diferença de tamanho não possui um valor desmedido. Sabe-se que o tamanho dessas NPPs depende não somente da concentração do ativo, mas também do método de preparação e dos materiais de parede (PAREDES, ASENCIO, *et al.*, 2016). Em literaturas, encontrou-se uma faixa de tamanho de NPPs de 140 a 190 nm usando o método de nanoemulsão (ETHIRAJAN, SCHOELLER, *et al.*, 2008) e uma faixa de 30 - 40 nm usando a nanoprecipitação (NAIDU e PAULSON, 2011), ambas utilizando a gelatina como material de parede.

Na figura 13 pode-se verificar por meio das imagens topográficas em 2D e 3D, os aspectos morfológicos das NPPs carregadas e das NPPs vazias, bem como a distribuição de tamanho dessas nanopartículas por meio do gráfico de polidispersão.

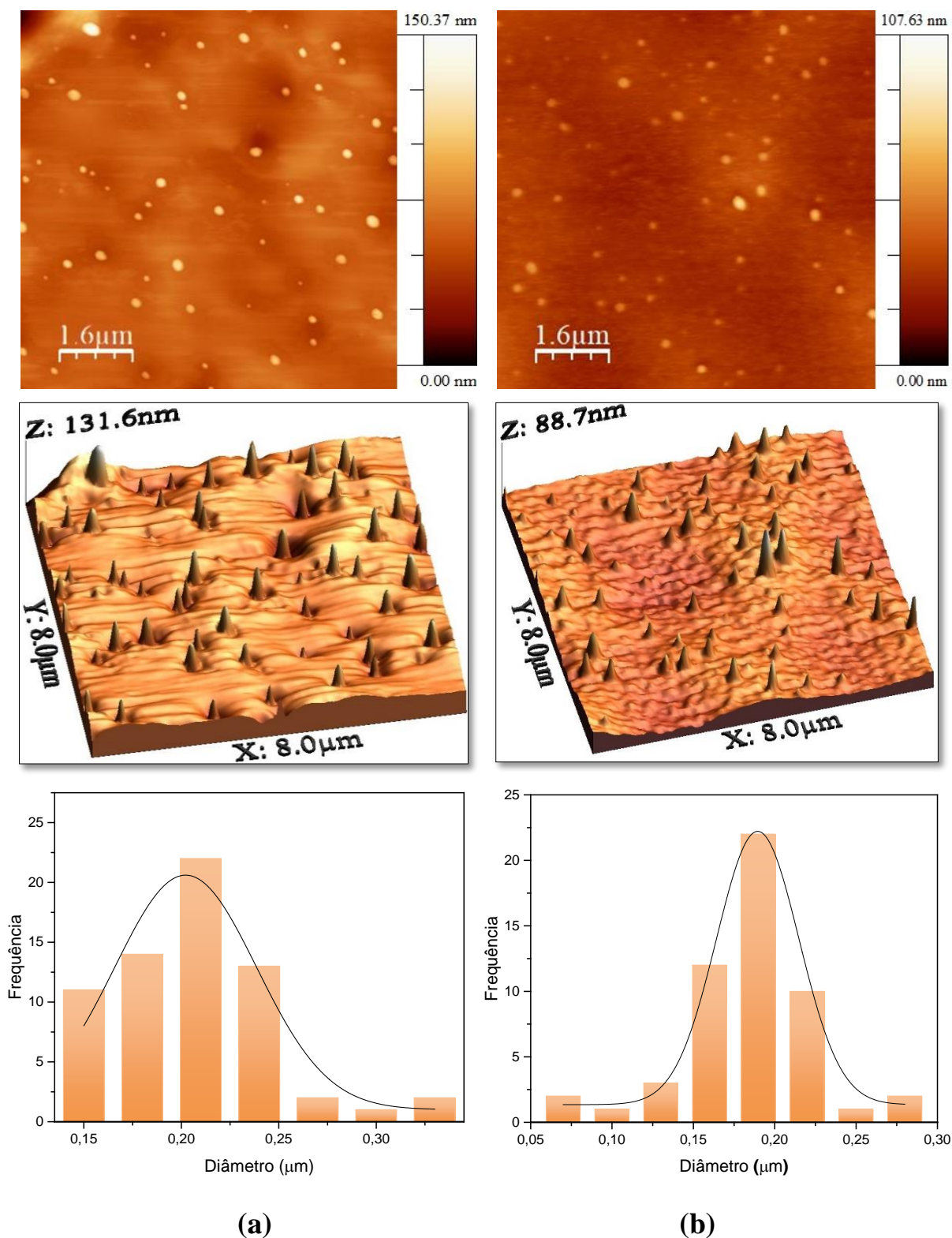


Figura 13: Imagens de topografia 2D e 3D de AFM e gráfico de Polidispersão: (a) NPPs com OE de *P. nigrum*; (b) NPPs vazias.

As regiões mais claras das imagens topográficas referem-se a domínios mais altos e ordenados da membrana gelatina/PCL. Observou-se que as nanopartículas apresentam geometria próxima a esférica e com variações expressivas de diâmetros. O gráfico de

polidispersividade mostrou maior uniformidade na distribuição de tamanho das nanopartículas vazias identificadas nesta imagem.

A distribuição das NPPs é variável e depende da região em que acontece a varredura. Apesar do tamanho das NPPs possuírem valores aproximados, as mesmas podem estar distribuídas de forma mais dispersa ou mais aglomerada, como mostram as imagens de topografia da figura 14, extraídas de regiões diferentes de uma mesma amostra.

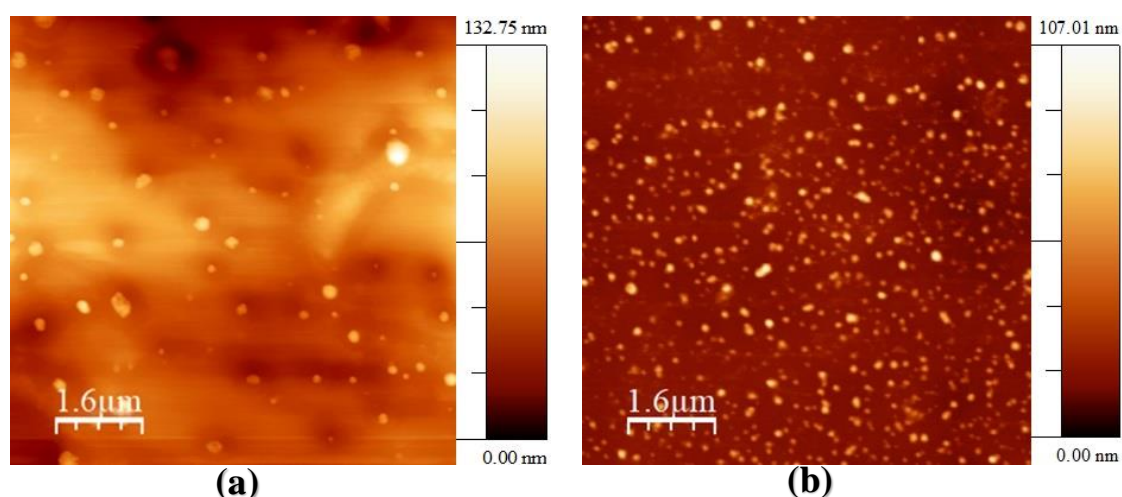


Figura 14: Imagens de Topografia de NPPs carregadas: (a) Nanopartículas Dispersas; (b) Nanopartículas Aglomeradas.

5.2.4. Eficiência de Encapsulamento

Logo após a sintetização das nanopartículas, calculou-se a eficiência de encapsulamento (EE) para uma concentração absoluta de $500 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, considerando a razão da quantidade de OE da *Piper nigrum* e o total de OE medido em suspensão do sistema.

Após a formulação das nanopartículas carregadas, foi obtido um valor de eficiência de 95,8%, o que é satisfatório, tendo base nos valores encontrados em diversos trabalhos que utilizaram também polímero como material de parede no encapsulamento de OE. Yang e colaboradores (2009) encontraram um valor de $EE = 80\%$ em nanopartículas que tinham como material de parede o polietileno glicol (PEG) no carregamento de OE de alho. Badri *et al.* (2018) mostraram um valor de $EE = 84\%$ no encapsulamento de OE de *Nigella Sativa L.* em nanopartículas biodegradáveis de PCL. Ghasemishahrestani *et al.* (2015) encontraram um valor de $EE = 97\%$ em nanopartículas biodegradáveis de gelatina carregadas de quercetina. Silva e colaboradores (2018) apresentaram um valor de $EE =$

79,2% no encapsulamento de OE de *Piper aduncum* e OE de *Piper hispidinervum* em nanopartículas biodegradáveis de gelatina.

No gráfico da figura 15, apresenta-se o monitoramento da EE (%) durante os seis primeiros meses da formulação sintetizada com o conservante NE. O estudo se deu em um sistema fechado, conservado a 25 °C sem sofrer variações das condições ambientais de armazenamento.

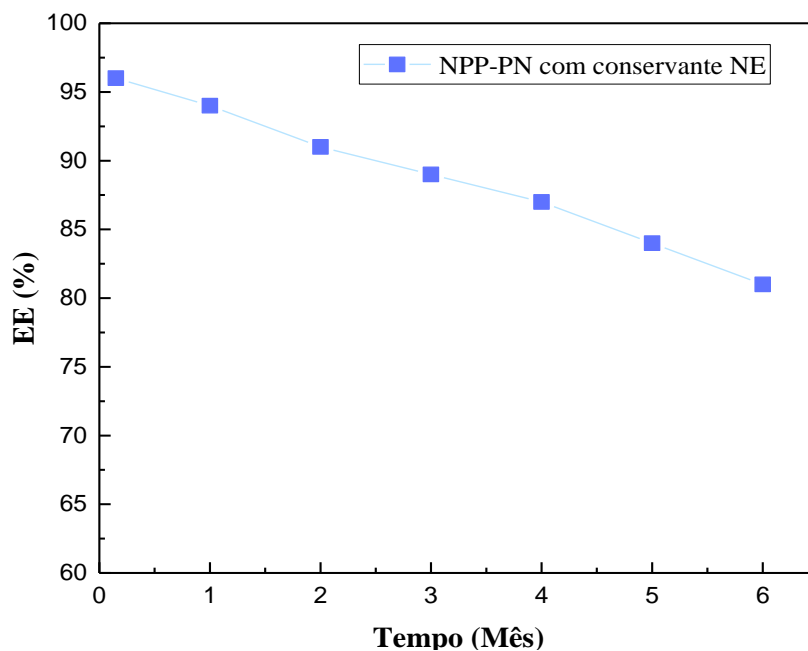


Figura 15: Gráfico do Monitoramento da EE da Síntese em Função do Tempo.

Nota-se no gráfico que, para a formulação, a eficiência de encapsulamento inicial de 95,8 % foi diminuindo comedidamente ao longo dos seis meses. No sexto mês, a formulação ainda apresenta uma eficiência final alta de 81%, revelando que o método utilizado, bem como os materiais de parede, foram altamente eficientes no encapsulamento do OE.

5.2.5. Liberação Controlada do OE Encapsulado *in vitro*

O estudo de liberação do agente ativo encapsulado é de grande interesse para a determinação do local alvo de aplicação. A taxa de liberação e o tempo de liberação precisam ser conhecidos para se ter certeza que o objetivo da aplicação será concretizado. O sistema analisado no ensaio de liberação controlada foi o de sínteses com conservante NE, o qual mostrou-se ser eficiente no monitoramento de EE. O ensaio foi realizado

mediante a variações de pH (4, 7 e 10), proporcionando o teste de liberação ao longo do tempo em diferentes exposições. A figura 16 mostra as curvas de liberação controlada, as quais foram ajustadas ao modelo Korsmeyer-Peppas para a identificação do mecanismo de liberação.

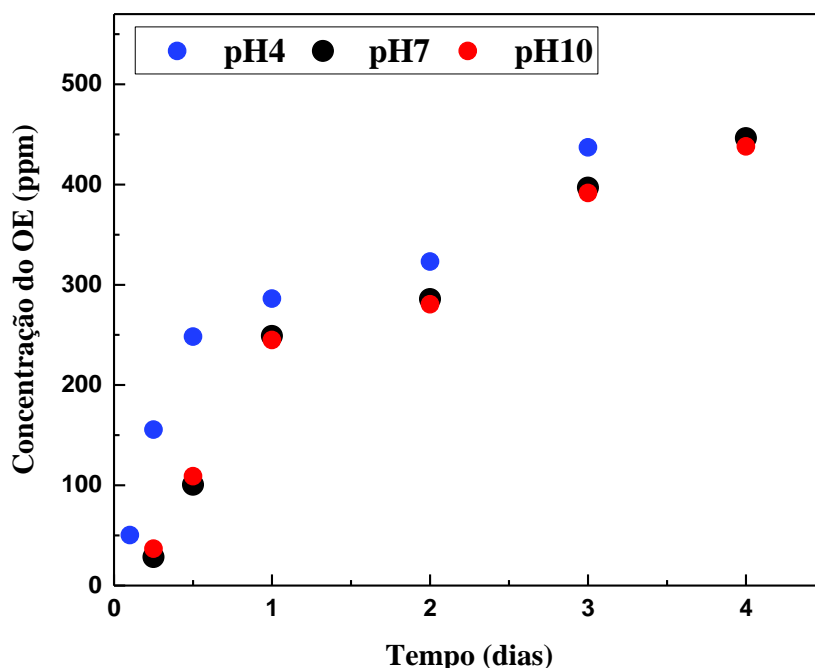


Figura 16: Gráfico de Liberação Controlada do OE de *P. nigrum*.

A liberação do OE da *Piper nigrum* foi avaliada por um período de uma semana (168 h). Pode-se observar no gráfico da figura 16 que os perfis de liberação do OE em pH = 7 e pH = 10 foram bem semelhantes, sendo mais tardio (30 min depois) que o perfil em pH=4. Os primeiros minutos avaliados até o último dia de liberação, nota-se uma liberação gradual. O tempo máximo em que a concentração máxima de OE foi liberada das nanopartículas é de 4 dias para o perfil em pH = 4 e 5 dias para os perfis em pH = 7 e pH = 10, atingindo a concentração aproximada de 450 mg. mL⁻¹. Dessa forma, é possível observar que a liberação do óleo encapsulado é influenciada pelo pH do meio, sendo liberado de forma mais eficiente e rápida em pH ácido. De acordo com os dados de potencial zeta, foi observado que o pH de melhor estabilidade para o sistema é o neutro e o básico, isso traz uma resposta ao fato da liberação nesses perfis terem demorado um pouco mais para iniciar.

Os dados da cinética de liberação da formulação testada em diferentes valores de pH mostraram melhor adequação dos dados experimentais ao modelo de Korsmeyer-

Peppas. Após o ajuste das curvas ao modelo proposto, foram observados valores de n entre 0,72 e 0,77, os quais revelam que os sistemas liberam o OE pelo mecanismo de liberação de transporte anômalo (não Fickiano), tanto por mecanismo de difusão quanto por relaxamento das cadeias poliméricas.

5.2.6. Análise Química via FTIR

A análise de FTIR foi utilizada para avaliar a presença dos principais grupos funcionais característicos no material de parede (gelatina tipo B e PCL) e no OE, constatando se houve sucesso no encapsulamento do OE nas NPPs biodegradáveis. A figura 17 apresenta um gráfico com os espectros dos polímeros gelatina tipo B e PCL, do OE, das NPPs vazias e das carregadas com o OE de *P. nigrum* e a tabela 6, apresenta os principais grupos funcionais encontrados no espectro de cada componente.

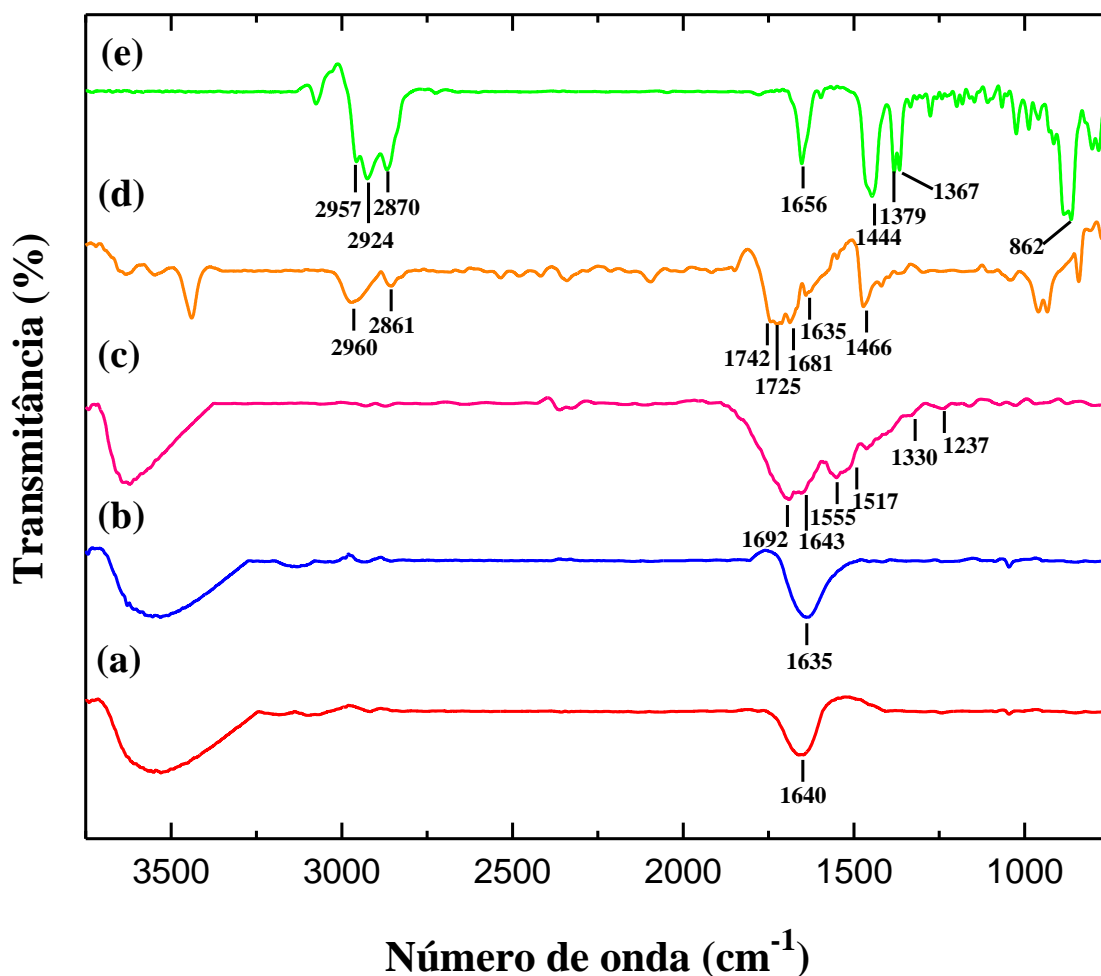


Figura 17: Espectros de FTIR de: (a) Nanopartículas Carregadas com OE de *P. nigrum*; (b) Nanopartículas vazias; (c) Gelatina tipo B; (d) PCL; (e) OE de *P. nigrum*.

Tabela 6: Principais Grupos encontrados no espectro de gelatina, PCL e OE de *P. nigrum*

Espectro FTIR	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
Gelatina	1237	estiramento C—O—C
	1330	ligação C—N
	1.555 e 1517	grupo de carbonila
	1643 e 1692	ligação de C=O
PCL	1466	estiramento de metileno
	1635 e 1681	ligação de C=O
	1725 e 1742	estiramento de carbonila
	2861 e 2960	modos vibracionais de grupos CH ₂
OE de <i>Piper nigrum</i>	1367 e 1379	modos vibracionais de grupos CH ₃
	1444	flexão de grupos CH ₂ e CH ₃
	1656	ligação de C=O
	2870, 2924 e 2957	alongamento—CH

O espectro da gelatina tipo B, apresenta uma banda forte de amidas em 1692 cm⁻¹ e em 1643 cm⁻¹ devido a ligação de C=O como já foi relatado em trabalhos de Silva *et al.* (2018) e Assimi *et al.* (2019). Há também um duplete intenso em 1555 cm⁻¹ e 1517 cm⁻¹ que representa o grupo de carbonila, bandas com baixa intensidade em 1330 cm⁻¹ que representa a ligação C—N, e em 1237 cm⁻¹ (estiramento C—O—C) também já foram relatadas em outras literaturas.

O espectro da PCL, apresenta bandas intensas em 1742 cm⁻¹ e 1725 cm⁻¹, que de acordo com trabalhos de Xiao *et al.* (2017) e Elzein *et al.* (2017), estão relacionadas ao modo vibracional do estiramento do grupo carbonila. O espectro da PCL também apresenta ligações de C=O, porém em 1681 cm⁻¹ e 1635 cm⁻¹. Em 2960 cm⁻¹ e 2861 cm⁻¹ tem-se bandas relativas aos modos vibracionais associados aos grupos CH₂, esse duplete, segundo Phillipson K. *et al.*, surge devido ao alongamento das ligações C-H do grupo metileno. A banda discreta que surge em 1466 cm⁻¹ é atribuída ao grupo metileno.

O espectro do OE da *P. nigrum* está de acordo com outras literaturas como as de Bounaas *et al.*, (2018) e Rakmai *et al.*, (2016). O espectro apresenta bandas de absorção em 2957, 2924 e 2870 cm⁻¹ (alongamento—CH), em 1656 cm⁻¹ tem-se a ligação de amidas de C=O para um de seus componentes majoritários (α -pineno) e a banda observada em 1444 cm⁻¹ corresponde às vibrações de flexão de CH₂ e CH₃ de grupos alifáticos. As bandas de 1379 e 1367 cm⁻¹ aparecem como um duplete de CH₃ e uma banda forte em 862 cm⁻¹ devido a outro componente majoritário (*E*-cariofileno).

Constata-se no gráfico da figura 17 que não há diferenciação do espectro das NPPS vazias com o das carregadas, os quais apresentaram uma banda de absorção

característica em 1635 cm^{-1} e em 1640 cm^{-1} devido a contribuição das ligações de C=O de amidas do material de parede (PCL + Gelatina), tendo em vista que não poderia ser atribuído ao deslocamento da principal banda do OE. Isto porque o pico de 1635 cm^{-1} é uma banda de absorção intensa encontrada não só no espectro das nanopartículas carregadas, como também no espectro das nanopartículas vazias. Bandas intensas e largas de 3000 a 3500 cm^{-1} são comuns em materiais orgânicos, devido a presença de H_2O . Como os picos de absorção relacionados ao OE não apareceram no espectro das nanopartículas carregadas, entende-se que o OE foi encapsulado com sucesso nos materiais de parede e por isso não há surgimento algum das bandas de absorção do óleo de *P. nigrum* não encapsulado, como observado por Laiane *et al.* (2018).

5.2.7. Análise Química via Raman

A espectroscopia Raman oferece uma abordagem para estudar os modos vibracionais no material em estudo, através do espalhamento inelástico de luz monocromática incidente. Esta técnica foi utilizada para averiguar se diferentemente dos espectros de FTIR, os espectros de Raman (Figura 18) das NPPs carregadas e vazias apresentariam diferenças nas bandas de absorções.

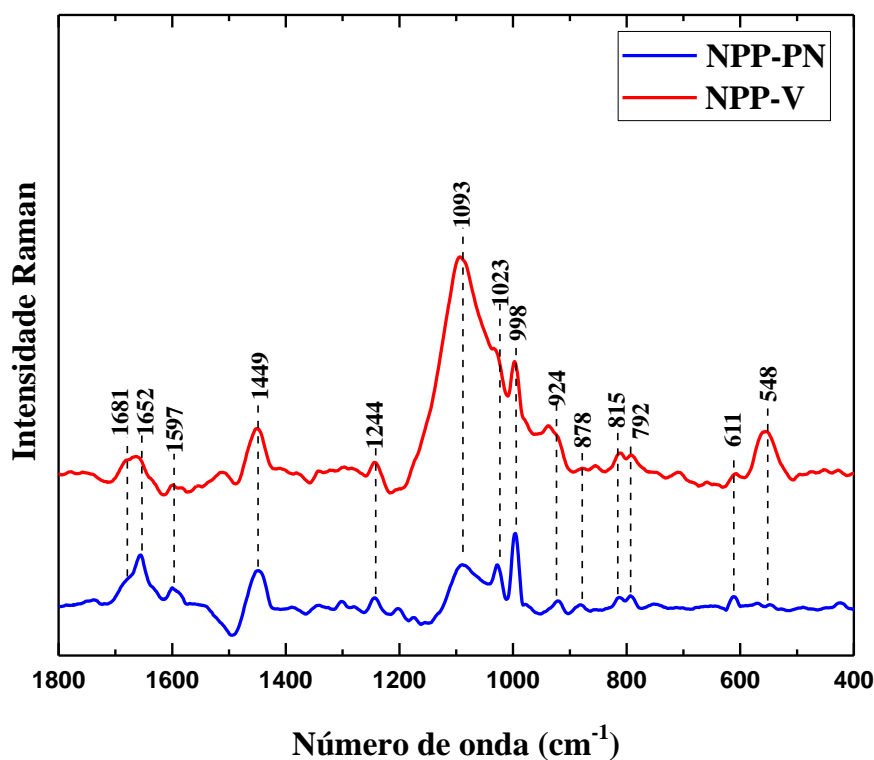


Figura 18: Espectros de Raman de NPPs Carregadas (NPP-PN) e NPPs vazias (NPP-V).

Tabela 7: Principais Grupos encontrados nos Espectros de RAMAN de NPPs

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
548, 611, 792 e 815	deformação de alguns anéis
878 e 924	estiramento C—C
998	estiramento NCH
1023	estiramento C—O
1093	estiramento da ligação C—C
1244	modos vibracionais da amida III
1449	flexão de grupos CH_2
1597	dobramento de NH_3
1652 e 1681	modos vibracionais da amida I

No gráfico da figura 18, pode ser observado que os espectros das NPPs carregadas e vazias apresentam as mesmas bandas de absorções, porém com intensidades diferentes. O pico em 1681 cm^{-1} e em 1652 cm^{-1} tem-se a formação de um duplete que correspondem à amida I, porém, no espectro das NPPs carregadas, essa banda é mais intensa, devido a contribuição também da amida I presente no OE. Em 1597 cm^{-1} tem-se um pico discreto do dobramento de (NH_3), em 1449 e 1244 cm^{-1} corresponde a CH_2 e aos modos vibracionais da amida III, respectivamente. Em 1093 cm^{-1} tem-se o estiramento da ligação C—C, nesta banda, o espectro de NPPs vazias apresenta maior intensidade, o que pode ser atribuído a maior quantidade de material de parede. Em 1023 , 998 , 924 e 878 cm^{-1} tem-se a presença de picos menos intensos para o estiramento de C—O, NCH e C—C respectivamente, e nos picos 815 , 792 , 611 e 548 cm^{-1} tem-se a deformação de alguns anéis.

5.2.8. Análise Qualitativa via AFM-IR

Os espectros obtidos por AFM-IR possibilitaram uma análise química em determinadas NPPs por meio de espectros de absorção local gerados pela variação da amplitude das oscilações do cantilever em função do comprimento de onda absorvido. A figura 19 apresenta os espectros de AFM-IR coletados e as imagens de AFM mostrando os pontos em que as medidas locais de IR foram feitas, sendo possível observar as bandas vibracionais na região espectral de 1800 a 1550 cm^{-1} . A vantagem desta técnica mista é que se podem encontrar bandas de absorção específicas do OE da *P. nigrum* e dos materiais de parede.

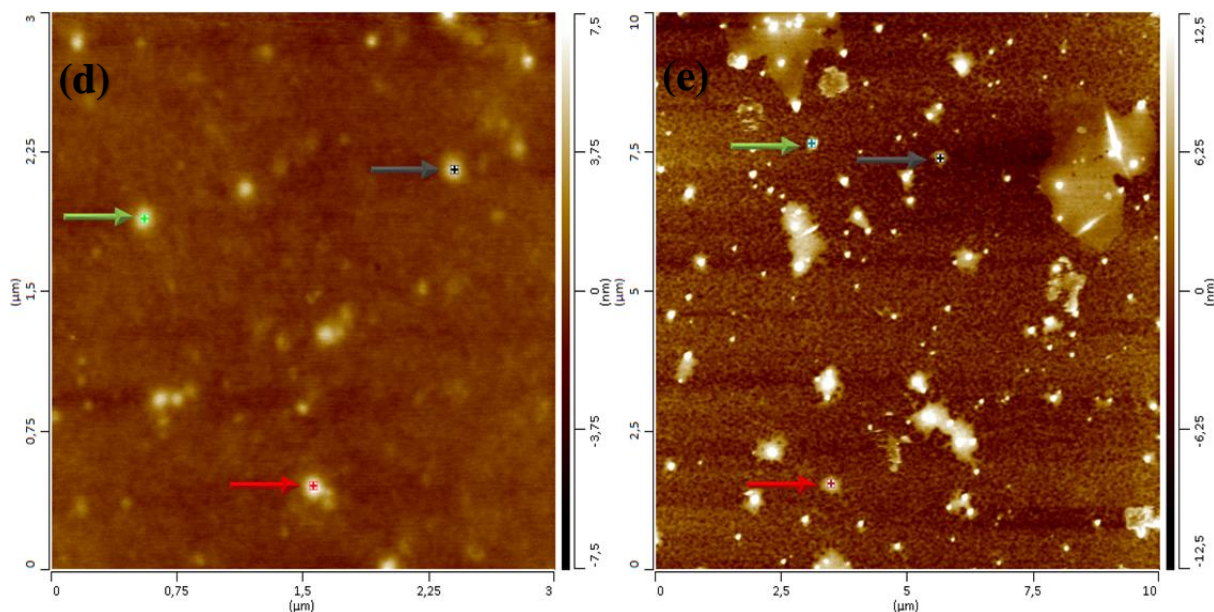
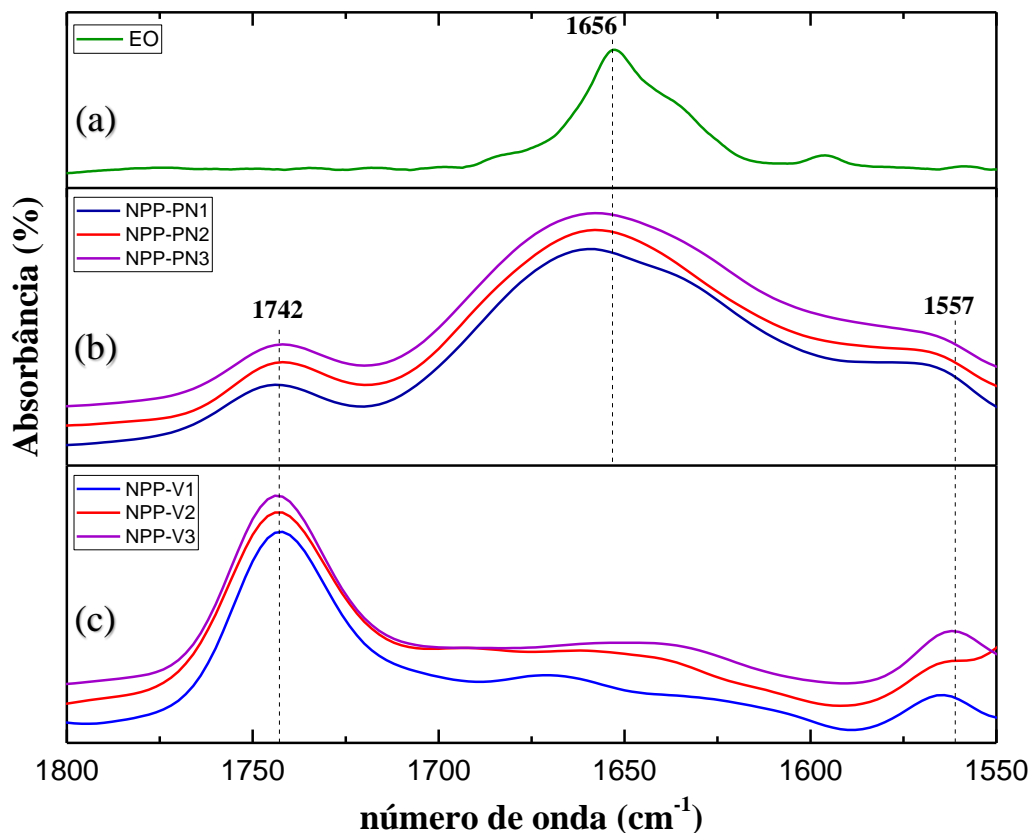


Figura 19: Espectros de AFM-IR das NPPs e FTIR do OE da *Piper nigrum*. (Nanopartículas em que as medidas locais de IR foram realizadas estão destacadas pelas setas).

Na figura 19 tem-se três espectros de AFM-IR das nanopartículas carregadas (NPP-PN) e das nanopartículas vazias (NPP-V) com o espectro de FTIR do OE da *P. nigrum*. A figura 19 (a) apresenta o espectro do OE limitado na faixa de 1800 a 1550 cm^{-1} e a figura 19 (b) apresenta os espectros das nanopartículas carregadas relativos aos pontos

identificados na figura 19 (d) de topografia. Da mesma forma, na figura 19 (c) os espectros das nanopartículas vazias dos pontos selecionados na figura 19 (e).

Com os resultados de FTIR do OE, verificou-se que a banda de absorção que havia de forma intensa somente nos espectros das nanopartículas carregadas no número de onda de 1656 cm^{-1} , era uma contribuição do pico característico do OE de *P. nigrum*, de uma ligação C=O de amidas, função presente na molécula da piperina, e que surge normalmente devido a presença do componente volátil α -pineno. Dessa forma, constatou-se a existência de OE nas NPPs produzidas com a intenção de transportar o bioativo. Na banda de absorção de 1742 cm^{-1} , presente nos espectros das nanopartículas carregadas e das nanopartículas vazias, tem-se o estiramento do grupo carbonila, característico da PCL, como visto nas análises de FTIR e na banda de 1557 cm^{-1} também presente nos espectros de nanopartículas, podem ser atribuídos ao material de parede gelatina.

As imagens topográficas obtidas de AFM-IR apresentaram nanopartículas com tamanhos menores que as apresentadas anteriormente na análise de DLS e AFM. Esta diminuição de tamanho pode ser atribuída ao processo de diluição que a síntese de nanopartículas sofreu para a efetivação desta análise. Nanopartículas com tamanho médio de 110 nm foram identificadas. As nanopartículas de tamanho menores tem a tendência de se aglomerar menos que as de tamanho maiores. Aparições de áreas irregulares também surgiram na imagem topográfica de nanopartículas vazias, sendo atribuídas ao substrato.

Com a análise dos espectros das nanopartículas carregadas, constatou-se também que a espessura do material de parede é menor que o diâmetro médio da ponteira ($<25\text{nm}$) utilizada na análise. Tendo em vista que o poder de penetração do IR varia de 2-3 nm podendo alcançar até duas vezes o raio da ponta (LIPIEC *et al.*, 2019), a sensibilidade do AFM-IR não alcança camadas muito espessas. Nestas análises foi possível verificar a presença OE no interior das nanocápsulas avaliadas pelo AFM-IR, o que permite ter uma noção da espessura do material de parede da cápsula. A figura 20 apresenta uma ilustração dessa estimativa.

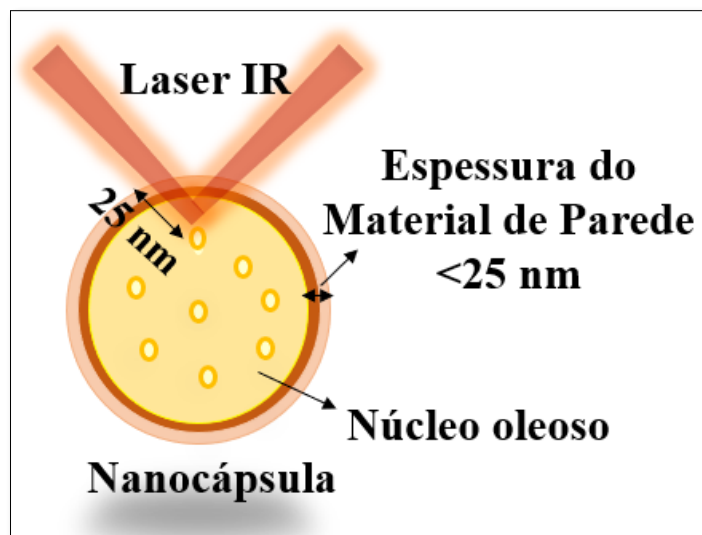


Figura 20: Ilustração do IR na Identificação da Espessura da Nanocápsula na Análise Química.

O IR ao atingir a nanopartícula provoca uma expansão térmica em sua estrutura, devido a absorção da radiação. A figura 20 ilustra como o valor aproximado de espessura do material de parede foi estimado.

Como visto anteriormente no estudo de liberação do OE, a nanopartícula apresenta um mecanismo anômalo, ou seja, libera o ativo tanto por difusão quanto por erosão, porém, a liberação de uma quantidade ainda que pequena só ocorre no estudo após 1 hora de exposição. Logo, levando em consideração a baixa possibilidade de haver OE na superfície da nanopartícula devido ao mecanismo de difusão, o IR precisou atravessar o material de parede para atingir as bandas de absorção do OE, como a capacidade máxima de penetração dessa análise foi de (25 nm), logo o material de parede é menor que esse valor. Essa análise também constata que essa nanopartícula classifica-se como nanocápsula, apresentando dois compartimentos, uma parede polimérica e um núcleo oleoso, e por isso, os espectros de FTIR das nanopartículas carregadas não conseguiu apresentar bandas de absorção do OE que estava protegido por um revestimento (PCL + gelatina).

5.2.9. Medidas de *Peak-Force Tapping*

Estas medidas foram realizadas no intuito de obter algumas informações da adesão das nanocápsulas inseridas no filme da síntese obtido pelo processo de secagem, contribuindo conseqüentemente, para o estudo da área superficial das mesmas.

As figuras 21 (a) e (b) apresentam, respectivamente, uma imagem de topografia e uma imagem que explora os valores de adesão registrados em cada região da amostra de nanocápsulas permitindo, desse modo, a identificação das regiões que podem ser mais adesivas ao contato externo.

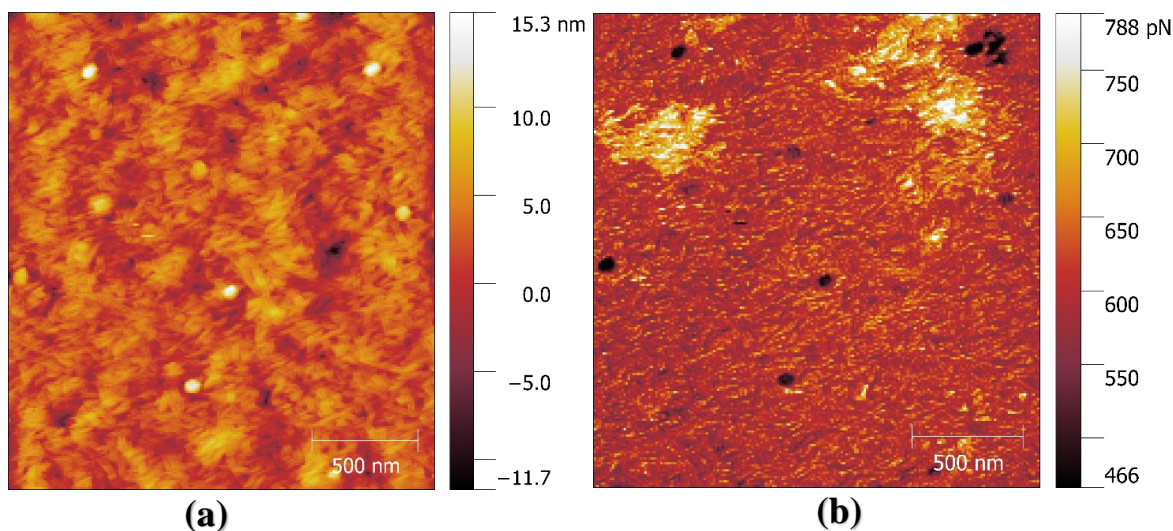


Figura 21: Medidas de *Peak-Force Tapping* das NPPs carregadas de OE: (a) Imagem Topográfica, (b) Imagem de Adesão.

A imagem topográfica apresenta algumas nanocápsulas dispersas em regiões irregulares e na imagem de adesão nota-se a diferença da adesividade dessas regiões por meio da barra de cores, na qual regiões mais claras expressam maior adesividade.

Ainda na imagem de adesão, verifica-se que as nanocápsulas em geral expressam uma região de baixa adesão, o que indica que há realmente uma proteção total do OE da *P. nigrum*, ou seja, esses valores de adesão são atribuídos ao material de parede e não ao OE, tendo em vista que os OEs possuem alta adesividade. Esse resultado corrobora com os resultados de FTIR em que não houve aparecimento de bandas de absorção do OE no espectro de nanopartícula carregada, devido ao encapsulamento do OE ocorrer em sistemas de nanocápsulas. Esse resultado também está de acordo com os resultados de AFM-IR em que foi identificado o valor aproximado da espessura do material de parede levando em consideração que não havia OE na área superficial da nanocápsula.

A presença de cavidades e elevações em algumas regiões são comuns e são oriundas de alguns materiais da síntese que não conseguiram integrar a composição das nanopartículas, como materiais poliméricos, emulsificantes e até mesmo o conservante, motivando a presença de áreas mais adesivas no filme formado ao redor das nanocápsulas.

As nanocápsulas bem formadas, estão fixadas nesse filme adesivo formado pela síntese após a secagem.

Esse tipo de análise qualitativa, abre novas perspectivas para entender como as nanopartículas e todo o filme formado pelo processo de secagem, respondem ao contato externo.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho são de grande importância e esclarecem várias dúvidas como, por exemplo, estimar a espessura das nanocápsulas e saber se realmente o OE fica encapsulado ou não, beneficiando o estudo de uma gama de sistemas nanocarreadores, por meio da caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas, que são projetadas para entregar (por exemplo, sob o estímulo de uma mudança nas condições ambientais) um agente ativo em determinado local.

A caracterização do OE que foi encapsulado em nanopartículas de gelatina e PCL, foi imprescindível. No processo de extração por hidrodestilação, o OE de *Piper nigrum* apresentou um grande potencial em rendimento e densidade. A análise obtida do óleo via CG/EM, identificou os componentes voláteis, sendo possível evidenciar diversas atividades biológicas atribuídas aos mesmos. Logo, devido à abundância da *Piper nigrum* no mundo todo, sua aplicação como fármaco ou larvicida pode se tornar viável.

O resultado obtido nas análises de (DLS e AFM) e Potencial Zeta, denotaram o aspecto morfológico e a carga das nanopartículas poliméricas, respectivamente, mostrando que a concentração do ativo utilizado acarreta em pouquíssimas alterações de tamanho, polidispersividade e estabilidade, apresentando valores satisfatórios para o estudo de nanocarreadores, viabilizando a utilização desses sistemas nanoestruturados.

A eficiência de encapsulamento para a formulação, monitorada até completar 6 meses, provou que a metodologia utilizada no encapsulamento é eficaz, atingindo ainda um valor acima de 80% no último mês de análise. Já o estudo de liberação controlada do OE, expõe um mecanismo anômalo e um modelo de liberação OE gradual.

A caracterização química via FTIR, Raman e AFM-IR certificaram a presença do OE no núcleo das nanopartículas transportadoras, através da comparação dos grupos funcionais presente nos espectros obtidos das nanopartículas vazias e carregadas. A análise local de AFM-IR possibilitou ainda a identificação indireta da espessura do material de parede das nanopartículas. As medidas de *Peak-Force Tapping* mostrou-se uma técnica de grande potencial na compreensão da área superficial das nanocápsulas por meio das imagens da força de adesão. Informações como estas, são cruciais para o entendimento do carregamento, do direcionamento do ativo, das condições ambientais suportáveis e prever o comportamento e a integridade durante o manuseio, armazenamento e transporte,

Desse modo, as sínteses de nanopartículas carregadas com OE da *Piper nigrum* possibilitam a criação de uma nova alternativa para o uso deste bioativo, que tem grande

potencial para aplicação em diversos setores da indústria. Levando em consideração que esse estudo deve seguir uma linha progressiva no que se refere a pesquisa.

6.1. Perspectivas futuras

As seguintes sugestões são propostas para a continuidade desse trabalho:

- i.* Avaliar as Curvas de Adesão das nanocápsulas preenchidas com OE de *P. nigrum* e das vazias, realizando uma comparação dos valores obtidos;
- ii.* Realizar medidas de indentação para calcular a dureza das nanocápsulas;
- iii.* Realizar Medidas de Força Modulada para investigar outras propriedades tribológicas;
- iv.* Realizar o bioensaio larvicida da formulação contendo o OE encapsulado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULAZEEZ, M. A. *et al.* Black Pepper (*Piper nigrum L.*) Oils. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**, v. II, n. 31, p. 277-285, 2016.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007. 1-804 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Editora Fio Cruz, v. 1, 2010. 1-546 p.

AHMAD, N. *et al.* Biological role of *Piper nigrum L.* (Black pepper): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. 1945-1953, 2012.

ALLOUCHE, J. Synthesis of Organic and Bioorganic Nanoparticles: An Overview of the Preparation Methods. **Nanomaterials: A Danger or a Promise**, v. 81, n. 2, p. 27-74, 2013.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C. **Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients**. India: SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition, v. 1-87, 2014.

ASBAHANI, A. E. *et al.* Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220-243, 2015.

ASSIMI, T. E. *et al.* Synthesis of poly(ϵ -caprolactone)-grafted guar gum by surface-initiated ringopening ringopening. **Carbohydrate Polymers**, v. 220, p. 95-102, 2019.

BADRI, W. *et al.* Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and *Nigella Sativa L.* essential oil for the topical treatment of inflammation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, p. 234-243, 2018.

BAGHERI, H.; MANAP, M. Y. B. A.; SOLATI, Z. Antioxidant activity of *Piper nigrum L.* essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation. **Talanta**, p. 220-228, jan. 2014.

BANIK, B. L.; FATTAHI, P.; BROWN, J. L. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, n. 2, p. 271-299, 2015.

BASTO, S. *et al.* Emulsão e microemulsão: novos sistemas de liberação controlada de fármacos no tratamento veterinário: Revisão. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 10, p. 25-33, 2016.

BENJEMAA, M. *et al.* Nanoencapsulation of *Thymus capitatus* essential oil: Formulation process, physical stability characterization and antibacterial efficiency monitoring. **Industrial Crops & Products**, v. 113, p. 414-421, 2018.

BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de Liberação Controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016.

BOUNAAS, K. *et al.* Essential oil counterfeit identification through middle infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 139, p. 347-356, 2018.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975–999, 2015.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, p. 221-247, 2011.

BUZANELLO, R. A. D. S. **Nanoencapsulação de curcumina em polímeros biodegradáveis/biocompatíveis**. Paraná - Brasil: Dissertação de Mestrado, v. 1-110p, 2013.

CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma introdução**. 8nd. ed. RJ-Brasil: LTC, v. 1-821p, 2012.

CAMPELO, P. H. et al. Stability of Lime Essential Oil Emulsion Prepared Using Biopolymers and Ultrasound Treatment. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 1, p. S564–S579, 2017.

CARNEVALLI, D. B.; ARAÚJO, A. P. S. D. Atividade Biológica da Pimenta Preta (*Piper nigrum L.*): Revisão de Literatura. **UNICIÊNCIAS**, v. 17, n. 1, p. 41-46, 2013.

CASTRO, M. Freitas. Formulação e Caracterização de Sistemas De Liberação Controlada a partir de P3(HB-co-HHX). RJ-Brasil. **Dissertação de Mestrado**, p. 1-104, 2018.

CHIEN, Y. W. Novel drug delivery systems. **Drugs and the pharmaceutical sciences**, v. 50, 1992.

COSTA, J. G. M. D. et al. Composição Química e Toxicidade de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Frente a Larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 3, p. 463-468, 2010.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 771–784, 2017.

DARAEI, H. et al. Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 381-391, 2014.

DAZZI, A. et al. Analysis of nano-chemical mapping performed by an AFM-based (“AFMIR”) acousto-optic technique. **Ultramicroscopy**, v. 107, p. 1194–1200, 2007.

DELGADO, J. M. F. Preparação e Caracterização de Nanotransportadores (Nanocápsulas, Nanoesferas, Lipossomas e Transportadores Lipídicos Nanoestruturados) sem substância ativa. Goiânia - Brasil. **Dissertação de Mestrado**, p. 1-117, 2013.

D'MELLO, S. R.; SUDIP, D. K.; DAS, N. G. **Drug delivery nanoparticles formulation and characterization**. New York: Informa - Healthcare, v. 191, 2009.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, p. 308-316, 2000.

ECHEVERRÍA, J.; ALBUQUERQUE, R. D. D. G. D. Nanoemulsions of Essential Oils: New Tool for Control of Vector-Borne Diseases and In Vitro Effects on Some Parasitic Agents. **Medicines**, v. 6, n. 42, p. 1-11, 2019.

ELZEIN, T. et al. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 273, p. 381-387, 2004.

ESFANJANI, A. F.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of Phenolic Compounds and Antioxidants. **Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients**, v. 1, p. 63-101, Afshin Faridi Esfanjani1 and Seid Mahdi Jafari 2017.

ESMAEILI, F.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. Preparation and characterization of estradiol-loaded PLGA nanoparticles using homogenization-solvent diffusion method. **DARU**, v. 16, n. 4, p. 196-202, 2008.

ETHIRAJAN, A. et al. Synthesis and Optimization of Gelatin Nanoparticles Using the Miniemulsion Process. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2383-2389, 2008.

FARCET, C.; NICOLAS, J.; CHARLEUX, B. Kinetic study of the nitroxide-mediated controlled free-radical polymerization of n-butyl acrylate in aqueous miniemulsions. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 40, n. 24, p. 4410-4420, 2002.

FERNANDES, L. D. S. L. Desenvolvimento de um Sistema de Polimerização por Atomização para a Formação de Partículas em escala Micro e Sub-micro. Natal - Brasil. **Tese de Doutorado**, p. 1-188, 2016.

FIALHO, S. L.; CUNHA JR, A. D. S. Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 1, p. 173-179, 2007.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, v. 25, p. 1-9, 2015.

GAO, H. et al. Aqueous/ionic liquid interfacial polymerization for preparing polyaniline nanoparticles. **Polymer**, v. 45, p. 3017-3019, 2004.

GARCÍA-ESTEPA, E. V. D. F. A. R. M. Nanotechnology in the agrofood industry. **Journal of Food Engineering**, v. 238, p. 1-11, 2018.

GESZKE-MORITZ, M.; MORITZ, M. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. **Materials Science and Engineering C**, v. 68, p. 982-994, 2016.

GHASEMISHAHRESTANI, Z. et al. Tunable Synthesis of Gelatin Nanoparticles Employing Sophorolipid and Plant Extract, a Promising Drug Carrier. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 7, p. 1365-1381, 2015.

GIRARD, E. A. Volume, Biomassa e Rendimento de Óleos Essenciais do Craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum). **Rev. Acad.**, v. 5, n. 2, p. 147-165, 2007.

- GRAHAM, N. B. Polymeric Inserts and Implants for the Controlled Release of Drugs. **British Polymer Journal**, v. 10, p. 260–266, 1978.
- GULZAR, T. et al. New constituents from the dried fruit of *Piper nigrum* Linn., and their larvicidal potential against the Dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 219-223, 2013.
- GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147–157, 2007.
- HOO, C. M. et al. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distribution. **Journal Nanoparticle Research**, v. 10, p. 89-96, 2009.
- HORCAS, I. et al. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. **Review of Scientific Instruments**, v. 78, p. 1-9, 2007.
- HORNIG, S. et al. Synthetic polymeric nanoparticles by nanoprecipitation. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 23, p. 3838–3840, 2009.
- HOSSEINI, S. F. et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 50– 56, 2013.
- IDRIS, M. et al. Nanoencapsulation of essential oils with enhanced antimicrobial activity: A new way of combating antimicrobial Resistance. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 4, n. 3, p. 165-170, 2015.
- IGWE, C. et al. Encapsulation of Essential Oils of *Piper Nigrum* and *Monodora myristica* from South-West Nigeria Using Gum Arabic. **Nigerian Food Journal**, v. 28, n. 1, 2010.
- ISLAM, S. et al. Chemical investigation of bioactive compounds of black pepper. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 1721–1726, 2015.
- JAEGHERE, F. D. et al. Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and in vitro cell uptake. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 6, p. 859-866, 1999.
- JAISSWAL, J.; GUPTA, S. K.; KREUTER, J. Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation process. **Journal of Controlled Release**, v. 96, n. 1, p. 169-178, 2004.
- JIMÉNEZ, M. et al. Elaboration and characterization of O/W cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and black pepper (*Piper nigrum*) emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 902e910, 2018.
- JOHNSON, D.; OATLEY-RADCLIFFE, D. L.; HILAL, N. Atomic Force Microscopy (AFM). **Membrane Characterization**, v. 1, n. 7, p. 115-144, 2017.
- KHAN, M. et al. Black Piper. **Medicinal Plants of South Asia**, v. 1, n. 6, p. 75-86, 2020.

KHAN, M. K.; WANG, Q. Y.; FITZPATRICK, M. E. Atomic Force Microscopy (AFM) for Materials Characterization. **Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods**, v. 1, p. 1-16, 2016.

LI, A. et al. Synthesis and In Vivo Pharmacokinetic Evaluation of Degradable Shell CrossLinked Polymer Nanoparticles with Poly(carboxybetaine) versus Poly(ethylene glycol) Surface-Grafted Coatings. **ACS nano**, v. 6, n. 10, p. 8970-8982, 2012.

LIPIEC, E. et al. High-Resolution Label-Free Studies of Molecular Distribution and Orientation in Ultrathin, Multicomponent Model Membranes with Infrared Nano-Spectroscopy AFM-IR. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 542, p. 347-354, 2019.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LOPES, R. Pimenta Negra. **Óleos Aromáticos**, 2015. Disponível em: <<http://oleosaromaticos.blogspot.com/>>. Acesso em: 15 Novembro 2018.

LÓPEZ-LORENTE, Á. I.; MIZAIKOFF, B. Recent advances on the characterization of nanoparticles using Infrared Spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 97-106, 2016.

MAES, C.; BOUQUILLON, S.; FAUCONNIER, M.-L. Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. **Molecules**, v. 24, n. 14, 2019. ISSN 1-17.

MAHMOUD, K. F.; RAMADAN, K. M. A.; ASHOUSH, I. S. Nanoencapsulation and nanoemulsion of bioactive compounds to enhance their antioxidant activity in food. **International Journal of Food Science**, v. 4, n. 3, p. 1-22, 2014.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciência Do Solo**, v. 38, n. 4, p. 375-395, 2002.

MCLAFFERTY, F. W. Comparative Evaluations of Mass Spectral Data Bases. **J Am Soc Mass Spectral Data Bases**, v. 2, p. 438-440, 1991.

MENON, A. N.; PADMAKUMARI, K. P.; JAYALEKSHMY, A. J. Essential Oil Composition of Four Major Cultivars of Black Pepper (*Piper nigrum* L.). **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 2, p. 84-86, 2002.

MOHAMED, M. A. et al. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. **Membrane Characterization**, M.A. Mohamed, J. Jaafar, A.F. Ismail, M.H.D. Othman, M.A. Rahman, v. 1, p. 3-29, 2017.

MORSCH, S. et al. Investigating the Photocatalytic Degradation of Oil Paint using ATR-IR and AFM-IR. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 11, p. 1-27, 2017.

MYSZKA, K.; LEJA, K.; MAJCHER, M. A current opinion on the antimicrobial importance of popular pepper essential oil and its application in food industry. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 1, p. 1-18, september 2018.

- NAIDU, B. V. K.; PAULSON, A. T. A New Method for the Preparation of Gelatin Nanoparticles: Encapsulation and Drug Release Characteristics. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, p. 3495-3500, 2011.
- NASROLLAHZADEH, M. et al. An Introduction to Nanotechnology. **Interface Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 1-27, 2019.
- NICOLETTI, C. Deckmann; FRASSON, A. P. Zanini. Formas de Liberação Controlada: Revisão Bibliográfica e Avaliação Comparativa da Qualidade de Comprimidos Retard de Nifedipina 20mg de Referência e Similar. **Revista Contexto & Saúde**, v. 5, n. 10, p. 65-74, 2006.
- OLIVEIRA, M. A. M. D. Produção de Micropartículas e Nanopartículas Poliméricas para Aplicações Biomédicas em Sistemas Heterogêneos de Polimerização. RJ - Brasil. **Tese de Doutorado**, p. 1-277, 2011.
- OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na Obtenção de Sistemas de Liberação de Fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 29-35, 2006.
- PAREDES, A. J. et al. Nanoencapsulation in the food industry: manufacture, applications and characterization. **Journal of Food Bioengineering and Nanoprocessing**, v. 1, n. 1, p. 56-79, 2016.
- PASCOLI, M. et al. State of the art of polymeric nanoparticles as carrier systems with agricultural applications: a minireview. **Energy, Ecology and Environment**, v. 3, n. 3, p. 137-148, 2018.
- PATHANIA, R. et al. Essential Oil Nanoemulsions and their Antimicrobial and Food Applications. **Current Research in Nutrition and Food Science**, v. 6, n. 3, p. 626-643, 2018.
- PEDRO, A. S. et al. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. In: PEDRO, A. S., et al. **In book: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Formatex, v. 2, 2013. Cap. 15, p. 1363-1374.
- PHILLIPSON, K.; HAY, J. N.; JENKINS, M. J. Thermal analysis FTIR spectroscopy of poly(ϵ -caprolactone). **Thermochimica Acta**, v. 595, p. 74-82, 2014.
- PINTO, E. P.; RAMOS, G. Q.; FONSECA FILHO, H. D. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. **Macapá**, v. 3, n. 2, p. 41-50, 2013.
- PRAKASH, B. et al. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, p. 1-11, 2018.
- RAAIJMAKERS, M. J. T.; BENES, N. E. Current trends in interfacial polymerization chemistry. **Progress in Polymer Science**, v. 63, p. 86-142, 2016.
- RAKMAI, J. et al. Physico-chemical characterization and evaluation of bio-efficacies of black pepper essential oil encapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin cyclodextrin. **Food Hydrocolloids**, v. 65, p. 1-8, 2016.

RAO, P. J.; SOWBHAGYA, H. B. Nanoencapsulation of Spice Oils. **Handbook of Food Bioengineering**, v. 7, p. 179-207, 2017.

RAVINDRAN, P. N. et al. Black pepper. In: RAVINDRAN, P. N., et al. **Handbook of Herbs and Spices**. [S.l.]: Woodhead Publishing Limited, v. 1, 2012. Cap. 6, p. 86-115.

RAWAT, M. et al. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 9, n. 29, p. 1790-1798, 2006.

REIS, C. P. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

REYES, T. **Agroforestry systems for sustainable livelihoods and improved land management in the East Usambara Mountains, Tanzania**. University of Helsinki. Helsinki, p. 1-167. 2008.

RODRIGUES, A. D. G.; GALZERANI, J. C. Infrared, Raman and photoluminescence spectroscopies: potentialities and complementarities. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 4, p. 1-9, 2012.

ROGOBETE, A. F. et al. New aspects of controlled release systems for local anaesthetics. A Review. **Trends in Anaesthesia and Critical Care**, v. 9, p. 27-34, 2016.

ROLAND, I. et al. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85-94, 2003.

ROUATBI, M.; DUQUENOY, A.; GIAMPAOLI, P. Extraction of the essential oil of thyme and black pepper by superheated steam. **Journal of Food Engineering**, p. 708-714, nov 2007.

RYU, J.-H. et al. Self-Cross-Linked Polymer Nanogels: A Versatile Nanoscopic Drug Delivery Platform. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 48, p. 17227-17235, 2010.

SAMUEL, M. et al. The larvicidal effects of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine against insecticide resistant and susceptible strains of *Anopheles malaria* vector mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v. 238, p. 1-9, 2016.

SANTRA, M. et al. Inheritance of β -carotene concentration in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. durum). **Euphytica**, v. 144, p. 215-221, 2005.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e Estabilidade Físico-química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, jul 2012.

SILVA, J. M. S. D. Encapsulamento do Óleo Essencial da *Lippia alba* em Nanopartículas de Poli- ϵ - caprolactona (PCL) para Avaliação da Estabilidade e Atividade Larvicida contra o *Aedes aegypti*. Manaus - Brasil. **Dissertação de Mestrado**, p. 1-70, 2019.

- SILVA, L. S. et al. Encapsulation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* Essential Oils in Gelatin Nanoparticles- A Possible Sustainable Control Tool of *A. aegypti*, *T. urticae* and *C. lataniae*. **J Sci Food Agric.**, v. 99, n. 2, p. 685-695, 2018.
- SINGH, G. et al. Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, p. 1878-1884, nov. 2004.
- SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.
- SOUZA, K. C. D. Síntese e Caracterização de Nanocompósitos de Sílica Mesoporosa com Partículas Magnéticas para Dispositivos de Liberação Controlada de Fármacos. MG-Brasil. **Dissertação de Mestrado**, p. 1-126, 2007.
- SUR, S. et al. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v. 20, p. 1-21, 2019.
- TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, p. 1-19, 2014.
- TRAN, T. H. et al. The Study on Extraction Process and Analysis of Components in Essential Oils of Black Pepper (*Piper nigrum L.*) Seeds Harvested in Gia Lai Province, Vietnam. **Processes**, v. 7, p. 1-16, 2019.
- TRTIK, P.; KAUFMANN, J.; VOLZ, U. On the use of peak-force tapping atomic force microscopy for quantification of the local elastic modulus in hardened cement paste. **Cement and Concrete Research**, v. 42, p. 215–221, 2012.
- VARELAS, C. G.; DIXON, D. G.; STEINER, C. A. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. **Journal of Controlled Release**, v. 4, n. 3, p. 185-192, 1995.
- WANG, Y. et al. Green and solvent-free simultaneous ultrasonic-microwave assisted extraction of essential oil from white and black peppers. **Industrial Crops & Products**, v. 114, p. 164-172, 2018.
- XIAO, Z.; XU, Z.; ZHU, G. Production and characterization of nanocapsules encapsulated linalool by ionic gelation method using chitosan as wall material. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 613-619, 2017.
- XU, D. et al. Micro-nano-structured Polyaniline Assembled in Cellulose Matrix Via Interfacial Polymerization for Applications in Nerve Regeneration. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 27, p. 2-33, 2016.
- YANG, F.-L. et al. Structural Characterization of Nanoparticles Loaded with Garlic Essential Oil and Their Insecticidal Activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10156–10162, 2009.
- ZHAI, H. et al. Potential of essential oils for poultry and pigs. **Animal Nutrition**, v. 4, p. 179-186, 2018.

ZHU, F.; MOJEL, R.; LI, G. Structure of black pepper (*Piper nigrum*) starch. **Food Hydrocolloids**, v. 71, p. 102-107, 2017.