

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

JOAB DE SOUZA AROUCHE

Desenvolvimento de uma formulação com potencial biocida baseada no encapsulamento do óleo essencial da *Piper callosum*: avaliação da estabilidade a 25 °C e 35 °C utilizando diferentes conservantes

MANAUS

2020

JOAB DE SOUZA AROUCHE

Desenvolvimento de uma formulação com potencial biocida baseada no encapsulamento do óleo essencial da *Piper callosum*: avaliação da estabilidade a 25 °C e 35 °C utilizando diferentes conservantes

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

Orientador: Prof. Dr. Edgar Aparecido Sanches

MANAUS

2020

Ficha Catalográfica

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

A771d Arouche, Joab de Souza
Desenvolvimento de uma formulação com potencial biocida baseada no encapsulamento do óleo essencial da *Piper callosum*: avaliação da estabilidade a 25 °C e 35 °C utilizando diferentes conservantes / Joab de Souza Arouche . 2020
61 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edgar Aparecido Sanches
Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Óleo essencial. 2. *Piper callosum*. 3. Biocida. 4. Nanopartículas. 5. Encapsulamento. I. Sanches, Edgar Aparecido. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial à Dona Maria Izabel Arouche (mãe) pelo apoio em todos os momentos, pelo incentivo e confiança que sempre depositou em mim.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar presente em todos os momentos da minha vida, direcionando meus planos, me dando forças, confiança e estratégias para vencer os desafios e concluir mais esta etapa.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Edgar A. Sanches** pela paciência, apoio e orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Doutorando **Sidney Gomes Azevedo**, pelo incentivo, palavras de motivação e conhecimentos transmitidos.

À **minha família** por me apoiar, me incentivar, me ajudar e torcer por mim em todos os momentos.

À Embrapa Amazônia Ocidental na pessoa do **Dr. Francisco Célio Maia Chaves** por ter cedido o óleo essencial da *Piper callosum* para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os amigos da turma PPGCEM 1/2018, em especial a **Sabrina da Silva Santana, Larissa Mendonça Barroso Gato, Ayná Caroline M. Vieira, André Lopes Teixeira, Igor Nonato Almeida Pereira, Daniel Rocha Filho, Ygor Geann dos Santos Leite, Márcia Cristina G. de A. Lima, José Lourenço Lagassi Dias, Ítalo Carvalho da Costa, Bruna Bandeira do Nascimento, Silma Sá e Alexandra Lizandra Gomes Rosas**. Obrigado pela amizade, pelo apoio nos momentos difíceis, pelos conhecimentos compartilhados, pela cumplicidade e os momentos de diversão proporcionados.

À **Universidade Federal do Amazonas** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais** pela oportunidade

Ao **NANOPOL** pelo apoio logístico e por me abraçar como pesquisador.

À **FAPEAM** pelo projeto Amazonas Estratégico 2018.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

Sempre parece impossível, até que seja feito.

Nelson Mandela (Madiba)

RESUMO

O desenvolvimento de um biocida contendo óleo essencial da *Piper callosum* encapsulado em nanopartículas poliméricas à base de gelatina e poli- ϵ -caprolactona (PCL) e a avaliação de sua estabilidade a 25 °C e 35 °C utilizando diferentes conservantes foram os objetivos principais desta presente pesquisa. Nanopartículas poliméricas biodegradáveis que transportam óleo essencial têm sido amplamente utilizadas na medicina, agricultura e alimentos. No entanto, existem poucas evidências científicas relatando testes de estabilidade com diferentes conservantes e em temperaturas variadas. A cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa CG/MS mostrou que o safrol (64%) é o principal constituinte do OE da *Piper callosum*, seguido pelo metil-eugenol (7,94%), α -pineno (7,12%) e β -pineno (6,62%). O tamanho das nanopartículas não carregadas (NP) foi de \pm 180 nm, com um índice de polidispersividade (PDI) de 0,17. As NP a 25 °C contendo OE da *Piper callosum* e conservante NE exibiram tamanhos de \pm 230 nm, com PDI de 0,20. O nanossistema sob 35 °C com OE apresentou tamanho de \pm 260 nm PDI de 0,22. Através da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), foi possível confirmar a eficiência de encapsulamento (EE), ao comparar o espectro das nanopartículas contendo o bioativo ao espectro amostral do óleo essencial da *Piper callosum in natura*. Notou-se que os picos do óleo essencial desapareceram na formulação que possuía o ativo natural. Após 25 dias avaliando a estabilidade do biocida, as amostras contendo o conservante NE foram as únicas que não apresentaram alterações nos parâmetros de estabilidade. Portanto, essas formulações foram selecionadas para continuar a pesquisa. As formulações contendo o conservante NE (25 °C e 35 °C) avaliadas em sistema aberto apresentaram aparência branca e fluida, com odor agradável e sem evidência de influências biológicas e físico-químicas que interferissem em sua estabilidade por 120 dias. A turbidez das formulações a 25 °C e 35 °C mostrou um valor inicial de 20 NTU e um valor final a 25 °C de 35 NTU, enquanto para o nanossistema polimérico a 35 °C o valor da turbidez foi cerca de 30 NTU. A EE para ambas as temperaturas começou em 94 %, com um valor final de 90 % a 25 °C e 91 % de EE para a solução a 35 °C. Após 240 dias, as nanopartículas a 25 °C e 35 °C, em sistema fechado, apresentaram odor desagradável e alteração de cor. As amostras provaram ser estáveis em todos os meios liberados, com valores muito semelhantes. No entanto, observou-se que a formulação com o conservante NE (25 °C) liberou o bioativo mais rapidamente. Os dados de estabilidade mostraram que a síntese contendo o conservante NE é promissora para aplicações futuras.

Palavras-Chave: óleo essencial; *Piper callosum*; biocida; nanopartículas; encapsulamento.

ABSTRACT

The aim of this research was to develop a biocide containing *Piper callosum* essential oil encapsulated in polymeric nanoparticles based on gelatin and poly- ϵ -caprolactone (PCL) and the evaluation of its stability at 25 °C and 35 °C using different preservatives. Biodegradable polymeric nanoparticles that carry essential oil have been widely used in medicine, agriculture and food. However, there are few scientific evidences reporting stability tests with different preservatives at different temperatures. The GC/MS technique showed that safrole (64 %) is the main constituent of the EO of *Piper callosum*, followed by methyleugenol (7.94 %), α -pinene (7.12 %) and β -pinene (6, 62 %). The size of the unloaded nanoparticles (NP) was \pm 180 nm, with a polydispersity index (PDI) of 0.17. The formulation at 25 °C containing EO and preservative NE exhibited sizes of \pm 230 nm, with PDI of 0.20. The formulation under 35 °C presented size of \pm 260 nm and PDI of 0.22. Through Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), it was possible to confirm the encapsulation efficiency (EE), when comparing the spectrum of the nanoparticles containing the bioactive to the sample spectrum of the essential oil of *Piper callosum in natura*. The peaks of the essential oil disappeared in the formulation containing the natural active. After 25 days evaluating the stability of the biocide, the samples containing the preservative NE did not show changes in the stability parameters. Therefore, these formulations were selected to continue the research. The formulations containing NE (25 ° and 35 °C) evaluated in an open system showed a white and fluid appearance, with a pleasant odor and without evidence of biological and physical-chemical influences that would interfere with its stability for 120 days. The turbidity at 25 °C and 35 °C showed an initial value of 20 NTU and a final value at 25 °C of 35 NTU, while at 35 °C the turbidity value was around 30 NTU. The EE for both temperatures started at 94 %, with a final value of 90 % at 25 °C and 91 % at 35 °C. After 240 days, the formulations at 25 °C and 35 °C, in closed systems, exhibited an unpleasant odor and color change, being discarded. The samples proved to be stable in all released media, with very similar values. However, it was noted that the formulation with the preservative NE (25 °C) released the bioactive more quickly. The stability data showed that the synthesis with the preservative NE is promising for future applications.

Keywords: essential oil; *Piper callosum*; biocide; nanoparticles; encapsulation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: <i>Piper callosum</i>	18
FIGURA 2: Esquema ilustrativo do encapsulamento de ativo	20
FIGURA 3: Ilustração de mecanismos de liberação.....	22
FIGURA 4: Esquema do desenvolvimento das formulações.....	24
FIGURA 5: Esquema sistema manipulado e em prateleira	26
FIGURA 6: Liberação controlada em membrana de diálise.....	27
FIGURA 7: Constituintes majoritários do OE da <i>Piper callosum</i>	28
FIGURA 8: Espectro FTIR do óleo essencial da <i>Piper callosum</i>	29
FIGURA 9: Aspecto das formulações recém preparadas.....	32
FIGURA 10: Propriedades organolépticas	33
FIGURA 11: Turbidez	34
FIGURA 12: Eficiência de encapsulamento.....	36
FIGURA 13: Avaliação do pH.....	38
FIGURA 14: Condutividade elétrica.....	40
FIGURA 15: Imagens da topografia e histogramas.....	43
FIGURA 16: Estudo da estabilidade manipulada 120 dias.....	45
FIGURA 17: Estudo da estabilidade em prateleira 240 dias.....	46
FIGURA 18: Liberação controlada.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Constituintes químicos do óleo essencial da <i>Piper callosum</i>	28
TABELA 2: Principais grupos funcionais identificados.....	30
TABELA 3: Valores dos parâmetros avaliados durante os testes	41
TABELA 4: Tamanho médio e índice de polidispersão das nanopartículas	42
TABELA 5: Determinação do mecanismo de liberação.....	49

LISTA DE SIGLAS

PCL – poli- ϵ -caprolactona

PC – *Piper callosum*

TACC – triglicerídeo do ácido cáprico-caprílico

OE – óleo essencial

SPAN - monoestearato de sorbitano

NE – fenoxietanol-2-metil-2H-isotiazolin-3-ona

EE – Eficiência de Encapsulamento

TWEEN 80® - monolaurato de polioxietenosorbitano

NP – nanopartículas poliméricas

NP-PC – nanopartículas poliméricas contendo óleo essencial de *Piper callosum*

NPV – nanopartículas poliméricas vazias

PDI – Índice de Polidispersão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. RVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 O papel e os efeitos dos agrotóxicos sintéticos convencionais.....	16
3.2 <i>Piper callosum</i>	17
3.3 Encapsulamento de ativos.....	19
3.4 Nanopartículas biodegradáveis baseadas em Gelatina/PCL	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Obtenção do óleo essencial	23
4.2 Quantificação e identificação dos constituintes químicos do OE.....	23
4.3 Desenvolvimento das nanopartículas biodegradáveis.....	24
4.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....	25
4.5 Avaliação da estabilidade das formulações.....	25
4.6 Análise topográfica das nanopartículas.....	25
4.7 Estudo de estabilidade das formulações manipuladas /em prateleira.....	25
4.8 Liberação controlada	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
5.1 Constituição química do óleo essencial	27
5.2 Análise das formulações por FTIR	29
5.3 Avaliação de estabilidade das formulações manipuláveis.....	31
6. ESCOLHA DA FORMULAÇÃO MAIS ESTÁVEL	41

7. ANÁLISE TOPOGRÁFICA.....	43
8. ESTUDO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO MANIPULADA	44
9. ESTUDO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO EM PRATELEIRA	45
10. LIBERAÇÃO CONTROLADA DO OE	47
11. CONCLUSÕES	49
12. REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

A *Piper callosum* é uma espécie amplamente encontrada na Amazônia e pertence ao gênero *Piper*, da família Piperaceae. A quantidade de óleo essencial (OE) contido nessa espécie é geralmente abundante, além de possuir múltiplas funções biológicas que resultam em diversas aplicações, incluindo a medicina tradicional (TAKEARA, 2017). No Estado do Amazonas, o óleo essencial da *P. callosum* é conhecido popularmente como “óleo elétrico”, e sua constituição química é formada, principalmente, por terpenóides, monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides.

A população nortista utiliza esse óleo no controle de insetos e também como regulador das funções estomacais. Além disso, trabalhos reportam que esta espécie possui diversas funções terapêuticas, representando uma promissora alternativa para aplicações em medicina (BATISTA et al., 2012).

O avanço tecnológico possibilitou o desenvolvimento de nano/micropartículas carreadoras de substâncias ativas (GHASEMISHAHRESTANI et al, 2015). A nanotecnologia vem proporcionando o desenvolvimento de produtos eficazes, de baixa toxicidade e baixo custo, como é o caso dos biocidas de liberação controlada baseados no encapsulamento do OE de várias espécies de plantas ricas em substâncias biologicamente ativas contra fungos, bactérias, vírus, larvas, insetos e pragas da agricultura (CALO et al., 2015; KHALIL et al, 2018; CORRÊA et al., 2019; ASIAEI et al., 2018; MOSTAFA et al., 2018; HAMED et al, 2016; FARIAS et al., 2019; WILLIAMS & WYNER, 2019; ESFANJANI, 2017).

A proposta do desenvolvimento de um biocida baseado no encapsulamento de OE já vem sendo reportada em literatura científica. No entanto, não foram encontrados trabalhos que reportam o encapsulamento do OE da *P. callosum* em nanopartículas poliméricas biodegradáveis constituídas por gelatina e PCL. Além disso, poucos estudos focam na avaliação da estabilidade dessas formulações a longo prazo, especialmente aqueles envolvendo como parâmetros de avaliação diferentes temperaturas de acondicionamento e a utilização de conservantes.

Especialmente nos dias atuais, a utilização de produtos alternativos e eficazes no combate de pragas vem ganhando destaque. Tais formulações devem garantir a preservação do meio ambiente, além de exibir baixa ou nenhuma toxicidade para o ser humano. Os inseticidas químicos tradicionais que vêm sendo utilizados na agricultura são extremamente tóxicos, sendo a maioria deles classificados como organofosforados. O sul e o sudeste do país são os maiores consumidores dessas substâncias e, conseqüentemente, também são as regiões que mais apresentam casos de intoxicação, câncer e morte devido à exposição a esses agrotóxicos (SOUZA; PEREIRA, 2019).

Dessa forma, essa pesquisa visa o desenvolvimento de uma formulação alternativa, baseada no desenvolvimento de um biocida a partir do óleo essencial da espécie *P. callosum* encapsulado em nanopartículas poliméricas biodegradáveis desenvolvidas à base de gelatina e poli- ϵ -caprolactona (PCL). Além de propor o desenvolvimento de uma nova formulação, a mesma foi avaliada em função do tempo em diferentes temperaturas (25 °C e 35 °C) e conservantes. Diferentes conservantes foram testados [a saber, (fenoxietanol-2-metil-2H-isotiazolin-3-ona - NE), ácido cítrico e timol], a fim de verificar sua influência na estabilidade das formulações em função do tempo. Além disso, a avaliação da estabilidade também foi acompanhada através da estimativa da eficiência de encapsulamento (EE), medidas de condutividade elétrica, turbidez e pH, e avaliação de propriedades organolépticas (cor e odor), acompanhadas periodicamente para selecionar a formulação mais estável. Considerando o potencial bioativo do óleo essencial da espécie *P. callosum*, espera-se contribuir cientificamente através desta pesquisa com a proposição de uma nova formulação alternativa, eficaz e de elevada estabilidade para agir como biocida alternativo no possível controle de pragas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma formulação alternativa de liberação controlada baseado no encapsulamento do óleo essencial da espécie *Piper callosum*, verificando a influência da temperatura e de conservantes na estabilidade das formulações.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar o OE por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) visando a identificação e a quantificação de seus constituintes químicos;
- Desenvolver um sistema de nanopartículas biodegradáveis baseadas em gelatina e poli- ϵ -caprolactona (PCL);
- Estimar o tamanho médio e o índice de polidispersão das nanopartículas poliméricas desenvolvidas;
- Estimar a EE do óleo essencial através das técnicas de FTIR - Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier e UV-vis – Espectrometria no Ultravioleta Visível;
- Avaliar a estabilidade das formulações em função dos conservantes NE, ácido cítrico e timol para ensaios de manipulação e de prateleira considerando como parâmetros a EE, pH, turbidez, propriedades organolépticas (cor e odor) e condutividade elétrica;
- Avaliar a cinética de liberação controlada do óleo essencial em diferentes pH.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A nanotecnologia tem proporcionado ferramentas para o desenvolvimento de biocidas nanoparticulados e biodegradáveis, carregados de ativos naturais atóxicos, e capazes de controlar diversos microrganismos patogênicos ao meio ambiente e ao ser humano. A seguir será apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre (i) o papel e os efeitos dos agrotóxicos sintéticos convencionais, (ii) a espécie *Piper callosum*, (iii) a técnica de encapsulamento de ativos, e também uma breve introdução sobre (iv) nanopartículas biodegradáveis baseadas em PCL e Gelatina.

3.1. O papel e os efeitos dos agrotóxicos sintéticos convencionais

Os agrotóxicos convencionais têm sido importantes para o desenvolvimento agrícola. Desde o seu surgimento, eles vêm exercendo o seu papel na proteção de diferentes cultivos. No entanto, suas substâncias tóxicas comprometem os alimentos, contaminam lençóis freáticos e ocasionam danos à saúde humana e animal. Muitos desses problemas são consequência de sua utilização indiscriminada, técnicas inapropriadas de manejo e concentrações elevadas. Os agrotóxicos sintéticos convencionais são produtos usados na agricultura visando o controle ou a eliminação dos problemas que decorrem dos ataques de pragas e doenças nas plantas agricultáveis. Entretanto, diversas pesquisas vêm mostrando que esses produtos ocasionam danos ao meio ambiente e às pessoas que os manejam (YILMAZ et al., 2019; PAVELA; GOVINDARAJAN, 2017).

Desde 2008 o Brasil é o maior consumidor de organofosforados do mundo em função do agronegócio, que representa um papel de destaque no setor econômico. Devido a esse consumo exacerbado, encontra-se entre as nações com maior número de mortes confirmadas e pessoas sequeladas devido à exposição a essas substâncias (GRIGORI, 2019). As regiões sul e sudeste do país são as que mais fazem uso de agrotóxicos sintéticos e, como consequência, são as regiões com maior incidência de danos causados à saúde humana.

Dentre os agrotóxicos sintéticos, os inseticidas baseados em substâncias organofosforadas são responsáveis por mais de 2/3 das mortes e mais de 3 milhões de casos de intoxicação. Os danos mais comuns são perda auditiva, malformações congênitas, síndromes intermediárias após exposição, síndromes neurológicas, neuropatias e, em último caso, a morte.

Considerando os graves danos que vêm sendo observados como recorrência do uso indiscriminado de agrotóxicos, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para propor diferentes formulações baseadas na atividade de produtos naturais, como os OE. Existem evidências científicas relatando o uso de plantas com propriedades repelentes e bioativas para o desenvolvimento de produtos alternativos naturais, atóxicos e eficientes (CORRÊA; SALGADO, 2011; MOSSA, 2016). A constituição química dos óleos essenciais de determinadas plantas oscila de acordo com a sua espécie, e suas atividades biológicas estão relacionadas a seus constituintes e grupos funcionais (MIRANDA et al., 2016). Por essa razão, algumas delas podem apresentar funções específicas inseticidas, fungicidas, acaricidas, bactericidas etc. Tais funções vêm sendo exploradas para o desenvolvimento de novas formulações biocidas.

3.2. *Piper callosum*

As plantas que fazem parte do grupo Piperaceae, além de serem grandes produtoras de OE, são ricas em substâncias bioativas. Dentre essas espécies destacam-se a *Piper nigrum*, *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Piper marginatum*, as quais possuem atividades inseticidas e larvicidas comprovadas (COSTA et al., 2010; SILVA et al., 2018). Os óleos essenciais de determinadas espécies vegetais possuem inúmeras atividades biocidas (SOUTO; HARADA; MAIA, 2011; SILVA; BASTOS, 2007), funções antioxidantes, antimicrobianas e antibacterianas (ABEW; SAHILE; MOGES, 2014) além de propriedades fungicidas (ALMEIDA et al., 2018).

A Amazônia possui um dos maiores ecossistemas mundiais com uma ampla variedade de plantas ricas em OE com funções bioativas e medicinais (ANDRADE;

GUIMARÃES; MAIA, 2009; TAKEARA, 2017). A *P. callosum* é o maior gênero da família Piperaceae (SILVA; BASTOS, 2007; REGINFO-SALGADO; FERNANDEZ-VILCHEZ; VARGAS-ARANA, 2010) e encontra-se amplamente distribuída no norte do país. Esta espécie é subarborescente perene, com caules subarborescentes e ramos nodosos, folhas alternas com as nervuras permanentes na face central, flores pequenas, amareladas e agregadas em espigas volumosas. Além disso, apresenta uma predisposição por climas quentes e solos ricos em matéria orgânica, justificando o fato de ser amplamente encontrada no Estado do Amazonas.

Na região norte do Brasil a *P. callosum* é conhecida como “óleo elétrico” por apresentar alívio imediato das dores musculares (analgesia), sendo também utilizada na medicina popular para combater dores estomacais e aliviar o incômodo de picadas de insetos (BERNARD et al., 2001). A **Figura 1** mostra a *P. callosum*.



Figura 1: *Piper callosum*. Fonte: EMBRAPA (2019).

O OE desta espécie é constituído por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (SILVA et al., 2017; SAAD et al., 2018). Muitos trabalhos reportam que o constituinte químico majoritário da *P. callosum* é o safrol, com 70 % de participação na constituição do OE (SOUTO; HARADA; MAIA, 2011).

Estudos recentes comprovam a utilização do safrol para o desenvolvimento da síntese do alucinógeno 3,4 metilendioximetanfetamina, sendo também aplicado

como dopamina (neurotransmissor responsável pelo controle de movimentos, do aprendizado, emoções, cognição e memória), representando um grande avanço para a saúde dos pacientes portadores de distúrbios motores e neurológicos (CREMASCO; BRAGA, 2010).

O uso do safrol não é permitido nos EUA desde o século XX pela FDA (*Food and Drug Administration*) quando estudos sugeriram que o mesmo pode ser cancerígeno (MAAR; ROSENBROCK, 2012). Além disso, o safrol possui substâncias psicoativas e alucinógenas (ANVISA, 2014). Por essa razão tem sido muito procurado para fabricação de drogas ilegais (CARVALHO, 2010). Contudo, em concentrações específicas seu uso é autorizado no Brasil pela Anvisa para algumas aplicações, como em alimentos sólidos, produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (AZAMBUJA, 2011). O safrol vem sendo utilizado na indústria para o desenvolvimento de protetores solares por apresentar substâncias capazes de absorver a radiação UV.

A literatura também relata a presença de β -pineno com um constituinte químico relevante na composição do OE da *P. callosum*. Suas atividades têm sido relatadas como miorrelaxante, antimicrobiana (SILVA et al., 2012), antidepressiva (GUZMÁN-GUTIÉRREZ et al., 2012), antiespasmódica, anti-inflamatória, ansiolítica e hipotensora (MENEZES et al., 2010), além da ação inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) (SILVA, 2017). Outro constituinte do OE dessa espécie, o α -pineno, vem apontando para citotoxicidade para células de carcinoma hepatocelular humano (AZEVEDO, 2014).

3.3. Encapsulamento de ativos

A técnica de encapsulamento de ativos vem sendo amplamente aplicada para diversas finalidades (APOLINÁRIO et al., 2017). Encapsular nada mais é do que separar dois meios, um interno e outro externo, utilizando a isolamento do ativo por uma membrana conhecida como carreador. Normalmente, aplica-se o encapsulamento de substâncias ativas nos estados sólido, líquido e até mesmo gasoso. As distinções entre macroencapsulação, microencapsulação e

nanoencapsulação estão nas dimensões das partículas carreadoras, com características e propriedades físicas e químicas próprias (CHENG; ZHAI, 2017). A **Figura 2** mostra o esquema ilustrativo do encapsulamento de uma substância ativa em um carreador polimérico.

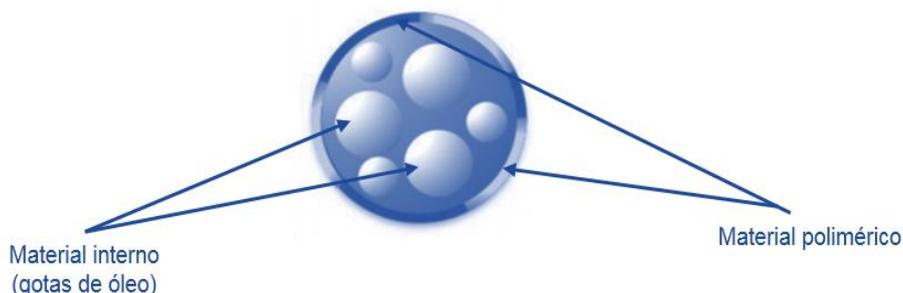


Figura 2: Esquema ilustrativo do encapsulamento de ativo. Fonte: Autor.

Uma das principais funções do nanoencapsulamento é proteger e prolongar a durabilidade de determinados princípios ativos até o momento de sua aplicação ou liberação (DE JONG; BORM, 2008), promovendo uma ação controlada (KALEPU; NEKKANTI, 2015; PARK et al., 2007). Por esta razão, esta técnica vem sendo amplamente aplicada para encapsular OE, por se tratar de substâncias voláteis e susceptíveis à fotodegradação (AZEVEDO et al., 2018).

As técnicas de encapsulamento e liberação controlada vêm sendo utilizadas principalmente por indústrias farmacêuticas, têxteis, de alimentos (AZEVEDO, 2005), para o controle de arboviroses (MAR et al., 2018), como larvicidas (AZEVEDO et al., 2018), dentre outras. Com a utilização de materiais biodegradáveis sendo empregados como carreadores, os OE vêm sendo encapsulados e liberados de maneira controlada visando maior durabilidade e eficácia de suas funções. Isso tem permitido o desenvolvimento dos mais diversos biocidas (PIRES, 2019; LIMA; ALBUQUERQUE; 2012; BARBOSA, 2016; SIMAS, 2004).

Neste trabalho foram escolhidos como carreadores a gelatina e o PCL. Nos últimos anos, a gelatina vem sendo empregada como carreador de fármacos, OE e produtos de origens biológicas (SILVA et al., 2018). O emprego dessa proteína como um eficiente carreador em sistemas nanotecnológicos de liberação controlada se dá

devido à sua biodegradabilidade, por ser atóxica, ao seu baixo custo e alta disponibilidade (NAIDU; PAULSON, 2011; DA SILVA, 2019). A gelatina é uma proteína colagenosa produzida por seres vivos e classificada em 3 tipos que se diferenciam por meio de suas fontes e estruturas (NEMATI et al., 2017): tipo A obtido de suínos, tipo B obtido de bovinos, e tipo C obtido de peixes e espécies marinhas. Os diferentes tipos de gelatina conferem diferentes propriedades a serem consideradas no desenvolvimento de nanopartículas carreadoras e formulações.

Além do uso tradicional da gelatina como carreador de substâncias ativas, o polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL) é um importante poliéster que garante elevada EE enquanto carreador (ZHANG et al., 2013). Assim como a gelatina, o PCL também vem sendo amplamente aplicado no desenvolvimento de nanopartículas biodegradáveis para fins de liberação controlada (SOUZA et al., 2012; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Alguns trabalhos reportam a associação entre gelatina e PCL no desenvolvimento de nanopartículas bicamadas para sistemas de liberação controlada. Essa associação pode se dar devido à necessidade de aumentar o tamanho médio das partículas a partir da sobreposição de uma segunda camada, melhorar a EE ou modificar o mecanismo de liberação do princípio ativo. Além de suas inúmeras aplicações, esses carreadores despertam grande interesse por serem biodegradáveis e muito menos agressivos ao meio ambiente. Além disso, representam materiais já amplamente estudados, mas que vem ganhando espaço notável nas aplicações em nanotecnologia (VIEIRA, 2010).

3.4. Nanopartículas biodegradáveis baseadas em Gelatina e PCL

Um sistema biodegradável é constituído por substâncias heterogêneas, que se tornam homogêneas por meio da participação dos tensoativos que atuam nas quebras de determinadas partículas, promovendo a mistura dos componentes. Os tensoativos são substâncias constituídas por moléculas solúveis por meio de solventes que modificam o estado aparente entre dois meios, ocasionando o surgimento de pequenas gotas homogêneas em escala nanométrica (GANTA et al., 2014). Normalmente utiliza-se água e OE para o desenvolvimento de determinados

sistemas biodegradáveis. No entanto, para formular um sistema de liberação controlada é importante considerar um conjunto de ações por meio da escolha de seus componentes. As substâncias ativas podem ser liberadas por alguns tipos de mecanismos. Dentre eles destacam-se a **erosão** (quando as nanopartículas liberam a substância ativa por meio de ações físicas e por reações químicas ligadas a degradação da parede polimérica) (RAMOS, 2018), e a **difusão** (a substância ativa é liberada com base em um gradiente de concentração, e difunde-se lentamente pelos seus poros) (SOUTO et al., 2012). Alguns exemplos de mecanismos de liberação controlada estão ilustrados na **Figura 3**.

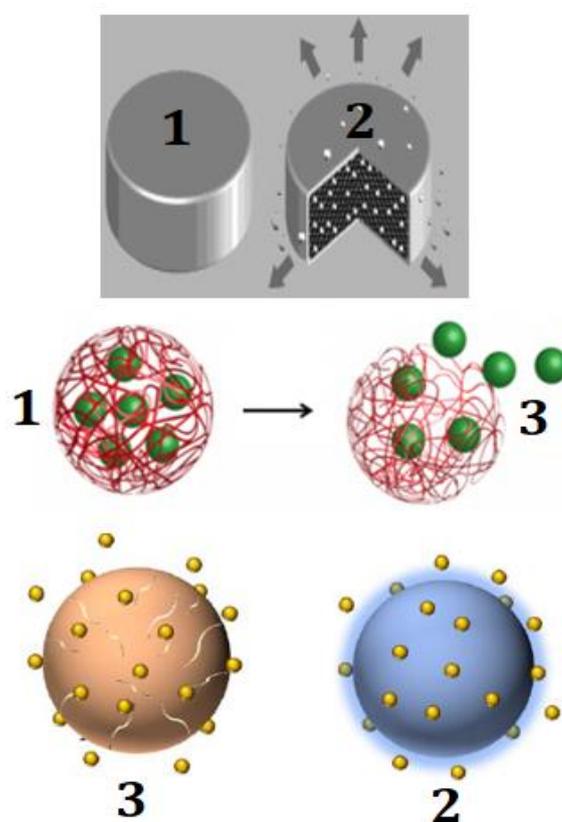


Figura 3: Ilustração de mecanismos de liberação (1-nanopartícula estável, 2 - difusão, 3-erosão). Fonte: Autor.

Nanopartículas biodegradáveis se desestabilizam quando expostas à radiação solar/excesso de luz (fotodegradação), pressão e ação mecânica, ou quando expostas a riscos biológicos por meio da proliferação de microrganismos (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2014).

Na área da saúde, nanopartículas biodegradáveis vêm sendo utilizadas há mais de quatro décadas e, com o avanço tecnológico, tem sido possível aplicar essas formulações com liberação controlada (SOKOLOV, 2018). A liberação controlada já é consolidada em diversas áreas, mas está sempre em desenvolvimento e modernização. Já é possível encontrar a venda antidepressivos, fertilizantes, alimentos, protetores solares, cosméticos, adesivos antitabagismo, repelentes etc. Agrotóxicos de liberação controlada são encontrados comercialmente somente com substâncias sintéticas e altamente tóxicas encapsuladas. Não são encontrados comercialmente biocidas baseados na liberação controlada de substâncias ativas naturais e de baixa toxicidade. Por essa razão, o desenvolvimento dessa nova formulação representa uma das motivações dessa pesquisa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção do óleo essencial

O OE da *P. callosum* (10 mL) foi cedido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Amazônia Ocidental, situada na Rodovia AM-010 de Manaus - Itacoatiara, no Km 30, na pessoa do Dr. Francisco Célio Maia Chaves.

4.2. Quantificação e identificação dos constituintes químicos do óleo essencial

Os constituintes químicos do OE foram identificados e quantificados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) (COLLINS, BRAGA & BONATO, 2006) na Central Analítica/UFAM, no equipamento Thermo, modelo Trace GC Ultra, coluna capilar Tr-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) utilizando He como gás de arraste (1.0 mL.min⁻¹). O volume injetado foi de 2 µL do OE *in natura* 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 (4 min), aumentando até 240 °C, com acréscimo de 4 °C.min⁻¹ 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 por comparação com dados da literatura (ADAMS, 2007).

4.3 Desenvolvimento das nanopartículas biodegradáveis

Normalmente a síntese de nanopartículas biodegradáveis são compostas por duas fases, aquosa e orgânica. Para a fase aquosa solubilizou-se 1 g de gelatina em 100 mL de água destilada seguida de agitação e aquecimento a 50 °C. Em outro béquer, dissolveu-se 0,3 g de Tween 80 em 50 mL de água destilada em agitação magnética até total solubilização. Em seguida, verteu-se o Tween 80 na gelatina solubilizada. Para a fase orgânica, solubilizou-se o PCL em 5 mL de diclorometano sob agitação magnética. Foi utilizado 0,02 g de SPAN, 0,1 g de TACC e 0,075 g de OE homogeneizados em 5 mL de diclorometano. Após agitação, verteu-se o SPAN, o TACC e o OE no PCL solubilizado originando a fase orgânica. Após o término da agitação magnética usou-se o ultra dispersor do tipo turrax para verter a fase orgânica na fase aquosa por 30 s. Em seguida, adicionou-se 0,0935 g de transglutaminase sob agitação magnética, ajustando-se o pH para 8. Após a preparação da síntese acrescentou-se o conservante NE. Em seguida, as formulações foram armazenadas em frascos reagentes e mantidas em incubadora com temperaturas controladas de 25 °C e 35 °C. A mesma metodologia foi utilizada para a adição de ácido cítrico e timol. O passo a passo do desenvolvimento das formulações é mostrado na **Figura 4**.

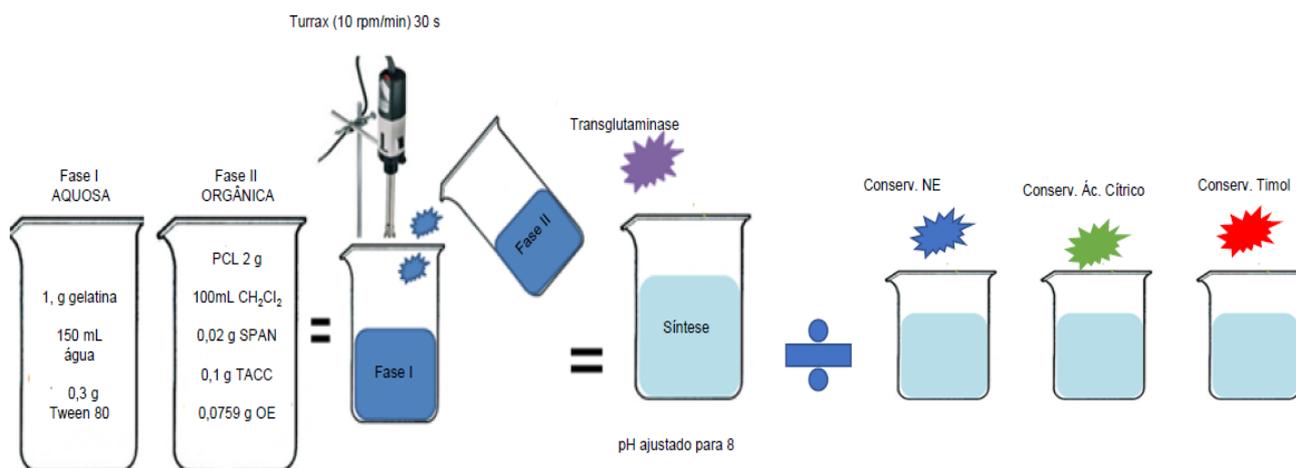


Figura 4: Esquema do desenvolvimento das formulações. Fonte: Autor.

4.4. Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier – FTIR

A determinação dos grupos funcionais orgânicos do OE e das nanopartículas carregadas e vazias foram analisadas no Espectrofotômetro de Infravermelho por transformada de Fourier da marca Shimadzu, modelo IR Prestige-21, utilizando-se o software IR solution versão 1.6, modo transmitância, 64 scans, no intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} . As medias foram realizadas no Hub Tecnologia e Inovação (Manaus/AM).

4.5. Avaliação da estabilidade das formulações

A avaliação da estabilidade das formulações foi realizada utilizando-se um pHmetro da marca BEL, Modelo PHS-BW; Turbidímetro Marca MS TECNOPON Modelo TB-1000; Condutivímetro Marca BEL, Modelo W12D; UV-vis Global Trade Technology Modelo UV 5100. A avaliação das propriedades organolépticas (cor e odor) foi realizada com o intuito de se verificar modificações físico-químicas associadas às possíveis alterações.

Para a estimativa da EE, as nanopartículas vazias e carregadas com OE foram separadas por centrifugação (DAIKI, modelo DTR 20.000) a 15000 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi utilizado para determinar a quantidade de OE livre. A EE foi calculada usando a fórmula:

$$EE (\%) = \frac{(\text{Concentração inicial do óleo essencial} - \text{Concentração do óleo livre})}{\text{Concentração do óleo essencial}} \times 100$$

4.6. Análise topográfica das nanopartículas

Utilizando-se uma pipeta, 1 gota das formulações contendo as nanopartículas foi adicionada em lâmina de vidro para posterior evaporação dos constituintes líquidos à temperatura ambiente por 3 h. Em seguida, a lâmina de vidro foi fixada em um suporte de amostra do AFM usando uma fita adesiva dupla face. As topografias das nanopartículas foram obtidas por microscopia de força atômica (*Atomic Force Microscopy* – AFM) no Laboratório de Óptica de Materiais (ÓPTIMA)

da UFAM, num microscópio Innova, Bruker em uma área de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$, operado no modo contato usando cantilevers de nitreto de silício e taxa de varredura de 1 Hz. As distribuições e tamanhos das partículas foram estimadas usando o software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

4.7. Estudo da estabilidade das formulações manipuladas e em prateleira

Os parâmetros avaliativos foram aplicados para (i) formulações manipuláveis e (ii) formulações em prateleira. A **Figura 5** aponta passo a passo das avaliações em ambos estados.



Figura 5: Esquema sistema manipulado e em prateleira. Fonte: Autor.

4.8. Liberação controlada

Estudos de liberação controlada *in vitro* foram realizados em membrana de diálise contendo 10 mL das formulações, e suspensa em água a 25 °C em diferentes pH (3, 7, 10) conforme **Figura 6**. Porções de 2 mL foram retiradas em diferentes

intervalos de tempo, e a concentração do OE nesta alíquota teve sua absorbância determinada por UV-vis. A quantidade de OE liberado foi determinada através da curva padrão previamente determinada. Os experimentos foram realizados em triplicata. A partir dos dados de liberação obtidos, foi realizada a análise dos mecanismos envolvidos no processo de liberação utilizando como base o modelo teórico descrito por Korsmeyer-Peppas.

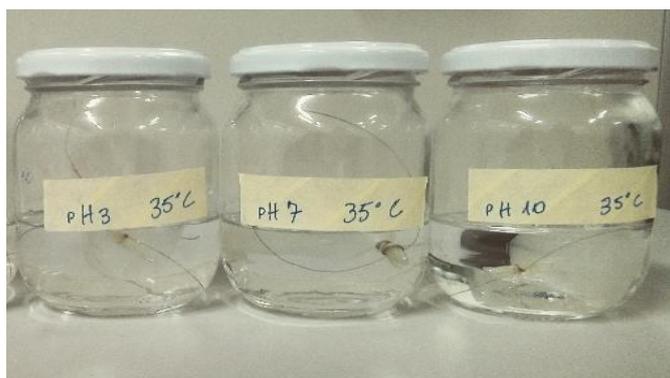


Figura 6: Liberação controlada em membrana de diálise. Fonte: Autor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para obtenção dos resultados dividiu-se a pesquisa em três etapas: (i) análise do OE da *Piper callosum*, (ii) caracterização das nanopartículas carregadas com OE, (iii) avaliação da estabilidade das nanopartículas em função de conservantes e temperaturas.

5.1 Constituição química do óleo essencial

A técnica de CG/EM permitiu a identificação de 8 monoterpenos que compõem 20 % do OE; 3 fenilpropenos que correspondem a 73 %, 3 sesquiterpenos com 1 % e outros não identificados que somam 3,8 %. No entanto, o principal componente do OE da *Piper callosum* foi o safrol (64 %), seguido pelo metileugenol (7,94 %), α -pineno (7,12 %) e β -pineno (6,62 %) conforme **Tabela 1**. Os constituintes com as maiores concentrações são citados na literatura por suas

múltiplas ações biológicas (NEGREIROS; MIQUELONI; ALVARES, 2017; IC et al., 2003; SALEHI 2019; CHAVES et al., 2012). A **Figura 7** aponta as fórmulas estruturais dos componentes majoritários do OE da *P. callosum*.

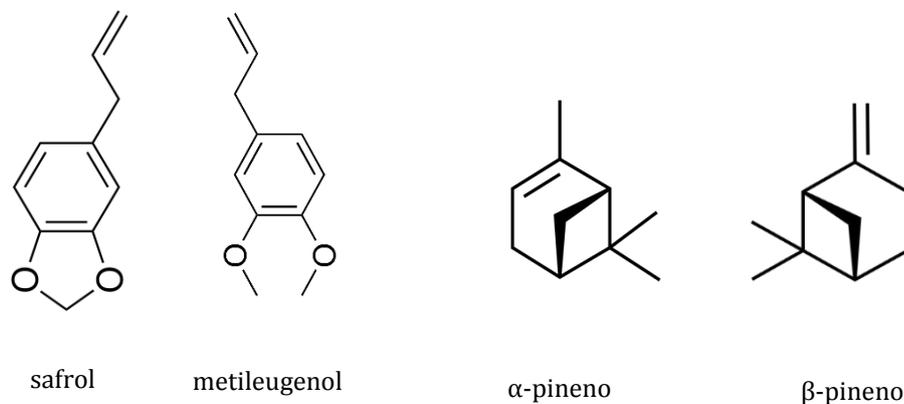


Figura 7: Constituintes majoritários do OE da *P. callosum*. Fonte: Autor.

Tabela 1: Constituintes químicos do óleo essencial da *Piper callosum*.

Nº	ÁREA	IRL	IRC
1 α -pineno	7,12	932	931
2 canfeno	0,46	944	944
3 β -pineno	6,62	974	972
4 mirceno	0,34	988	990
5 α -terpineno	1,42	1014	1013
6 1,8 cineol	3,68	1026	1027
7 γ -terpineno	2,83	1054	1057
8 terpinoleno	0,58	1086	1087
9 camfor	0,1	1141	1140
10 terpine-4-ol	0,52	1174	1176
11 safrol	63,7	1285	1290
12 metil eugenol	7,94	1403	1406
13 γ -muuroleno	0,24	1478	1478
14 germacreno	0,37	1480	1482
15 δ -cardineno	0,35	1522	1525
16 elemicin	0,88	1555	1559
Total identificado	97,17		
Monoterpenos nº 1,2,3,4, 5, 7, 8 e 10	19,89		
Fenilpropenos nº 11, 12 e 16	72,5		
Sesquiterpenos nº 13, 14 e 15	0,96		
Outros nº 6 e 9	3,78		

IRL= índice de retenção teórico

IRC = índice de retenção calculado, ADAMS 2007.

O safrol e os demais constituintes majoritários do OE da *P. callosum* estão presentes em grandes concentrações em várias espécies do gênero *Piper*, como *P. hispidinervum* (LIMA, et al., 2014); *P. callosum* (LUGO, et al., 2007; SOUTO, et al., 2012); *P. carniconectivum* (GONÇALVES, 2012) e *P. obliquum* (AIZZO, 2013).

5.2. Análise das formulações por FTIR

Através da Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi possível verificar qualitativamente o encapsulamento do OE nas formulações. A **Figura 8** mostra o espectro da formulação contendo o bioativo (em rosa), as nanopartículas vazias (em verde) e o óleo essencial *in natura* (em azul). A **Tabela 2** mostra os principais grupos funcionais identificados.

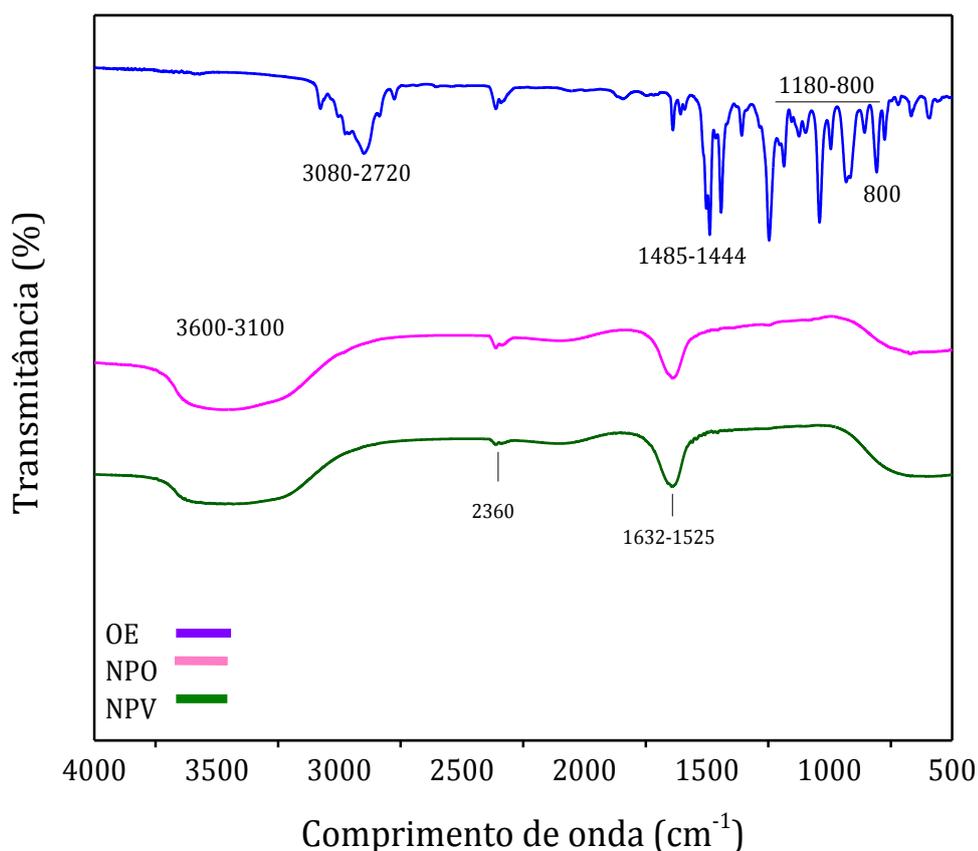


Figura 8: Espectro FTIR do óleo essencial da *Piper callosum* (em azul), nanopartículas com óleo essencial (em rosa) e nanopartículas vazias (em verde). Fonte: Autor.

Tabela 2: Principais grupos funcionais identificados.

Espectro (FTIR)	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
formulação	3600-3100	H ₂ O e O-H
	1632-1525	C = O e C-N e N-H
OE da <i>Piper callosum</i>	3080-2720	C-H de alcenos
	1180-800	vibrações de alcenos
	1485 e 1444	estiramentos típicos de ligação dupla de anel aromático

Fonte: Autor.

A extensa banda localizada entre 3600-3100 cm⁻¹ refere-se a H₂O, normalmente observada em espectros de nanopartículas poliméricas (RHODEN, 2018). Refere-se também ao material do carreador, neste caso a gelatina (PRESTES et al., 2013), da associação polimérica das vibrações de deformação axial do grupo O-H. Nessa mesma região, bandas de amins primárias e secundárias foram encontradas nos espectros de nanopartículas carregadas com OE e em espectros de nanopartículas vazias. As bandas identificadas entre 3080-2720 cm⁻¹ são C-H de alcenos dos constituintes do OE, provavelmente um grupo de monoterpenos (α -pineno, β -pineno, limoneno e 1,8-cineol), como também vibrações de alcenos nas bandas entre 1180-800 cm⁻¹ (LIMA; XAVIER; TEIXEIRA, 2017).

Os picos localizados em 2360 cm⁻¹ nas três amostras, provavelmente são devidos à exposição ao CO₂, alterando o perfil nessa região por interferência no equipamento. Bandas entre 1632-1525 cm⁻¹ se referem às amidas I e II, que são características do material polimérico. A amida I nesta região faz jus à vibração de C=O (SILVA, 2018) e a amida II se refere à vibração em o plano C-N e N-H (SILVESTRIN; ALENCASTRO, 2007). Dois estiramentos típicos de ligação dupla de anel aromático em 1485 cm⁻¹ e 1444 cm⁻¹ também foram observados, e estão associados aos dois componentes com maiores participações no OE da *P. callosum* (safrol, metileugenol). Os pequenos picos que não foram identificados ao longo do espectro das nanopartículas carregadas correspondem ao OE que não foi encapsulado.

Quando o espectro das nanopartículas contendo o bioativo foi comparado ao espectro da amostra de OE *in natura*, foi possível confirmar qualitativamente a EE, uma vez que os picos desapareceram no espectro da formulação contendo OE.

5.3. Avaliação da estabilidade das formulações manipuláveis

Foram avaliadas (i) a formulação contendo OE encapsulado e conservante NE (ii) a formulação contendo OE encapsulado e conservante ácido cítrico, (iii) a formulação contendo OE encapsulado e conservante timol. A finalidade da avaliação de estabilidade foi verificar possíveis alterações referentes à desestabilização das formulações, além de verificar qual a formulação mais estável ao longo do tempo.

Todos os produtos precisam passar por várias avaliações de estabilidade, industriais ou manipuladas. Os testes de estabilidade iniciais visam verificar a qualidade do produto antes da liberação para o consumidor. Esses testes são realizados para garantir sua estabilidade até o final de sua validade, ou seja, para garantir que o produto execute efetivamente a ação para a qual foi criado ([ANVISA, 2012](#)).

Os sistemas manipulados são aqueles expostos a fatores externos como mudança de temperatura, luz do ambiente, riscos biológicos entre outros fatores durante suas avaliações, visando testar o comportamento da solução perante situações físico-químicas mais extremas. As avaliações para esses sistemas são realizadas em curto espaço de tempo e frequentemente, o que difere de uma avaliação da formulação em prateleira, com a avaliação da estabilidade é realizada com menos frequência, evitando que esses produtos sejam expostos a fatores externos que influenciem na sua estabilidade. O objetivo dessas avaliações é determinar a validade para um produto que se encontra em estado fechado e a durabilidade para esse mesmo produto após aberto.

As avaliações físico-químicas mais aplicadas para determinar a estabilidade das nanopartículas poliméricas, são análises organolépticas, testes comportamentais por centrifugação, estresse térmico, medidas de pH e condutividade elétrica ([CADWALLADER, 1989](#); [IDSON, 1993](#)). Aplicações de parâmetros avaliativos para a caracterização de nanopartículas poliméricas são muito importantes, pois além de estudar seus comportamentos, elas determinam sua estabilidade ([McCLEMENTS, 2005](#)).

Os testes de estabilidade foram iniciados em centrífuga através de um estudo de estabilidade comportamental, sendo avaliado o estado das formulações após a centrifugação. O estudo de estabilidade comportamental visa verificar se as formulações suportam pressão, mobilização, alterações temporais sem separação de fases (ANVISA, 2004). As formulações foram submetidas a 15000 rpm e nenhuma disjunção de fase foi observada.

Após concluir o estudo comportamental das formulações pelo teste de centrifugação, a análise de estabilidade foi realizada a 25 °C e 35 °C, e os parâmetros avaliados foram propriedades organolépticas (cor e odor), turbidez, eficiência de encapsulamento, pH e condutividade elétrica. Todos os parâmetros foram analisados ao longo do tempo.

Avaliação das propriedades organolépticas

As propriedades organolépticas (cor e odor) foram analisadas em comparação com os aspectos iniciais da formulação padrão (**Figura 9**) para verificar se sofreram mudanças na cor e odor, além de separação de fases, turvação excessiva e rompimentos.



Figura 9: Aspecto das formulações recém preparadas (tempo zero). Fonte: Autor.

Em relação às propriedades organolépticas, as formulações (mantidas a 25 °C e 35 °C) contendo os conservantes ácido cítrico e o timol apresentaram mudança de cor e odor após 25 dias. Esses resultados sugerem uma possível proliferação de microrganismos (ISAAC et al., 2008). Esses resultados apontaram que os conservantes não foram apropriados. No entanto, as formulações contendo o conservante NE (armazenadas a 25 °C e 35 °C) não apresentaram alterações nas propriedades organolépticas avaliadas no mesmo período de 25 dias. Portanto, a formulação (mantida a 25 °C e 35 °C) contendo o conservante NE foi a única aprovada quando as propriedades organolépticas foram avaliadas. A **Figura 10** ilustra as formulações.

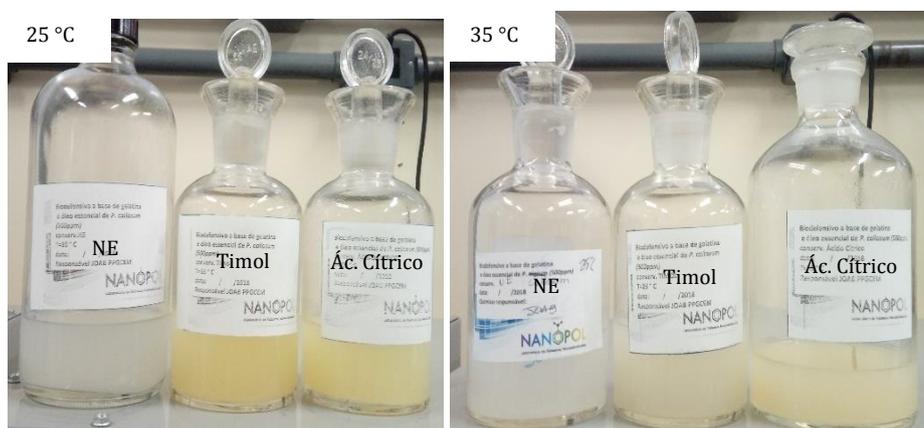


Figura 10: Propriedades Organolépticas/Sistemas após 20. Fonte: Autor.

Avaliação da turbidez

Corroborando com os indicativos de desestabilização constatados pela avaliação das propriedades organolépticas das formulações (a 25 °C e 35 °C) contendo os conservantes ácido cítrico e timol, a análise da turbidez dessas formulações também apresentou alterações. Sabe-se que a desestabilização de sistemas biodegradáveis se relaciona a fatores físicos, químicos e biológicos (ANVISA, 2012; THOMPSON, 2006; STAUB et al., 2007). Entretanto, nas formulações contendo o conservante NE (a 25 °C e 35 °C) não foram observadas mudanças significativas de valores de turbidez capazes de comprometer a

estabilidade, corroborando com a avaliação das propriedades organolépticas, de acordo com a **Figura 11**.

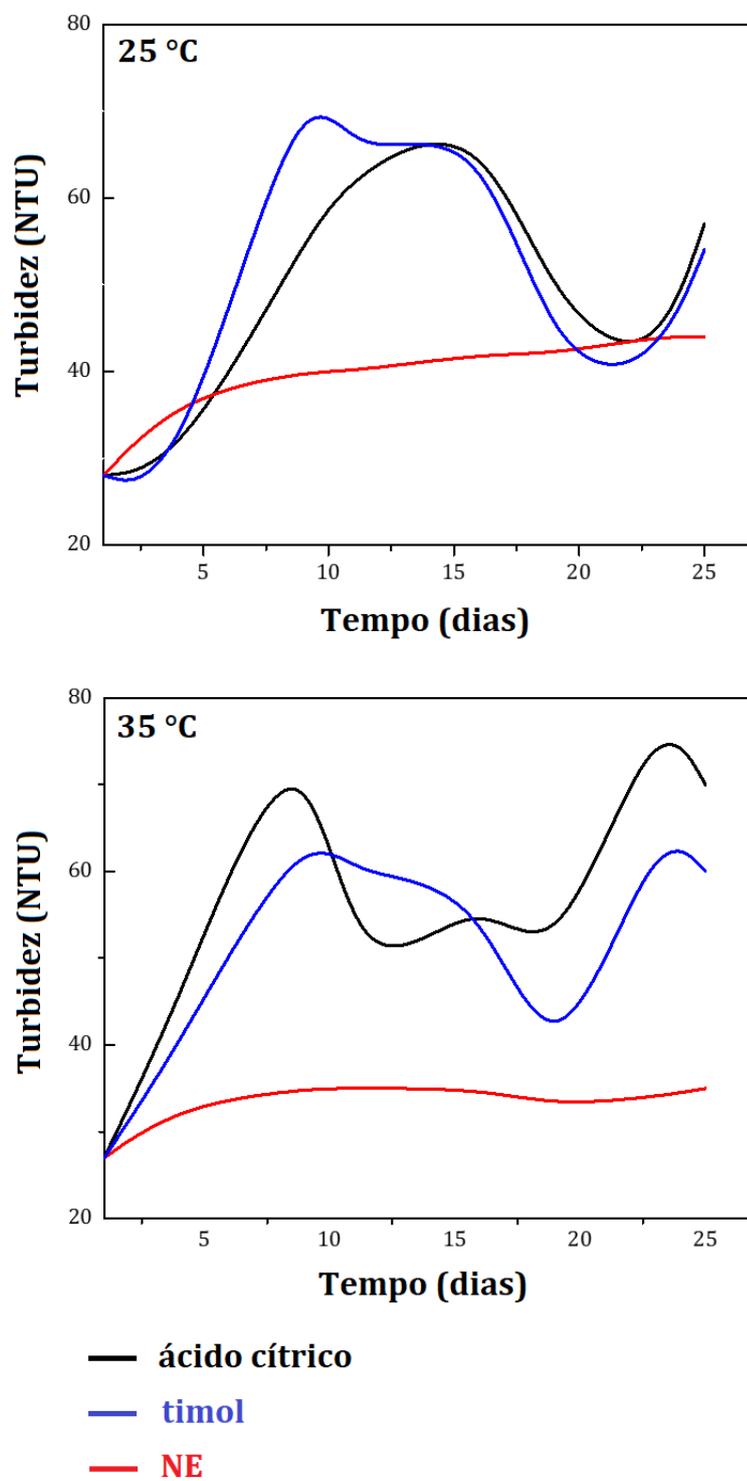


Figura 11: Turbidez. Fonte: Autor.

Avaliação da eficiência de encapsulamento

Todas as formulações apresentaram EE superior a 90 %, sendo um indicativo de que a combinação dos carreadores gelatina e PCL foi eficaz para encapsular o OE. A formulação contendo o conservante ácido cítrico apresentou EE inicial de (97 ± 2) % e valor final de (91 ± 2) % em ambas as temperaturas. As formulações contendo o conservante NE e timol apresentaram EE inicial de (95 ± 2) % e, ao final da análise, (90 ± 2) %. As formulações contendo o conservante timol apresentaram comportamentos semelhantes em ambas as temperaturas. A **Figura 12** mostra a variação da EE num período de avaliação de 25 dias para as formulações contendo os conservantes NE, ácido cítrico e timol.

Nanopartículas poliméricas biodegradáveis são consideradas eficientes quando sua eficiência de encapsulamento é superior a 70 % (XING et al., 2005). Se considerarmos apenas a análise da EE, todas as formulações indicariam estabilidade, uma vez que apresentaram elevada EE. Por essa razão é importante associar a avaliação da estabilidade com outras análises (como a avaliação organoléptica e turbidez) e, como visto anteriormente, as formulações contendo os conservantes ácido cítrico e timol não foram aprovadas nas análises anteriores, mesmo apresentando elevada EE.

Embora as formulações contendo os conservantes ácido cítrico e timol tenham apresentado desestabilização confirmado pela avaliação organoléptica e turbidez, esse fato não comprometeu a EE provavelmente por se tratar de um sistema de carreadores bicamadas, promovendo maior proteção do OE.

Alguns trabalhos reportam que nanossistemas poliméricos biodegradáveis que possuem duas camadas são mais resistentes a fatores extrínsecos do que aqueles que possuem apenas uma camada (APOLINÁRIO et al., 2017; SOUZA et al., 2012).

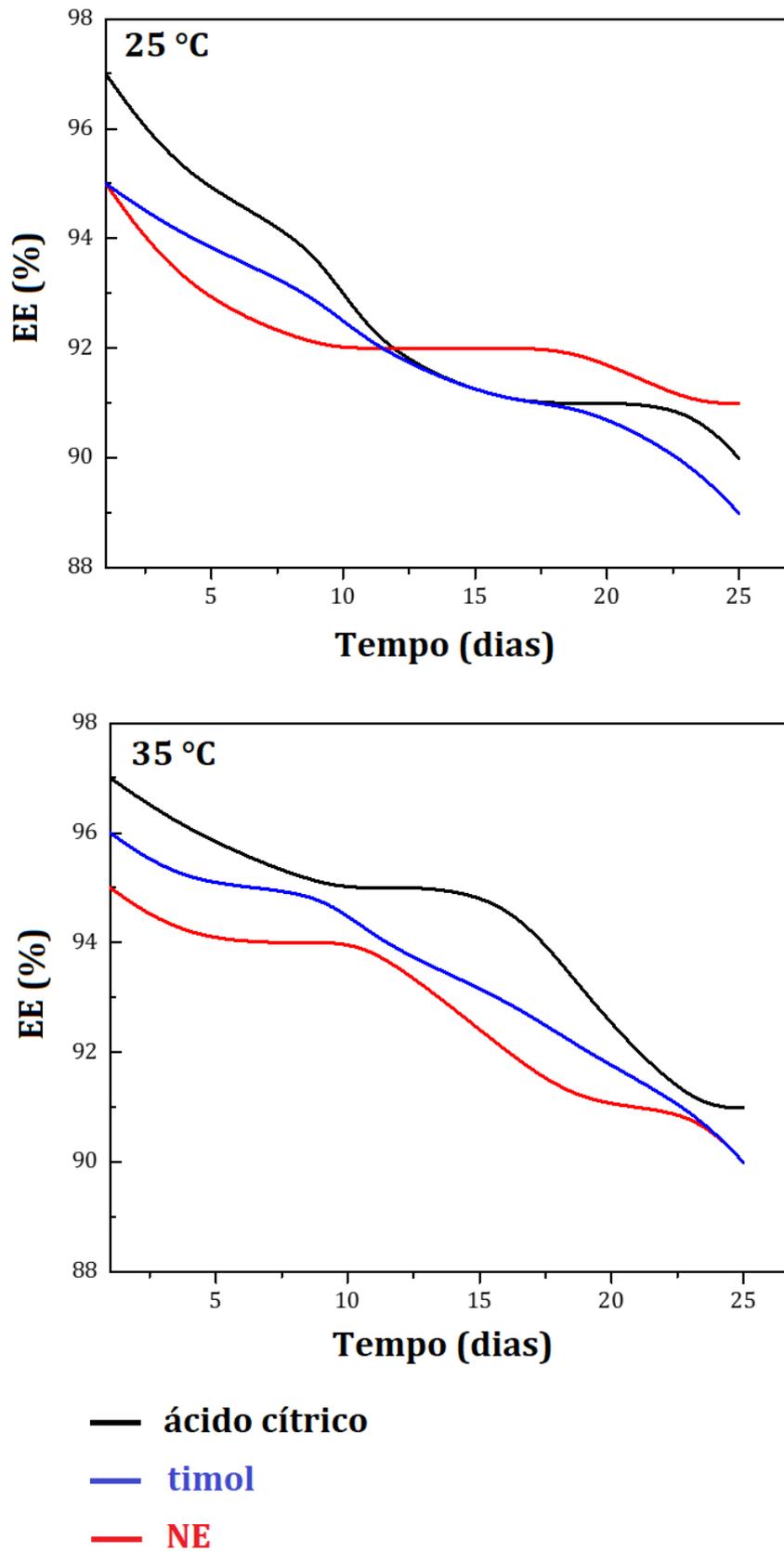


Figura 12: Eficiência de encapsulamento. Fonte: Autor.

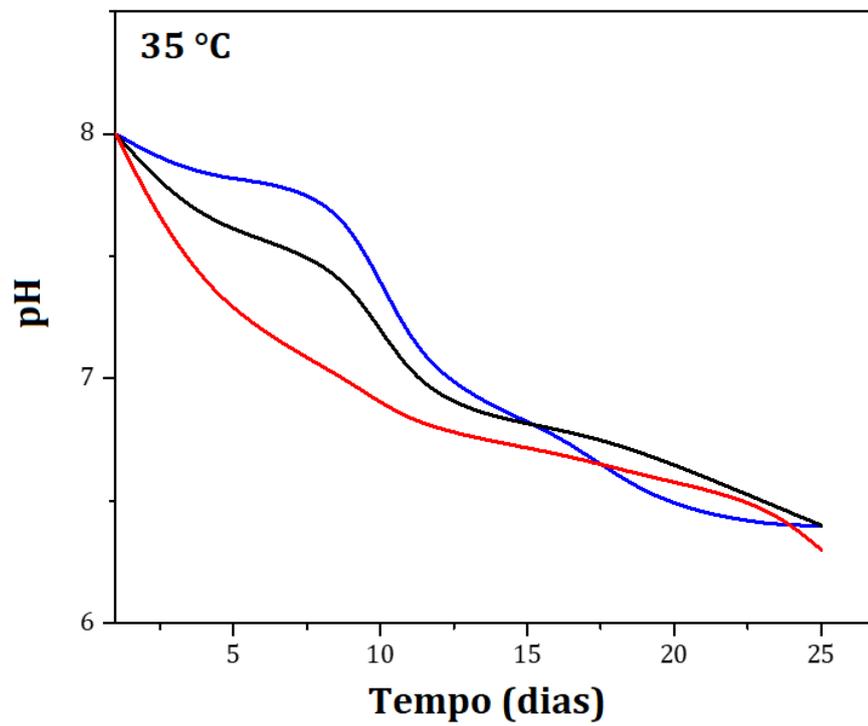
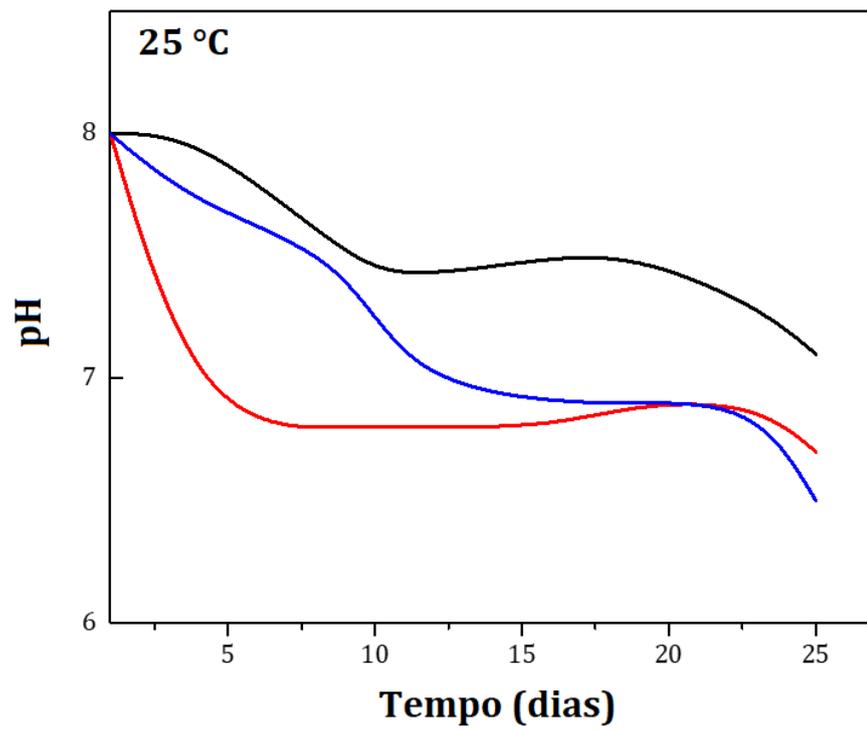
Avaliação do pH

Durante os 25 dias de análise da estabilidade das formulações, os valores dos pH foram diminuídos, mas se mantiveram acima de 6,3. Com base nesse resultado, pode-se sugerir que o OE permaneceu protegido pelos carreadores bicamadas durante o período de avaliação (como mostrou o elevado percentual de EE), uma vez que valores mais baixos de pH indicam exposição do OE (pH = 5,5) e desestabilização das formulações.

Todas as formulações apresentaram pH inicial igual a 8 e, na análise final, os resultados foram: as formulações contendo o conservante NE apresentaram pH = 6,7 a 25 °C e pH = 6,3 a 35 °C; as formulações contendo o conservante ácido cítrico apresentaram pH = 7,3 a 25 °C e pH = 6,4 a 35 °C; e as formulações contendo o conservante timol apresentaram pH = 6,5 a 25 °C e pH = 6,4 a 35 °C.

Como mostra a **Figura 13**, todas as formulações apresentaram diminuição do valor de pH ao longo dos 25 dias de análise. Esse fato está relacionado à exposição do OE ao meio pela diminuição da EE, como visto anteriormente. Dentre todas as formulações avaliadas, aquela contendo o conservante NE e mantida a 25 °C foi a que apresentou menor variação de pH após o quinto dia de análise. No entanto, como mencionado anteriormente, uma única avaliação isolada não é suficiente para analisar a estabilidade uma formulação sendo, portanto, necessária a união de diversos parâmetros para que essa avaliação seja eficiente.

No entanto, a diminuição dos valores de pH não está relacionada apenas com a exposição de OE no meio, uma vez que o pH do OE é ácido e, naturalmente a partir de sua exposição ao meio, a formulação tenderá ao pH do OE. A diminuição dos valores de pH também pode estar relacionada à proliferação de microrganismos na formulação, como bactérias e fungos, que altera naturalmente o pH (BRITO et al., 2011). Além disso, alterações extremas de pH são sugestivas de instabilidades, pois indicam degradação das nanopartículas e do material polimérico.



— ácido cítrico
— timol
— NE

Figura 13: Avaliação do pH das formulações. Fonte: Autor.

Avaliação da condutividade elétrica

A formulação contendo o conservante ácido cítrico apresentou condutividade elétrica de no intervalo de 1,9 a 4,0 mS (a 25 °C) e entre 1,3 a 2,9 mS (a 35 °C). As formulações contendo o conservante timol apresentaram condutividade elétrica no intervalo de 0,8 a 1,3 mS (a 25 °C), e entre 0,3 e 3,3 mS (a 35 °C). Já a formulação contendo o conservante NE a 25 °C apresentou condutividade elétrica entre 2,1 e 2,7 mS, enquanto aquela mantida a 35 °C esteve no intervalo entre 2,7 e 3,1 mS, conforme ilustra a **Figura 14**. Esses valores corroboram com as avaliações das propriedades organolépticas, de turbidez e de EE, pois mudanças inesperadas na condutividade elétrica são indicativas de instabilidades ([ANVISA, 2004](#)).

O aumento dos valores de condutividade elétrica em sistemas contendo OE encapsulado em nanopartículas poliméricas biodegradáveis está relacionado à presença de grande quantidade de carga (íons) livres na solução. Desta forma, o aumento da condutividade elétrica relaciona-se à exposição do OE na solução e, conseqüentemente, à diminuição da EE e desestabilização da formulação. Em alguns casos, esses valores de condutividade elétrica podem ser ainda mais alterados em função da temperatura na qual a formulação é acondicionada. A diminuição dos valores de pH pode ser correlacionada aos valores de condutividade elétrica, uma vez que essa diminuição está relacionada à exposição de maiores quantidades de OE no meio e, conseqüentemente, ao aumento de cargas ([GOIANO et al., 2016](#)).

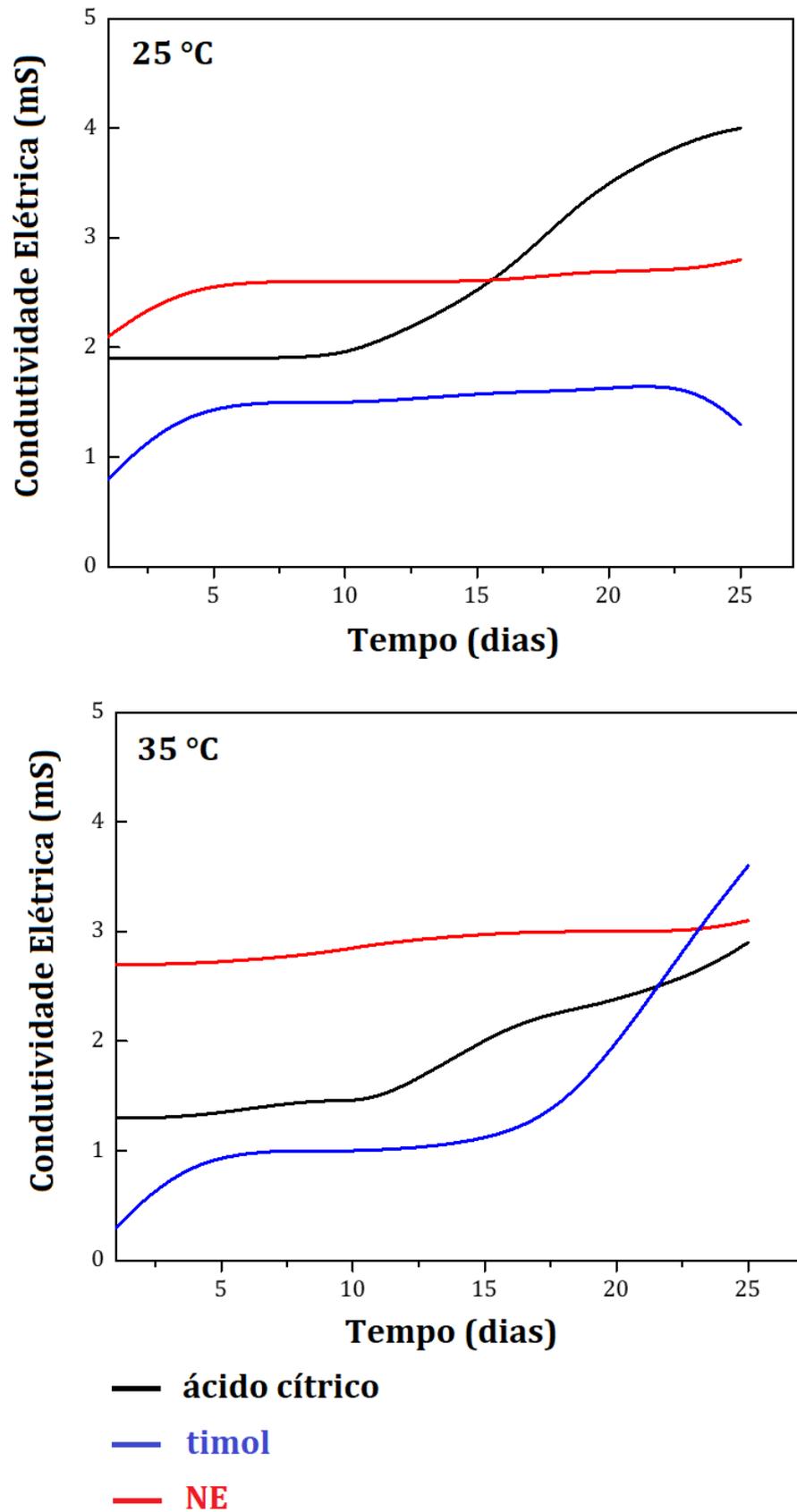


Figura 14: Condutividade elétrica. Fonte: Autor.

6. Escolha da formulação mais estável

A próxima etapa da pesquisa visou a escolha da formulação mais estável mediante todos os parâmetros avaliados anteriormente durante 25 dias, a saber: EE, pH, turbidez e condutividade elétrica. Os valores destes parâmetros obtidos na avaliação encontram-se na **Tabela 3**. Das formulações avaliadas, aquela que apresentou maior estabilidade (ou seja, aquela que foi aprovada em todos os parâmetros avaliados) foi a que continha o conservante NE, em ambas temperaturas, 25 °C e 35 °C. Os sistemas contendo os demais conservantes não foram aprovados em todos os parâmetros avaliativos. Portanto, as nanopartículas contendo o conservante NE foram selecionadas para a segunda etapa da pesquisa, o teste de prateleira.

Tabela 3: Valores dos parâmetros avaliados durante os testes de estabilidade das formulações

Turbidez (NTU)		
Conservante	25 °C	35 °C
NE	28 - 44	27 - 35
Ácido Cítrico	28 - 57	27 - 80
Timol	28 - 54	27 - 60
EE (%)		
Conservante	25 °C	35 °C
NE	95 - 90	95 - 90
Ácido Cítrico	97 - 91	97 - 91
Timol	95 - 90	96 - 90
pH		
Conservante	25 °C	35 °C
NE	6,7	6,3
Ácido Cítrico	7,3	6,4
Timol	6,5	6,4
Condutividade elétrica (mS)		
Conservante	25 °C	35 °C
NE	2,1 a 2,7	2,7 a 3,1
Ácido Cítrico	1,9 a 4,0	1,3 a 2,9
Timol	0,8 a 1,3	0,3 a 3,3

Fonte: Autor.

7. Análise topográfica

Como mencionado anteriormente, a formulação que se apresentou mais estável dentro dos parâmetros avaliativos foi aquela que continha o conservante NE sob 25 °C e 35 °C. Por esse motivo, esta formulação foi analisada por AFM para se determinar seus aspectos topográficos, bem como a distribuição de tamanho das nanopartículas que compõem as formulações. As imagens de AFM encontram-se na **Figura 15**.

Tanto as nanopartículas contendo OE quanto as nanopartículas vazias (ambas as formulações contendo o conservante NE) apresentaram morfologia com tendência esférica.

O tamanho médio das nanopartículas vazias foi encontrado em torno de 180 nm, com um índice de polidispersividade de 0,17.

O tamanho médio das nanopartículas a 25 °C contendo OE foi encontrado em torno de \pm 230 nm, com um índice de polidispersividade de 0,20.

O tamanho médio das nanopartículas a 35 °C contendo OE foi encontrado em torno de 260 nm, com um índice de distribuição de 0,22.

Como esperado, o tamanho médio das nanopartículas vazias foi menor que o tamanho médio das nanopartículas contendo OE encapsulado, sendo mais uma ferramenta para a confirmação da eficácia do encapsulamento. Esses dados também corroboram com aqueles de EE, uma vez que nanopartículas com diâmetros maiores estão relacionadas à maior quantidade de OE encapsulado. A **Tabela 4** sumariza os dados obtidos por AFM.

Tabela 4: Tamanho médio (nm) e Índice de Polidispersividade (PDI) das nanopartículas vazias e das nanopartículas carregadas com OE.

Nanopartículas	Tamanho Médio (nm)	Índice de Polidispersividade (PDI)
vazias	180	0.17
Com OE (25 °C)	230	0.20
Com OE (35 °C)	260	0.22

Fonte: Autor.

Segundo Schaffazick, (2003) nanopartículas poliméricas com PDI iguais ou aproximados a 0,2 possuem uniformidade e adequação para sistemas coloidais.

Quanto maior o tamanho das nanopartículas poliméricas, maior será sua eficiência de encapsulamento (YILMAZ et al., 2019). A formulação nanométrica submetida a 35 °C com o conservante NE foi a que apresentou maior tamanho e polidispersão comparada as demais soluções. Estes resultados sugerem que houve o encapsulamento do óleo essencial devido ao aumento do diâmetro médio das nanopartículas.

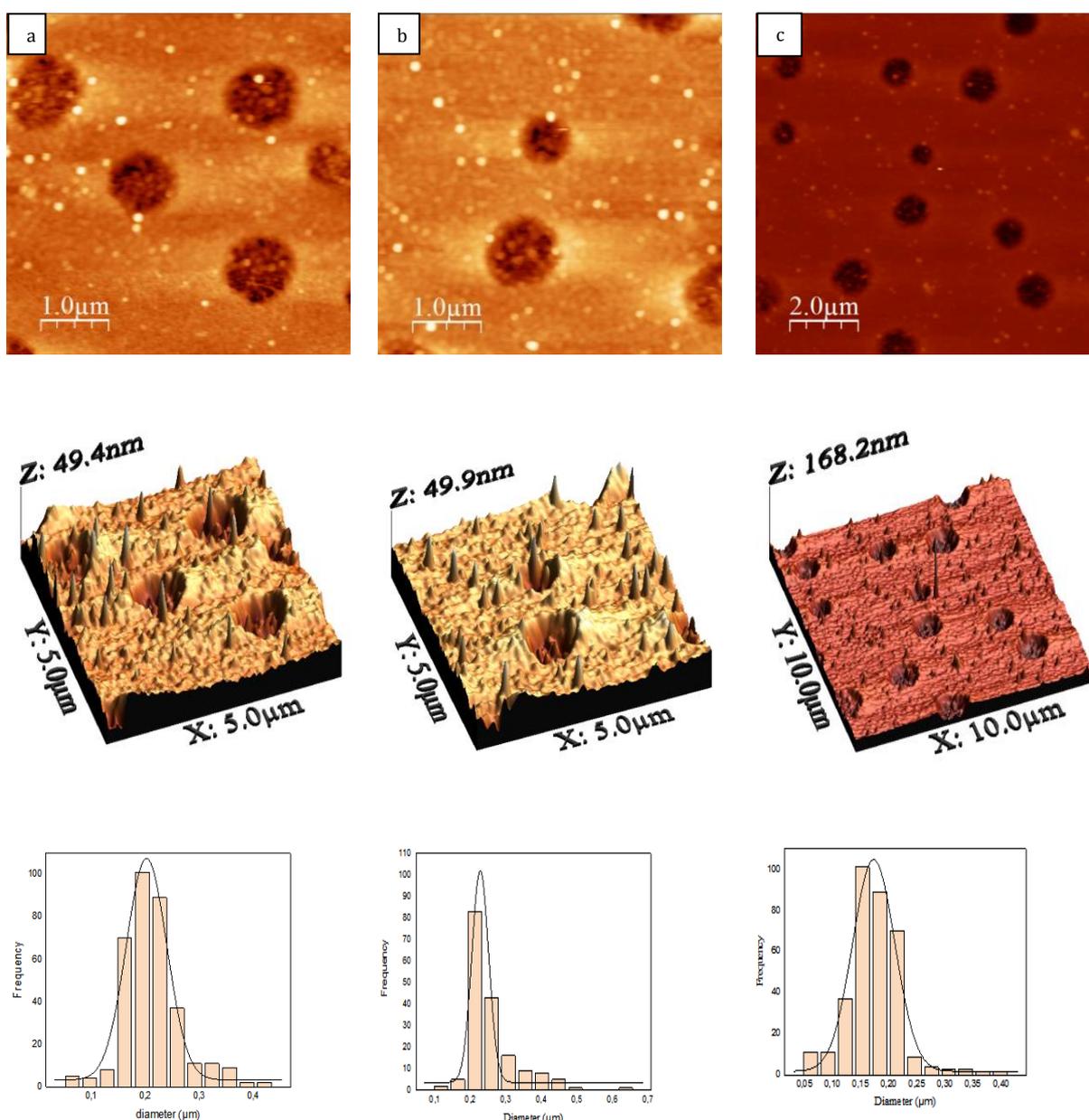


Figura 15: Imagens da topografia e histogramas para a) nanopartículas carregadas com óleo essencial a 25° C, b) nanopartículas carregadas com óleo essencial a 35° C e c) nanopartículas vazias. Fonte: AFM (2019).

8. Estudo de estabilidade da formulação manipulada

As formulações contendo o conservante NE e mantidas a 25 °C e 35 °C foram avaliadas novamente em ensaios de manipulação, ou seja, elas foram abertas em períodos constantes, colocando-as em contato com fatores externos como luz, ar, umidade etc. Essa avaliação se manteve por 120 dias. O intuito dessa avaliação é termos uma previsão do tempo que essa formulação poderia ser utilizada após aberta, ou seja, o tempo no qual a estabilidade seria mantida.

A análise da turbidez (25 °C e 35 °C) apontou o valor inicial das formulações de (20 ± 2) NTU, e valores finais de (35 ± 2) NTU (a 25 °C) e (30 ± 2) NTU (a 35 °C). Considerando o desvio, as duas formulações apresentaram praticamente o mesmo valor de turbidez ao final da análise. A diferença entre os valores finais e inicial da turbidez está possivelmente relacionada à desestabilização das nanopartículas e liberação do OE ao meio, introduzindo fragmentos dos carreadores na solução.

A avaliação da EE apontou valor inicial de 94 % para a formulação controle, e valor final de 90% (a 25 °C) e 91% (a 35 °C). A variação da EE pode ser acompanhada na **Figura 16**. Após os 120 dias, observou-se que a EE permaneceu acima de 70 %, sendo este o valor mínimo considerado eficiente para encapsular nanossistemas poliméricos biodegradáveis (DE MATOS; SCOPEL; DETTMER, 2018).

Para a condutividade elétrica, os resultados corroboram com os demais parâmetros. Assim como a turbidez e a EE exibiram ligeiro aumento de valores nas duas temperaturas, a condutividade elétrica também apresentou esse aumento. Esse fato ocorre, como explicado anteriormente, à exposição do OE no meio, fornecendo cargas para a solução.

No entanto, ainda é possível sugerir que a formulação mantida a 35 °C apresentou estabilidade ligeiramente superior em todos os parâmetros avaliados. Esse resultado é extremamente significativo pois é um indicativo de que esta formulação poderia ser utilizada em regiões de temperaturas mais elevadas, como é o caso do Estado do Amazonas.

Dessa forma, foi determinado um tempo útil de 120 nos quais as formulações contendo OE da *P. callosum* mantidas a 25 °C e 35 °C mantiveram suas propriedades

em níveis aceitáveis, ou seja, mantiveram uma estabilização aceitável. Com base nos resultados, podemos dizer que as nanopartículas poliméricas à base de PCL/gelatina contendo OE e conservante NE a 25 °C e 35 °C têm uma duração de, pelo menos, 120 dias após manipulação.

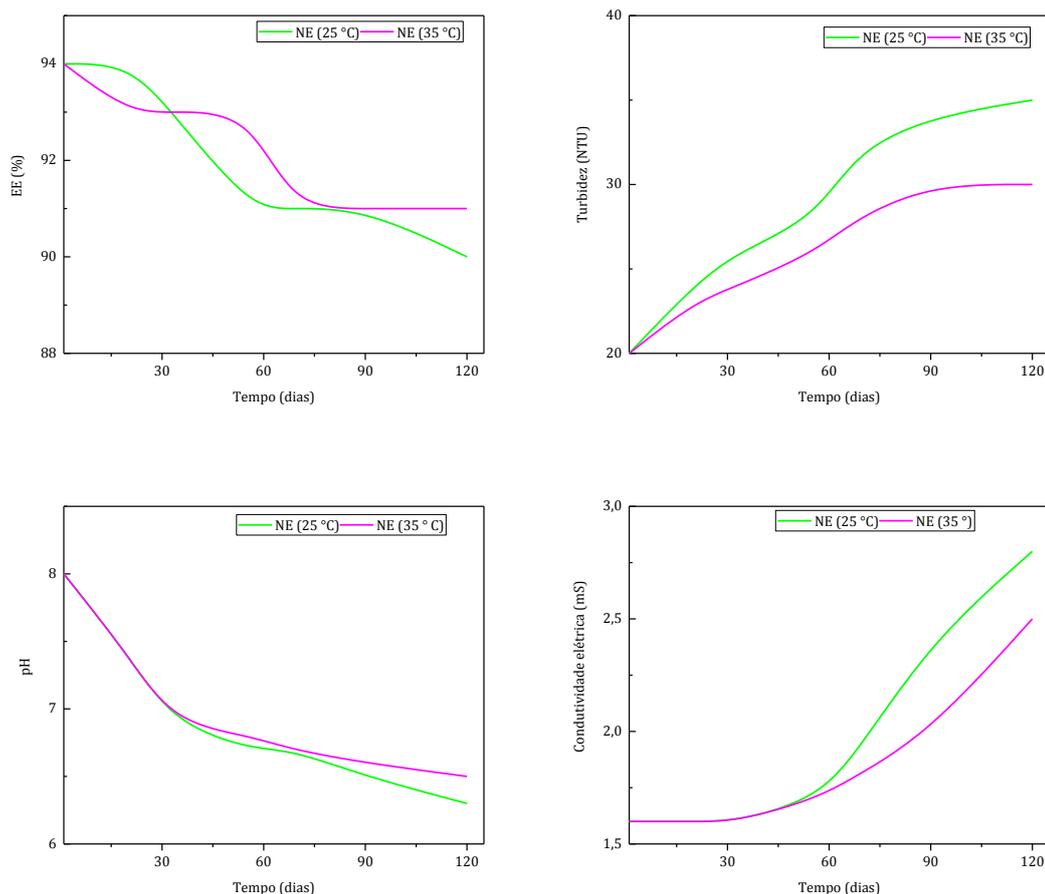


Figura 16: Estudo da estabilidade manipulada 120 dias. Fonte: autor.

9. Estudo de estabilidade da formulação em prateleira

Para concluir a pesquisa, foi realizado o estudo de estabilidade em prateleira das formulações mantidas a 25 °C e 35 °C contendo o conservante NE. Os métodos de avaliação foram os mesmos aplicados no sistema manipulado (propriedades organolépticas, EE, turbidez, pH e condutividade elétrica).

As formulações, após 240 dias de avaliação, começaram a apresentar odor desagradável e alteração de cor que pode ser ocasionada por proliferação de micro-

organismos. Sabe-se que tais carreadores em água possuem facilidade para proliferação de microrganismos (DE PAOLI, 2008; COSTA et al., 2014).

As análises das formulações foram realizadas mensalmente durante 240 dias. Os valores são exibidos na **Figura 17**.

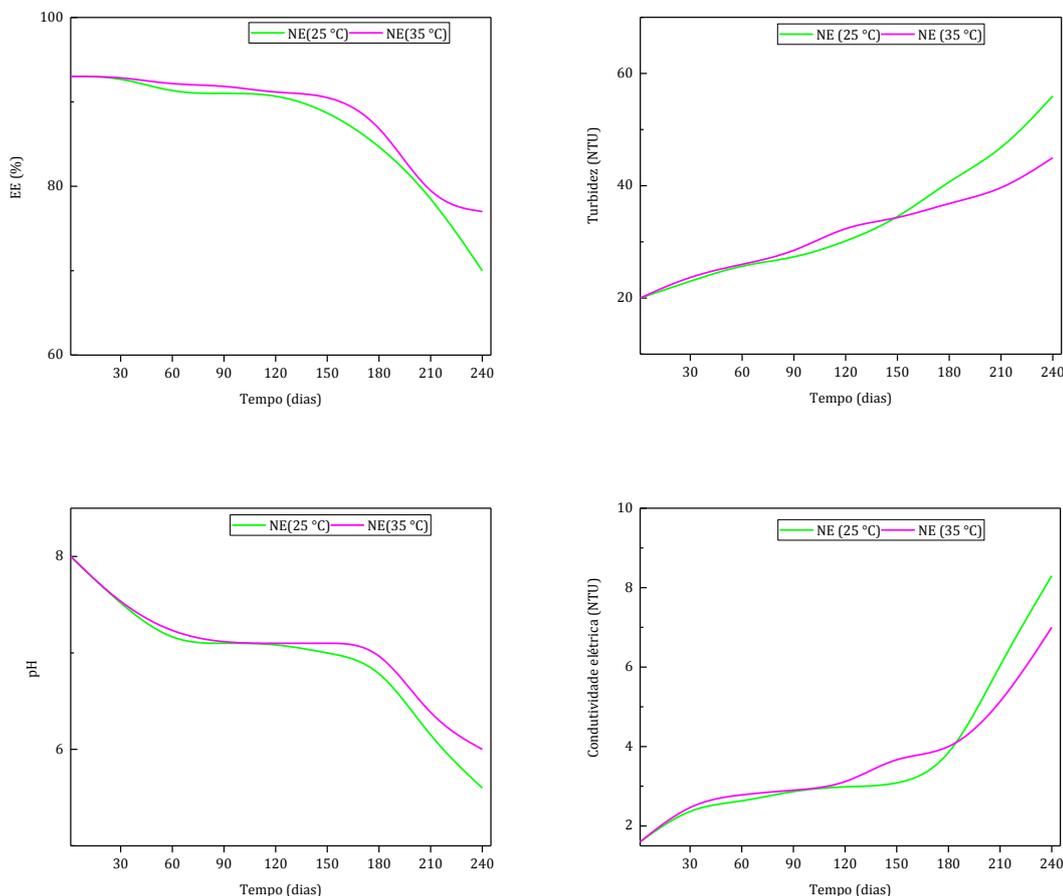


Figura 17: Estudo da estabilidade em prateleira 240 dias. Fonte: Autor.

As formulações a 25 °C e 35 °C apresentaram EE de 94 %, e terminaram em 240 dias com 70 % para a formulação mantida a 25 °C, e 77 % para a formulação mantida a 35 °C. Utilizando como base os parâmetros avaliativos, a formulação a 35 °C apresentou-se ligeiramente mais estável em todos os parâmetros.

Os resultados revelados pela EE foram confirmados pelos dados de turbidez, que indicaram valor inicial de 20 NTU para ambas as temperaturas, porém com a possível proliferação de microrganismos ao final do experimento, esse valor aumentou, finalizando em 56 NTU para a formulação mantida a 25 °C e 45 NTU para aquela mantida a 35 °C.

Tanto o material de parede quanto o OE da *Piper callosum* estão em uma escala ácida próxima ao pH 5. Portanto, espera-se que, de acordo com a desestabilização, as formulações se aproximem desse valor. O pH das formulações foi ajustado inicialmente para 8 em ambas as temperaturas. No entanto, após 240 dias, esses valores foram reduzidos. A formulação sob 25 °C apresentou como resultado final pH 5,6, enquanto a formulação mantida a 35 °C finalizou em pH 6. Esses valores se aproximam do pH do OE e do material de parede, indicando que quantidades de OE foram expostas ao meio, corroborando com os valores de EE. Os valores da condutividade elétrica também foram influenciados por essa razão.

Nanopartículas podem permanecer inalteradas por um certo tempo, dias, meses e até anos (CHANAMAI; McCLEMENTS, 2004). No entanto, as análises foram interrompidas devido às alterações organolépticas (cor e odor), e é aconselhável que as formulações mantenham seus aspectos iniciais desde o desenvolvimento até a validade (CRONEMBERGER; PAULA; MEIRELLES, 2015). A estabilidade das nanopartículas se dá à sua capacidade em resistir a mudanças nas suas propriedades físico-químicas e sensoriais com o tempo (ZÜGE, 2012).

Os dados obtidos no ensaio de estabilidade de prateleira mostraram que as formulações podem permanecer fechadas por até 240 dias, mantendo suas propriedades físicas durante esse período.

10. Liberação controlada do óleo essencial

A liberação controlada das formulações contendo o OE da *Piper callosum* foi analisada *in vitro* em diferentes pH (3, 7 e 10) sob duas temperaturas (25 °C e 35 °C) em função do tempo e do conservante NE pelo período de 120 horas (5 dias).

A **Figura 18** mostra as curvas de liberação controlada das formulações, as quais foram ajustadas ao modelo de Korsmeyer-Peppas para a identificação do mecanismo de liberação.

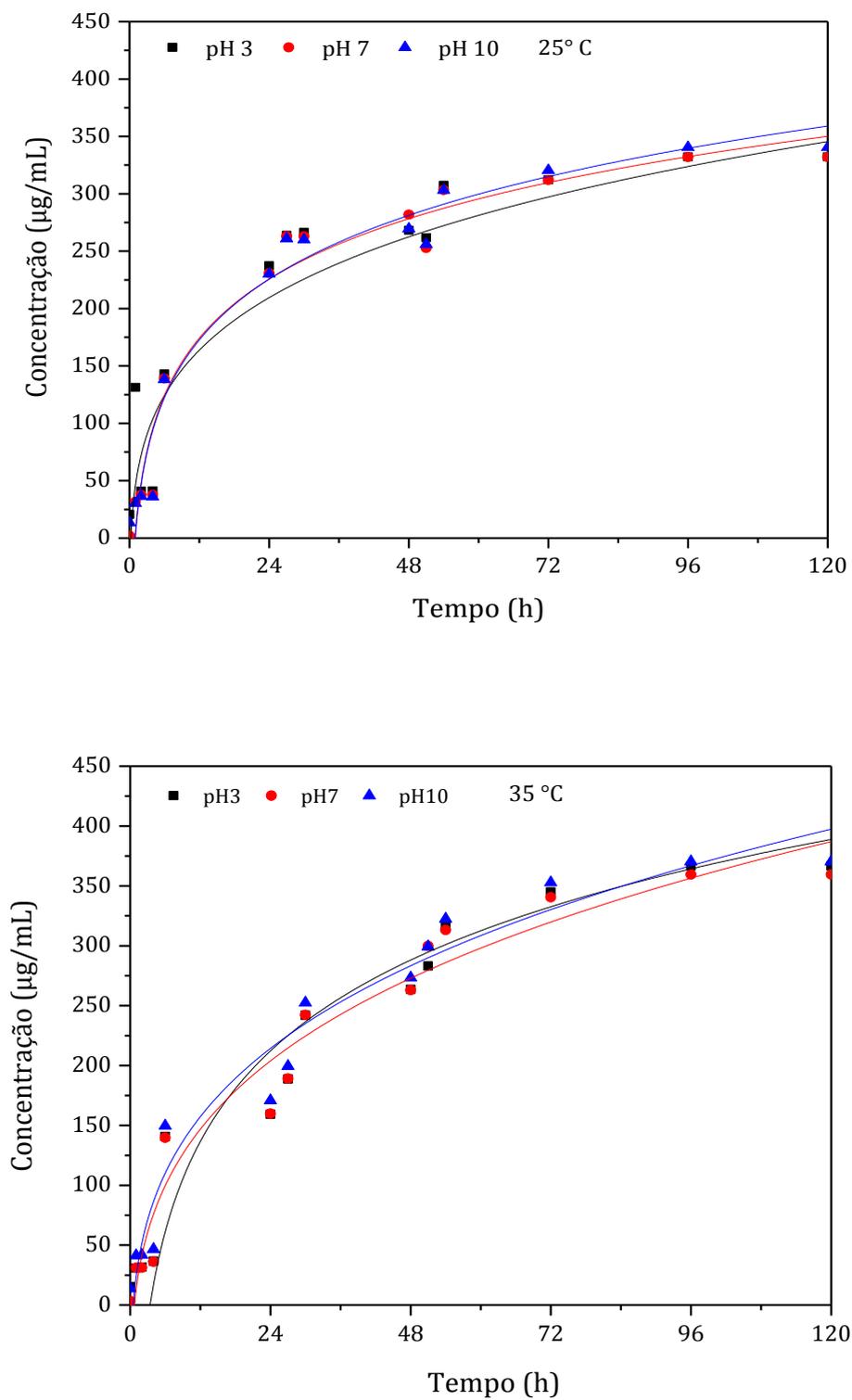


Figura 18: Liberação controlada. Fonte: autor.

As concentrações do OE liberadas em ambas as formulações foram bem próximas após 24 h, chegando a 200 ppm. O ensaio foi realizado por 120 h e a concentração total de OE liberada a 25 °C foi 332 ppm (em pH 3 e pH 7) e 340 ppm em pH 10. Para formulação a 35 °C, os valores foram de 367 ppm em pH 3, 360 ppm em pH 7 e 370 ppm em pH 10.

Esses dados mostram que as formulações desenvolvidas apresentam aproximadamente a mesma concentração de OE liberada, independentemente do pH. No entanto, notou-se que a formulação com o conservante NE mantida a 25 °C liberou o OE mais rapidamente. Dessa forma, é possível observar que a liberação do OE encapsulado pode ser influenciada pela temperatura, sendo liberado de forma mais eficiente e rápida em temperatura ambiente.

Utilizando como base o modelo de Korsmeyer-Peppas, foi possível determinar o mecanismo de liberação do OE. Os valores de n entre 0,43 e 0,89 confirmam o mecanismo de difusão anômala, sugerindo que a liberação do OE pode ocorrer tanto por difusão quanto por erosão (COSTA, 2020; DA SILVA, 2019). Esses dados são confirmados pela **Tabela 5**.

Tabela 5: Determinação do mecanismo de liberação do OE.

Modelo	Coefficientes	pH 3	pH 7	pH 10
Korsmeyer-Peppas 25 ° C	k	63,1	66,1	62,4
	n	0,64	0,67	0,62
	R ²	0,98	0,99	0,92
Modelo	Coefficientes	pH 3	pH 7	pH 10
Korsmeyer-Peppas 35 ° C	k	51,4	56,2	54,3
	n	0,6	0,68	0,61
	R ²	0,89	0,99	0,93

Fonte: Autor.

11. CONCLUSÕES

O presente trabalho desenvolveu com sucesso formulações baseadas em nanopartículas poliméricas biodegradáveis à base de PCL/gelatina contendo óleo essencial da *Piper callosum* encapsulado e mantidas em diferentes temperaturas

baseadas nos climas brasileiros. Inicialmente as formulações foram desenvolvidas e avaliadas ao longo do tempo em função do melhor conservante, ou seja, o nanossistema com o conservante que contribuiu para manter a formulação estável dentro dos parâmetros avaliativos. Este sistema foi aquele que continha o conservante NE. A análise das formulações por FTIR confirmou qualitativamente a eficiência de encapsulamento do óleo essencial. As características topográficas das formulações mostraram que as nanopartículas apresentam morfologia próxima à esférica, ideal para sistemas carreadores de ativos, porém as nanopartículas submetida a 35 ° C apresentaram maior tamanho e índice de polidispersão e como consequência maior eficiência de encapsulamento apontando que a formulação se apresenta mais estável em temperaturas mais elevadas. Os ensaios de liberação controlada apontaram que as formulações são capazes de liberar em torno de 200 ppm nas primeiras 24 h. Além disso, a concentração máxima de óleo essencial liberada após 120 h não foi significativamente influenciada pelo pH do meio, mas sim pela temperatura. Os dados analisados de estabilidade mostraram que a síntese com o conservante NE é promissora para futuras aplicações e que sua durabilidade foi encontrada em torno de 120 dias para sistemas manipuláveis e 240 dias para análise em prateleira. Os sistemas manipuláveis como os avaliados em prateleira se mostraram mais estáveis a 35 °C. Espera-se que esta presente pesquisa possa contribuir na proposição de uma formulação alternativa para ser utilizada como biocida eficaz de baixa toxicidade.

12. REFERÊNCIAS

ABEW, B.; SAHILE, S.; MOGES, F. In vitro antibacterial activity of leaf extracts of *Zehneria scabra* and *Ricinus communis* against *Escherichia coli* and methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of tropical Biomedicine**, v.4, p. 816-820, 2014.

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, p. 1-804, 2007.

AIZZO, J. R. S. Variabilidade Química do Óleo Essencial da *Piper obliquum* Ruiz & Pav. da Estação Ecológica Cuniã, Porto Velho-RO. Dissertação (Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente), Universidade Federal de Rondônia, 2013.

ALMEIDA, C. A. et al. Piper essential oils inhibit *Rhizopus oryzae* Growth, biofilm formation, and *Rhizopuspepsin* activity. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**. Article ID 5295619, 7 pages, 2018.

ANDRADE, E. H. A.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. **Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de Piper da Amazônia**. Belém: FEQ/UFPA, 2009. 448p.

ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos - séries temáticas**. 1a ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (2012).

ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (2014).

APOLINÁRIO, A. C. et al. Polimerossomos Versus Lipossomos: A Evolução Da “bala Mágica”. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 810–817, 2017.

ASIAEI, E. O.; MOGHIMIPOUR, E.; FAKOOR, M. H.; Evaluation of Antimicrobial Activity of *Eucalyptus camaldulensis* Essential Oil Against the Growth of Drug Resistant Bacteria. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 13, n. 4, 2018.

AZAMBUJA, WAGNER. Safrol (2011). <https://www.oleosessenciais.org/safrol/>. Acesso em 08/03/2020.

AZEVEDO, S. G. Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia spp.* (Myrtaceae) ocorrentes na Amazônia de terra firme. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Amazonas, 2014.

AZEVEDO, S. G et al., Bioactivity of *Licariapuchury-major* essential oil against *Aedes aegypti*, *Tetranychusurticae* and *Cerataphislataniae*. **Rec. Nat. Prod.** 12: 229 – 238, 2018.

AZEVEDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

BATISTA, A. C. et al. Produção de biomassa e teor de óleo essencial de plantas de óleo elétrico (*Piper callosum* Ruiz & Pav.) em diferentes níveis de luminosidade nas condições de. p. 5797–5805, 2012.

BARBOSA, P.F.P. Produção de nanopartículas poliméricas para estudo de liberação controlada de compostos bioativos para controle de *Rhipicephalus microplus* (acari:

ixodidae). Dissertação (Agroquímica), Instituto Federal de educação e tecnologia, GO, 2016.

BERNARD, P. et al. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A2 inhibitors. **Phytochemistry**, v. 58, p. 865-874, 2001.

BRITO. G. F. et al. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.6.2. 127-139, 2011.

CADWALLADER, D. E. Stability Testing – Its role in pre-formulation and formulation of cosmetic products. **Cosmetic and Toiletries**, v. 104, n. 11, p. 87-102, 1989.

CALO, J. R. et. al; Essential oils as antimicrobials in food systems–A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CALDERARI, M, T. **Estudos de óleos essenciais de Piperaceae do Vale do Itajaí**. Dissertação (Dissertação em Química) – UFSC. Florianópolis. p.117. 2002.

CARVALHO, M. C. Fação criminosa já fabrica ecstasy, aponta investigação. **Folha de São Paulo**. 29 de junho de 2010. Acesso em 08/03/2020.

COLLINS, C., BRAGA, G., & BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

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

COSTA, J. G. M. 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. 463-7, 2010.

COSTA, C. Z. et al. Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. XY, n. 00, p.1-9, 2014.

CORREA, M. S. et. al; Antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil from dried leaves of *Eucalyptus staigeriana*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, 2019.

CORRÊA, J. C. R; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações. **Rev. PI. Med.**, Botucatu, v. 13, n. 4, p. 500-506, 2011.

CHANAMAI, R; McCLEMENTS, D. J. Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.

CHAVES, F. C. M. et. al; Variação da composição química do óleo essencial de *Piper callosum* Ruiz & Pav. em função de níveis de luminosidade. In: **Embrapa Amazônia**

Ocidental - Resumo em Anais de congresso (ALICE). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MEDICINAL AND NUTRACEUTICAL PLANTS, 3.; 2012, Aracajú. [Abstracts...]. Aracajú: ISHS; UFS, SBCTA, 2012. 1 CD-ROM., 2012.

CHENG, X.; ZHAI, X. Thermal performance analysis of a novel PCM capsule in red blood cell shape. **Applied Thermal Engineering**, v. 120, p. 130–137, jun. 2017.

CREMASCO, M. A.; BRAGA, N. D. P. Isomerização do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC) para a obtenção de isosafrol. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 4, p. 737–740, 2010.

CRONEMBERGER, P. R.; PAULA, S. C.; MEIRELLES, L. M. A. Análise de sabonetes líquidos íntimos analysis of intimate liquid soaps. **Revista Saúde em Foco, Teresina**, v. 2, p. 49–59, 2015.

DA SILVA, M. J. 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*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade Federal do Amazonas, 2019.

DE JONG, W. H.; BORM, P. J. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. **Int J Nanomedicine**, 3(2):133-49, 2008.

DE MATOS, E. F; SCOPEL, B. S.; DETTMER, A. *Citronella* essential oil microencapsulation by complex coacervation with leather waste gelatin and sodium alginate. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 1989-1994, 2018.

DE PAOLI, M. A. Degradação e Estabilização de Polímeros. Chemkeys 2. ed versão on-line, 2008.

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.

FARIAS, P. K. S. et. al. Antioxidant activity of essential oils from condiment plant sand their effect on lactic cultures and pathogenic bacteria. **Rural Science**, v. 49, n. 2, 2019.

GANTA, SRINIVAS et al. Nanoemulsions in translational research-opportunities and challenges in targeted cancer therapy. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 3, p. 694– 37 708, jun. 2014.

GOIANO, T. et al. BIOATIVOS PARA CONTROLE DE *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* (ACARI : IXODIDAE) BIOATIVOS PARA CONTROLE DE *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* (ACARI : IXODIDAE), 2016.

GONÇALVES, H.P. Avaliação da Atividade leishmanicida de bioativos da Amazônia, extraídos de *Piper aleyreanum* e *Piper carniconnectivum* contra *Leishmania amazonensis* “in vitro”. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental. Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2012.

GOVINDARAJAN, M.; BENELLI, G. Absinthe-based compounds as a new larvicidal: efficacy against six mosquito vectors and acute toxicity in non-target aquatic organisms. **Parasitol Res**, 115 (12): 4649-4661, 2016.

GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. et al. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: Identification of β -pinene and linalool as active principles. **Journal of Ethnopharmacology**, 143(2), 673-679, 2012.

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.

GRIGORI, P. Afinal, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxico do mundo?. **AGÊNCIA PÚBLICA/REPÓRTER BRASIL**, ATUALIZADO EM 25 JUN 2019 - 13H41. Acesso em 01/03/2020.

HAMED, S. M. et al. Biosynthesis of silver and silver chloride nanoparticles by *Parachlorella kessleri* SAG 211-11 and evaluation of its nematicidal potential against the root-knot nematode; *Meloidogyne incognita*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, n. 18, p. 354-364, 2016.

IC, Y. O. L. et al. Constituintes químicos e atividade inseticida do óleo essencial de *Piper callosum*. **Anais da Sociedade Brasileira de Química**. v. 10, n. 3, p. 1997, 2003.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. **I. Drug and Cosmetic Industry**, v. 151, n. 1, 27-28, 30, 1993.

ISAAC, V.L.B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev. Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.29, n.1, p. 81-96, 2008.

KALEPU, S.; NEKKANTI, V. Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects. **Acta Pharm. Sin B** 5(5): 442-453, 2015.

KHALIL, Noha et. al; Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected apiary fruits. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p 88-92, 2018.

LIMA, M. P.; ALBUQUERQUE, C. N. Preparo e caracterização de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) contendo megazol, agente anti-chagásico. **Rev. Bras. Farm.** 93(4): 493-498, 2012.

LIMA, I. K. C.; XAVIER, M. R.; TEIXEIRA, A. M. R. Análise das bandas vibracionais do óleo essencial de *Eucalyptus globulos* e de seus constituintes majoritários obtidas por métodos teóricos e experimental. **Reunião Regional da SBPC no Cariri (URCA)**, 2017.

LIMA, R. N. Caracterização Química dos óleos essenciais e extratos supercríticos de três espécies de *Piper* de Sergipe. Dissertação (Química), Universidade Federal de Sergipe, 2014.

LIMA, R. K. et al. Composição química e toxicidade de óleos essenciais para o pulgão-verde *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.81, n.1, p. 22-29, 2014.

LUGO, Y. O. et al. Avaliação do perfil químico do óleo essencial de *P. callosum* por CG-EM coletada na região do médio Amazonas. 61^a Reunião Anual da SBPC, 2007.

MAAR, J. H.; ROSENBROCK, L. C. C. A química fina que poderia ter sido: a extração de óleo de sassafrás e de safrol no alto e médio vale do Itajaí. **Scientiæ Zudia**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 799-820, 2012.

MAR, J. M et al. *Lippia origanoides* essential oil: an efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Ind Crops Prod** 111: 292 - 297, 2018.

MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects induced by *Cymbopogon winterianus* essential oil in rats: involvement of calcium channels and vagal pathway. **J. Phar. Pharmacol.** 62(2):215–221, 2010.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. óleos essenciais de folhas de diversas espécies: Propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213–220, 2016.

MOSSA, A. T. H.; Green pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 354, 2016.

MOSTAFA, A. A. et. al; Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 2, p. 361-366, 2018.

McCLEMENTS, D. J. (2005). Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques. 13 (2. ed.) Boca Raton: CRC Press.

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**, 121, 3495-3500, 2011.

NEGREIROS, J. R. S.; MIQUELONI, D. P.; ALVARES, V. S.; Comportamento do composto majoritário de óleos essenciais de espécies de Piper da Amazônia sob armazenamento. **Embrapa Acre-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2017.

NEMAT, S. et al. Alginate-gelatin encapsulation of human endothelial cells promoted angiogenesis in in vivo and in vitro milieu. **Biotechnology and Bioengineering**, 114:2920–2930, 2017.

PARK, H. M. et al. Environmentally friendly polymer hybrids. Part I. Mechanical, thermal, and barrier properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 38, n. 5, p. 909-915, 2007.

PAVELA, R.; GOVINDARAJAN, M. The essential oil of *Zanthoxylum monophyllum* is a potential mosquito larvicide with low toxicity for non-target fish *Gambusia affinis*. **Jornal de Pest Science**, 90 (1): 369-378, 2017.

PEREIRA, L. J. B.; GARCIA-ROJAS, E. E. Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 155–162, 2014.

PIRES, V. C. Avaliação do potencial larvicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e sua formulação em nanocápsulas poliméricas. Dissertação (Biotecnologia em Saúde), FIOCRUZ, 2019.

PRESTES, R. C. et al. Caracterização Da Fibra De Colágeno, Gelatina E Colágeno Hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 4, p. 375–382, 2013.

RAMOS, I. M. F. C. Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para liberação de fármaco no sistema nervoso central. Tese (Ciências em Engenharia Química), Instituto Alberto Luiz Coimbra, RJ, 2018.

REGINFO-SALGADO, E. L.; FERNANDEZ-VILCHEZ, C. M.; VARGAS-ARANA, G. Búsqueda y evaluación de aceites esenciales em espécies amazônicas. **Folia Amazônica**, v. 20, n. 2-1, p. 29-32, 2010.

RHODEN, C. R. B. Síntese de análogos de peptídeos incorporados a materiais nanoparticulados de carbono funcionalizados via reações multicomponentes. Tese (Nanociências), Universidade Franciscana, 2018.

SAAD, M. M. et al. Insecticidal activities of monoterpenes and phenylpropenes against *Sitophilus oryzae* and their inhibitory effects on acetylcholinesterase and adenosine triphosphatases. **Applied entomology and zoology**, v. 53, n. 2, p. 173-181, 2018.

SALEHI, B. et al.; Piper Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry Biological Activities and Applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1364, 2019.

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, A. C. R. et al. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. **Molecules** 17, 6305-6316, 2012.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Sobre *Crinipellis pernicioso* , *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatol. Bras.**, v. 32, n. 2, p. 143–145, 2007.

SILVA, L. S. et al. Encapsulation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* essential oils in gelatin nanoparticles: a possible sustainable control tool of *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. June, 2018.

SILVA, R. J. F. et al. Morphoanatomical and physicochemical profile of *Piper callosum*: Valuable assessment for its quality control. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 1, p. 20–33, 2017.

SILVESTREIN, R.M.; ALENCASTRO, R.B. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 429p., 2007.

SIMAS, N. K. et al., Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, Vol. 27, No. 1, 46-49, 2004.

SOKOLOV, Y. V. Nanoemulsions as prospective drug delivery systems. **Visnik farmacii**, v. 0, n. 1(77), p. 21–25, 2018.

SOUTO, R. N. P. et. al; Insecticidal activity of Piper essential oils from the Amazon against the fireant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical entomology**, v. 41, n. 6, p. 510-517, 2012.

SOUTO, R. N. P.; HARADA, A. Y.; MAIA, J. G. S. Estudos preliminares da atividade inseticida de óleos essenciais de espécies de *Piper linneus* (*piperaceae*) em operárias de *Solenopsis saevissima f Smith* (*Hymenoptera: formicidae*), em laboratório. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 1, n. 1, p. 42-48, 2011.

SOUTO, E. B. et al. - Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados – parte II. **Polímeros**, vol. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SOUZA, R. A. D.; PERREIRA, L. A. Agronegócio e Agrotóxico: uma parceria para o (in) sucesso da produção de alimentos. **ORG & DEMO**, Marília, v. 20, n. 1, p. 27-44, jan./jun., 2019.

SOUZA, P. M. S. et al. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 132–137, 2012.

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 anos de análise de imagem. **Métodos Nat.**, 9 (7): 671–675, 2012.

STAUB et al. Determinação da segurança biológica do xampu de cetoconazol: teste de irritação ocular e avaliação do potencial de citotoxicidade in vitro. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 43, 39 n. 2, 2007.

TAKEARA, R. et al. Biological Properties of Essential Oils from the Piper Species of Brazil: A Review. In: EL-SHEMY, H. A. Aromatic and Medicinal Plants - **Back to Nature**. Publish: In Tech, p. 82-93, 2-17.

THOMPSON, JUDITH E. A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos. Porto Alegre: Artmed, 2006.

VIEIRA, M. M. G. Desenvolvimento de compostos poliméricos biodegradáveis modificados com cargas e fibras naturais vegetais. 2010. 198 f. Dissertação

(Mestrado) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

VILLANOVA, JANAINA C. O; ORÉFICE, RODRIGO L.; CUNHA, A. S. Polímeros em Medicamentos Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010.

YILMAZ, M. T. et al. Electrospraying method for fabrication of essential oil loaded-chitosan nanoparticle delivery systems characterized by molecular, thermal, morphological and antifungal properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 52, p. 166–178, 2019.

WILLIAMS, M. A.; WYNER, S. N.; Antimicrobial Resistance: Facing the Rise of a Global Threat. **AJPH BOOK & MEDIA**.; v. 109, n.4, p. 246, 2019.

XING, F. et al. Nanoencapsulation of capsaicin by complex coacervation of gelatin, acacia, and tannins. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 96, n. 6, p. 2225–2229, 2005.

ZÚGE, C. B. Estudo da inversão catastrófica e transicional de emulsões de óleo de soja com diferentes tensoativos. Dissertação (Engenharia de alimentos), Universidade Federal Do Paraná. 2012.

ZHANG, Z. et al. Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 205–218, 2013.