

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE UM SISTEMA DE  
NANOPARTÍCULAS BICAMADAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DO ÓLEO  
ESSENCIAL DA *Piper nigrum***

**SIDNEY GOMES AZEVEDO**  
DOUTORADO

Manaus/AM

Julho/2021

**SIDNEY GOMES AZEVEDO**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE UM SISTEMA DE  
NANOPARTÍCULAS BICAMADAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DO ÓLEO  
ESSENCIAL DA *Piper nigrum***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em química, com ênfase na Linha de Pesquisa Produtos Naturais e Biomoléculas.

**Prof. Dr. Edgar A. Sanches**

ORIENTADOR

**Dra. Amanda Luizetto dos Santos**

COORIENTADORA

Manaus/AM

Julho/2021

## Ficha Catalográfica

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

A994d Azevedo, Sidney Gomes  
Desenvolvimento, caracterização e estabilidade de um sistema de nanopartículas bicamadas para liberação controlada do óleo essencial da piper nigrum / Sidney Gomes Azevedo . 2021  
137 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edgar Aparecido Sanches  
Coorientadora: Amanda Luizetto dos Santos  
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Óleos Essenciais. 2. Encapsulação. 3. Nanopartículas Bicamadas. 4. Polímeros Biodegradáveis. 5. Liberação Controlada.  
I. Sanches, Edgar Aparecido. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**SIDNEY GOMES AZEVEDO**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE UM SISTEMA DE  
NANOPARTÍCULAS BICAMADAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DO ÓLEO  
ESSENCIAL DA *Piper nigrum***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em química, com ênfase na Linha de Pesquisa Produtos Naturais e Biomoléculas.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Marco Antônio Farias**  
Universidade Federal do Amazonas

**Prof. Dr. Walter Ricardo Brito**  
Universidade Federal do Amazonas

**Profa. Dra. Natália Mayumi Inada**  
Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP)

**Prof. Dr. Francisco Célio Maia Chaves**  
EMBRAPA Amazônia Ocidental

*Dedico este trabalho a todos os apaixonados pelo mundo da pesquisa científica que, mesmo em meio a tantas dificuldades, não medem esforços para realizá-la.*

## AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao Universo pelas energias positivas (Deus) e pela força nos momentos de desânimo.
- ❖ Ao orientador Dr. Edgar Aparecido Sanches pelo acompanhamento constante, pelo incentivo à busca de novos conhecimentos, pela paciência e oportunidade. Mesmo em momentos de dificuldade, sempre esteve disposto a estimular e apoiar o desenvolvimento desta pesquisa.
- ❖ À querida Dra. Milade Cordeiro Carneiro dos Santos que, desde a graduação, me incentivou a continuar minha formação especificamente na área de Produtos Naturais.
- ❖ Ao meu querido amigo Wilson Nogueira e família (Rosário Nogueira e Dassuem Nogueira), pela acolhida, pelo apoio, pelas conversas, pelos momentos de descontração, muito obrigado! Foi difícil estar em Manaus, e teria sido muito mais se não fosse a ajuda de vocês!
- ❖ Ao meu Amor André Andrade (minha energia boa) pelo carinho, apoio, dedicação e paciência. Mesmo distante, sempre me incentiva a seguir em frente, sem medir esforços.
- ❖ Aos amigos do grupo de pesquisa NANOPOL que auxiliaram nas discussões referentes ao trabalho e contribuíram para minha formação: Laiane Souza, Yuri Gomes, Josiana Mar, Jéssica Montenegro, Ana Luiza, Ayná Vieira, Joab Arouche, Larissa Medeiros, Bianca Feitosa, Matheus Biondo e Suzan Sonkey.
- ❖ À querida Geisiane Rosa e Profa. Natália M. Inada da USP de São Carlos, e à minha coorientadora Amanda Luizetto dos Santos, muito obrigado pelos ensinamentos!
- ❖ À Natalia M. Inada, Ph.D. Cientista Pesquisadora do Laboratório de Biofotônica, do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos, pela disponibilidade, acolhida quando estivem em São Carlos e inspiração!
- ❖ À Prof<sup>a</sup> Dra Tatiane Pereira da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UFAM) por disponibilizar o equipamento DLS, imprescindível nessa pesquisa.
- ❖ Ao Prof. Dr. Pedro Campelo pelos ensinamentos sobre mecanismos de liberação controlada, e por sempre estar disposto a colaborar.
- ❖ Ao Dr. Henrique Duarte da Fonseca Filho pelas imagens de AFM e AFM-IR.
- ❖ À Ievgeniia Iermak, PhD do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP) pelos momentos de troca científica.
- ❖ Ao Me. Phiiipi Cavalcante Ricardo e Prof. Dr. Ricardo Lima Serudo pelas medidas de FTIR realizadas no HUB/UEA.
- ❖ À Dra. Maria Diva Landgraf e Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende do Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP) pelo acolhimento e pelas análises cromatográficas.

- ❖ À Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar do Departamento de Química da UFAM pelos equipamentos e estrutura disponibilizada desde o início da pesquisa.
- ❖ À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade.
- ❖ À FAPEAM pela bolsa concedida durante toda a execução dessa pesquisa.
- ❖ Ao CNPq (Processo 403496/2013-2) pela infraestrutura.
- ❖ Ao Projeto **FAPEAM Amazonas Estratégico** por ter subsidiado os recursos financeiros (capital, custeio e bolsas) que impulsionaram o desenvolvimento desta pesquisa.

*“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso, passará pela vida sem ver nada.”*

**Albert Einstein**

## RESUMO

A sensibilidade dos óleos essenciais aos fatores ambientais e sua baixa solubilidade aquosa tem limitado suas aplicações, tornando-os interessantes materiais para inserção de nanotecnologia. Nesta pesquisa foi desenvolvido um nanossistema polimérico bicamada de liberação controlada baseado no carreamento do óleo essencial da espécie *P. nigrum*. Poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) e gelatina foram usados como carreadores. As técnicas de caracterização usadas foram Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chamas (CG/DIC), Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM), Microscopia de Força Atômica (AFM), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia no Infravermelho associada à Microscopia de Força Atômica (AFM-IR) e Espectroscopia no Ultravioleta e Visível (UV-vis). O óleo essencial apresentou o constituinte  $\beta$ -cariofileno (35%) como composto majoritário, seguido por silvestreno (14.17%) e sabineno (14.96%). As nanopartículas contendo óleo essencial encapsulado apresentaram diâmetro médio de  $(290 \pm 30)$  nm com PDI de  $(0,23 \pm 0,03)$ , potencial zeta  $(-45 \pm 3)$  mV e morfologia esférica. A Eficiência de Encapsulação (EE) foi  $(98 \pm 2)$  %. A estabilidade dos sistemas encapsulados foi avaliada por meio da EE, condutividade elétrica, turbidez, pH e propriedades organolépticas após a adição de conservantes específicos, dentre os quais destaca-se a mistura dos conservantes fenoxietanol/isotiazoni-3-ona (sistema NPNE), que garantiram estabilidade aproximada de 120 e 210 dias nos testes de manipulação constante e prateleira, respectivamente. No estudo de fotoestabilidade, os carreadores favoreceram a proteção prolongada do óleo essencial até aproximadamente 168 h em relação ao óleo *in natura*, que degradou após 6 h de exposição à radiação ultravioleta. O sistema polimérico desenvolvido, além de proteger o óleo essencial apresentou característica de liberação controlada em pH ácido, neutro e básico. As curvas de liberação evidenciaram o mecanismo de liberação pulsada, inerente ao design das bicamadas poliméricas das nanopartículas.

**Palavras-chave:** Óleos Essenciais. Encapsulação. Nanopartículas Bicamadas. Polímeros Biodegradáveis. Estabilidade. Liberação Controlada.

## ABSTRACT

The sensitivity of essential oils to environmental factors and their low aqueous solubility has limited their applications, making them interesting materials for nanotechnology insertion. In this research, a controlled-release bilayer polymeric nanosystem was developed to encapsulate the essential oil from *P. nigrum*. Poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) and gelatin were used as carriers. The applied characterization techniques were Dynamic Light Scattering (DLS), Gas Chromatography/Flame Ionization Detector (CG/DIC), Gas Chromatography/Mass Spectrometry (CG/EM), Atomic Force Microscopy (AFM), Infrared-transform Fourier Spectroscopy Infrared (FTIR), Infrared Spectroscopy/Atomic Force Microscopy (AFM-IR) and Ultraviolet-visible Spectroscopy (UV-vis). The essential oil presented  $\beta$ -caryophyllene (35%) as the major compound, followed by sylvestrene (14.17%) and sabinene (14.96%). The nanoparticles containing encapsulated essential oil presented average diameter of  $(290 \pm 30)$  nm with PDI of  $(0.23 \pm 0.03)$ , zeta potential  $(-45 \pm 3)$  mV and spherical morphology. The Encapsulation Efficiency (EE) was  $(98 \pm 2)$  %. The stability of the encapsulated systems was evaluated by EE, electrical conductivity, turbidity, pH and organoleptic properties after the addition of specific preservatives, among which the mixture of phenoxyethanol/isotiazoni-3-one (NPNE system) resulted in enhanced stability of approximately 120 and 210 days in constant handling and shelf life tests, respectively. In the photostability evaluation, the carriers favored the prolonged protection of the essential oil up to approximately 168 h when compared to the essential oil *in natura*, which degraded after 6 h of exposure to ultraviolet radiation. The developed polymeric system, in addition to protecting the essential oil, presented similar controlled release in acidic, neutral or basic pH. The release curves showed the pulsatile release mechanism inherent to the design of the polymeric bilayers of nanoparticles.

**Keywords:** Essential Oils. Encapsulation. Bilayered Nanoparticles. Biodegradable Polymers. Stability. Controlled Release.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fatores que podem influenciar na composição química dos óleos essenciais. ....	22
Figura 2. Estrutura molecular do biopolímero gelatina. ....	27
Figura 3. Quebra da caprolactona para a formação do polímero sintético PCL. ....	28
Figura 4. Nanopartícula polimérica: Princípios ativos dissolvidos no núcleo da matriz.....	31
Figura 5. Mecanismos de liberação de bioativos a partir de nanopartículas de gelatina: difusão simples de gotículas do bioativo; liberação por degradação; clivagem da matriz de gelatina por enzimas proteolíticas. ....	41
Figura 6. Proposta especulativa da ação das nanopartículas poliméricas biodegradáveis contendo o óleo essencial da <i>P. nigrum</i> encapsulado. ....	45
Figura 7. Ilustração esquemática da obtenção do óleo essencial e sua caracterização físico-química. ....	47
Figura 8. Representação esquemática da formulação do sistema coloidal contendo nanopartículas preenchidas com óleo essencial da espécie <i>P. nigrum</i> .....	50
Figura 9. Cinética de extração do óleo essencial.....	56
Figura 10. Perfil cromatográfico do óleo essencial da <i>P. nigrum</i> . ....	58
Figura 11. Fórmulas estruturais dos metabólitos do óleo essencial da <i>P. nigrum</i> .....	61
Figura 12. Tamanho de partículas e Índice de policidspersão gerado por <i>Dinamic Light Scattering</i> (DLS). NPOE: Nanopartículas poliméricas contendo óleo essencial encapsulado; NPV: Nanopartículas vazias. ....	64
Figura 13. Formação das nanopartículas encapsulantes a base de PCL/Gelatina: (a) nanopartículas vazias com topografia, (b) nanopartículas carregadas com óleo essencial com topografia, (c) distribuição de tamanho das nanopartículas vazias e (d) distribuição de tamanho das nanopartículas carregadas. Os histogramas foram gerados a partir do programa ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).....	66
Figura 14. Potencial zeta das nanopartículas poliméricas vazias (NPV) e com óleo essencial encapsulado (NPOE).....	70
Figura 15. Espectros de FTIR de (a) EO de <i>P. nigrum</i> , (b) gelatina, (c) PCL, (d) nanopartículas vazias e (e) nanopartículas carregadas com óleo essencial. ....	71

Figura 16. (a) Esquema de possíveis interações entre fases na formação das nanopartículas e (b) Proposta especulativa da interação entre o PCL e a Gelatina na estrutura das nanopartículas poliméricas.....	74
Figura 17. Mapas topográficos AFM (a) NPV e (b) NPOE (c) espectro AFM-IR do óleo essencial, (d) espectro AFM-IR do sistema NPV e (e) espectro AFM-IR do sistema NPOE no intervalo de 1550-1800 cm <sup>-1</sup> . As setas verdes indicam as nanopartículas selecionadas para a aplicação do feixe de Infravermelho.....	75
Figura 18. Separação das nanopartículas da solução coloidal por centrifugação.....	87
Figura 19. (a) Eficiência de encapsulação (EE) do óleo essencial da <i>P.nigrum</i> e (b) condutividade elétrica das formulações em função do tempo. ....	88
Figura 20. Ensaio microbiológico qualitativo para os sistemas (a) NPNE e (b) NPTE.....	89
Figura 21. (a) Sistema NPNE totalmente desestabilizado e (b) mapa topográfico. ....	92
Figura 22. (a) Avaliação da turbidez e (b) do pH das formulações.....	93
Figura 23. (a) Formulações controle e (b) Formulações ao final do período de avaliação da estabilidade sob manipulação constante. ....	96
Figura 24. (a) Fotodegradação do óleo essencial <i>in natura</i> da <i>P. nigrum</i> e (b) do óleo essencial encapsulado no sistema NPNE.....	103
Figura 25. (a) Ensaio de liberação controlada do óleo essencial da <i>P.nigrum</i> em pH 4, 7 e 10 e (b) derivada das curvas de liberação controlada. ....	108
Figura 26. Diagrama esquemático da proposta especulativa da interpretação da liberação controlada associada ao <i>design</i> das nanopartículas em função do tempo. ....	111
Figura 27. (a) Espectro de FTIR do óleo essencial da <i>P. nigrum</i> e (b) da fase orgânica contendo PCL e óleo essencial.....	112
Figura 28. Valores experimentais e ajustados segundo o modelo de Korsmeyer e Peppas para o estudo de liberação controlada em diferentes pH. ....	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do óleo essencial das sementes da <i>P. nigrum</i> . ....	59
Tabela 2. Estabilidade a $(35 \pm 2)$ °C das nanopartículas poliméricas contendo óleo essencial encapsulado em função dos conservantes.. ....	83
Tabela 3. Estabilidade em prateleira dos sistemas NPNE, NPTI e NPSC avaliada a 25 °C a cada 30 dias. ....	98
Tabela 4. Estabilidade em prateleira dos sistemas NPNE, NPTI e NPSC avaliada a 35 °C a cada 30 dias. ....	101
Tabela 5. Modelos e coeficientes de liberação controlada do óleo essencial. ....	114

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Decomposição de polímeros na presença de oxigênio .....	30
Equação 2- Decomposição de polímeros na ausência de oxigênio.....	30
Equação 3: Ordem zero. ....	43
Equação 4: Primeira ordem.....	43
Equação 5: Higuchi .....	43
Equação 6- Korsmeyer e Peppas .....	43
Equação 7- Cálculo da densidade do óleo essencial .....	49
Equação 8- Cálculo de rendimento do óleo essencial.....	49
Equação 9- Cálculo da concentração do óleo essencial livre .....	53
Equação 10- Cálculo da eficiência de encapsulamento do óleo essencial.....	53

## LISTA DE SIGLAS

**( $\zeta$ )** – Potencial zeta

**AFM** – Atomic force microscopy (Microscopia de Força Atômica)

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**BzNa** – Benzoato de sódio

**CG/DIC** – Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chamas

**CG/EM** – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

**Conserv MI** – Metilcloroisotiazolinona / Metilisotiazolinona

**Conserv NE** – Fenoxietanol /2-metil-Isotiazolin-3-ona

**DLS** – Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering)

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético

**EE** – Eficiência de encapsulação

**FTIR** – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

**IBAMA** – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais renováveis

**MAPA** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

**NP** – Nanopartículas

**NPV** – Nanopartículas Vazias

**NPBS** – Nanopartículas com benzoato de sódio

**NPED** – Nanopartículas com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

**NPMI** – Nanopartículas com conservante MI

**NPNE** - Nanopartículas com conservante NE

**NPSC** – Nanopartículas Sem Conservantes

**NPTI** - Nanopartículas com conservante timol

**PCL** – Poli- $\epsilon$ -caprolactona

**PDI** – Índice de Polidispersão

**pH** – Potencial Hidrogeniônico

**RDC** – Resolução da Diretoria Colegiada

**Rpm** – Rotação por minuto

**Span 60** – Monoestearato de sorbitano

**TACC** – Triglicérides de ácido cáprico caprílico

**Timol** – 3 -Hidroxi -4-isopropil tolueno

**TWEEN 80** – polissorbato 80

**UV-Vis** – Espectroscopia no Ultravioleta e Visível

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	18
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1. <i>Inserção de nanotecnologia em óleos essenciais</i>	20
3.2. <i>Polímeros biodegradáveis como carreadores de óleos essenciais</i>	26
3.3. <i>Nanopartículas poliméricas encapsulantes</i>	30
3.4. <i>Métodos de preparação de nanopartículas poliméricas encapsulantes</i>	32
3.5. <i>Estabilidade de formulações</i>	35
3.6. <i>Liberação controlada</i>	40
3.7. <i>Problemática x alternativas</i>	43
4. METODOLOGIA	47
4.1. <i>Extração do óleo essencial</i>	47
4.2. <i>Determinação das propriedades físicas do óleo essencial</i>	47
4.3. <i>Análise cromatográfica (CG/DIC- CG/EM) do óleo essencial</i>	48
4.4. <i>Desenvolvimento das nanopartículas poliméricas</i>	49
4.5. <i>Caracterização das nanopartículas</i>	50
4.5.1. <i>Tamanho, Índice de Polidispersão (PDI) e potencial zeta (<math>\zeta</math>)</i>	50
4.5.2. <i>Microscopia de Força Atômica (AFM)</i>	51
4.5.3. <i>AFM acoplada a Espectrofotômetro de Infravermelho (AFM-IR)</i>	51
4.5.4. <i>Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier - FTIR</i>	52
4.5.5. <i>Eficiência de Encapsulação (EE) por UV-Vis</i>	52
4.6. <i>Estabilidade dos sistemas contendo óleo essencial encapsulado</i>	52
4.6.1. <i>Teste de centrifugação</i>	53
4.6.2. <i>Estabilidade preliminar</i>	53

4.6.3. Estabilidade sob manipulação constante a $(25 \pm 2)$ °C	53
4.6.4. Teste de prateleira	54
4.6.5. Fotoestabilidade	54
4.7. <i>Análise microbiana</i>	<b>54</b>
4.8. <i>Liberação controlada</i>	<b>55</b>
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1. <i>Propriedades físicas do óleo essencial</i>	<b>56</b>
5.2. <i>Composição química do óleo essencial</i>	<b>57</b>
5.3. <i>Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas encapsulantes</i>	<b>62</b>
5.3.1. <i>Tamanho de partículas e Índice de Polidispersividade (PDI)</i>	<b>63</b>
5.3.2. Potencial zeta ( $\zeta$ )	68
5.3.3. Análise espectroscópica por FTIR e AFM-IR	70
5.3.4. Eficiência de Encapsulação (EE)	77
5.4. <i>Estabilidade dos sistemas contendo óleo essencial encapsulado</i>	<b>79</b>
5.4.1. Estabilidade preliminar	81
5.4.2. Estabilidade sob manipulação constante	86
5.4.2.1. Avaliação da Eficiência de encapsulação (EE) e condutividade elétrica	86
5.4.2.2. Avaliação da turbidez e pH	93
5.4.2.3. Avaliação das propriedades organolépticas	96
5.4.3. Estabilidade de prateleira a 25 °C e 35 °C	97
5.4.4. Fotoestabilidade	102
5.5. Liberação controlada	107
6. CONCLUSÃO	116
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

## 1 INTRODUÇÃO

A inserção de nanotecnologia em produtos naturais tem ganhado destaque em diversas pesquisas pois vem resultando em produtos alternativos eficazes para diversos propósitos (CARPENA et al., 2021; MAES; BOUQUILLON; FAUCONNIER, 2019). Nesse contexto, a técnica de encapsulação de princípios ativos tornou-se uma ferramenta para melhorar as propriedades de biomoléculas com baixa estabilidade quando expostas ao ambiente (DUTTA; DAS, 2021). A liberação controlada representa o princípio básico desses sistemas encapsulados, permitindo que a substância ativa seja liberada de forma modulada e com ação específica, utilizando-se menores concentrações e reaplicações, a depender o tempo e do perfil de liberação dessas substâncias (CAMPELO et al., 2017).

O uso exacerbado de produtos sintéticos com toxicidade para o controle de pragas e doenças é intensivo no Brasil (SILVA et al., 2011). Alternativamente, os óleos essenciais *in natura* vêm sendo amplamente utilizados como alternativa para o controle de pragas de agricultura (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; SAWICKA et al., 2021; SWATHY et al., 2018). Estudos recentes apontam a eficácia de óleos essenciais no controle de pragas como pulgões, moscas, cochonilhas, formigas cortadeiras e cupins, as quais frequentemente causam prejuízos no setor agrícola e requerem metodologias específicas de controle (BENELLI et al., 2018, 2019; TU et al., 2018).

Especificamente, a eficácia do óleo essencial da *Piper nigrum* (pimenta-do-reino) no controle de insetos, ácaros e pulgões vem sendo amplamente reportada (SIDDIQUI et al., 2004; UPADHYAY; JAISWAL, 2007). Alternativas tecnológicas parceiras à natureza tem estimulado estudos que visam uma possível substituição dos sistemas agrícolas convencionais por biodefensivos de baixa ou nenhuma toxicidade, a eficiência no controle de pragas e microrganismos nocivos, o não favorecimento de resistência, a disponibilidade e o custo reduzido (FERNANDES; LEITE; MOREIRA, 2006; PAES, 2015; SALAMA et al., 2021).

Considerando a inserção de nanotecnologia no óleo essencial da *P. nigrum* com propriedades biodefensivas comprovadas, foi desenvolvida uma formulação constituída por

nanopartículas poliméricas biodegradáveis encapsulantes, envolvendo uma série de parâmetros relacionados às finalidades específicas de ação das substâncias encapsuladas e também dos mecanismos de liberação controlada, os quais são influenciados pelo tipo de material carreador (HALEVAS et al., 2019; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; RAJKUMAR et al., 2020; RISCH; REINECCIUS, 1995). A combinação de dois ou mais carreadores vêm sendo uma alternativa tecnológica para novos *designs* de nanopartículas encapsulantes, sendo possível projetar mecanismos de liberação específicos, como a liberação pulsada, atingir tamanhos desejados do diâmetro médio das nanopartículas, bem como melhorar a eficiência de encapsulação. Dentro desse contexto, o sistema coloidal desenvolvido nessa pesquisa foi projetado utilizando-se os carreadores poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) e gelatina. Esses carreadores foram escolhidos por serem atóxicos, terem boas propriedades encapsulantes e serem altamente biodegradáveis.

No entanto, projetar um sistema coloidal formado por nanopartículas poliméricas biodegradáveis com elevada eficiência de encapsulação não é o suficiente para garantir o sucesso da formulação. Ensaio de estabilidade se fazem necessários para avaliar o comportamento das formulações em função do tempo (ANVISA, 2004). A utilização de conservantes em sistemas encapsulados é uma alternativa eficaz para aumentar o tempo de vida das formulações (REZENDE SCHAFFAZICK et al., 2002), especialmente pelo retardamento de possíveis proliferações microbianas, as quais podem degradar as paredes mais externas das nanopartículas resultando na ruptura e subsequente exposição do óleo essencial na formulação. No entanto, são poucos os trabalhos que reportam tanto a utilização de conservantes em sistemas coloidais de liberação controlada, quando a avaliação de estabilidade de formulações sob manipulação ou em prateleira (REZENDE SCHAFFAZICK et al., 2002; SILVA et al., 2020).

É importante ressaltar que não existe no Brasil nenhuma norma que regularize especificamente os ensaios de estabilidade de sistemas encapsulados contendo óleos essenciais. As orientações mais próximas estão relacionadas à área de cosmetologia, e esse guia vem sendo usado em diversas pesquisas para orientar essas avaliações (ANVISA, 2004). Ainda, avaliar a estabilidade de

sistemas contendo nanopartículas poliméricas biodegradáveis não é uma tarefa fácil pois envolve uma série de fatores que devem ser avaliados simultaneamente e, muitas vezes, o que se tem são apenas indicativos subjetivos dos fenômenos observados durante o processo de armazenamento. A biodegradabilidade dos carreadores em solução aquosa é um processo natural e, portanto, o desenvolvimento dessas formulações contendo conservantes vai prever a melhor composição para que ela possa durar o máximo possível, mas esses períodos geralmente não são muito longos e dependem da formulação e dos conservantes utilizados (SILVA et al., 2020).

Diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar a estabilidade de formulações contendo diferentes conservantes. As nanopartículas poliméricas biodegradáveis foram desenvolvidas a partir de PCL e gelatina, e carregadas com óleo essencial da *P. nigrum*. As técnicas de Cromatografia Gasosa (CG-DIC e CG-EM) permitiram a caracterização dos constituintes químicos do óleo essencial. A Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) permitiu, basicamente, a caracterização molecular dos constituintes individuais da formulação. O tamanho dos diâmetros médios das nanopartículas e a carga superficial foi avaliada por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). A Microscopia de Força Atômica acoplada ao Espectrofotômetro de Infravermelho (AFM-IR) possibilitou a avaliação da morfologia das nanopartículas, do mapa topográfico, da distribuição de tamanho, bem como da verificação da efetividade do encapsulamento do óleo essencial. A Espectroscopia no Ultravioleta e Visível (UV-Vis) foi utilizada para estimar a Eficiência de Encapsulamento (EE) do óleo essencial nos sistemas desenvolvidos, bem como para avaliar a fotoestabilidade mediante exposição à luz ultravioleta ( $\lambda = 274 \text{ nm}$ ). Os testes de estabilidade permitiram o acompanhamento dos parâmetros EE, pH, condutividade elétrica, turbidez e propriedades organolépticas (cor e odor) das formulações ao longo do tempo mediante avaliações sob manipulação constante e testes de prateleira (a 25 °C e 35 °C). Por fim, o sistema mais estável foi selecionado para os estudos de liberação controlada do óleo essencial em diferentes pH, sendo possível associar o perfil das curvas de liberação com a proposição do *design* nas nanopartículas e do mecanismo de liberação do óleo essencial.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver, caracterizar e avaliar a estabilidade em função de conservantes de um sistema coloidal formado por nanopartículas poliméricas biodegradáveis contendo óleo essencial da *Piper nigrum* encapsulado.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a cinética de extração e as propriedades físicas (rendimento, densidade, índice de refração e pH) do óleo essencial da espécie *Piper nigrum*;
- Identificar e quantificar os constituintes químicos do óleo essencial *in natura* por Cromatografia Gasosa (CG/DIC) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM);
- Desenvolver um sistema de nanopartículas poliméricas bicamadas utilizando como carreadores os polímeros poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) e gelatina, e adicionando os conservantes fenoxietanol/metilisotiazolinona (NPNE), metilisotiazolinona/metilcloroisotiazolinona (NPMI), benzoato de sódio (NPBS), timol (NPTI) ou ácido etilenodiaminotetracético (NPED);
- Determinar a eficiência de encapsulação (EE) das nanopartículas por UV-Vis;
- Determinar o diâmetro médio das nanopartículas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Microscopia de Força Atômica (AFM);
- Determinar o Índice de Polidispersividade (PDI) e Potencial Zeta dos sistemas ( $\zeta$ );
- Avaliar o perfil espectroscópico dos sistemas encapsulados e de seus componentes individuais por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e por Espectroscopia no Infravermelho associada à Microscopia de Força Atômica (AFM-IR);

- Realizar testes de estabilidade em função do tempo e dos conservantes avaliando a Eficiência de Encapsulação (EE), condutividade elétrica, pH, turbidez e propriedades organolépticas dos sistemas encapsulados;
- Realizar o teste de estabilidade preliminar dos sistemas visando a primeira triagem;
- Realizar o teste de estabilidade dos sistemas sob manipulação constante a  $(25 \pm 2)$  °C até atingirem EE (%) igual ou inferior a 70% ou serem descartados por alterações nas propriedades organolépticas (cor e odor);
- Realizar o teste de prateleira a  $(25 \pm 2)$  °C e  $(35 \pm 2)$  °C com avaliações a cada 30 dias.
- Avaliar a fotoestabilidade por UV-Vis do óleo essencial *in natura* e do sistema encapsulado mais estável pelo contato com a radiação ultravioleta ( $\lambda = 254$  nm);
- Avaliar a cinética de liberação do óleo essencial em diferentes pH e elucidar o mecanismo de liberação.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Inserção de nanotecnologia em óleos essenciais

Os óleos essenciais vêm sendo empregados como substâncias ativas em diversos sistemas encapsulados (CAMPELO et al., 2018; DE MATOS; SCOPEL; DETTMER, 2018; DE OLIVEIRA et al., 2019; GHADERI-GHAHFAROKHI et al., 2017). São produtos naturais obtidos a partir de plantas, sendo constituintes importantes do setor produtivo de várias indústrias, especialmente as de perfumaria, alimentos e farmacêutica (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993). Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, separáveis comumente por arraste a vapor d'água, dentre outras formas de extração (SIMOES et al., 2004). Ainda, podem apresentar diferenças físico-químicas e odoríferas quando extraídos de diferentes partes da planta. A principal característica dos óleos essenciais é a volatilidade de seus constituintes (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993). Esse é um dos principais motivos para que sejam considerados os princípios ativos de diversos sistemas encapsulados: uma vez que suas propriedades bioativas são notadamente comprovadas, torna-se necessário o uso de ferramentas tecnológicas visando contornar o problema de elevada volatilidade e, ao mesmo tempo, aproveitar ao máximo seu poder bioativo.

Atualmente diversas técnicas de extração de óleos essenciais vêm sendo empregadas, sendo que cada uma delas possui suas peculiaridades:

**Enfloração:** O método consiste na retirada de óleos essenciais de flores frescas utilizando gordura, no qual se espalha uma fina camada (gordura sem odor) sobre placas de vidro e, em seguida, coloca-se pétalas por um determinado período sobre esta placa, sendo substituídas a cada intervalo de tempo por novas camadas. Após o processo em que a gordura absorve ao máximo a fragrância, os óleos podem ser retirados por extração com solvente orgânico (ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011).

**Prensagem:** Método utilizado para extrair óleos essenciais de frutos cítricos, no qual este é prensado até a liberação das substâncias voláteis encontradas no pericarpo e em cavidades oleaginosas. Por

meio da decantação, centrifugação ou destilação fracionada, os óleos são separados da emulsão formada com a água (ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011).

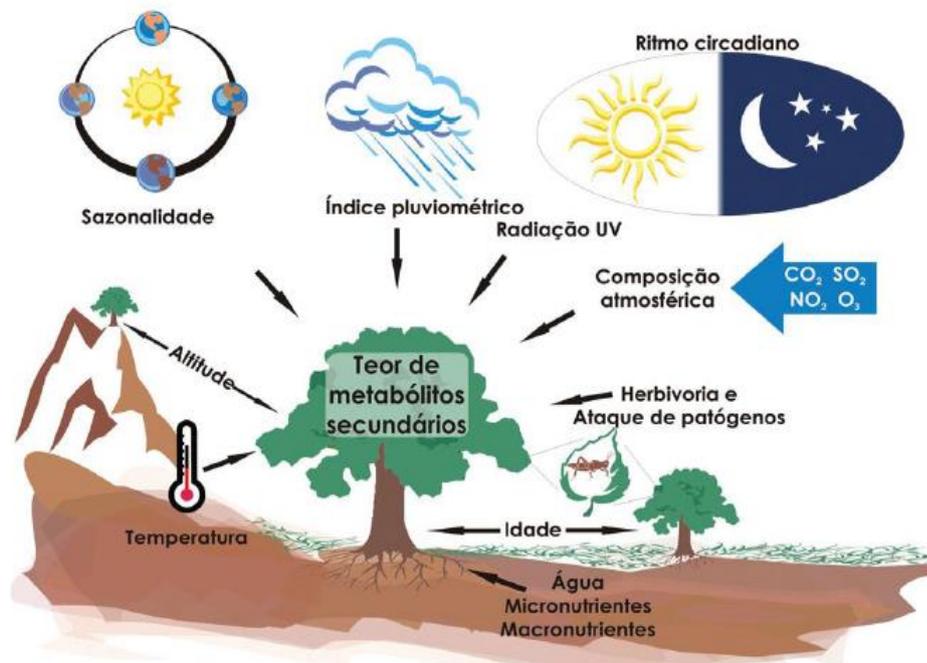
**Extração por arraste a vapor d'água:** Neste método, o material vegetal fica em contato com a água dentro de um balão, e uma fonte de calor provoca a ebulição da água que então arrasta os óleos essenciais em pequena escala. Geralmente, usa-se um aparato do tipo Clevenger. Depois de separados, os óleos essenciais são secos com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro (ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011).

**Extração por *headspace*:** É uma técnica muito sensível, usada na análise de compostos em baixas concentrações, onde o analito é mais volátil que a matriz. Este volatiliza preferencialmente, podendo ser determinado sem os interferentes dos outros componentes da amostra. A principal característica do *headspace* é a possibilidade de determinação de componentes voláteis da amostra a ser estudada de forma direta. Esta é uma técnica muito eficiente, pois possibilita a introdução da amostra no cromatógrafo gasoso para obtenção dos óleos essenciais (ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011).

**Fluido Supercrítico:** Um fluido supercrítico é aquele em que o gás se encontra a uma temperatura em que não pode ser liquefeito por compressão isotérmica. A temperatura a partir da qual este fenômeno acontece é chamada de temperatura crítica. Nestas condições, o gás comprimido apresenta baixa viscosidade e elevada densidade, permitindo sua utilização em processos de extração de solutos a partir de matrizes sólidas. O CO<sub>2</sub> apresenta algumas características que o elegeram como uma opção diferenciada enquanto solvente supercrítico, dentre elas está a facilidade de separação do soluto por ser extremamente volátil, não tóxico, não inflamável, relativamente barato e inodoro odor (MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996).

A composição química dos óleos de uma mesma planta pode variar significativamente de acordo com o período de coleta, estação do ano, temperatura, estágio de desenvolvimento, condições climáticas e de solo (**Figura 1**) (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; SIMOES et al., 2004) . Ainda, diversas funções biológicas são atribuídas aos óleos essenciais, tais como proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra perda d'água, controle da temperatura etc. (TAIZ; ZEIGER, 2004). A

composição química pode ser descrita principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos, além de fenilpropanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993).



**Figura 1.** Fatores que podem influenciar na composição química dos óleos essenciais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; SIMOES et al., 2004).

Diversas famílias botânicas são ricas em óleos essenciais. Dentre elas destaca-se a Piperácea, conhecida por conter em sua composição química substâncias ativas como fenilpropanóides (safrol e dilapiol), piperina, amidas análogas a piperina e terpenóides ( $\alpha$  e  $\beta$  pineno, *E*-cariofileno, óxido de cariofileno, dentre outros) associados às suas propriedades inseticidas, larvicidas, fungicidas e bactericidas. O gênero *Piper* se destaca por conter espécies que apresentam metabólitos secundários (como terpenos, lignanas e amidas), os quais vêm sendo utilizados no controle de diversas pragas agrícolas (SOUSA et al., 2008).

A espécie *Piper nigrum* (pimenta preta ou pimenta-do-reino) tem grande distribuição no Brasil, com boa adaptação na região norte. É uma das especiarias de mais amplo uso culinário no mundo (CARNEVALLI; ARAÚJO, 2013). As sementes são comumente usadas como conservante

alimentício. O óleo essencial extraído das sementes é rico em compostos monoterpênicos como canfeno,  $\delta$ -3-careno, *p*-cimeno, limoneno, mirceno, *cis*-ocimeno,  $\alpha$  e  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, borneol, cânfora, carvacrol, *cis*-carveol, *trans*-carveol, carvona, 1,8-cineol e sesquiterpenos como  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -*trans*-bergamoteno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\delta$ -cadineno,  $\gamma$ -eudesmol, elemol, cubebol e  $\alpha$  e  $\beta$ -bisabolol. Estes metabólitos são frequentemente usados como agentes sinérgicos nos inseticidas naturais, além de apresentarem propriedades larvicidas, antifúngicas, antibacterianas e repelentes (ABDULAZEEZ et al., 2015; RAVINDRAN; BEVERAGES; KALLUPURACKAL, 2012; STOYANOVA et al., 2006).

A técnica de encapsulação de óleos essenciais vem sendo extensamente aplicada como uma ferramenta nanotecnológica para proteger esses ativos do meio externo, bem como modular a suas liberações de acordo com necessidades específicas (KUMARI et al., 2010; MAHAPATRO; SINGH, 2011; SILVA et al., 2020). A encapsulação de compostos bioativos representa uma alternativa viável e eficiente. Além disso, esta técnica pode aumentar a estabilidade física das substâncias, protegê-las das interações com o ambiente, diminuir sua volatilidade, aumentar sua bioatividade, reduzir a toxicidade e ainda permitir a liberação dos ativos ao longo do tempo em meios específicos (BILIA et al., 2014; DONSI et al., 2011).

Diversos tipos de materiais vêm sendo utilizados como carreadores desses princípios ativos, destacando-se os polímeros naturais e sintéticos (GASPERINI; MANO; REIS, 2014; SILVA et al., 2020, 2018). Os carreadores, também conhecidos como materiais de parede, são os materiais responsáveis pela proteção do ativo da formulação. Durante o desenvolvimento de nano ou micropartículas encapsulantes, eles agem como uma membrana protetora da substância ativa. No caso dos sistemas coloidais, os carreadores protegem a substância ativa do meio aquoso. No entanto, é necessário conhecer profundamente as características dos carreadores quanto a biodegradabilidade, capacidade para funcionalização de superfície, conjugação, complexação, capacidade de encapsulação e afinidade química com a substância ativa (KUMARI et al., 2010; PARRIS; COOKE; HICKS, 2005). As nanopartículas poliméricas vêm sendo amplamente desenvolvidas como carreadoras de ativos

naturais pois são alternativas tecnológicas de excelente biocompatibilidade, não imunogênicas, não tóxicas e biodegradáveis, além de estarem inseridas em uma ampla classe de nanocarreadores (DONSÌ et al., 2011; XIAO; XU; ZHU, 2017).

A técnica de encapsulação vem ganhando destaque na química de produtos naturais como alternativa para o melhoramento das atividades e estabilidade de metabólitos passíveis de degradação ou volatilização, como é o caso dos óleos essenciais (SILVA et al., 2018). Os sistemas encapsulados desenvolvidos abrangem aplicações como biodefensivos (sendo diretamente empregados no controle de pragas e vetores de doenças) (BRAVO CADENA et al., 2018; DONSÌ et al., 2011), em medicina (especialmente na entrega seletiva de fármacos (CHAN et al., 2021; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; MISRA; ACHARYA; SAHOO, 2010; SADAQUAT et al., 2021; YASMIN et al., 2017), em cosméticos (especialmente na proteção de substâncias propensas à oxidação, e na entrega de substâncias ativas em camadas mais profundas da pele (MARTINS; BARREIRO; RODRIGUES, 2016), em tecnologia de alimentos (protegendo substâncias altamente antioxidantes e vitaminas (RAMACHANDRAIAH; HONG, 2021; VIDEIRA-QUINTELA; MARTIN; MONTALVO, 2021), e nas mais diversas aplicações em que se torna necessário direcionar o sítio de atuação do princípio ativo, bem como controlar sua taxa de liberação. Esse tipo de nanotecnologia permite manter as características e propriedades de compostos ativos, como sua proteção, estabilização e liberação prolongada.

Assim como a maior parte dos compostos bioativos, os óleos essenciais são quimicamente diversificados, podendo gerar alguns desafios quanto à sua introdução em sistemas complexos. Sabe-se que sua incorporação em determinado sistema pode afetar negativamente tanto sua estabilidade quanto sua atividade biológica. Ainda, um inconveniente é que os óleos essenciais apresentam baixa solubilidade em água devido à composição química rica em constituintes hidrofóbicos (PARRIS; COOKE; HICKS, 2005). Por isso, pesquisas voltadas ao desenvolvimento de sistemas contendo grupos instáveis, voláteis e pouco solúveis em água ganham destaque, especialmente na química dos produtos naturais (CADONÁ et al., 2020).

A encapsulação de óleos essenciais permite a otimização de sua funcionalidade, fator que possibilita uma ação mais prolongada de seus princípios ativos, já que os óleos essenciais são originalmente negativados por sua volatilidade (SOUZA et al., 2014). A encapsulação de substâncias ativas pode ser realizada através de diferentes técnicas, todas com o mesmo objetivo de encapsular/compartimentalizar conteúdos sólidos, líquidos ou gasosos no interior de uma membrana formada por um ou mais carreadores, protegendo o conteúdo do ambiente externo e permitindo que seja liberado em taxas controladas (MONDAL, 2008; ÜNER; KARAMAN; AYDOĞMUŞ, 2014).

A encapsulação de ativos naturais, como os óleos essenciais, em geral, vem sendo desenvolvida por uma série de pesquisadores com o intuito de melhorar a estabilidade química, aumentar a atividade destas substâncias e reduzir a volatilização, melhorando seus potenciais biológicos. Nesse contexto, podemos citar alguns exemplos de encapsulação de óleos essenciais e suas mais novas aplicações, a partir de publicações de 2021:

(XAVIER et al., 2021) encapsularam o óleo essencial da *Cinnamodendron dinisii* utilizando zeína como carreador aplicado em matriz de quitosana para produzir uma embalagem de filme nanocompósito ativo para conservação de alimentos. Os filmes de quitosana obtidos e funcionalizados com as nanopartículas demonstraram atividade antioxidante e antimicrobiana, eficientes na conservação de carne moída.

(MOURA et al., 2021) investigaram o potencial de micropartículas à base de mandioca contendo óleo essencial de *Siparuna guianensis* no controle de larvas do *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. A microencapsulação de amido de mandioca reduziu a degradação do óleo essencial e aumentou as atividades letais persistentes em mais de 50% contra as larvas de mosquito de ambas as espécies em comparação com o óleo essencial puro.

Ainda, (CAMPELO et al., 2021) desenvolveram uma nova forma farmacêutica semissólida à base de óleo essencial de cravo-da-Índia e polissacarídeos para o tratamento da candidíase vaginal. As nanoemulsões apresentaram excelente estabilidade coloidal e pH adequados. Dessa forma, o encapsulamento de óleos essenciais vem permitindo o desenvolvimento de diversos produtos

alternativos para o controle de microrganismos, sugerindo uma ampla gama de carreadores, bem como da combinação deles, para o *design* de nano/micropartículas com elevada capacidade encapsulante e com propriedades bioativas atribuídas às mais diversas fontes vegetais de óleos essenciais.

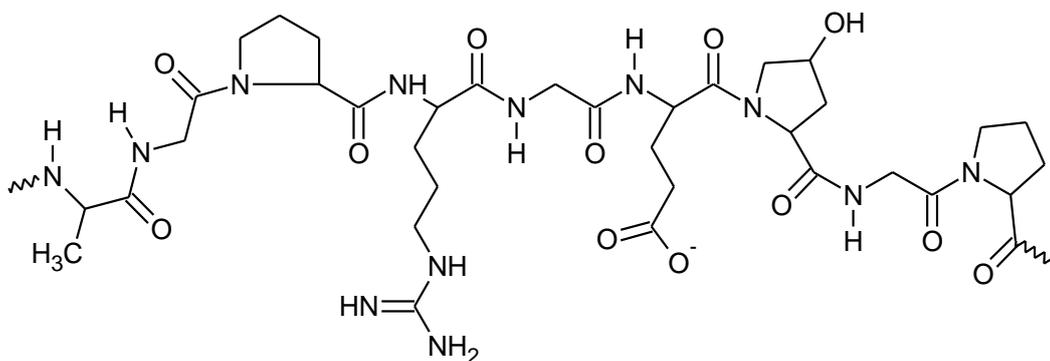
### 3.2. Polímeros biodegradáveis como carreadores de óleos essenciais

Polímeros biodegradáveis (sintéticos ou naturais) apresentam enorme propensão à degradação por meio de processos naturais, onde são reaproveitados no ambiente através dos ciclos da natureza (BRITO *et al.*, 2011; CLARINVAL; HALLEUX, 2005; PAVLOVIĆ; PAVLOVIĆ, 2021). Biopolímeros como colágeno, gelatina, quitosana, gomas e amidos vêm sendo alternativas para o uso como carreadores em sistemas encapsulados. Esses polímeros possuem características peculiares, como baixa toxicidade, compatibilidade e, principalmente, biodegradabilidade (AWASTHI *et al.*, 2020; POLMAN *et al.*, 2021).

A gelatina (**Figura 2**) é considerada um polímero natural derivado do colágeno, comumente usada em aplicações farmacêuticas e médicas devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade em ambientes fisiológicos. Essas características contribuem para a sua utilização segura como componente em formulações carreadoras (SAHOO *et al.*, 2015; YOUNG *et al.*, 2005). É uma macromolécula constituída por aminoácidos, possuindo grupos catiônicos e aniônicos, além de sequências repetitivas de glicina, prolina e alanina, responsáveis pela estrutura e tripla hélice que garantem sua elevada estabilidade. A estrutura primária da gelatina oferece muitas possibilidades de modificação química, garantindo a interação com substâncias ativas (SAHOO *et al.*, 2015), bem como com outros carreadores (BASTOS *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Dois tipos diferentes de gelatina podem ser produzidos, dependendo do método de pré-tratamento do colágeno. A gelatina do Tipo A é obtida a partir do tratamento em meio ácido, garantindo maior quantidade de cargas positivas atribuídas ao grupo  $\text{NH}_3^+$  e ponto isoelétrico em torno do pH 9. Já o Tipo B é obtido por tratamento

alcalino e possui ponto isoelétrico em torno do pH 4,8, garantindo maior proporção de grupos carboxila ( $\text{COO}^-$ ) (NAIDU; PAULSON, 2011).

A gelatina tem sido amplamente empregada como carreador de medicamentos e moléculas bioativas em diferentes formas de transportadores, tais como hidrogéis, micro e nanopartículas. A estrutura e funcionalidade da gelatina oferece vantagens para sua modificação, tornando-a um polímero natural interessante em aplicações nanotecnológicas, incluindo o papel de carreador de óleos essenciais (AZIMI et al., 2013; EL-ASSAL, 2016; ELZOGHBY, 2013; GHASEMISHAHRESTANI et al., 2015; RAMÍREZ-AGUDELO et al., 2018; SAHOO et al., 2015; SILVA et al., 2018; YANG; LI; NIE, 2007; YOUNG et al., 2005). As nanopartículas de gelatina também podem ser modificadas por meio de produção iônica. Há vários métodos de produção que abrangem os tipos de gelatina A e B. (MADKHALI; MEKHAIL; WETTIG, 2019) ressaltam que não há ligações específicas para determinar a flexibilidade em relação à hidrólise do colágeno, fazendo com que a gelatina tenha várias posições no espaço das suas cadeias que são passíveis de rompimento. Essas rupturas dependem de fatores como pH e temperatura, tornando a hidrólise randômica, justificando a heterogeneidade molecular da gelatina.

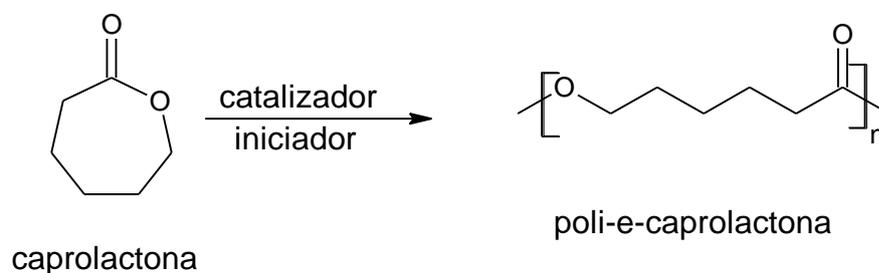


**Figura 2.** Estrutura molecular do biopolímero gelatina.

A gelatina vem sendo utilizada como carreador de diversas substâncias ativas, resultando no desenvolvimento de nanopartículas com aplicações em diversas áreas devido à sua biocompatibilidade e degradabilidade. A aplicação de nanopartículas de gelatina também se estende

à indústria de cosméticos, onde são usadas como nanocápsulas para armazenar polifenóis e flavonóides para aplicação em filtros solares de ação prolongada (GRAZIOLA et al., 2016).

A associação de polímeros naturais e sintéticos pode ser uma alternativa de melhoria na formação e estabilização de sistema encapsulantes, garantindo a eficiência de encapsulação da substância ativa. Destaca-se o polímero sintético poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) ( $C_6H_{10}O_2$ )<sub>n</sub> (Figura 3), derivado da quebra e polimerização da caprolactona. Trata-se de um polímero semicristalino com peso molecular entre 5.000 e 80.000 Da, solúvel em vários solventes orgânicos, com temperatura de fusão baixa (de 59 e 64°C) e temperatura de transição vítrea em torno de -60 °C.

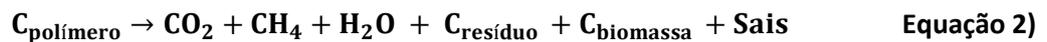
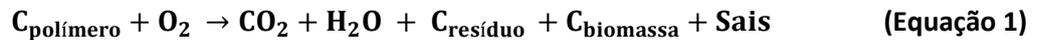


**Figura 3.** Quebra da caprolactona para a formação do polímero sintético PCL.

O PCL é um polímero semicristalino, biodegradável e de fácil processamento. Estudos de (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010) demonstraram que a versatilidade do PCL pode ser empregada à produção de membranas biopoliméricas que são capazes de liberar gradativamente o princípio ativo de forma que o PCL também pode ser sintetizado em fibras sobrepostas e semipermeáveis.

O PCL é degradado pela hidrólise das ligações ésteres pela enzima lipase. Esta é capaz de degradar tanto a fase amorfa quanto a cristalina do polímero. Quando no solo, apresenta perda de massa, indicando a presença de um mecanismo de quebra aleatória da cadeia. Por essa razão surgiu o interesse para a sua utilização em sistemas de liberação de ativos, podendo ser incorporado a outros polímeros para melhorar a resistência e modular a taxa de liberação de compostos bioativos em sistemas micro e nanoestruturados (GRILLO et al., 2012a, 2012b).

Materiais poliméricos como a gelatina e o PCL podem sofrer reações de decomposição tanto na presença (**Equação 1**) quanto na ausência de oxigênio (**Equação 2**). Geralmente, os produtos gerados são CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>, compostos inorgânicos ou biomassa (BRITO et al., 2011).



Como os materiais usados nesta pesquisa são inertes e passíveis de decomposição por microrganismos, para deixar os átomos de carbonos disponíveis, sugere-se que estes inicialmente sofram uma quebra através de reações abióticas, como a fotodegradação, oxidação e/ou degradação térmica no meio aplicado. A biodegradação procede pela decomposição por microrganismos que, por sua vez, podem liberar enzimas capazes de decompor as macromoléculas em cadeias menores. Por fim, estes fragmentos podem ser levados para o interior das células microbianas onde serão decompostas em CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, sais minerais e biomassa (BRITO et al., 2011).

Pesquisas anteriores mostram o sucesso da associação de polímeros sintéticos e naturais na produção de nanopartículas poliméricas, como o trabalho de (DE OLIVEIRA et al., 2019), que produziram nanopartículas para o encapsulamento do o óleo essencial de *Allium sativum*. Os polímeros utilizados foram o PCL e a gelatina. Com o objetivo de melhorar as propriedades biológicas, químicas e mecânicas do titânio, (KICHI et al., 2020) desenvolveram um sistema a base de gelatina e PCL. Esse estudo mostrou que a associação destes polímeros no revestimento do titânio melhorou sua resistência em todas as avaliações. (AHMAD et al., 2018) Desenvolveram nanofibras de PCL/gelatina com propriedade antioxidante como material potencial para curativos. As nanofibras mantiveram a integridade estrutural e mostraram atividade semelhante à enzima superóxido dismutase no sistema tampão.

### 3.3. Nanopartículas poliméricas encapsulantes

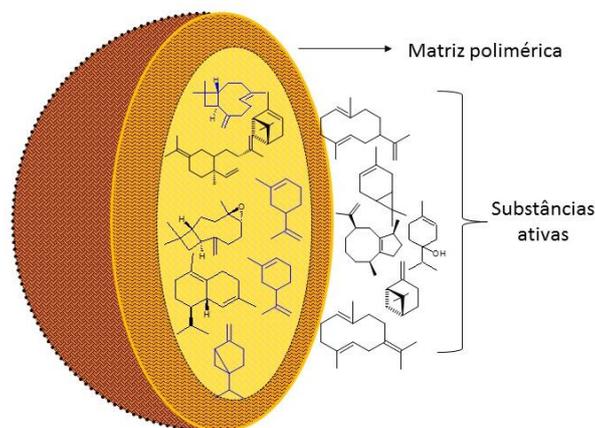
A incorporação de nanotecnologia no desenvolvimento de produtos alternativos tem permitido ampliar suas aplicações nas mais variadas áreas da pesquisa. O princípio dessa ciência é que os materiais na escala nanométrica podem apresentar propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais diferentes daquelas em maior escala. Vale ressaltar que essas propriedades podem variar de acordo com o tamanho e a forma das partículas (DURAN; CAPPARELLI; MORAES, 2006).

As nanopartículas encapsulantes podem ser formadas a partir de diferentes carreadores, sendo desenvolvidas através da associação de materiais que juntos originam um terceiro material com propriedades superiores aos componentes de formulação separados. Podem ser constituídas por multicamadas que são sobrepostas de acordo com o interesse de aplicação. Diversas pesquisas têm sido realizadas no desenvolvimento de nanopartículas biodegradáveis e no aprimoramento de sua aplicabilidade (REDDY et al., 2012; SILVA et al., 2020; WANG et al., 2019), permitindo a combinação de biomateriais com diferentes propriedades físicas e químicas. Atenção recente tem sido dada ao desenvolvimento de nanopartículas biodegradáveis baseadas em bicamadas para proteger e liberar compostos bioativos encapsulados (DE OLIVEIRA et al., 2019; KUSUMASTUTI et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019). Conseqüentemente, novos sistemas de liberação controlada têm sido voltados para produtos farmacêuticos (CRIADO-GONZALEZ et al., 2019; QIU et al., 2020), área biomédica (ARABPOUR et al., 2019; YAN et al., 2019) e agricultura (KUSUMASTUTI et al., 2019; SILVA et al., 2018).

A combinação de materiais biopoliméricos representa uma alternativa importante para encapsular óleos essenciais. No entanto, compreender o projeto de desenvolvimento de nanopartículas bicamadas é crucial para a obtenção de formulações estáveis, liberação controlada adequada e funcionalização de superfície para posterior conjugação com moléculas bioativas ou ligantes. O desenvolvimento dessas nanopartículas encapsulantes envolve uma série de parâmetros relacionados com as finalidades específicas de ação das substâncias encapsuladas e também dos mecanismos de liberação controlada, os quais muitas vezes podem estar relacionados com o tipo de carreador utilizado (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; RISCH; REINECCIUS, 1995). Sua formação

depende de alguns fatores, sendo o principal deles a interação química e/ou física entre as camadas e a substância ativa encapsulada.

As nanopartículas, quando possuem uma camada interna estruturada, são denominadas nanocápsulas e quando apresentam uma matriz contínua são chamadas de nanoesferas (MAHMOUDI SABER, 2019). As nanocápsulas são partículas constituídas por uma parede polimérica contendo no seu interior uma cavidade, onde está adsorvido o princípio ativo, o qual também pode estar presente na parede polimérica (Figura 4). Por outro lado, as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica onde componentes químicos podem ficar retidos ou adsorvidos (SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2002). As interações químicas nesses sistemas encapsulados são observadas através da formação de ligações de hidrogênio, iônicas e covalentes. Essas ligações dão origem à organização entre as camadas e estruturação de interação com substratos. A biocompatibilidade de polímeros sintéticos e naturais é uma variável que influencia nas características e na formulação de sistemas carreadores (SAHU et al., 2017).



**Figura 4.** Nanopartícula polimérica: Princípios ativos dissolvidos no núcleo da matriz.

Os sistemas encapsulados funcionam como estratégias eficientes para transportar a substância ativa ao seu local de ação através da escolha de um carreador e da rota adequada, tendo como objetivos principais o de proteger o seu conteúdo de fatores ambientais (luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos), além da liberação controlada e sob estímulos (tais como

mudança de pH, rompimento físico, intumescimento, dissolução etc.). Além disso, a encapsulação também pode mascarar o sabor e/ou odor desagradável e aumentar o tempo de atuação do composto ativo, prolongando seu efeito. Neste caso, o tipo de nanopartícula e o local em que a substância ativa será exposta (adsorvido na superfície ou não) dependerão das características finais desejadas, como aplicação, tamanho, distribuição de tamanho, grau de biodegradabilidade e compatibilidade do polímero com a substância ativa (MAHAPATRO; SINGH, 2011).

O desenvolvimento de nanossistemas poliméricos está se expandindo e desempenhando um papel fundamental em várias áreas, desde o controle da poluição à tecnologia ambiental, da eletrônica à fotônica, da medicina à biotecnologia, dos materiais aos sensores, e assim por diante. Diversos registros na literatura vêm enfatizando esse crescente interesse. Esta tendência é baseada em suas propriedades únicas, que atendem a inúmeras aplicações e necessidades de mercado (PUHL et al., 2011; RAO; GECKELER, 2011).

Devido às características intrínsecas dos carreadores gelatina e PCL, além da possibilidade de compatibilidade positiva entre esses carreadores no *design* de nanopartículas bicamadas, esse sistema foi o escolhido para encapsular o óleo essencial da *P. nigrum*. O *design* de nanopartículas encapsulantes influencia significativamente na liberação controlada do bioativo encapsulado (DA COSTA et al., 2021). Além disso, a verificação da formação das camadas e a localização do ativo encapsulado são informações nem sempre obtidas facilmente. É preciso utilizar um conjunto de técnicas que, muitas vezes, fornecem informações que, em conjunto, podem ser utilizadas para propor esse *design*. No entanto, muitas propostas na literatura continuam sendo especulativas, mas com boas proposições baseadas geralmente nas curvas de liberação controlada e em técnicas espectroscópicas e microscopia eletrônica (DA COSTA et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2019, 2020; SILVA et al., 2018).

### **3.4. Métodos de preparação de nanopartículas poliméricas encapsulantes**

Várias são as metodologias para o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas encapsulantes, as quais geralmente empregam em suas formulações materiais como polímeros

(sintéticos ou naturais), tensoativos, compostos bioativos, solventes orgânicos e óleos essenciais, dependendo da formulação. Para o preparo de nanopartículas com a finalidade de carreamento de ativos naturais, deve-se levar em consideração as propriedades físico-químicas do polímero. Os polímeros e seus produtos de degradação devem ser biocompatíveis e biodegradáveis, não causando danos ou impactos ao meio ambiente (GRILLO et al., 2012a; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Segundo (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010) geralmente são utilizados métodos clássicos de obtenção de nanopartículas:

**Método de nanoprecipitação:** O método de nanoprecipitação é também chamado de deslocamento de solvente ou deposição interfacial. Esse método requer duas fases, uma orgânica e outra aquosa. A fase orgânica consiste essencialmente numa solução ou numa mistura de solventes (etanol, acetona, hexano, diclorometano etc.), de uma macromolécula com papel de carreador (polímero sintético, semissintético ou natural), substância ativa, óleo e tensoativo lipofílico. Por outro lado, a fase aquosa consiste em uma mistura de tensoativo em meio aquoso. Neste método as nanopartículas são obtidas como uma suspensão coloidal formada quando a fase orgânica é adicionada lentamente com agitação moderada à fase aquosa. As principais variáveis do procedimento são aquelas associadas às condições de adição da fase orgânica à fase aquosa, tais como taxa de injeção de fase orgânica e taxa de agitação de fase aquosa (ELZOGHBY, 2013; FESSI et al., 1989; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SAHOO et al., 2015).

**Método de emulsão-difusão:** A preparação de nanopartículas pelo método emulsão-difusão permite a nanoencapsulação de substâncias ativas lipofílicas e hidrofílicas. O procedimento experimental requer três fases: orgânica, aquosa e diluição. Quando o objetivo é a nanoencapsulação de uma substância ativa lipofílica, a fase orgânica contém o polímero, a substância ativa, o óleo e um solvente orgânico parcialmente miscível com água. A fase orgânica é emulsionada sob agitação vigorosa na fase aquosa e, após formação de emulsão primária, o solvente orgânico é difundido para a fase aquosa externa pela adição de excesso de água (diluição), conduzindo à precipitação do polímero e formação das nanopartículas (GRILLO et al., 2012a; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

O mecanismo de formação de nanocápsulas sugerido por (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998b) baseia-se na teoria de que cada gota de emulsão produz várias nanocápsulas, e que estas são formadas pela combinação de precipitação de polímeros e fenômenos interfaciais durante a difusão do solvente (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998a).

**Método de emulsificação dupla:** Esse método consiste na formação de duas emulsões que são geralmente preparadas usando dois tensoativos: um hidrofóbico destinado a estabilizar a interface água/óleo da emulsão interna, e um hidrofílico para estabilizar a interface externa das gotas de óleo para emulsões água/óleo/água. A emulsão primária é formada com a utilização de um ultrassom e o tensoativo hidrofóbico estabiliza a interface água/óleo da fase interna. A emulsão secundária também pode ser formada com ultrassom e a dispersão das nanopartículas é estabilizada pela adição de outro tensoativo (hidrofílico) (GRILLO et al., 2012a; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SAHOO et al., 2015).

**Método de coacervação por emulsão:** Esse método envolve a formação de uma emulsão óleo/ água, onde a fase orgânica é composta pelo solvente e pelo composto bioativo, e a fase aquosa é composta pelo polímero, agente estabilizante e água. A emulsão pode ser formada pela utilização de ultrassom ou agitação mecânica. Em seguida, o processo de coacervação é realizado pela adição de eletrólitos, adição de um solvente não miscível em água ou agente desidratante ou alteração de temperatura. Finalmente, o processo de coacervação é complementado com medidas adicionais para a formação de retículos, que torna possível a obtenção das nanopartículas. A formação das nanopartículas se dá durante a fase de coacervação, em que há precipitação do polímero da fase de emulsão contínua para formação de uma película que se aglomera em nanopartícula (GRILLO et al., 2012a; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; RAO; GECKELER, 2011; SAHOO et al., 2015)

**Método de revestimento de polímero (*Polymer-coating method*):** Esse método é utilizado para a deposição de uma fina camada polimérica na superfície da nanopartícula previamente formada pela adsorção do polímero em nanopartículas não revestidas quando incubadas com uma solução polimérica sob agitação. Da mesma forma, essa camada polimérica pode ser adicionada durante a fase

final dos métodos citados anteriormente (GRILLO et al., 2012a; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

**Método de camada por camada (*Layer-by-layer method*):** Esse método favorece a obtenção de partículas vesiculares, também denominadas cápsulas de polieletrólito. O mecanismo de formação é baseado na atração eletrostática irreversível que leva à adsorção de polieletrólitos nas camadas formadas. É adsorvida uma camada de polímero por incubação na solução polimérica, diminuindo a solubilidade do polímero por adição gota a gota de solvente susceptível de ser misturado. Este procedimento é então repetido com um segundo polímero e várias camadas de polímero são depositadas sequencialmente, uma após a outra (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

### 3.5. Estabilidade de formulações

Os sistemas coloidais normalmente não possuem tendência à separação de fases uma vez que o processo de sedimentação é lento para partículas submicrométricas, sendo minimizado pelo movimento Browniano (REZENDE SCHAFFAZICK et al., 2002). No entanto, com o passar do tempo, pode ocorrer a aglomeração das partículas e, conseqüentemente, sua sedimentação.

Vários fatores influenciam na estabilidade dessas formulações, destacando-se a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos. Além disto, é fundamental a avaliação da estabilidade dessas formulações sob diferentes condições (MOLPECERES et al., 1997). O tamanho de partícula, potencial zeta, condutividade elétrica, eficiência de encapsulação, turbidez e pH são geralmente os parâmetros que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas (SILVA et al., 2020). Muitas pesquisas têm abordado unicamente valores de Eficiência de Encapsulação (EE), os quais são consideravelmente elevados. No entanto, são poucos os trabalhos que avaliam este e os outros parâmetros mencionados acima ao longo do tempo. Ou seja, existem poucos estudos referentes à estabilidade de nanopartículas a longo prazo, especialmente as poliméricas biodegradáveis (LAZZARI et al., 2012; LEMOINE et al., 1996; MOROZOVA et al., 2019; SILVA et al., 2020).

A aplicabilidade industrial de nanopartículas dispersas em meio aquoso pode ser limitada, devido aos problemas de baixa estabilidade físico-química, em períodos de armazenamento prolongados. Dentre eles, há a degradação do polímero e migração da substância ativa para o meio externo. A instabilidade de um sistema pode ser caracterizada a partir de fenômenos como floculação, coalescência, cremação, sedimentação, ruptura e separação de as fases (GRILLO et al., 2012a; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2002). Além disto, é importante enfatizar que sistemas coloidais formados por nanopartículas poliméricas biodegradáveis são propensos à proliferação microbiana, havendo a necessidade de adição de conservantes (REZENDE SCHAFFAZICK et al., 2002; SILVA et al., 2020). Poucos trabalhos tem mostrado interesse em avaliar a adição de tais componentes em suas formulações (SILVA et al., 2020).

(SILVA et al., 2020) avaliou a adição de benzoato de sódio e NE em um sistema coloidal formado por nanopartículas de PCL contendo óleo essencial da *Lippia alba* encapsulado. Os autores verificaram o dobro do tempo de estabilidade (aproximadamente 60 dias) para os sistemas contendo conservantes, em relação ao sistema controle sem conservante (30 dias).

A avaliação da estabilidade de formulações é um importante parâmetro que visa garantir a segurança, qualidade e eficácia do produto. Todo produto desenvolvido depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, além de outros fatores intrínsecos como propriedades físico-químicas, substâncias ativas, excipientes, fórmulas farmacêuticas e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais usados (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL., 2019).

A desestabilização de um sistema coloidal por floculação ocorre pela aglomeração das partículas em agregados diferentes. Porém, ainda é possível reconhecer cada partícula de forma individual. O processo de floculação pode ser resultado de forças existentes entre as partículas, como forças de repulsão eletrostática, forças de repulsão estérica e forças de atração de van der Waals. As forças repulsivas estão diretamente relacionadas às cargas de mesmo tipo existentes na superfície das partículas. As forças de repulsão estérica ocorrem quando a molécula emulsificante adere à superfície da partícula, mantendo-a estável. Já a desestabilização por coalescência é um processo de separação

durante o qual as partículas se unem, formando partículas maiores que tendem a se separar do resto da emulsão, sendo irreversível. Esses agregados podem se manter dispersos na fase aquosa, podendo decantar ou flutuar (MCCLEMENTS, 2016). O mecanismo de cremação ocorre quando as partículas emulgentes tendem a se separar, sedimentando ou sobrenadando, de acordo com a diferença da densidade entre as fases. Esse processo pode não ser necessariamente acompanhado de floculação das gotas. É reversível, logo, após agitação, a emulsão retorna à sua condição original (FRANZOL; REZENDE, 2015; PARTICLE SCIENCES, 2011). Já o mecanismo de separação de fases é o processo em que ocorre a quebra total da emulsão, sendo nítida a separação das fases óleo/água. As colisões entre as partículas podem resultar em floculação, podendo levar à coalescência em partículas maiores. Possivelmente, a fase dispersa pode se tornar a fase contínua, separada da dispersão por uma única interface. Neste caso, tem-se a emulsão totalmente separada (FRANZOL; REZENDE, 2015; MCCLEMENTS, 2016). Ainda, pode ocorrer a desestabilização pela atividade microbiana, onde microrganismos (por ação enzimática) rompem algumas das ligações químicas da cadeia principal do polímero, causando a ruptura das nanopartículas (BRITO et al., 2011).

O estudo de estabilidade fornece dados sobre o comportamento do nanossistema em determinado intervalo de tempo, frente às condições ambientais nas quais foi submetido desde a sua fabricação até sua desestabilização. A avaliação da estabilidade pode ser realizada considerando diferentes parâmetros como temperatura de armazenamento, centrifugação, pH, condutividade elétrica, turbidez, propriedades organolépticas, eficiência de encapsulação, uso de conservantes, dentre outras (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL., 2019). Como não existe uma normativa específica para sistemas de nanopartículas contendo óleo essencial encapsulado, utilizou-se o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (ANVISA, 2004).

O uso de conservantes é regulamentado pela ANVISA através da RDC N° 29, DE 1 de junho de 2012, a qual aponta uma série de substâncias cuja função é inibir o crescimento de microrganismos, conservando a formulação livre de deteriorações causadas por bactérias, fungos e leveduras. Os conservantes não devem acrescentar cor ou odor ao produto, sendo compatíveis com todos os

ingredientes. Além disso, devem agir durante a fabricação e ao longo da vida útil da formulação, e ainda devem ser não inflamáveis e não tóxicos (ANVISA, 2012). O conservante deve ser estável às variações de temperatura e pH. Porém, sabe-se que nenhuma combinação orgânica é estável em calor elevado ou condições de pH extremas. A alteração do pH pode ser um indício de degradação do polímero, e sua diminuição em um curto período de tempo pode ser atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do mesmo (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A condutividade elétrica é um parâmetro essencial para se determinar a integridade do sistema, principalmente daqueles armazenados em prateleira. Mudanças bruscas na condutividade elétrica podem ser um indicativo de instabilidade, podendo ser atribuída aos processos de coalescência e floculação (ANVISA, 2004). Já a variação da turbidez pode também estar associada aos processos de coalescência, floculação ou até mesmo ruptura. Em alguns sistemas poliméricos também é possível observar a diminuição de turbidez, a qual pode estar relacionada à sedimentação e ou à floculação das nanopartículas (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998b).

A estabilidade das nanopartículas poliméricas também pode ser afetada por fatores intrínsecos como força da gravidade e forças de atração de van der Waals, que são responsáveis pela atração e ocorrência de choques entre as partículas, resultando na junção das mesmas (GOODWIN, 2004). As forças atrativas existentes entre moléculas quimicamente saturadas, postuladas por van der Waals, também se originam de interações elétricas. Essas forças intermoleculares podem causar a desestabilização do sistema coloidal. Duas moléculas com dipolos permanentes se direcionam igualmente de modo a resultar na atração entre as partículas. Moléculas dipolares induzem a formação de dipolo em outras moléculas, levando à atração das partículas. No entanto, também existem forças atrativas entre moléculas apolares (forças de dispersão de London) devido à polarização provocada em uma das moléculas pelas distribuições de cargas.

De acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA ([ANVISA, 2004](#)), diversos são os ensaios para a avaliação da estabilidade de formulações. Dentre eles podem ser destacados:

**Estabilidade preliminar:** Este teste também é conhecido como teste de triagem e tem como objetivo auxiliar na escolha das formulações. O estudo de estabilidade preliminar consiste na realização do teste na fase inicial do desenvolvimento do produto, utilizando-se diferentes formulações de laboratório e com duração reduzida. Empregam-se condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto.

**Avaliação da estabilidade acelerada:** ensaio projetado para avaliar possíveis alterações físicas, químicas e microbiológicas em condições forçadas de armazenamento.

**Estudo de estabilidade de acompanhamento:** realizado com o objetivo de monitorar e confirmar o prazo de validade e o prazo de reteste.

**Avaliação da estabilidade de longa duração:** ensaio projetado para verificar as características físicas, químicas e microbiológicas de uma formulação nas condições de armazenamento e prazo de validade propostos, podendo também ser utilizado para definição do prazo de reteste.

**Avaliação da estabilidade em uso:** ensaio realizado para produtos acondicionados em embalagens multidose, com a finalidade de prover informação inicial e final que comprove o período de utilização pelo qual o produto mantém sua estabilidade após abertura e subsequentes reaberturas.

**Avaliação da fotoestabilidade:** ensaio realizado com a finalidade de demonstrar que os produtos, quando exposto à luz, permanecem dentro das especificações.

**Teste de prateleira:** Também conhecido como estabilidade de longa duração ou *Shelf life*, tem como objetivo validar os limites de estabilidade do produto e comprovar o prazo de validade estimado no teste de estabilidade acelerada.

**Teste de compatibilidade entre formulação e material de acondicionamento:** A estabilidade do produto e sua compatibilidade com o material de acondicionamento são conceitos distintos,

separados e complementares, que devem ser aplicados ao produto antes de ser comercializado. Neste teste, são avaliadas diversas alternativas de materiais de acondicionamento para determinar a mais adequada para o produto

### **3.6. Liberação controlada**

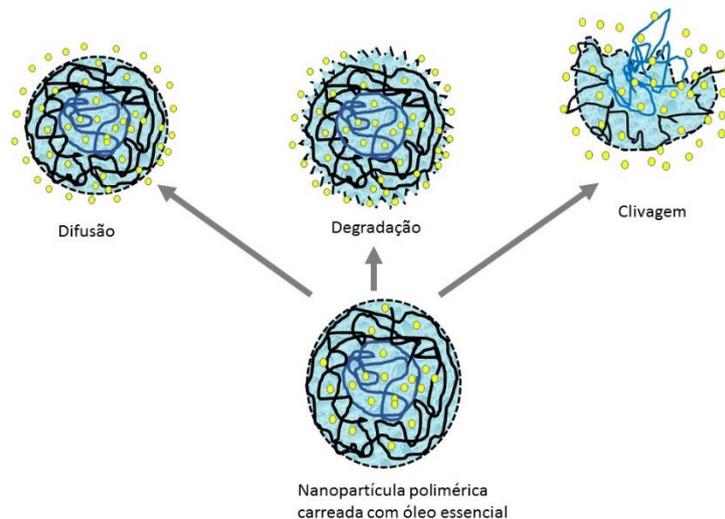
Os sistemas poliméricos de liberação controlada caracterizam uma inovação na incorporação de substâncias ativas, pois apresentam maior controle da liberação do ativo, redução de doses tóxicas, monitoramento dos níveis das substâncias ativas no sítio de aplicação e direcionamento do princípio ativo a alvos específicos (BIZERRA; SILVA, 2016).

O mecanismo de liberação controlada consiste em deslocar certos ativos presentes nas nanopartículas para o meio de aplicação. Esse deslocamento é gradativo e está relacionado com a concentração liberada ao longo do tempo, trazendo benefícios como a redução da evaporação de ativos voláteis, fácil manuseio e redução na fitotoxicidade, resultando em vantagens tanto para o ecossistema quanto para a saúde humana (ROY *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2020).

A investigação do perfil de liberação de bioativos a partir de nanopartículas poliméricas fornece importantes informações a respeito dos mecanismos que norteiam a liberação controlada (NERI-BADANG; CHAKRABORTY, 2019). Existem vários mecanismos possíveis de liberação dos bioativos: liberação devido à erosão ou degradação de polímeros; autodifusão através dos poros; liberação através de erosão superficial do polímero, liberação pulsada etc. (GRILLO *et al.*, 2012a; YASMIN *et al.*, 2017).

Na maioria dos estudos de liberação envolvendo nanopartículas poliméricas, a liberação bifásica é mais comum e inclui dois estágios: uma fase inicial de liberação associada às interações fracas entre o bioativo e as nanopartículas, e uma segunda fase onde os ativos estão ligados covalentemente e sua liberação ocorre através de difusão lenta da matriz, exibindo liberação prolongada e sustentada (BIZERRA; SILVA, 2016; YASMIN *et al.*, 2017).

Estudos dos mecanismos de liberação de ativos a partir de nanopartículas de gelatina mostraram que o ativo pode se difundir através da parede polimérica e a liberação ocorre pela difusão ou erosão da matriz. Ainda, o ativo pode ser liberado através da degradação lenta da parede polimérica, ou pela clivagem da matriz através da ação de enzimas (**Figura 5**) (YASMIN et al., 2017).



**Figura 5.** Mecanismos de liberação de bioativos a partir de nanopartículas de gelatina: difusão simples de gotículas do bioativo; liberação por degradação; clivagem da matriz de gelatina por enzimas proteolíticas.

Os mecanismos de liberação podem ser associados aos modelos matemáticos que justificam o controle e a liberação dos ativos. A cinética de liberação relacionada à concentração liberada *versus* tempo pode ser representada matematicamente por modelos como de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas (DE OLIVEIRA et al., 2019; SINGH et al., 2020).

O modelo de ordem zero (**Equação 3**) baseia-se na liberação lenta a partir de formulações que não desagregam (SINGH et al., 2020). O modelo de primeira ordem (**Equação 4**) descreve a liberação das substâncias ativas de um sistema onde a taxa de liberação é dependente da concentração, podendo descrever a dissolução de componentes solúveis em uma matriz porosa. O modelo de Higuchi descreve a liberação como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo (DE OLIVEIRA et al., 2019; SINGH et al., 2020).

$$Q_t = Q_0 + k_0 t \quad \text{(Equação 3)}$$

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + k_1 t \quad \text{(Equação 4)}$$

$$Q_t = k_h t^{1/2} \quad \text{(Equação 5)}$$

Um modelo que tem sido amplamente utilizado para verificar e descrever o mecanismo de liberação de bioativos em sistemas nanoestruturados é o de Korsmeyer-Peppas (BIZERRA; SILVA, 2016; GRILLO et al., 2011, 2012a; ROMERO-CANO; VINCENT, 2002; SAIRAM et al., 2006). Este modelo matemático descreve de forma simplificada os mecanismos de liberação de substâncias ativas a partir de sistemas poliméricos, como mostra a **Equação 6** (KORSMEYER et al., 1983):

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = kt^n \quad \text{(Equação 6)}$$

onde  $Q_t$  representa a quantidade da substância ativa liberada no tempo  $t$ ;  $Q_\infty$  é a quantidade total da substância ativa encapsulada, e  $K$  é a constante de difusão, dependente do modelo cinético. O termo  $n$  é o expoente da difusão que caracteriza o mecanismo de transporte da liberação do ativo encapsulado (KORSMEYER et al., 1983).

Os modelos matemáticos são essenciais para descrever a liberação dos princípios ativos. A verificação do mecanismo de liberação pode ser feita pelo valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que ajuda a avaliar o ajuste de um modelo teórico à curva experimental de liberação em função do tempo. Contudo, este valor tende, geralmente, a aumentar com a adição de mais parâmetros ao modelo, independentemente do significado da variável adicionada. O uso de pelo menos cinco tempos de dissolução é recomendado para a descrição adequada de um perfil de liberação (TAVARES et al., 2016).

Os modelos teóricos de liberação controlada podem descrever os mecanismos de liberação de óleos essenciais encapsulados com parede polimérica biodegradável, pois possuem características bem definidas que podem simular a dosagem e a liberação de acordo com as matrizes

aplicadas. O modelo de Korsmeyer-Peppas demonstra-se promissor para esses tipos de sistema, sendo reportado em diversos estudos (BAISHYA, 2017; DE OLIVEIRA et al., 2019).

(BEZERRA et al., 2016) estudaram a liberação controlada de óleo essencial de citronela microencapsulada em matrizes a base de gelatina e goma arábica. O estudo determinou através de dados estatísticos o modelo de liberação que melhor representou a saída do óleo essencial das microcápsulas, sendo proposto o mecanismo difusão Fickiano.

(CEREMPEI; MURESAN; CIMPOESU, 2014) estudaram a liberação controlada do óleo essencial de gerânio encapsulado em matriz polimérica de quitosana. Ao variarem a concentração de quitosana, foram observadas pequenas diferenças em termos de liberação controlada do óleo essencial. Esse comportamento pode ser explicado pela quantidade de quitosana que reduz as dimensões dos espaços intermoleculares, resultando em uma liberação facilitada do óleo essencial. O mecanismo que norteou a liberação proposta nesta pesquisa foi o modelo de liberação proposto por Korsmeyer-Peppas, que descreve de forma simplificada os mecanismos de liberação de substâncias ativas a partir de sistemas poliméricos.

### **3.7. Problemática x alternativas**

Os agrotóxicos, também denominados defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, biocidas ou produtos fitossanitários, são produtos químicos, físicos ou biológicos usados no controle de seres vivos considerados nocivos ao homem, suas criações e plantações. Dentre os agrotóxicos, são encontrados produtos que controlam plantas invasoras (herbicidas), insetos (inseticidas), fungos (fungicidas), bactérias (bactericidas), ácaros (acaricidas) e ratos (rodenticidas) (AZEVEDO; FREIRE, 2006). No entanto, as contaminações por defensivos ou agrotóxicos estão entre os principais problemas ambientais da atualidade por agredirem a saúde humana, e por degradarem e poluírem o meio ambiente. Além disso, já vêm sendo registrados casos de resistência em algumas pragas, o que prejudica a persistência de utilização de um determinado agrotóxico (RAKES et al., 2021; SINGH et al., 2020).

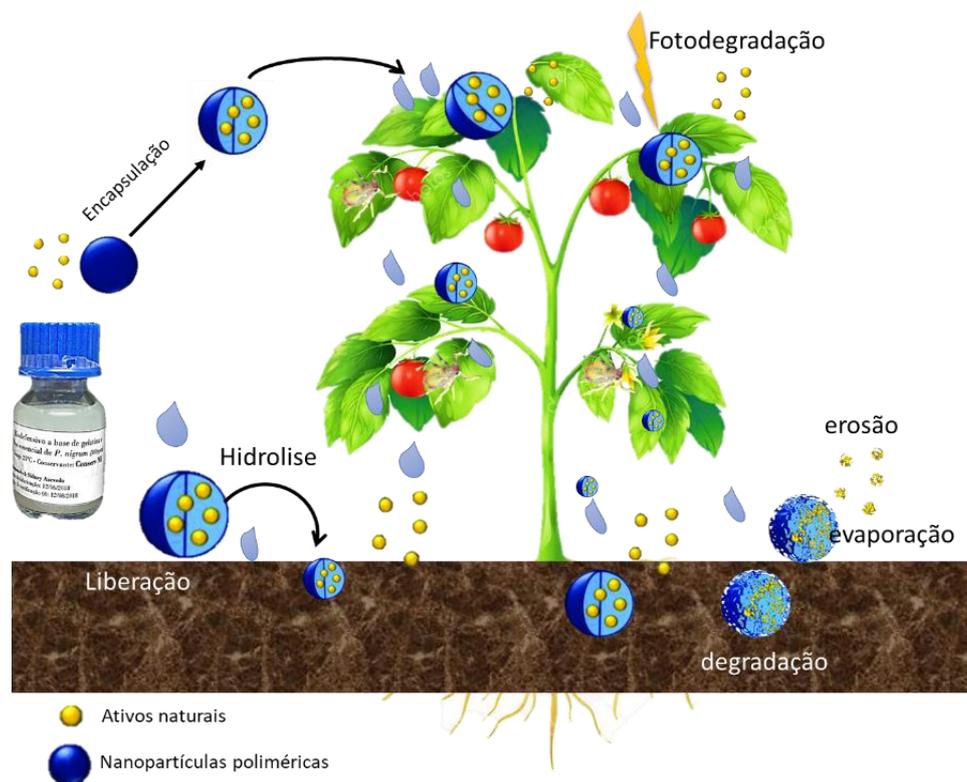
O Brasil posiciona-se entre os quatro maiores consumidores de pesticidas no mundo, contribuindo para os malefícios trazidos à saúde dos seus habitantes. O mesmo *ranking* é composto também por Estados Unidos, União Européia e China (PAUGARTTEN, 2020; SEVERO *et al.*, 2020). A quantidade de agrotóxicos utilizada nos plantios nacionais atinge de maneira preocupante os consumidores, principalmente após 2008, quando o agronegócio brasileiro passou a ser considerado o maior utilizador de agrotóxicos no mundo. Há evidências de que o consumo de alimentos com limite máximo de resíduos de agrotóxicos permitido pode ser responsável pela elevação de diversos tipos de câncer, neuropatias, alterações endócrinas, malformações fetais, diabetes, problemas reprodutivos, distúrbios respiratórios, mal de Parkinson e moléstias imunológicas (D'AVILA *et al.*, 2015; LOPES, 2010).

A busca por defensivos naturais tem sido retomada devido à problemática exposta anteriormente. Segundo (MORAIS, 2016), os agricultores utilizavam espécies vegetais coletadas dentro de suas propriedades para o combate de predadores de suas lavouras, como por exemplo o crisântemo (*Chrysanthemum*), usado para o controle de pulgões, coleópteros, percevejos do cafeeiro e lagartas desfolhadoras. Ainda, o cipó timbó (*Derris elliptica guianensis*) também era utilizado para controlar besouros e lagartas, além de outros produtos naturais e técnicas artesanais.

Os defensivos naturais ou bio defensivos surgem como uma eficiente alternativa por serem considerados produtos biológicos, orgânicos ou naturais (provenientes de plantas), de baixa toxicidade e baixa agressividade ao homem e à natureza, além de serem eficientes no controle de insetos e microrganismos nocivos (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2016). Diversos estudos com produtos naturais têm sido divulgados na literatura especialmente empregando óleos essenciais (AZEVEDO *et al.*, 2018; CHENG *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2014; HAYOUNI *et al.*, 2010; MAR *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2010, 2018), que vêm sendo testados para o controle de pragas das mais diversas plantações. Esses produtos naturais alternativos representam mais uma opção na proteção das lavouras, principalmente no intuito de suprir as necessidades dos produtores de base ecológica e o desejo da sociedade em reduzir o uso/consumo de produtos tóxicos (FERNANDES; LEITE; MOREIRA, 2006; HALFELD-VIEIRA *et*

al., 2016; MORAIS, 2016; PAES, 2015). Além disso, representam uma importante vertente de inserção de nanotecnologia em produtos naturais visando o desenvolvimento de bio defensivos alternativos.

Os bio defensivos nanoencapsulados podem ser produzidos e encontrados como emulsões, líquidos miscíveis, pós, microcápsulas, nanocápsulas ou granulados. O uso desses encapsulados traz benefícios por conta do mecanismo de liberação gradativa dos ativos (MD MEFTAUL *et al.*, 2020), além da redução do impacto ambiental. Como a proposta dessa pesquisa foi desenvolver um sistema nanoestruturado para carrear ativos naturais, criou-se um esquema ilustrativo (Figura 6), simulando sua utilização como bio defensivo agrícola de liberação controlada. Essa proposta se dá devido às proeminentes propriedades inseticida, fungicida e bactericida do óleo essencial da *P. nigrum* quando aplicado no controle de pragas de plantações (ABDULAZEEZ *et al.*, 2015; KAPOOR *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2008; UPADHYAY; JAISWAL, 2007).



**Figura 6.** Proposta especulativa da ação das nanopartículas poliméricas biodegradáveis contendo o óleo essencial da *P. nigrum* encapsulado.

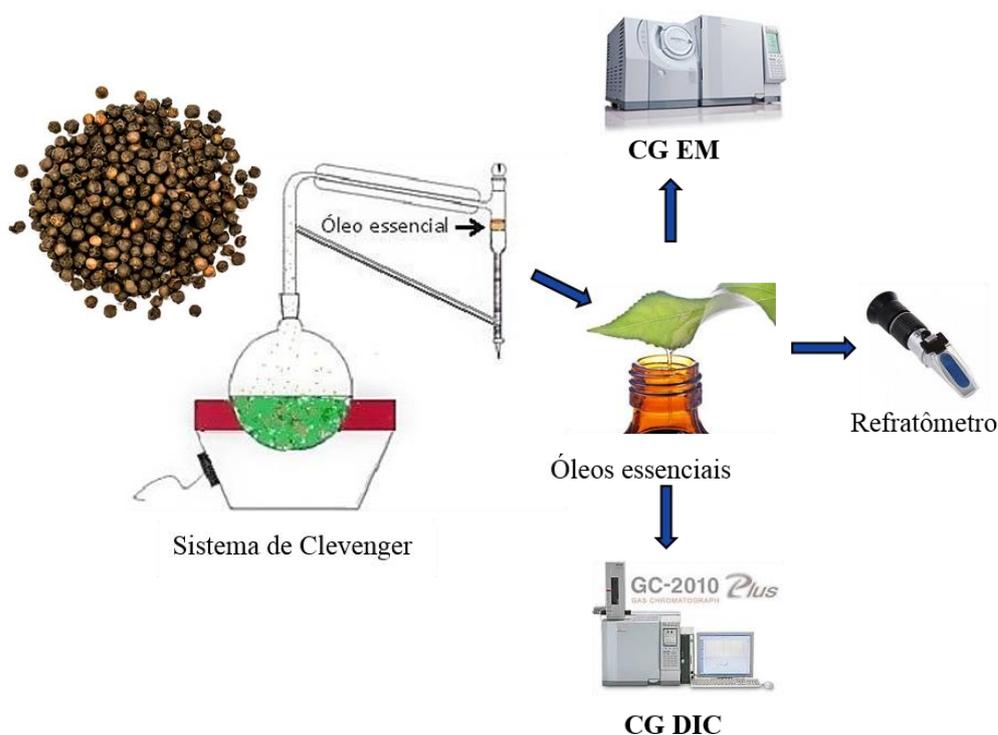
Sistemas nanoestruturados produzidos a partir de materiais biodegradáveis são candidatos para o melhoramento das atividades e proteção de substâncias ativas, frente a interferência do meio natural, podendo ser um defensivo em potencial. A **Figura 6** ilustra a criação de um sistema protetor para óleos essenciais através do desenvolvimento de uma matriz polimérica constituída de carreadores adequados que são inertes e biodegradáveis.

Ao ser aplicado, o nanossistema libera o óleo essencial controladamente e, conseqüentemente, toda a formulação poderá ser degradada no solo após a ação das chuvas. Polímeros biodegradáveis (sintéticos ou naturais) apresentam grande capacidade de degradação por meio de processos naturais, onde os produtos de degradação podem ser reaproveitados no ambiente através dos ciclos elementares como o ciclo do carbono, nitrogênio e enxofre (LI et al., 2012). Ainda, o processo de biodegradação do material encapsulante poderá ocorrer tanto em meios líquidos quanto em sólidos e está diretamente relacionado à quebra dos carreadores por degradação térmica e/ou fotodegradação pela luz natural, resultando na ação do ativo encapsulado contra microrganismos como bactérias, fungos, insetos, ácaros etc. (SINHA et al., 2004).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Extração do óleo essencial

Sementes da *Piper nigrum* (Autorização SISGEN A26CD5E) foram adquiridas no mercado Adolpho Lisboa em Manaus/AM. O óleo essencial foi extraído a partir de 150 g das sementes secas e trituradas através do método de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado. Após a extração, foram mensurados os volumes aproximados no próprio extrator (**Figura 7**). O óleo essencial foi coletado, desidratado com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, centrifugado, armazenado em frasco de vidro do tipo âmbar e mantido a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .



**Figura 7.** Ilustração esquemática da obtenção do óleo essencial e sua caracterização físico-química.

### 4.2. Determinação das propriedades físicas do óleo essencial

Para a determinação da cinética de extração foi observada a variação do volume do óleo essencial extraído a cada 30 min, durante 6 h. A densidade relativa do óleo essencial foi estimada da seguinte forma: dois tubos capilares lavados e secos foram preenchidos com água destilada ( $m_1$ ) ou óleo essencial ( $m_2$ ) e tiveram suas massas aferidas. 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 7** (SANITÁRIA, 2010).

$$D = \frac{(m_2 - m_1)}{(m_1 - m)} \quad \text{(Equação 7)}$$

O rendimento foi calculado a partir da medida de sua densidade partindo do volume de óleo essencial obtido no sistema de extração, dividido pela massa seca das sementes. O rendimento obtido foi então calculado pela **Equação 8** (GIRARD; KOEHLER; NETTO, 2007).

$$R\% = \frac{\text{Volume do óleo} * \text{Densidade do óleo}}{\text{massa } P} * 100 \quad \text{(Equação 8)}$$

onde R% é o rendimento em porcentagem e *massa P* é a massa seca das sementes.

O índice de Refração foi medido diretamente em um refratômetro Atago Master Refractometer.

#### 4.3. Análise cromatográfica (CG/DIC- CG/EM) do óleo essencial

O óleo essencial extraído foi analisado em um Cromatógrafo Gasoso equipado com Detector de Ionização por Chama (CG/DIC) e em um Cromatógrafo Gasoso acoplado à um Espectrômetro de Massas (CG/EM), ambos da Shimadzu™ (GC2010-FID e GCMS-QP2010, respectivamente). Na análise por CG-DIC foi utilizada uma coluna capilar DB5 (5% difenil, 95% polidimetilsiloxano) (30 m x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura do filme), sendo utilizados como gás de arraste o He em fluxo de 1,0 mL/min. A injeção em modo split 1:10 foi aplicada com o injetor a 250 °C e o detector de ionização por chama a 290 °C. A temperatura programada para o forno foi de 60 °C a 250 °C a 3 °C min<sup>-1</sup>. Foram injetados padrões de hidrocarbonetos lineares (C<sub>7</sub> a C<sub>30</sub>) para a determinação dos índices de retenção nas mesmas condições cromatográficas. Na análise por CG-EM a coluna utilizada foi uma DB5-MS e o gás de arraste foi He. As condições das análises

cromatográficas foram as mesmas utilizadas para CG-DIC. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

A determinação da composição química do óleo essencial foi realizada com base nos dados de índices de retenção obtidos por CG-DIC, e dos espectros de massas obtidos por CG-EM. Os índices de retenção foram calculados utilizando a Equação de van der Dool-Kratz ([VAN DEN DOOL; DEC. KRATZ, 1963](#)), relacionando os tempos de retenção das substâncias presentes nos óleos essenciais com os tempos de retenção de hidrocarbonetos lineares injetados na sequência das amostras. Os índices de retenção e os espectros de massas foram comparados com dados teóricos da base de dados Wiley 7.0, NIST e literatura ([ADAMS, 2010](#)).

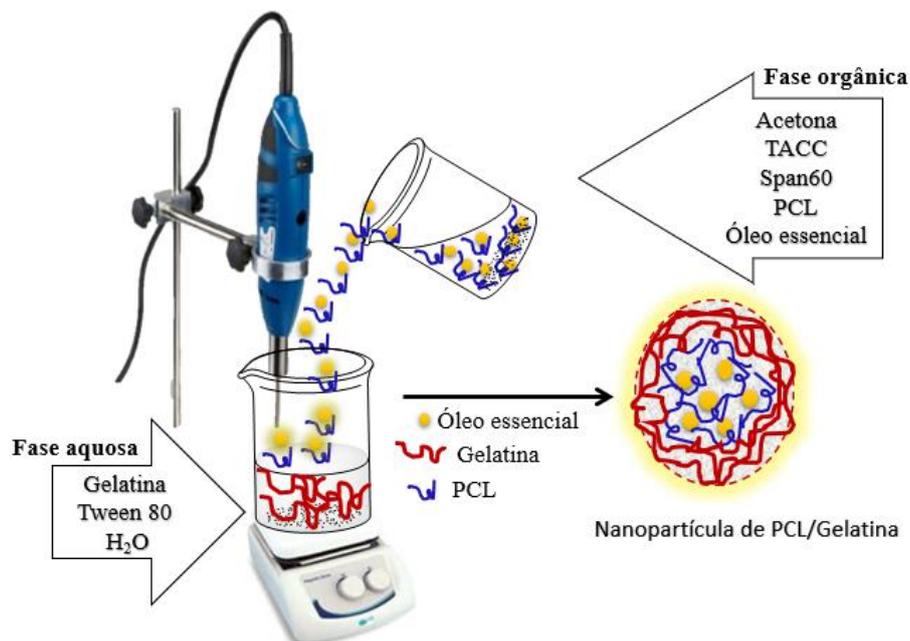
#### **4.4. Desenvolvimento das nanopartículas poliméricas**

O sistema coloidal formado por nanopartículas bicamadas de carreadores PCL e gelatina foi desenvolvido a partir de duas soluções, chamadas de fase orgânica e fase aquosa, conforme ilustra a **Figura 8**.

A fase aquosa foi constituída por 1 g de gelatina (tipo B), a qual foi aquecida a 50 °C em 100 mL de água destilada sob agitação constante. Esta solução foi submetida a banho-maria até atingir 40 °C, sendo então adicionados 0,30 g de Tween 80 (previamente solubilizado em 50mL de água destilada). Para a preparação da fase orgânica, PCL (0,05 g), Span 60 (0,02 g) e TACC (0,1 g) foram solubilizados em acetona (15 mL). O óleo essencial na concentração absoluta de 500 µg/mL foi então adicionado à fase orgânica sob agitação magnética.

Após a solubilização do óleo essencial, a fase orgânica foi adicionada à fase aquosa utilizando um dispersor do tipo ultraturrax (10.000 rpm) durante 30 s para a formação das nanopartículas poliméricas. Em seguida, adicionou-se transglutaminase (0,19 g) e a solução final manteve-se sob agitação constante até eliminação total do solvente. Após esta etapa, foram adicionados diferentes conservantes seguindo a RDC nº 29 de 1º de junho de 2012, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ([ANVISA, 2012](#)).

Os conservantes utilizados foram (i) fenoxietanol/metilisotiazolinona (sistema NPNE), (ii) metilisotiazolinona/ metilcloroisotiazolinona (sistema NPMI), (iii) benzoato de sódio (sistema NPBS), (iv) timol (sistema NP TI) e (v) ácido etilenodiaminotetracético (sistema NPED). Foi sintetizado também um sistema contendo óleo essencial sem a adição de conservante (sistema NPSC), bem como um sistema com nanopartículas vazias (sem óleo essencial, sistema NPV). Para cada sistema, o pH final foi ajustado para 8 utilizando-se NaOH (1,0 M).



**Figura 8.** Representação esquemática da formulação do sistema coloidal contendo nanopartículas preenchidas com óleo essencial da espécie *P. nigrum*.

## 4.5. Caracterização das nanopartículas

### 4.5.1. Tamanho, Índice de Polidispersão (PDI) e potencial zeta ( $\zeta$ )

O tamanho de partícula, PDI e potencial zeta foram medidos a temperatura ambiente por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), utilizando um equipamento Malvern Instruments ZetaSizer, modelo Nano-ZS, localizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFAM). As amostras foram diluídas em água deionizada (1:100). Para a medida de tamanho de partículas, foram utilizadas cubetas

de poliestireno e cubetas específicas para a análise de potencial zeta (WISSING; MÜLLER, 2002). Os parâmetros de medidas foram baseados nas normas ISO 22412, ISO 13321 e ISO 13099-2 (ISO22412, 2017).

#### 4.5.2. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A análise morfológica e a estimativa do tamanho médio das nanopartículas foi realizada 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™). As varreduras foram realizadas em áreas de (8 x 8)  $\mu\text{m}^2$  com (512 x 512) pixels a uma taxa de varredura de 1 Hz. As medidas foram realizadas a (23  $\pm$  1 °C) e (60  $\pm$  1) % de umidade relativa. Além disso, o *software* imageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012) foi usado para analisar distribuição de tamanho das nanopartículas com base no estudo das aplicações de tratamento de imagens.

#### 4.5.3. AFM acoplada a Espectrofotômetro de Infravermelho (AFM-IR)

Análises por AFM-IR foram realizadas em um sistema NanoIR2 a uma taxa de varredura de 0,04 Hz usando uma sonda de silício revestida de ouro ContGB-G com diâmetro do ápice da ponta <25 nm e frequência de ressonância nominal de 13 kHz a (23  $\pm$  1 °C) e (5  $\pm$  1) % de umidade relativa. Os espectros de infravermelho foram obtidos no intervalo de 1550  $\text{cm}^{-1}$  a 1840  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução espectral de 2  $\text{cm}^{-1}$ /ponto. Os sistemas coloidais foram diluídos em água Milli Q para reduzir a concentração e aumentar a dispersão das nanopartículas. As amostras foram depositadas em um substrato de silício revestido com ouro e secas com um fluxo de  $\text{N}_2$  durante 15 min. Imagens 2D e 3D de AFM foram processadas usando o *software* Gwyddion (NEČAS; KLAPETEK, 2012).

#### 4.5.4. Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR dos sistemas de nanopartículas vazias e cheias e dos óleos essenciais *in natura* foram obtidos em um Espectrofotômetro FTIR 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<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas no Laboratório HUB de Tecnologia e Inovação da Escola Superior de Tecnologia – EST (UEA).

#### 4.5.5. Eficiência de Encapsulação (EE) por UV-Vis

Para a estimativa da EE do óleo essencial, os sistemas coloidais foram centrifugados a 10000 rpm por 10 min. Em seguida, as análises foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis (Global Trade Technology). Inicialmente, foi realizada uma varredura com o óleo essencial, onde obteve-se o pico máximo de absorção no comprimento de onda  $\lambda = 270$  nm. Uma curva de calibração foi feita com diferentes concentrações do óleo essencial em metanol. A equação da reta foi obtida através de estudos de regressão linear, entre as concentrações do óleo essencial e as absorbâncias dos picos correspondentes. Normalmente, a EE é medida pela subtração das concentrações total e livre do princípio ativo em suspensão.

A concentração de óleo essencial livre foi calculada através da **Equação 9**, e a EE do óleo essencial foi determinada a partir da **Equação 10** (SILVA et al., 2018).

$$[Conc. OE] = \frac{\text{Absorbância do óleo essencial em } \lambda 270 - 0,2189}{0,0304} \quad \text{(Equação 9)}$$

$$(EE\%) = \frac{\text{Concentração inicial do óleo essencial} - \text{Concentração do óleo livre}}{\text{Concentração inicial do óleo essencial}} \times 100 \quad \text{(Equação 10)}$$

#### 4.6. Estabilidade dos sistemas contendo óleo essencial encapsulado

Algumas diferenciações na regulação de produtos de origem biológica, frente aos químicos, já vêm sendo estabelecidos pela ANVISA, IBAMA e MAPA, desde a publicação do Decreto N°

4.074/2002 que prioriza os produtos de baixa toxicidade, beneficiando os de origem biológica, especialmente aqueles que poderiam ser utilizados na agricultura orgânica. No entanto, produtos contendo óleos essenciais encapsulados para aplicação biodefensiva não se enquadram nessas categorias. Por essas razões, as avaliações de estabilidade das formulações desenvolvidas foram baseadas no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004), com algumas modificações, descritas a seguir.

#### **4.6.1. Teste de centrifugação**

As formulações foram submetidos ao teste de centrifugação por 30 min a 3.000 rpm, em triplicata, para verificação de estabilidade preliminar do sistema polimérico (ANVISA, 2004). Neste estudo o produto deverá permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação.

#### **4.6.2. Estabilidade preliminar**

As formulações com conservantes foram mantidas a  $(5 \pm 2)$  °C, sendo posteriormente avaliados os parâmetros EE, pH, turbidez, condutividade elétrica e propriedades organolépticas. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

#### **4.6.3. Estabilidade sob manipulação constante a $(25 \pm 2)$ °C**

Os sistemas coloidais contendo conservantes (NPNE, NPMI, NPTI, NPED e NBS) foram armazenadas em frascos transparentes, autoclavados, devidamente identificados e acondicionados em estufa incubadora BOD a  $(25 \pm 2)$  °C. As formulações foram manuseadas periodicamente, com intervalos entre 1 e 3 dias. A cada manuseio, os frascos foram abertos, expostos às condições ambientais como contato com o ar, luz e variação da temperatura. Foram avaliados os parâmetros EE, pH, turbidez, condutividade elétrica e propriedades organolépticas até os sistemas atingirem EE = 70%,

ou serem descartados por alterações (levemente ou intensamente modificadas) das propriedades organolépticas (cor e odor). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

#### **4.6.4. Teste de prateleira**

As formulações selecionados nos testes de estabilidade sob manipulação constante a  $(25 \pm 2)$  °C foram submetidas aos testes de prateleira em incubadora BOD a  $(25 \pm 2)$  °C e  $(35 \pm 2)$  °C, onde permaneceram estocadas em frascos transparentes e vedados. Foram avaliados os parâmetros EE, pH, turbidez, condutividade elétrica e propriedades organolépticas até os sistemas atingirem EE = 70%, ou serem descartados por alterações (levemente ou intensamente modificadas) das propriedades organolépticas (cor e odor). Todas as medidas foram realizadas a cada 30 dias, em triplicata.

#### **4.6.5. Fotoestabilidade**

O estudo de fotoestabilidade foi realizado em triplicata com óleo essencial *in natura* e com sistema contendo o óleo essencial encapsulado. O óleo essencial foi solubilizado em metanol na concentração de 500 µg/mL e inserido tanto em frascos transparentes e quanto protegidos da luz (sistema controle). Já o sistema contendo o óleo essencial encapsulado foi adicionado em frasco transparente. Todas as réplicas foram colocadas em contato com a radiação UV-Vis ( $\lambda = 254$  nm), em capela UNION Modelo CAU. Em tempos pré-determinados foram retiradas alíquotas do óleo essencial e do sistema encapsulado para leitura de suas absorbâncias em um Espectrofotômetro UV-Vis (Global Trade Technology).

#### **4.7. Análise microbiana**

A análise microbiana foi realizada para os sistemas com e sem conservante. O PDA (19,5 g) foi solubilizado em 500 mL de água ultrapura. O volume final foi dividido em dois erlenmeyers de 500 mL. Os frascos foram protegidos com parafilme e papel alumínio e autoclavados por 20 min (1 atm e 121 °C). Para os ensaios, a capela de fluxo laminar foi limpa com hipoclorito de sódio e etanol 70 %.

O meio, já resfriado, foi inserido em placas de Petri descartáveis cobrindo o fundo das mesmas. A estriagem foi realizada com alças estéreis, apenas em um sentido. Após a estriagem, as placas foram fechadas com parafilme e inseridas em incubadora por 48 h para observação de presença de microrganismos. O ensaio foi realizado em duplicata.

#### **4.8. Liberação controlada**

Estudos de liberação controlada foram realizados em frascos de 150 mL, onde 15 mL da formulação contendo nanopartículas carregadas com óleo essencial (na concentração absoluta de 500 µg/mL) foi adicionado em membrana de celulose com porosidade de 0,2 µm (Sigma-Aldrich). Então, a membrana contendo a formulação foi inserida em meio aquoso (85 mL) a 25 °C em pH 4, 7 e 10. Uma alíquota de 2 mL foi retirada em intervalos regulares de tempo e sua absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV-Vis (Global Trade Technology). A quantidade de óleo essencial liberado em função do tempo foi quantificada por meio da curva padrão previamente determinada. Os experimentos foram realizados em triplicata.

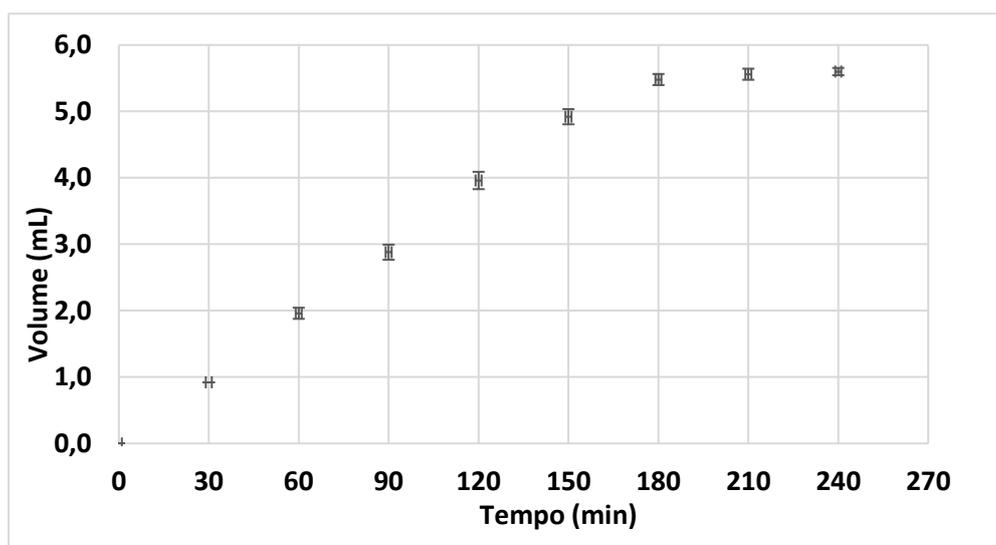
Para determinar a quantidade de óleo essencial liberada ao longo do tempo usou-se a seguinte fórmula: [Liberação (%) = (quantidade de óleo essencial liberada após o tempo  $t$  / quantidade total de óleo essencial encapsulado em nanopartículas)\*100] (NAIDU; PAULSON, 2011). Para a estimativa do mecanismo de liberação, a curva experimental foi ajustada aos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas (DE OLIVEIRA et al., 2019; SINGH et al., 2020) utilizando-se s do programa STATISTICA (OGLIARI; PACHECO, 2004).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Propriedades físicas do óleo essencial

As propriedades físicas dos óleos essenciais podem ser obtidas de forma rápida e serem indicativos prévios de qualidade e estabilidade. A avaliação rápida do rendimento de extração, Índice de Refração (IR) e densidade são ferramentas alternativas importantes, uma vez que posteriores caracterizações avançadas demandam tempos maiores de análise e equipamentos mais sofisticados.

A variação do volume do óleo essencial extraído da *P. nigrum* em função do tempo está ilustrada graficamente na **Figura 9**. O tempo ótimo de extração por hidrodestilação, a partir da massa fixada em 150 g, foi de aproximadamente 180 min. O tempo de extração é um dos principais parâmetros a serem considerados na indústria de óleos essenciais, pois além de estar diretamente relacionado à qualidade e pureza, também influencia na natureza econômica do processo (SOUZA; MELLO; LOPES, 2011). Extrações em tempos menores ao tempo ótimo podem resultar na predominância de constituintes de maior volatilidade. Entretanto, extrações prolongadas podem encarecer o processo e também sobrecarregar o produto de compostos de aroma indesejado, além de possível oxidação (CHAAR, 2000).



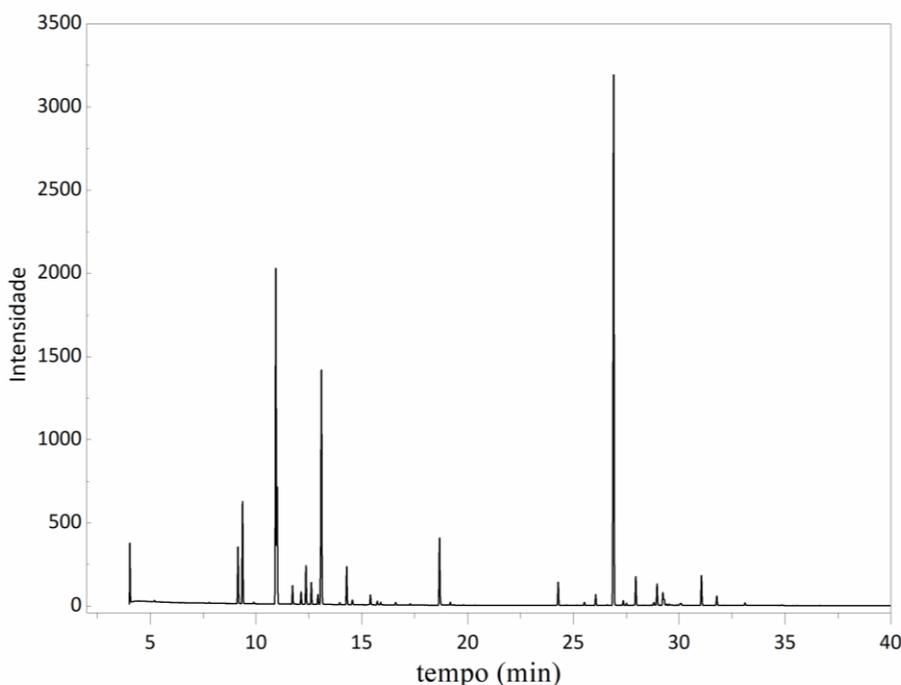
**Figura 9.** Cinética de extração do óleo essencial.

O tempo de extração influenciou no rendimento do óleo essencial. Após 180 min foi observado o maior rendimento (aproximadamente 2,6 %), o qual permaneceu constante até 240 min (tempo máximo de avaliação). A literatura científica mostra que o rendimento deste óleo essencial ao longo de processos de extração está relacionado à espécie vegetal e ao método e tempo de extração (AZIZ; NAHER; ROY, 2012; IGWE et al., 2011; MATTANA et al., 2015; MORSHED et al., 2017).

O IR e a densidade são grandezas físicas diretamente relacionadas ao controle de qualidade de óleos essenciais, podendo ser utilizadas como valores de referência para a verificação prévia de eventuais alterações. O IR do óleo essencial extraído foi estimado em aproximadamente  $(1.48 \pm 0,01)$ . A densidade foi calculada em torno de  $(0,78 \pm 0,01) \text{ g/cm}^3$ . (IGWE et al., 2011) investigou as propriedades físicas do óleo essencial da *P. nigrum* extraído das sementes visando sua encapsulação, e obtiveram valores de IR e densidade similares aos encontrados (1.481 e 0,88, respectivamente). De acordo com o *Atomic Database* (2021), o IR do óleo essencial desta espécie é considerado aceitável dentro do intervalo entre 1.474 e 1492. Portanto, o óleo essencial extraído possui densidade moderada, ou seja, a luz permeia o óleo essencial apresentando moderada atividade óptica (KRAMIDA; RALCHENKO; READER, 2021).

## 5.2. Composição química do óleo essencial

A Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) permitiu a identificação de 29 constituintes químicos no óleo essencial. A **Figura 10** mostra o cromatograma obtido. A **Tabela 2** mostra a identificação de cada pico do cromatograma apresentado na **Figura 10**, assim como os seus Índices Aritméticos experimentais ( $IA_{exp}$ ), da literatura ( $IA_{lit}$ ) (ADAMS, 2010) e o respectivo teor na mistura de óleo essencial (%Área).



**Figura 10.** Perfil cromatográfico do óleo essencial da *P. nigrum*.

Na composição química do óleo essencial destacaram-se os monoterpenos (51,66%), tendo como principais representantes o sabineno (14,96%), silvestreno (14,17%) e  $\alpha$ -pipeno (5,28%). Entretanto, o componente majoritário do óleo essencial foi o  $\beta$ -cariofileno (34,87%) (ABDULAZEEZ et al., 2015; COSTA et al., 2010), um sesquiterpeno bicíclico de fórmula  $C_{15}H_{24}$ , encontrado em vários óleos essenciais, especialmente na *P. nigrum*. De acordo com (MONTANARI et al., 2011) este constituinte está presente em espécies como *Lippia sericea*, *Aloysiatriphylla Royle* e *Lippia Alba*, com comprovada ação fungicida, além de apresentar atividade anti-inflamatória, antibiótica, antioxidante, anticarcinogênica e anestésica (MOHAMMAD; JAWAD; HUSSEIN, 2016).

As fórmulas estruturais dos metabólitos identificados no óleo essencial estão apresentadas na **Figura 11**, com destaque para a composição majoritária. O  $\beta$ -cariofileno, além das bioatividades descritas anteriormente, também é um componente de outros óleos essenciais usados como tempero, como o óleo do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), de cânhamo (*Cannabis sativa*) e do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (GERTSCH et al., 2008; IGWE et al., 2011; JIROVETZ et al., 2002; ORAV et al., 2004).

**Tabela 1.** Composição química do óleo essencial das sementes da *P. nigrum*.

	Constituintes	%Área	IA <sub>lit</sub>	IA <sub>exp</sub>
1	$\alpha$ -tujeno	2,92	924	925
2	$\alpha$ -pineno	5,28	932	931
3	sabineno	14,96	969	971
4	$\beta$ -pineno	3,19	974	972
5	mirreno	0,87	988	991
6	$\alpha$ -felandreno	0,50	1002	1001
7	$\delta$ -3-careno	2,09	1008	1007
8	$\rho$ -cimeno	0,51	1020	1022
9	silvestreno	14,17	1025	1026
10	$\gamma$ -terpineno	2,14	1054	1057
11	terpinoleno	0,56	1086	1087
12	<i>E</i> -sabineno hidratado	0,15	1098	1100
13	dehidro sabina cetona	0,16	1117	1119
14	terpinen-4-ol	3,95	1174	1176
15	$\alpha$ -terpineol	0,21	1186	1190
16	$\delta$ -elemeno	1,30	1335	1339
17	$\alpha$ -copaeno	0,20	1374	1377
18	$\beta$ -elemeno	0,63	1389	1393
19	$\beta$ -cariofileno	34,87	1417	1421
20	$\gamma$ -elemeno	0,29	1434	1436
21	$\alpha$ -guaieno	0,14	1437	1440
22	$\alpha$ -humuleno	1,70	1452	1455
23	germacreno D	0,20	1480	1482
24	$\beta$ -selineno	1,24	1489	1487
25	$\alpha$ -selineno	0,52	1498	1497
26	germacreno A	0,11	1507	1506
27	$\delta$ -cadineno	0,05	1522	1525
28	germacreno B	1,84	1559	1558
29	óxido de cariofileno	0,57	1582	1583
<b>Total de compostos identificados</b>		<b>95,32</b>		
Total de monoterpenos		51,66		
Monoterpenos hidrocarbonetos		47,35		
Monoterpenos oxigenados		4,31		
Total de sesquiterpenos		43,66		
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		43,09		
Sesquiterpenos oxigenados		0,57		
Outros		4,68		

Os constituintes do óleo essencial da *P. nigrum* são similares àqueles encontrados por (BASTOS et al., 2020). Os autores identificaram 15 terpenos, representando 92% do total dos componentes do óleo essencial. O componente majoritário também foi o  $\beta$ -cariofileno (28%), seguido por limoneno (15%), sabineno (11,4%),  $\beta$ -pineno (11%),  $\alpha$ -pineno (10,5%), 3-careno (6%),  $\alpha$ -copaeno (3,6%), elemeno (2%), mirreno (1,6%) e  $\alpha$ -cariofileno (1%). Os demais terpenos identificados apresentaram percentuais inferiores a 1%:  $\alpha$ -tujeno (0,93%),  $\rho$ -cimeno (0,47%), 2-careno (0,4%), linalol (0,3%) e 4-terpineol (0,28%).

Estudos prévios também reportaram a composição química qualitativa semelhante à encontrada nesta pesquisa, embora em concentrações individuais diferentes (ABOUTABL et al., 2011; COSTA et al., 2010; IGWE et al., 2011; JEENA et al., 2014; KAPOOR et al., 2009; MORSHED et al., 2017). Esses estudos também identificaram o  $\beta$ -cariofileno como o principal constituinte do óleo essencial, mas com concentrações variando de 25% a 80%. A variação na composição química dos terpenos no óleo essencial da *P. nigrum* pode ser atribuída à origem, clima, tipo de cultivo e de solo, além do método de extração empregado. Por outro lado, essas variações podem ser causadas por adversidades no meio ambiente, como deficiência de nutrientes, luz, temperaturas extremas e a presença e/ou ausência de microrganismos patogênicos (GARCÍA-DÍEZ et al., 2016).

Existe uma variedade considerável de constituintes e concentrações dos compostos deste óleo essencial, inclusive pelo surgimento de compostos não identificados na espécie coletada no Brasil. A composição do óleo essencial da *P. nigrum* coletada em 5 localidades do sul da China foi analisada por CG/EM. Os autores identificaram 19 constituintes que representaram 98,2% – 99,35% do óleo essencial, tendo como componentes majoritários o  $\beta$ -cariofileno (62,23%), 3-careno (26,84%), *D*-limoneno (25,83%), óxido de cariofileno (8,17%), espatulenol (5,32%), copaeno (5,04%) e humuleno (4,13%) (LI et al., 2020).

A composição química do óleo essencial da *P. nigrum* coletada em diferentes localidades vem sendo avaliada para diversos fins. Recentemente, (ZHANG et al., 2021) constataram atividades hepatoprotetora e antifúngica promissoras. Além disso, este óleo essencial tem sido avaliado para o controle da *Musca domestica* (mosca-doméstica), uma espécie que vem se mostrando com elevada resistência aos inseticidas convencionais. Os resultados revelaram efeitos altamente significativos do óleo essencial nos estágios larval (CL<sub>50</sub> = 448,94 ppm, CL<sub>90</sub> = 2760,46 ppm), pupal (CL<sub>50</sub> = 327,73 ppm, CL<sub>90</sub> = 1350,32 ppm) e adultos (CL<sub>50</sub> = 229,80 ppm, CL<sub>90</sub> = 1129,84 ppm). Ainda, apresentou efeito repelente (26 ± 4) % em todos os estágios avaliados (KHAN, 2021).

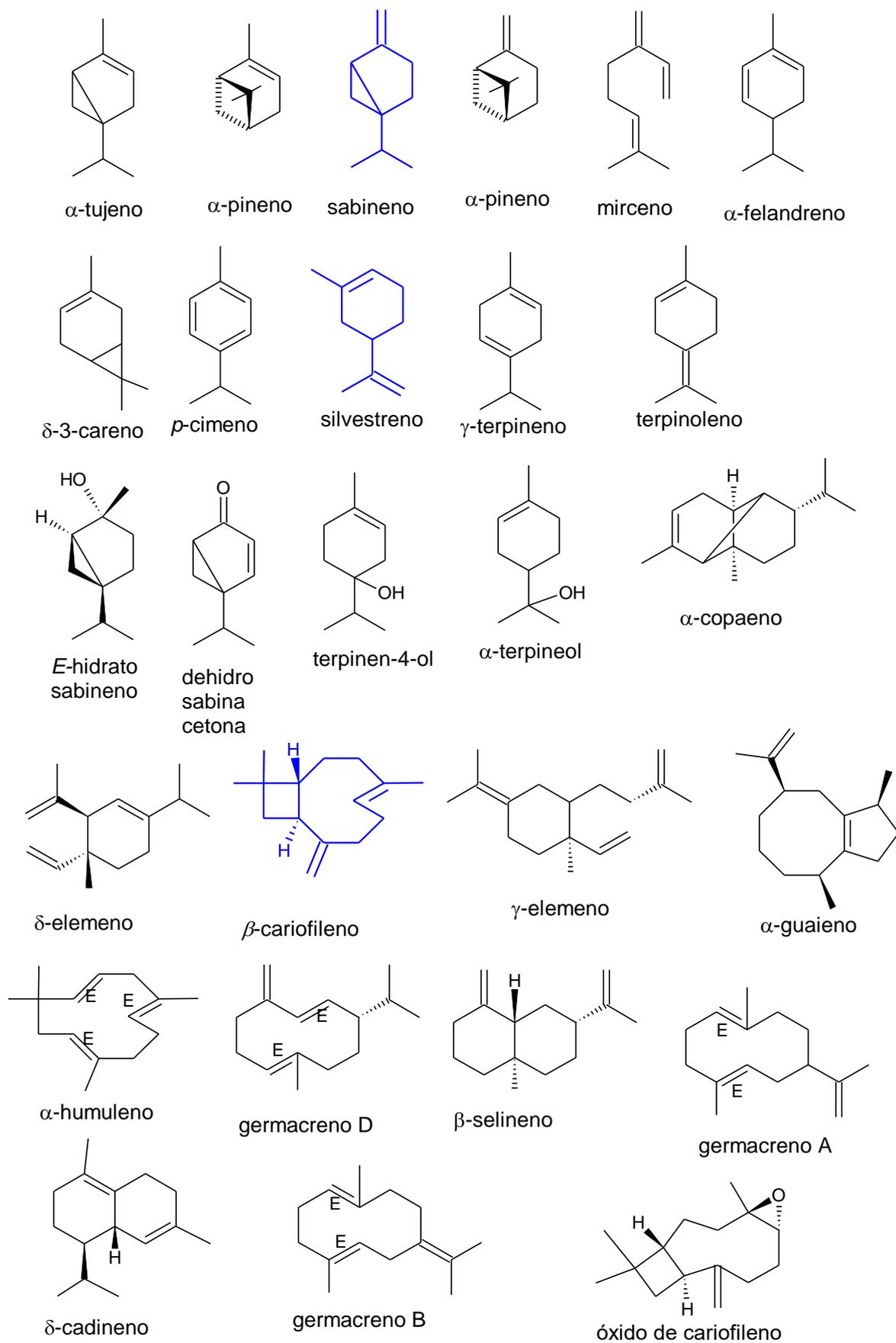


Figura 11. Fórmulas estruturais dos metabólitos do óleo essencial da *P. nigrum*.

O sinergismo químico, bem como os componentes majoritários, pode ser responsável pelas atividades biológicas atribuídas aos metabólitos secundários do óleo essencial da *P. nigrum*. Dentre essas bioatividades podem ser destacadas a antibacteriana, antidepressiva, antifúngica, antidiarréica, antiinflamatória, antimutagênica, antimetastática, antioxidante, antiespasmódica, antiespermatogênica, antitumoral, antitireoidiana, afecções gástricas, hepatoproteção, além da inseticida (SCOTT et al., 2008; UPADHYAY; JAISWAL, 2007), larvicida (COSTA et al., 2010), e protetiva contra o estresse oxidativo induzido por diabetes (AHMAD et al., 2012).

### **5.3. Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas encapsulantes**

O desenvolvimento de uma formulação com propriedades biodefensivas depende, na maioria dos casos, de alguns parâmetros fundamentais para o planejamento de um sistema de liberação controlada, como distribuição de tamanho das nanopartículas, concentração de óleo essencial a ser encapsulado, mecanismo de liberação controlada, eficiência de encapsulamento, local de aplicação, estabilidade em prateleira, além da avaliação de parâmetros físicos como pH, turbidez e condutividade elétrica.

Inicialmente, a proposta de aplicação para o sistema desenvolvido seria a ação biodefensiva para o controle de pragas de plantações. Dessa forma, o produto seria aplicado em matrizes ambientais, permanecendo na superfície das folhas das plantas para posterior liberação controlada do óleo essencial e bioatividade (MAHMOUDI SABER, 2019). O tamanho de partícula e sua distribuição determinam propriedades como estabilidade, carga superficial e homogeneidade do sistema (RAO; GECKELER, 2011). Por esse motivo, os sistemas carreadores a serem desenvolvidos deveriam apresentar preferencialmente tamanho médio entre 100 – 300 nm, garantindo a permanência das nanopartículas no ambiente e no local de ação, sem que haja a penetração pela parede celular da planta, devido ao tamanho do poro que, de forma geral, varia entre 5 e 20 nm (NAIR et al., 2010). Outros fatores a serem considerados estão relacionados à bioatividade dos

nanossistemas no solo (após a remoção pela ação da chuva), como o polímero empregado como carreador e a biodegradabilidade (DE ÁVILA et al., 2009).

O primeiro parâmetro a ser considerado no desenvolvimento das formulações foi a escolha do polímero carreador, o qual seria determinante para a distribuição dos tamanhos dos diâmetros das nanopartículas. Nas primeiras formulações foi usado somente o PCL, resultando nanopartículas de diâmetro médio abaixo de 50 nm. Essa distribuição de tamanho de diâmetros não seria ideal, como discutido anteriormente. No entanto, como o PCL tem se mostrado um excelente agente carreador para óleos essenciais, resultando em elevada eficiência de encapsulamento em sistemas de liberação controlada (OLIVEIRA et al., 2019; PEREIRA et al., 2018), optou-se pelo desenvolvimento de um sistema bicamada, no qual a segunda camada seria constituída por gelatina do tipo B. Esse artifício resultou no aumento do diâmetro médio de sistemas encapsulados e permitiu o desenvolvimento de nanopartículas para aplicações específicas. Dessa forma, o desenvolvimento das formulações foi baseado em dois mecanismos de encapsulamento simultâneos: a emulsão-difusão e a emulsificação dupla (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Sistemas encapsulados constituídos por nanopartículas bicamadas vêm sendo desenvolvidos para as mais diversas finalidades. Atualmente, existem muitas pesquisas focadas especialmente na compreensão da interação entre os carreadores que constituem as nanopartículas, e de que forma essa interação pode interferir no mecanismo de liberação controlada no ativo encapsulado (DA COSTA et al., 2021). Além disso, um conjunto de técnicas forneceram informações que, reunidas, puderam gerar um conjunto de dados capaz de fornecer subsídios para a otimização do sistema desenvolvido e, conseqüentemente, sua estabilidade ao longo de tempo. Esses resultados serão apresentados a seguir.

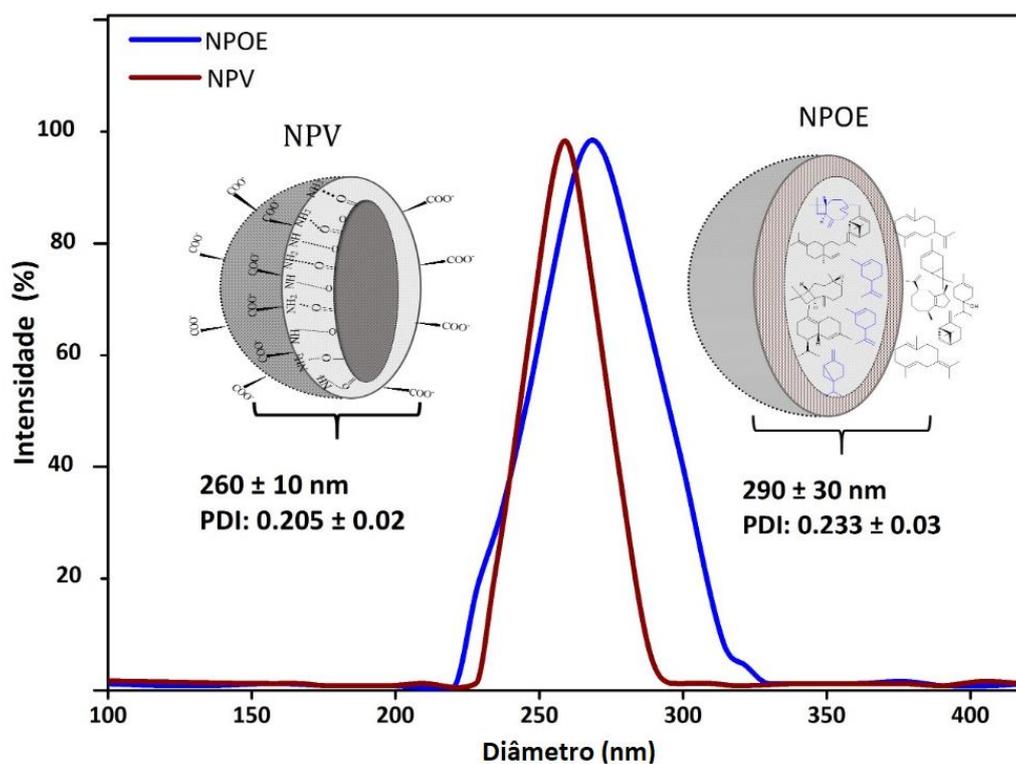
### **5.3.1. Tamanho de partículas e Índice de Polidispersividade (PDI)**

As técnicas de DLS e AFM foram utilizadas para a avaliação do tamanho médio dos diâmetros das nanopartículas e do Índice de Polidispersividade (PDI) levando-se em consideração as

formulações contendo nanopartículas vazias (NPV) e as formulações contendo óleo essencial encapsulado (NPOE).

A **Figura 12** ilustra o tamanho de partícula e o PDI gerados pela técnica de DLS. As formulações NPV e NPOE apresentaram nanopartículas com diâmetros médios de  $(260 \pm 10)$  nm e  $(290 \pm 30)$  nm, respectivamente. A distribuição de tamanho de partícula inferida pelo PDI foi encontrada entre  $(0,20 \pm 0,02)$  e  $(0,23 \pm 0,03)$ , respectivamente, para os sistemas NPV e NPOE. Os resultados obtidos mostram que tanto o sistema vazio quando o carregado com óleo essencial apresentaram nanopartículas com diâmetro hidrodinâmico e PDI compatíveis com suspensões coloidais. As medidas de tamanho e a polidispersividade são parâmetros indicativos de estabilidade, e indicaram que os sistemas desenvolvidos são relativamente homogêneos, sem agregados e menos propensos à desestabilização (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Os valores obtidos estão de acordo com aqueles reportados, os quais estabelecem que partículas com diâmetros médios inferiores a 300 nm e PDI iguais ou abaixo de 0,2 são uniformes e estáveis enquanto sistemas coloidais (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).



**Figura 12.** Tamanho de partículas e Índice de polidispersão gerado por *Dynamic Light Scattering* (DLS). NPOE: Nanopartículas poliméricas contendo óleo essencial encapsulado; NPV: Nanopartículas vazias.

(ZANETTI et al., 2019) produziram nanopartículas poliméricas a base de PCL para o encapsulamento de cinamato de geranila. As nanopartículas vazias apresentaram tamanho médio de 168,8 nm e PDI de 0,165. Já as nanopartículas carregadas apresentaram diâmetro médio de 177,6 nm e PDI de 0,173, dados obtidos por DLS. Estes resultados indicaram que a presença dos ativos encapsulados influenciou na distribuição de tamanhos e PDI. Essa mesma constatação foi observada em nosso estudo. No entanto, também podemos considerar que a gelatina, enquanto segunda camada das nanopartículas encapsulantes, pode ter influenciado na distribuição de tamanho, uma vez que sistemas bicamadas induzem naturalmente a novos desafios, inclusive a afinidade química entre os carreadores (DA COSTA et al., 2021).

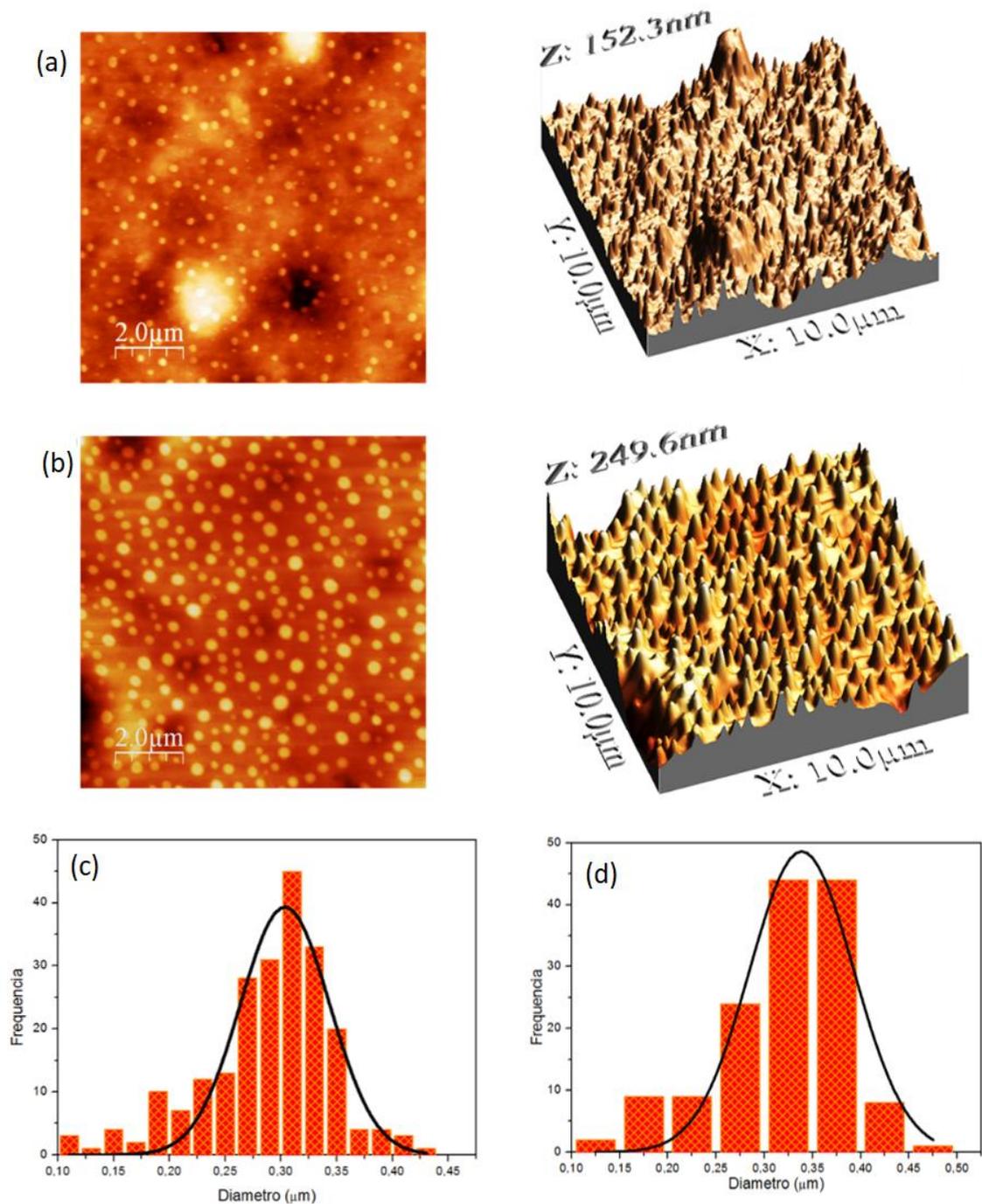
(ABRIATA et al., 2019) desenvolveram e caracterizaram nanopartículas poliméricas também a base PCL para o carregamento de paclitaxel, resultando em diâmetros médios em torno de 140 nm e PDI menor que 0,1, além de elevada eficiência de encapsulamento.

(GHASEMISHAHRESTANI et al., 2015) reportaram o diâmetro médio de nanopartículas a base de gelatina em torno de 328,7, com PDI de 0,065 para NPV, e 365,5 nm e 0,285 para as nanopartículas carregadas. Esses dados estão relativamente próximos aos obtidos nesta pesquisa.

Através das imagens de AFM foi possível observar a formação das nanopartículas carreadoras. A **Figura 13** mostra a morfologia dos sistemas (a) NPV e (b) NPOE. As regiões em forma de círculos referem-se aos domínios em destaque e ordenados da membrana PCL/Gelatina, sendo associadas à formação das nanopartículas encapsulantes. Os sistemas NPV e NPOE apresentaram morfologia próxima à esférica. O tamanho médio das nanopartículas poliméricas vazias foi determinado em torno de  $(300 \pm 10)$  nm e PDI de  $(0,17 \pm 0,03)$  (**Figura 13a**). Já o sistema carregado com óleo essencial apresentou tamanho médio de  $(330 \pm 20)$  nm e PDI de  $(0,23 \pm 0,03)$  (**Figura 13b**).

A morfologia esférica revelada em ambos os sistemas é significativamente importante em liberação controlada para controle de pragas em culturas de plantas devido à adesão uniforme necessária sobre a superfície da planta (TSUIJI, 2001). Uma distribuição uniforme de picos e vales ao longo da superfície das nanopartículas pode ser útil para uma interação uniforme entre as

nanopartículas e a superfície da planta, contribuindo para a degradação das nanopartículas e liberação do óleo essencial.



**Figura 13.** Formação das nanopartículas encapsulantes a base de PCL/Gelatina: (a) nanopartículas vazias com topografia, (b) nanopartículas carregadas com óleo essencial com topografia, (c) distribuição de tamanho das nanopartículas vazias e (d) distribuição de tamanho das nanopartículas carregadas. Os histogramas foram gerados a partir do programa ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

Comparando-se os resultados de tamanho médio de diâmetro e polidispersividade com aqueles obtidos por DLS, pode confirmar que, além da formação das nanopartículas, o tamanho e a

dispersão das mesmas são próximos, sugerindo que os sistemas coloidais desenvolvidos contêm partículas em escala nanométrica. As diferenças nos valores encontrados pelas duas técnicas estão relacionadas à sensibilidade de cada equipamento, e estão sendo consideradas dentro do desvio padrão. Dessa forma, podemos dizer que ambas as técnicas foram complementares tanto para avaliar a formação das nanopartículas, quanto para determinar seus diâmetros, PDI e morfologia.

(XING et al., 2005) investigaram a variação de morfologias e tamanhos de partículas através de proporções de surfactantes. Quando os mesmos estavam em baixa proporção, a formação de nanopartículas poliméricas estáveis não foi observada, além de serem observadas distorções na morfologia, tornando-a irregular e com menor capacidade encapsulante. Uma adição excessiva de surfactante também pode causar efeitos adversos, provocando agregação. Além disso, com o aumento da adição de surfactante, o diâmetro médio das partículas diminuiu. Comparativamente, nosso estudo garante que a proporção de surfactantes usados na formulação foi adequada.

Através das imagens de topografia (**Figura 13(a) e (b)**) foi avaliada a rugosidade superficial das nanopartículas vazias (NPV) e carregadas (NPNOE). Este é o resultado da interação de vários fatores, alguns deles intrínsecos e podem estar relacionados com o próprio material (tipo, forma, tamanho, distribuição, grau de polimerização e eficiência na ligação entre as os carreadores) (LEE et al., 2021). Outros fatores extrínsecos podem afetar a rugosidade superficial, tais como tipo de sistema polimérico usado, exposição do material a condições extremas e método de obtenção da nanopartículas (MARGHALANI, 2010).

A rugosidade média aritmética da superfície das nanopartículas (RA) é definida como o desvio médio absoluto de irregularidades na rugosidade da linha média ao longo de um comprimento da superfície. O parâmetro RA foi obtido através de equação a descrita por (GADELMAWLA et al., 2002). A rugosidade quadrada média (RQ) é o desvio padrão da distribuição da altura da superfície e é usada para descrever a rugosidade da superfície (GADELMAWLA et al., 2002)

A rugosidade aritmética (RA) e quadrática (RQ) encontrada para as NPV foi de  $(9 \pm 1)$  e  $(11 \pm 2)$  respectivamente. Enquanto para as NPOE, a rugosidade encontrada foi  $RA = (15 \pm 1)$  e  $RQ =$

( $20 \pm 2$ ). Estes resultados revelam a influência do encapsulamento do óleo essencial na rugosidade das nanopartículas. Estes valores de rugosidades foram extraídos do filme de nanopartículas preenchidas e vazias, após a secagem no substrato. De acordo com os valores encontrados, verificou-se que ambas as rugosidades (RQ) e (RA) seguem uma tendência de aumento em razão da presença do óleo essencial no interior das nanopartículas (COSTA; AZEVEDO; SANCHES, 2021).

A análise morfológica de parâmetros de superfície baseada na técnica AFM representa uma ferramenta importante e eficiente para a avaliação de sistemas de liberação controlada, especialmente aqueles constituídos de nanopartículas biopoliméricas contendo óleos essenciais. A avaliação desses parâmetros pode influenciar no desenvolvimento de um determinado sistema e auxiliar no processo de fabricação de nanopartículas com propriedades de superfície adequadas para aplicação tecnológica. O controle das propriedades superficiais de nanopartículas carregadas com óleo essencial, como a rugosidade, é fundamental para a ancoragem dessas nanopartículas a outras superfícies e, portanto, o estudo de parâmetros morfológicos pode ser a chave para encontrar uma superfície adequada. Com isso, esse sistema pode liberar seu princípio ativo nas condições propostas. Em nosso caso, essa ferramenta teórica foi importante para avaliar as diferenças entre o sistema vazio e o sistema contendo óleo essencial encapsulado. De acordo com os resultados, podemos sugerir que o sistema contendo óleo essencial encapsulado possui as melhores condições, como esperado, para atuar como biodefensivo, uma vez que os resultados baseados na análise morfológica de rugosidade sugerem que este sistema apresenta maior aspereza e microtextura, o que pode levar à eficiente ancoragem da nanopartícula a outra superfície para posterior liberação do óleo essencial (DE OLIVEIRA et al., 2020).

### 5.3.2 Potencial zeta ( $\zeta$ )

A **Figura 14** mostra a variação do potencial zeta em função do pH dos sistemas NPV e NPOE. O pH de um sistema coloidal é um dos parâmetros mais importantes e que diretamente afeta os valores do potencial zeta. A faixa de pH avaliada foi de 2 a 13, sendo possível notar que no intervalo

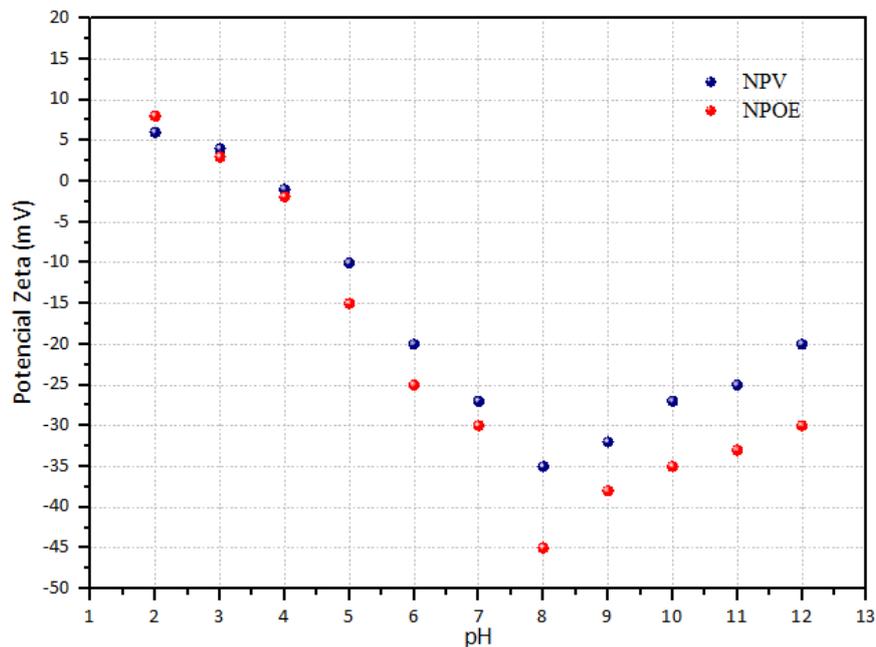
de pH = 2 a pH = 4 houve uma tendência de ambos os sistemas manterem seus pontos isoelétricos ( $\zeta \sim 0$ ), fator determinante para a aglomeração das nanopartículas e, portanto, desestabilização dos sistemas. No entanto, observou-se que, com o aumento do pH entre 5 e 8, ambos os sistemas passaram a adquirir considerável carga superficial, a qual atingiu seu maior valor (em módulo) para o pH = 8. Para este pH, o sistema NPV apresentou  $\zeta = (-35 \pm 2)$  mV. Já as nanopartículas carregadas com óleo essencial apresentaram  $\zeta = (-45 \pm 3)$  mV.

O potencial zeta é um parâmetro físico-químico importante para o fornecimento de informações que podem ser correlacionadas com a estabilidade de sistemas coloidais (SCHAFFAZICK et al., 2003) pois está correlacionado com cargas das superfícies das mesmas. Os valores do potencial zeta dos sistemas NPV e NPOE em pH = 8 indicaram boa estabilidade em solução, uma vez que os valores encontrados são maiores que -30 mV (CAMPELO et al., 2017a;).

A análise do potencial zeta também é um indicativo que determina os tipos de estabilidade que ocorrem em sistemas coloidais. Na estabilidade estérica, por exemplo, o emulsificante se junta à superfície das nanopartículas, auxiliando em sua estabilização, e geralmente são observadas em sistemas coloidais com baixo potencial zeta. Já a estabilidade eletrostática ocorre quando há repulsão entre as partículas devido à elevada carga superficial, dificultando a aglomeração do sistema coloidal (CAMPELO et al., 2017).

O valor do  $\zeta$  no sistema NPV ( $-35 \pm 2$ ) mV já é indicativo de um relevante equilíbrio. No entanto, o encapsulamento do óleo essencial alterou o valor de  $\zeta$  para ( $-45 \pm 3$  mV), sendo um indicativo do melhoramento da estabilidade do sistema coloidal em termos de cargas superficiais. A literatura reporta que, quando o valor do potencial zeta (em módulo) for elevado, o sistema poderá apresentar boa estabilidade físico-química uma vez que grandes forças repulsivas tendem a evitar a aglomeração em função dos choques aleatórios de nanopartículas, bem como garantir a eficiência de encapsulamento (SCHAFFAZICK et al., 2003). Quanto maior for a repulsão de cargas entre dois glóbulos próximos, menor a sua interação e, portanto, menor a tendência à floculação e coalescência. Assim, 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 (ROLAND *et al.*, 2003)



**Figura 14.** Potencial zeta das nanopartículas poliméricas vazias (NPV) e com óleo essencial encapsulado (NPOE).

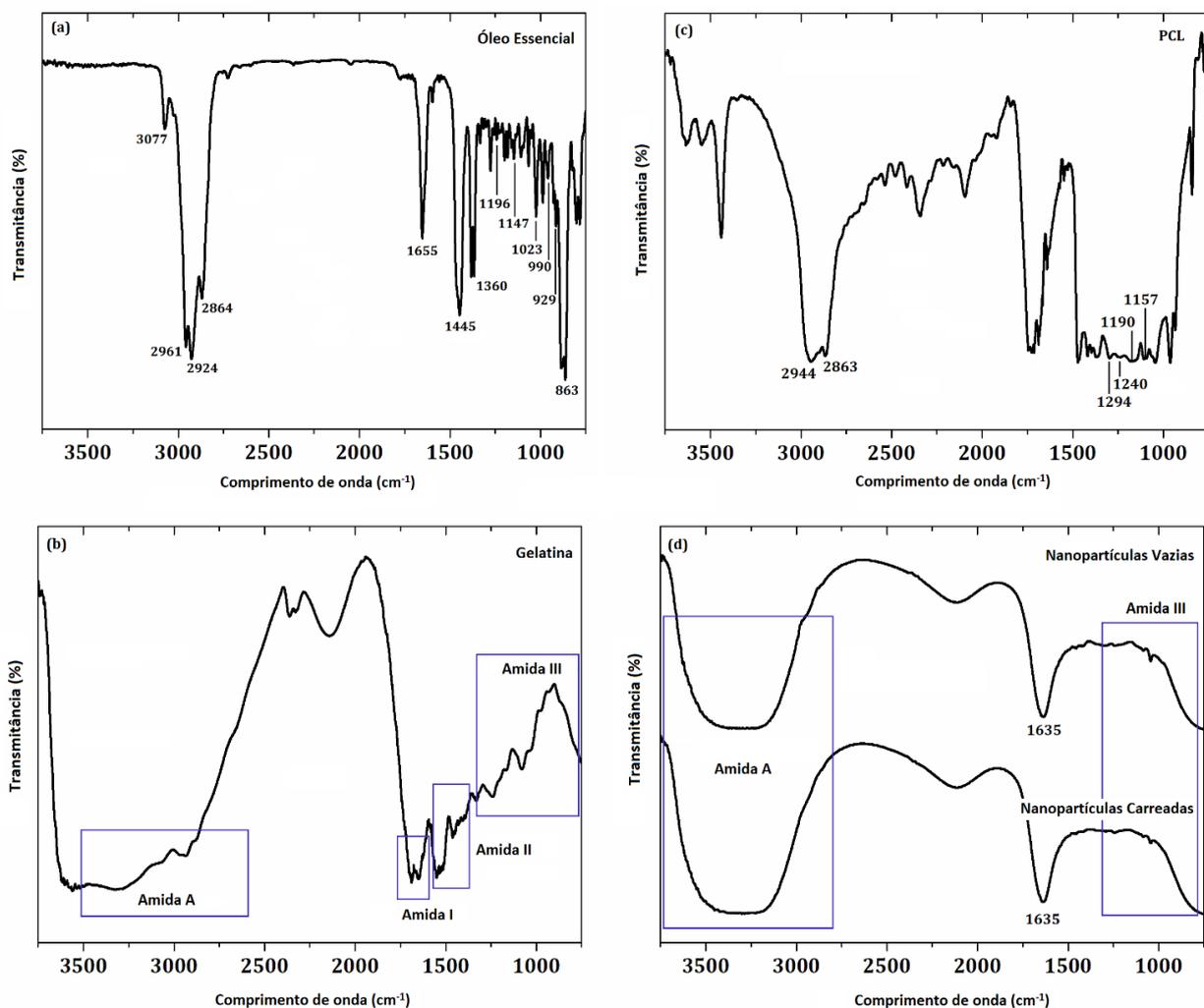
Valores negativos elevados de potencial zeta podem estar relacionados aos grupos carboxílicos e/ou grupos ionizados do biopolímero gelatina, assim como à presença dos grupos terminais dos surfactantes utilizados na formulação (ABRIATA *et al.*, 2019), no caso o span 60 e o polisorbato 80 (XING *et al.*, 2005).

(JIMÉNEZ *et al.*, 2018) prepararam e caracterizaram micro e nanoemulsões contendo óleo essencial da *P. nigrum* usando ultrassom e homogeneização em alta pressão utilizando span 60 e tween 80. O valor de potencial zeta foi encontrado próximo ao sistema obtido nesta pesquisa, variando entre  $(-48 \pm 1)$  e  $(-51 \pm 2)$  mV.

### 5.3.3. Análise espectroscópica por FTIR e AFM-IR

A **Figura 15** mostra os espectros de FTIR do (a) óleo essencial *in natura*, (b) PCL puro, (c) gelatina pura, (d) sistema coloidal contendo nanopartículas vazias e (e) sistema coloidal contendo nanopartículas carregadas com óleo essencial.

O espectro do óleo essencial *in natura* é mostrado na **Figura 15a**. As bandas encontradas entre 1300 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  são de descrições complexas. Devido à mistura de constituintes químicos, algumas bandas podem estar sobrepostas. As bandas localizadas em 3077  $\text{cm}^{-1}$ , 2961  $\text{cm}^{-1}$ , 2924  $\text{cm}^{-1}$  e 2864  $\text{cm}^{-1}$  estão associadas aos modos vibracionais  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ . O modo vibracional  $\nu(\text{C}=\text{C})$  foi observado em 1655  $\text{cm}^{-1}$ . A banda em 1445  $\text{cm}^{-1}$  está associada ao modo vibracional  $\delta_s(\text{CH}_2)$ . As bandas em 1360  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas ao modo vibracional  $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ . As bandas em 1196  $\text{cm}^{-1}$  e 1147  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas aos modos vibracionais  $w(\text{CH}_2)$ .



**Figura 15.** Espectros de FTIR de (a) EO de *P. nigrum*, (b) gelatina, (c) PCL, (d) nanopartículas vazias e (e) nanopartículas carregadas com óleo essencial.

Os modos vibracionais  $\nu(\text{C}-\text{O})$  foram verificados em 1023  $\text{cm}^{-1}$  e 990  $\text{cm}^{-1}$ . A banda em 919  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída ao modo vibracional  $\rho(-\text{C}-\text{H})$ . A flexão fora do plano de  $\text{CH}_2$  foi encontrada em 863  $\text{cm}^{-1}$ . Geralmente, os grupos funcionais observados compartilham maior semelhança com resultados

já reportados (BOUNAAS et al., 2018; KAMARAJ et al., 2017; OLALERE; ABDURAHMAN; ALARA, 2017; RAKMAI et al., 2017b).

O espectro referente à gelatina é mostrado na **Figura 15b**. Quatro regiões principais foram observadas na faixa de (i) 3500-2300  $\text{cm}^{-1}$ , (ii) 1656-1644  $\text{cm}^{-1}$ , (iii) 1560-1335  $\text{cm}^{-1}$  e (iv) 1240-750  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem às regiões amida A, amida I, amida II e amida III, respectivamente. Resultados semelhantes também foram relatados anteriormente (CEBI et al., 2016; HASHIM et al., 2010; PRADINI et al., 2018; SILVA et al., 2018). A amida A é representada pelo modo vibracional  $\nu(\text{N-H})$  acoplado à ligação de hidrogênio e O-H livre, enquanto a amida I contém o modo vibracional  $\nu(\text{C}=\text{O})$  com contribuição da vibração do estiramento C-N. A amida I, banda entre 1600  $\text{cm}^{-1}$  e 1700  $\text{cm}^{-1}$ , representa o pico mais útil para a análise de estruturas de proteínas secundárias. A amida II surge da vibração de flexão N-H e modo de vibração  $\nu(\text{C-N})$ . A amida III representa a vibração no plano dos grupos C-N e N-H da amida ligada ou vibração do grupo  $\text{CH}_2$ . (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004; PRADINI et al., 2018; PRANOTO; LEE; PARK, 2007).

O espectro do PCL (**Figura 15c**) apresentou uma banda em 1727  $\text{cm}^{-1}$  resultante do modo vibracional  $\nu(\text{C}=\text{O})$ . A banda em 1294  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída aos modos vibracionais  $\nu(\text{C-C})$  e  $\nu(\text{C-O})$  da fase cristalina. Outras bandas também foram observadas em 2944  $\text{cm}^{-1}$  e 2863  $\text{cm}^{-1}$  sendo atribuídas, respectivamente, aos modos vibracionais  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  e  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ . A banda em 1240  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída ao modo vibracional  $\nu_{\text{as}}(\text{COC})$ . As bandas em 1190  $\text{cm}^{-1}$  podem ser conferidas aos modos vibracionais  $\nu(\text{OC-O})$  e  $\nu_{\text{s}}(\text{COC})$ , respectivamente. A banda em 1157  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída aos modos vibracionais  $\nu(\text{C-O})$  e  $\nu(\text{C-C})$  na fase não cristalina (COLEMAN; ZARIAN, 1979; ELZEIN et al., 2004; PHILLIPSON; HAY; JENKINS, 2014).

A **Figura 15d** mostra o espectro dos sistemas coloidais contendo as nanopartículas vazias e as nanopartículas carregadas. Duas bandas principais foram observadas: a primeira variando de 3500  $\text{cm}^{-1}$  a 2300  $\text{cm}^{-1}$  e atribuída à região da amida A, e a segunda banda principal encontrada em 1635  $\text{cm}^{-1}$  e relacionada à região da amida I (DA COSTA et al., 2021). Ambas as bandas foram relacionadas ao carreador gelatina. Esse perfil espectral atribuído à gelatina nos sistemas encapsulados é diferente

daquele observado no caso da gelatina pura. Essa diferença pode ser atribuída a vários fatores. Dentre eles, destaca-se a nanometrização da gelatina pelo processo de encapsulação (LAI et al., 2014). Além disso, pode ser sugerida também a interação química entre os carreadores (BASTOS et al., 2020).

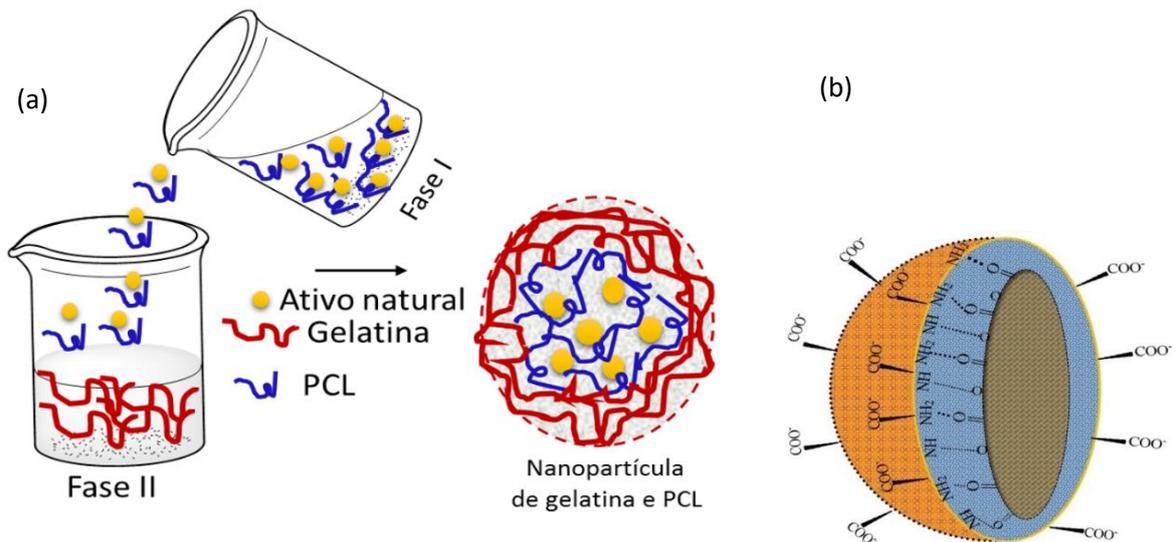
Observa-se que as bandas características do PCL e do óleo essencial não foram encontradas nos espectros das nanopartículas carregadas ou vazias. Por este motivo, podemos sugerir que a diferença de concentração entre os constituintes da formulação (especialmente PCL, gelatina e óleo essencial) pode ter influenciado no perfil dos espectros dos sistemas coloidais contendo as nanopartículas, uma vez que a massa de gelatina é 20 vezes maior que a massa de PCL utilizada na formulação (DA COSTA et al., 2021). Dessa forma, as bandas de absorção características do PCL e do óleo essencial podem ter sido encobertas pelas bandas alargadas e intensas da gelatina. Essa pode ser uma limitação da técnica que se caracterizou por permitir uma análise generalizada dos sistemas coloidais como um todo (GAUTAM; DINDA; MISHRA, 2013). Resultados parecidos também foram reportados previamente, mostrando que as bandas de absorção do óleo essencial encapsulado e do PCL também não foram visualizadas pelos mesmos motivos, destacando-se apenas o perfil espectral da gelatina nanometrizada (também em maiores concentrações que os demais constituintes) nos sistemas encapsulados (SILVA et al., 2020, 2018).

Conforme observando anteriormente, o perfil espectral dos sistemas contendo as nanopartículas é predominantemente representado pelas bandas de absorção da gelatina, mas não é idêntico ao perfil da gelatina pura. No entanto, devido à intensidade e largura consideráveis dessas bandas, uma análise mais aprofundada acerca dessas interações não foi possível ser realizada, mas pode ser deduzida:

(i) A Gelatina em escala nanométrica pode apresentar características diferentes da gelatina em escala micrométrica, sendo que a nanometrização pode levar a modificações estruturais e rearranjos não definidos;

(ii) O PCL, quando dissolvido em solvente orgânico, não produz nenhum íon em solução. No entanto, a gelatina, um polímero polieletrólito que possui muitos grupos ionizáveis (como grupos

aminos e carboxílicos) pode produzir íons que ficam disponíveis em solução. Devido aos grupos funcionais do PCL e gelatina, pode ser possível o surgimento de interações químicas entre esses carreadores, como a ligação de hidrogênio entre o grupo éster de PCL e o grupo amina das moléculas de gelatina (**Figura 16**) (GAUTAM; DINDA; MISHRA, 2013; GOUDARZI et al., 2021).

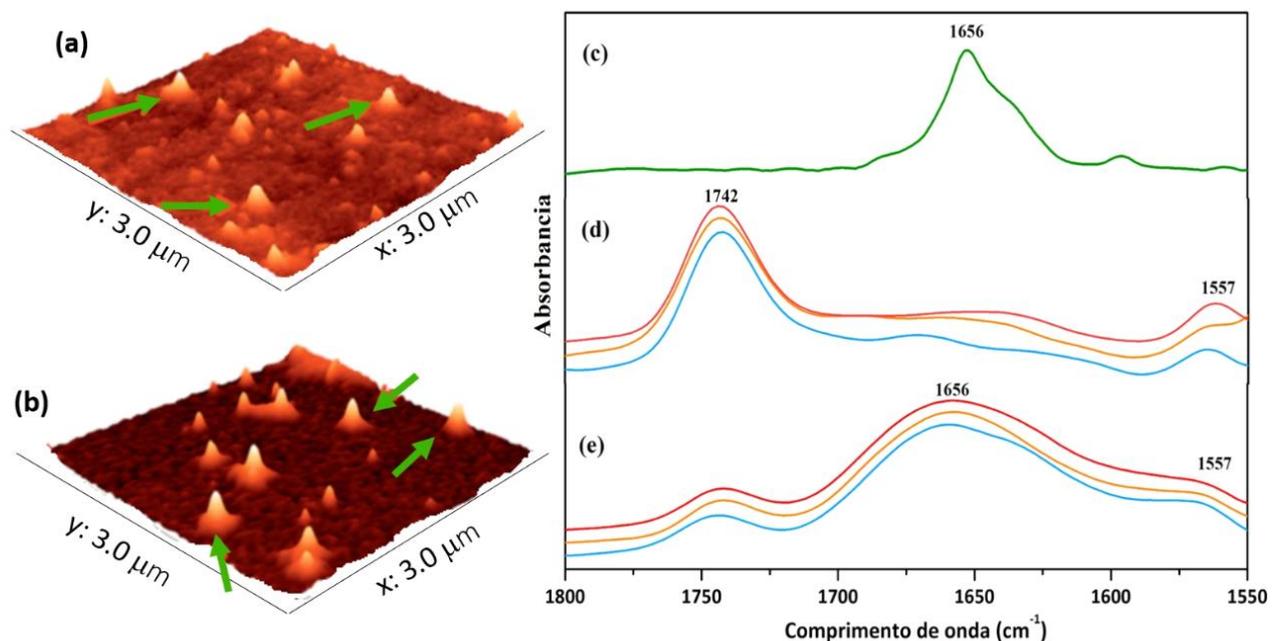


**Figura 16.** (a) Esquema de possíveis interações entre fases na formação das nanopartículas e (b) Proposta especulativa da interação entre o PCL e a Gelatina na estrutura das nanopartículas poliméricas.

Mesmo baseando-se em trabalhos já publicados com resultados semelhantes de FTIR, ainda permaneceu a importância de identificar a presença do óleo essencial nas nanopartículas carregadas. Devido às inconclusões oriundas da análise de FTIR, também foram realizadas medidas de AFM-IR para avaliar melhor a topografia e a composição química das nanopartículas (DAZZI et al., 2012), uma vez que essa técnica permite a análise pontual do sistema. Além disso, essa técnica permite obter informações químicas com resolução em nanoescala, além de ter a vantagem de uma medida extremamente localizada, sendo possível selecionar algumas nanopartículas e submetê-las ao feixe de infravermelho. Esta técnica vem sendo utilizada como ferramenta para avaliar a morfologia e a composição química de diversas nanoestruturas (ELZEIN et al., 2004; FARBER et al., 2019; HUANG et al., 2020; PEREZ-GUAITA et al., 2018).

As formulações contendo as nanopartículas carregadas e vazias foram diluídas permitindo a dispersão na superfície da lâmina de vidro, evitando a influência das nanopartículas vizinhas. Mapas topográficos, espectros e mapas de infravermelho foram registrados em três nanopartículas diferentes para cada sistema coloidal, conforme mostra a **Figura 17**. As regiões selecionadas foram destacadas por setas verdes nas imagens de AFM (**Figuras 17 (a) e (b)**), que foram relacionadas às nanopartículas vazias e carregadas com óleo essencial, respectivamente.

Uma das principais características da técnica AFM-IR na caracterização de materiais é a forte correlação com medidas por espectroscopia FTIR convencional. Isso ocorre porque o sinal medido pelo AFM-IR é diretamente proporcional ao coeficiente de absorção no infravermelho para um dado material (DAZZI et al., 2012).



**Figura 17.** Mapas topográficos AFM (a) NPV e (b) NPOE (c) espectro AFM-IR do óleo essencial, (d) espectro AFM-IR do sistema NPV e (e) espectro AFM-IR do sistema NPOE no intervalo de 1550-1800  $\text{cm}^{-1}$ . As setas verdes indicam as nanopartículas selecionadas para a aplicação do feixe de Infravermelho.

Em nosso experimento, o espectro de absorção das amostras foi medido diretamente pela análise da deflexão da ponteira do AFM quando posicionada na nanopartícula desejada, e um laser pulsado excitou as ligações químicas gerando uma expansão térmica modulada. Desta forma,

enquanto as informações topográficas da amostra foram armazenadas quando a ponteira faz a varredura em sua superfície, os mapas químicos também foram coletados monitorando a deflexão da ponteira na frequência da fonte de infravermelho. Assim, os espectros de absorção estão relacionados às medições convencionais de espectroscopia de infravermelho (DAZZI et al., 2012).

Três bandas principais foram observadas nos espectros das nanopartículas carregadas (**Figura 17(e)**), em (i)  $1742\text{ cm}^{-1}$  e (ii)  $1557\text{ cm}^{-1}$ , bem como uma banda larga entre (iii)  $1700$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$ . As bandas localizadas em  $1742\text{ cm}^{-1}$  e  $1557\text{ cm}^{-1}$  apresentaram aumento de intensidade no espectro das nanopartículas vazias (**Figura 17(d)**). Além disso, a banda larga entre  $1700$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$  não foi encontrada no espectro das nanopartículas vazias.

A banda localizada em  $1742\text{ cm}^{-1}$  está claramente relacionada ao modo vibracional  $\nu(\text{C}=\text{O})$  do PCL, uma vez que a gelatina não apresenta bandas em torno deste comprimento de onda (**Figura 15(b)**). A banda em  $1557\text{ cm}^{-1}$  está claramente relacionada à região do grupo amida II da gelatina. Além disso, nenhuma banda foi observada em torno deste comprimento de onda no espectro do PCL (**Figura 15(c)**).

Finalmente, a banda larga de  $1700$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$  foi formada por uma banda centrada em  $1656\text{ cm}^{-1}$  (encontrada apenas nos espectros das nanopartículas carregadas) e um ombro discreto em torno de  $1635\text{ cm}^{-1}$  (encontrado em ambos os espectros). A banda localizada em  $1656\text{ cm}^{-1}$  foi relacionada à contribuição do óleo essencial (e melhor visualizada nos espectros do óleo essencial *in-natura*, **Figura 17 (c)**, e pode ser atribuída basicamente ao estiramento  $\text{C}=\text{C}$  de todas as moléculas terpênicas que constituem quimicamente o óleo essencial (BASTOS et al., 2020). A banda localizada em  $1635\text{ cm}^{-1}$  está relacionada ao grupo amida I do carreador gelatina.

Dessa forma, a técnica AFM-IR permitiu a obtenção de informações químicas localizadas. Os resultados obtidos por AFM-IR foram importantes por fornecerem informações sobre as nanopartículas individuais desenvolvidas: permitiu a verificação das bandas de absorção dos carreadores PCL e gelatina, além de mostrar o sucesso do encapsulamento do óleo essencial no sistema contendo as nanopartículas carregadas (DA COSTA et al., 2021).

#### 5.3.4. Eficiência de Encapsulação (EE)

A associação entre os materiais de síntese, o método utilizado e as condições de preparo e armazenamento podem ser avaliados como efetiva, pois influenciaram consideravelmente na Eficiência de Encapsulamento (EE) do óleo essencial, a qual foi estimada em  $(98 \pm 2) \%$ . Esses dados corroboram com os resultados obtidos por AFM-IR mostrando que, de fato, existe óleo essencial encapsulado nas nanopartículas poliméricas.

Diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de óleo essencial associado aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas, o pH do meio, as características da superfície das partículas como cargas superficiais, rugosidade, morfologia, a natureza do polímero, a quantidade de óleo essencial encapsulado, a ordem de adição dos reagentes na síntese, a natureza do óleo essencial utilizado e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2002).

Muitos óleos essenciais são encapsulados com o objetivo de preservar e melhorar as bioatividades conferidas aos mesmos. Tem-se tentado criar sistemas que atinjam elevada EE, porém esses sistemas não são fáceis de serem obtidos em sistemas biodegradáveis, e o grande desafio é criar mecanismos químicos para que a EE seja mantida pelo maior tempo possível.

(PASCUAL-VILLALOBOS et al., 2015) encapsularam vários óleos essenciais com atividades inseticidas em sistemas contendo carreadores a base de alginato e glicerol, porém com baixa EE, variando de  $(10 \pm 1) \%$  a  $(29 \pm 2) \%$ . (ASPREA et al., 2017) desenvolveram sistemas encapsulados a base de lipídios e obtiveram EE entre  $(46,30 \pm 0.01) \%$  e  $(50,90 \pm 0.02) \%$  no encapsulamento do óleo essencial de tomilho. (RAKMAI et al., 2017a) encapsularam o óleo essencial da *P. nigrum* em nanopartículas a base de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, reportando EE de  $(50 \pm 2) \%$ . Os autores sugerem que essa eficiência pode estar relacionada à afinidade dos compostos do óleo essencial com o carreador.

No entanto, temos em literatura diversos casos de sistemas encapsulados com elevados valores de EE. (TEIXEIRA et al., 2013) encapsularam o óleo da *P. nigrum* em nanocápsulas poliméricas

de ciclodextrina, afim de avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial. A EE foi de  $(78 \pm 4) \%$ , evidenciando a importância da escolha do carreador. Investigações também foram realizadas acerca da encapsulação do óleo essencial da *P. nigrum* em partículas formadas por goma arábica, e a EE foi de 80% (IGWE et al., 2011).

(NAIDU; PAULSON, 2011) desenvolveram um método de obtenção de nanopartículas poliméricas de gelatina para encapsulação e liberação de ativos com EE de 85%. (GRILLO et al., 2012b) sintetizaram nanopartículas a base de PCL para a encapsulação de herbicidas com EE superior a 84%. Metodologias para a encapsulação de óleos essenciais são estudadas para alcançar elevada EE visando melhorar as atividades biológicas atribuídas aos mesmos (ASBAHANI et al., 2015; HASANI; OJAGH; GHORBANI, 2018; LIU et al., 2017a). Na encapsulação do óleo essencial da *Piper nigrum* em nanopartículas de gelatina e alginato de sódio pelo método de coacervação complexa foi observada a EE entre  $(49 \pm 3) \%$  a  $(82 \pm 4) \%$  (BASTOS et al., 2020).

Esses resultados ressaltam a efetividade do sistema de nanopartículas desenvolvido nesta pesquisa, bem como a necessidade da escolha de carreadores adequados e de elevada capacidade de carregamento. A EE depende de vários parâmetros. A retenção do agente ativo no carreador é governada por fatores relacionados à natureza química do ativo encapsulado, incluindo seu peso molecular, funcionalidade química, polaridade e volatilidade, além das propriedades do carreador e da técnica de encapsulação escolhida. Por outro lado, as propriedades hidrofóbicas dos surfactantes também afetam a eficiência de encapsulação (BRAVO CADENA et al., 2018). Embora tenham sido reportados em literatura diversos sistemas formados por polímeros biodegradáveis com elevada EE, são poucos que abordam a variação da EE ao longo de tempo, tornando-se questionável a estabilidade desses sistemas para posteriores aplicações. Dessa forma, seguiu-se essa pesquisa avaliando a estabilidade dos sistemas desenvolvidos através do monitoramento dos parâmetros EE, condutividade elétrica, pH, turbidez e propriedades organolépticas, como será detalhadamente discutido a seguir.

#### 5.4. Estabilidade dos sistemas contendo óleo essencial encapsulado

Neste tópico serão apresentadas as avaliações da estabilidade das nanopartículas contendo óleo essencial encapsulado. A adição de conservantes representa uma alternativa para prolongar a estabilidade de formulações. A aplicabilidade industrial de nanopartículas dispersas em meio aquoso pode ser limitada, devido aos problemas de baixa estabilidade físico-química, em períodos de armazenamento prolongados. As principais limitações são a agregação das partículas, a estabilidade química do polímero e, ainda, a liberação prematura da substância ativa (GUTERRES et al., 1995; SAEZ et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2003). Além disso, é importante enfatizar que sistemas coloidais são propensos à proliferação microbiana (SILVA et al., 2020). No entanto, poucos trabalhos relacionados a sistemas coloidais contendo nanopartículas poliméricas biodegradáveis têm se preocupado em avaliar a adição de tais componentes às formulações (SCHÖLER et al., 2000; SILVA et al., 2020).

No sistema contendo nanopartículas poliméricas biodegradáveis e óleo essencial encapsulado, foram adicionados os conservantes (i) fenoxietanol/metilisotiazolinona (NPNE), (ii) metilisotiazolinona (NPMI), (iii) benzoato de sódio (NPBS), (iv) timol (NPTI) e (v) ácido etilenodiaminotetracético (NPED). Foi considerado também o sistema contendo óleo essencial sem a adição de conservante (NPSC). Portanto, foram desenvolvidas 6 formulações.

No Brasil, não existe ainda uma regulamentação específica para sistemas biodefensivos contendo óleos essenciais como substância ativa para utilização em controle de pragas em agricultura. Existem regulamentações apenas para produtos biológicos, que são aqueles insumos agrícolas desenvolvidos a partir de um ingrediente ativo que seja natural, considerado ativo biológico. Agentes microbiológicos (ácaros, insetos e nematoides), microbiológicos (vírus, bactérias e fungos), semioquímicos (feromônios) e bioquímicos (hormônios) são considerados ativos biológicos e fazem parte da formulação de diferentes biodefensivos, destinados ao uso na produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas. Algumas diferenciações na regulação de produtos de origem biológica, frente aos químicos, já vêm sendo estabelecidos pela ANVISA, IBAMA e MAPA, desde a

publicação do Decreto N° 4.074/2002 que prioriza os produtos de baixa toxicidade, beneficiando os de origem biológica, especialmente aqueles que poderiam ser utilizados na agricultura orgânica. No entanto, produtos contendo óleos essenciais encapsulados para aplicação biodefensiva não se enquadram nessas categorias.

Por essas razões, as avaliações de estabilidade das formulações desenvolvidas vêm sendo baseadas no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004), com modificações.

Antes de iniciar as avaliações de estabilidade propriamente ditas, a (ANVISA, 2004) recomenda que a formulação seja submetida a um teste de centrifugação a 3.000 rpm durante 30 min. O produto deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. Se aprovado nesse teste, o produto poderá, de fato, ser então submetido às avaliações de estabilidade. O teste de centrifugação foi realizado conforme as recomendações já descritas, não sendo observada separação de fases ou formação de corpo de fundo. Este teste preliminar é um indicativo para a avaliação continuada da estabilidade dos sistemas desenvolvidos, podendo então ser avaliados outros parâmetros protocolados.

No teste de centrifugação, a força da gravidade atua sobre as nanopartículas fazendo com que se movam no meio. Este teste simula um aumento na força de gravidade, influenciando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades, as quais podem ser observadas em forma de precipitação, separação de fases e coalescência. Para (FIRMINO et al., 2011), o teste de centrifugação determina a estabilidade física de sistemas coloidais. Assim, quando submetidos à centrifugação, caso o sistema não apresente boa estabilidade, haverá a tendência de separação de seus componentes e, portanto, a necessidade de reformulação dos sistemas.

De acordo com a (ANVISA, 2004) o estudo de estabilidade é realizado a fim de avaliar a capacidade do material de manter suas propriedades organolépticas, físico-químicas e microbiológicas preservadas a longo prazo. Como dito anteriormente, em nosso caso essa avaliação foi realizada sob a ação de diferentes conservantes. Esses ensaios permitiram a obtenção de um panorama geral da estabilidade das formulações ao longo do tempo (sob manipulação constante e em prateleira) através

da avaliação dos parâmetros EE (%), condutividade elétrica, pH, turbidez e propriedades organolépticas (cor e odor).

Os ensaios de estabilidades realizados nesta pesquisa foram os seguintes:

**(i) Estabilidade preliminar:** as formulações foram submetidas a temperaturas  $[(5 \pm 2) ^\circ\text{C}]$  visando a primeira triagem;

**(ii) Estabilidade sob manipulação constante a  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ :** as formulações foram submetidas a manipulação constante, em intervalos pré-estabelecidos (entre 1 e 3 dias), até atingirem EE (%) igual ou inferior a 70%, ou apresentarem alterações (levemente ou intensamente modificadas) em suas propriedades organolépticas (cor e odor);

**(iii) Teste de prateleira:** As formulações selecionadas nos testes de estabilidade sob manipulação constante a  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$  foram submetidas aos testes de prateleira a  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$  e  $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , onde permaneceram estocadas até atingirem EE (%) igual ou inferior a 70%, ou apresentarem alterações (levemente ou intensamente modificadas) em suas propriedades organolépticas (cor e odor). Os frascos foram abertos a cada 30 dias.

**(iv) Fotoestabilidade:** tanto o óleo essencial *in natura* quanto o sistema encapsulado mais estável foram submetidos aos testes de fotoestabilidade pelo contato com a radiação ultravioleta ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) e, em tempos pré-determinados, foram analisadas as absorbâncias de alíquotas da formulação.

#### **5.4.1. Estabilidade preliminar**

A estabilidade preliminar é conhecida como Teste de Triagem, Estabilidade Acelerada ou de Curto Prazo, e tem como objetivo orientar a escolha das formulações. Este teste emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto. Por isso, este teste não tem o propósito de estimar a vida útil da formulação, mas sim de auxiliar na triagem. Geralmente as formulações são submetidas a aquecimento em estufas, resfriamento em refrigeradores e a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento.

Os valores usualmente adotados para temperaturas baixas e elevadas são, respectivamente,  $(5 \pm 2) ^\circ\text{C}$  e  $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . A duração do estudo é geralmente de 15 dias. A periodicidade de avaliação das amostras pode variar conforme as especificações do produto, as características especiais de algum componente da formulação ou o conservante utilizado. Porém, o mais usual neste estudo preliminar é que sejam avaliadas, inicialmente, no tempo zero e durante todos os dias em que estiverem submetidas às condições do estudo (ANVISA, 2004).

Os sistemas de nanopartículas contendo óleo essencial encapsulado e conservantes (NPNE, NPMI, NPBS, NPTI e NPED) foram acondicionados em refrigerador a  $(5 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Foi observada a aparência viscosa e separação de fases após 24 h, sendo indicativos de desestabilização. Além disso, ainda foi possível observar fenômenos como floculação e coalescência. Observou-se a formação de agregados de diferentes formas e tamanhos. Alguns sistemas apresentaram aglomerados maiores separando-se do resto da emulsão, conforme também observado por (MCCLEMENTS, 2016). A separação de fases ocorre geralmente pela separação das fases óleo/água. As colisões entre as partículas podem resultar em floculação, podendo levar à coalescência de partículas. Possivelmente, a fase dispersa pode se tornar a fase contínua, separada da dispersão por uma única interface. Neste caso, tem-se a formulação totalmente separada (FRANZOL; REZENDE, 2015; MCCLEMENTS, 2016). A partir dos fenômenos observados, concluiu-se que as formulações desenvolvidas não são indicadas para armazenamento a baixas temperaturas. Esse resultado já era esperado devido à presença do carreador gelatina na formulação. Dessa forma, não foi possível realizar os ciclos alternados de resfriamento e aquecimento.

Mesmo assim, optou-se por submeter todos os sistemas encapsulados em BOD a  $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$  para avaliação preliminar de sua estabilidade. No entanto, esses sistemas não foram aqueles submetidos a  $(5 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , uma vez que não foi possível realizar os ciclos de resfriamento e aquecimento. Os resultados estão apresentados na **Tabela 2**. Os sistemas foram abertos após 15 dias, sendo avaliados os parâmetros (EE), condutividade elétrica, turbidez, pH e propriedades organolépticas (cor e odor).

De acordo com a **Tabela 2**, após 15 dias de avaliação de estabilidade a  $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , todos os sistemas encapsulados mantiveram os valores de EE acima de  $(70 \pm 2) \%$ . Este percentual é considerado relativamente alto e representativo, conforme descreve (XING et al., 2005) e, juntamente com as propriedades organolépticas, é um dos principais parâmetros a serem considerados na avaliação de estabilidade de formulações.

**Tabela 2.** Estabilidade a  $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$  das nanopartículas poliméricas contendo óleo essencial encapsulado em função dos conservantes. Foram avaliados os parâmetros Eficiência de Encapsulamento (EE), condutividade elétrica, turbidez, pH, propriedades organolépticas (cor e odor) após 0 e 15 dias.

Parâmetros	NPNE		NPMI		NPBS	
	0	15	0	15	0	15
Tempo (dias)						
EE (%)	$98 \pm 2$	$76 \pm 3$				
Condutividade Elétrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	$1043 \pm 5$	$1050 \pm 5$	$738 \pm 5$	$900 \pm 5$	$915 \pm 5$	$1000 \pm 10$
Turbidez (NTU)	$40 \pm 1$	$45 \pm 2$	$40 \pm 1$	$40 \pm 1$	$40 \pm 1$	$60 \pm 4$
pH	$8,00 \pm 0,02$	$7,60 \pm 0,03$	$8,00 \pm 0,02$	$7,60 \pm 0,03$	$8,00 \pm 0,02$	$6,70 \pm 0,04$
Cor	SA	SA	SA	SA	SA	LA
Odor	SA	SA	SA	SA	SA	LA
Parâmetros	NPED		NPTI		NPSC	
	0	15	0	15	0	15
Tempo (dias)						
EE (%)	$98 \pm 2$	$83 \pm 3$	$98 \pm 2$	$98 \pm 2$	$98 \pm 2$	$76 \pm 3$
Condutividade Elétrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	$687 \pm 5$	$1200 \pm 10$	$856 \pm 5$	$1100 \pm 10$	$628 \pm 5$	$5000 \pm 10$
Turbidez (NTU)	$40 \pm 1$	$50 \pm 3$	$40 \pm 1$	$80 \pm 2$	$40 \pm 1$	$70 \pm 3$
pH	$8,00 \pm 0,02$	$7,20 \pm 0,03$	$8,00 \pm 0,02$	$7,00 \pm 0,04$	$8,00 \pm 0,02$	$6,00 \pm 0,03$
Cor	SA	LA	SA	LA	SA	LA
Odor	SA	LA	SA	LA	SA	LA

EE (%) = Eficiência de Encapsulamento em porcentagem; SA = Sem Alteração; LA = Levemente Alterado. Os erros foram estimados a partir do desvio padrão obtidos pela média ponderada de medidas em triplicata.

Os parâmetros pH, condutividade elétrica e turbidez geralmente estão associados à diminuição da EE devido à exposição de óleo essencial (anteriormente encapsulado) na própria formulação. Observou-se que os sistemas NPNE, NPMI e NPTI foram aqueles que mantiveram a EE =  $(98 \pm 2) \%$  após 15 dias de avaliação. Considerando os demais sistemas, o NPBS e NPSC atingiram o menor valor de EE, em torno de  $(76 \pm 2) \%$ . Preliminarmente, podemos sugerir que o conservante benzoato de sódio foi o menos efetivo na prolongação da estabilidade dos sistemas quando submetidos a  $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , uma vez que a EE ao final da análise foi similar à do sistema encapsulado sem a adição de conservante (NPSC).

O monitoramento do pH também representa uma importante ferramenta para a avaliação da estabilidade de sistemas coloidais, uma vez que alterações em seu valor podem indicar fenômenos que comprometem a qualidade do sistema. Além disso, também podem estar relacionadas

à saída dos ativos encapsulados das nanopartículas, indicando também a desestabilização da formulação (GONZÁLEZ-REZA et al., 2018). Esse fenômeno está associado à diminuição da EE e, conseqüentemente, à exposição de óleo essencial (pH = 5,4). Os menores valores de pH após 15 dias de avaliação foram observados nos sistemas que apresentaram menores EE, como o NPBS e NPSC. Embora os sistemas NPNE e NPMI mantivessem os valores de EE, foi verificada uma diminuição marginal de seus valores de pH, muito provavelmente devido às interações naturais entre os constituintes das formulações (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Seguindo o mesmo raciocínio que leva em consideração a alteração de parâmetros físicos devido à exposição do óleo essencial no meio (por consequência da diminuição da EE), verificou-se que os valores de condutividade elétrica aumentaram em todos os sistemas após 15 dias de avaliação. O maior valor foi observado no sistema NPSC [de  $(628 \pm 5) \mu\text{S/cm}$  para  $(5000 \pm 10) \mu\text{S/cm}$ ]. Acredita-se que o aumento da condutividade elétrica esteja relacionado à exposição do óleo essencial. Devido a relação estrutural dentro dos grupos químicos, os componentes dos óleos essenciais podem se converter em outros. Por reações de oxidação, isomerização, ciclização ou desidrogenação essas conversões podem levar ao aumento da condutividade elétrica e baixos valores de pH (TUREK; STINTZING, 2013). Além disso, de acordo com os dados de CG/DIC e CG/EM, o óleo essencial da *P. nigrum* é rico em compostos contendo grupos eletronegativos que podem contribuir para a condutividade elétrica (TUREK; STINTZING, 2013). Por outro lado, a desestabilização e exposição do óleo essencial no meio pode ser consequência da ruptura das nanopartículas (conforme indica a diminuição da EE), desencadeando reações que resultam em elétrons livres (SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2002).

Corroborando com os indicativos de EE e pH, a análise da turbidez das formulações também mostrou alterações, especialmente nos sistemas com quedas mais significativas de EE. Essas quedas podem estar relacionadas à ruptura das nanopartículas (e sucessiva liberação de óleo essencial), fazendo com que fragmentos dessas partículas fiquem dispersos no meio, alterando a turbidez das formulações (GONZÁLEZ-REZA et al., 2018). Os sistemas NPNE e NPMI foram os que

apresentaram menores variações de turbidez: os valores aumentaram de  $(40 \pm 1)$  NTU para  $(45 \pm 2)$  NTU no sistema NPNE, e mantiveram-se em  $(40 \pm 1)$  NTU no sistema NPMI.

O aumento da temperatura de armazenamento das formulações pode desencadear reações químicas que alteram os parâmetros avaliados, modificando a velocidade das reações, bem como a degradação dos materiais da formulação. Dentre esses materiais, a gelatina quando mantida acima da temperatura ambiente por longo tempo pode sofrer gelatinização (SMITTARELLO et al., 2021), processo pelo qual as ligações começam a se romper liberando cadeias em meio aquoso, fazendo com que a água livre seja adsorvida. No entanto, esse fenômeno não foi observado, uma vez que alguns sistemas (como o NPNE e NPMI) mantiveram seus valores elevados de EE. Além disso, a gelatina nanometrizada pode apresentar comportamentos diferentes quando comparada com aquela na forma de pó (LAI et al., 2014).

As propriedades organolépticas (cor e odor) mantiveram-se inalteradas nos sistemas NPNE e NPMI. Após 15 dias, os demais sistemas apresentaram leves alterações de cor e odor. Porém, a modificação das propriedades organolépticas geralmente está associada à proliferação de microrganismos (ANVISA, 2004), sugerindo a melhor ação de alguns conservantes da formulação.

De forma geral, os resultados da estabilidade das formulações a  $(35 \pm 2)$  °C foram satisfatórios. O primeiro resultado positivo foi a verificação de valores de EE superiores a 70 % após 15 dias. As alterações verificadas nos demais parâmetros (pH, condutividade elétrica e turbidez) estiveram basicamente relacionadas à exposição do óleo essencial na própria formulação. Embora os sistemas NPBS, NPED, NPTI e NPSC apresentassem pequenas variações de cor e odor, ainda optamos por mantê-los nas subseqüentes avaliações que aconteceram a  $(25 \pm 2)$  °C (para verificarmos se houve influência da temperatura), a fim de avaliarmos o real comportamento e durabilidade de todas as formulações em temperatura ambiente. No entanto, os resultados de estabilidade preliminar já apontaram para duas formulações com maiores probabilidades de se manterem estáveis a  $(35 \pm 2)$  °C, que são o NPNE e NPMI, com variações marginais de EE (%), condutividade elétrica, pH e turbidez, além de cor e odor inalterados.

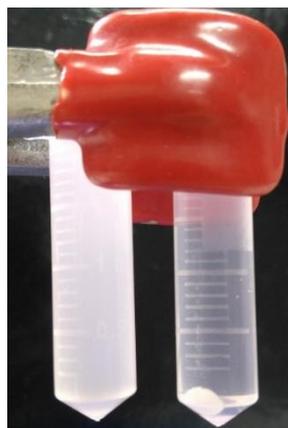
#### 5.4.2 Estabilidade sob manipulação constante

A avaliação da estabilidade sob manipulação constante teve como objetivo fornecer dados para prever o tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (vidro transparente). Este teste é empregado geralmente na fase de desenvolvimento de formulações utilizando-se lotes produzidos em escala laboratorial e piloto de fabricação, podendo estender-se às primeiras produções. Este teste foi utilizado para estimar o tempo de validade das formulações quando as mesmas foram submetidas às condições de manuseio convencionais, como exposição à luz, contato com o ar quando os frascos foram abertos e mudança brusca de temperatura [de  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$  para  $(17 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , temperatura local do laboratório]. O acompanhamento dos parâmetros EE (%), condutividade elétrica, pH, turbidez, cor e odor em função dos diferentes conservantes foi realizado até que as formulações atingissem EE = 70% ou precisassem ser descartadas por alterações de suas propriedades organolépticas (cor e odor).

Serão discutidos abaixo cada um desses parâmetros separadamente, a fim de entendermos o mecanismo de desestabilização das formulações em função do tempo.

##### 5.4.2.1. Avaliação da Eficiência de encapsulação (EE) e condutividade elétrica

A EE (%) foi estimada a partir da análise da presença de óleo essencial no sobrenadante quando o sistema de nanopartículas contendo óleo essencial encapsulado foi submetido a um processo de centrifugação a 10.000 rpm por 10 min. A **Figura 18** mostra as nanopartículas separadas por centrifugação, sendo possível observar a separação de fases. Através de uma curva padrão do óleo essencial, foram calculadas as absorbâncias do sobrenadante por espectroscopia UV-Vis. A EE e as propriedades organolépticas foram os parâmetros usados para determinar o tempo de avaliação dos sistemas. Segundo (XING et al., 2005), um sistema de partículas poliméricas pode ser considerado com EE satisfatória quando esta for igual ou superior a 70% (DE MATOS; SCOPEL; DETTMER, 2018).



**Figura 18.** Separação das nanopartículas da solução coloidal por centrifugação.

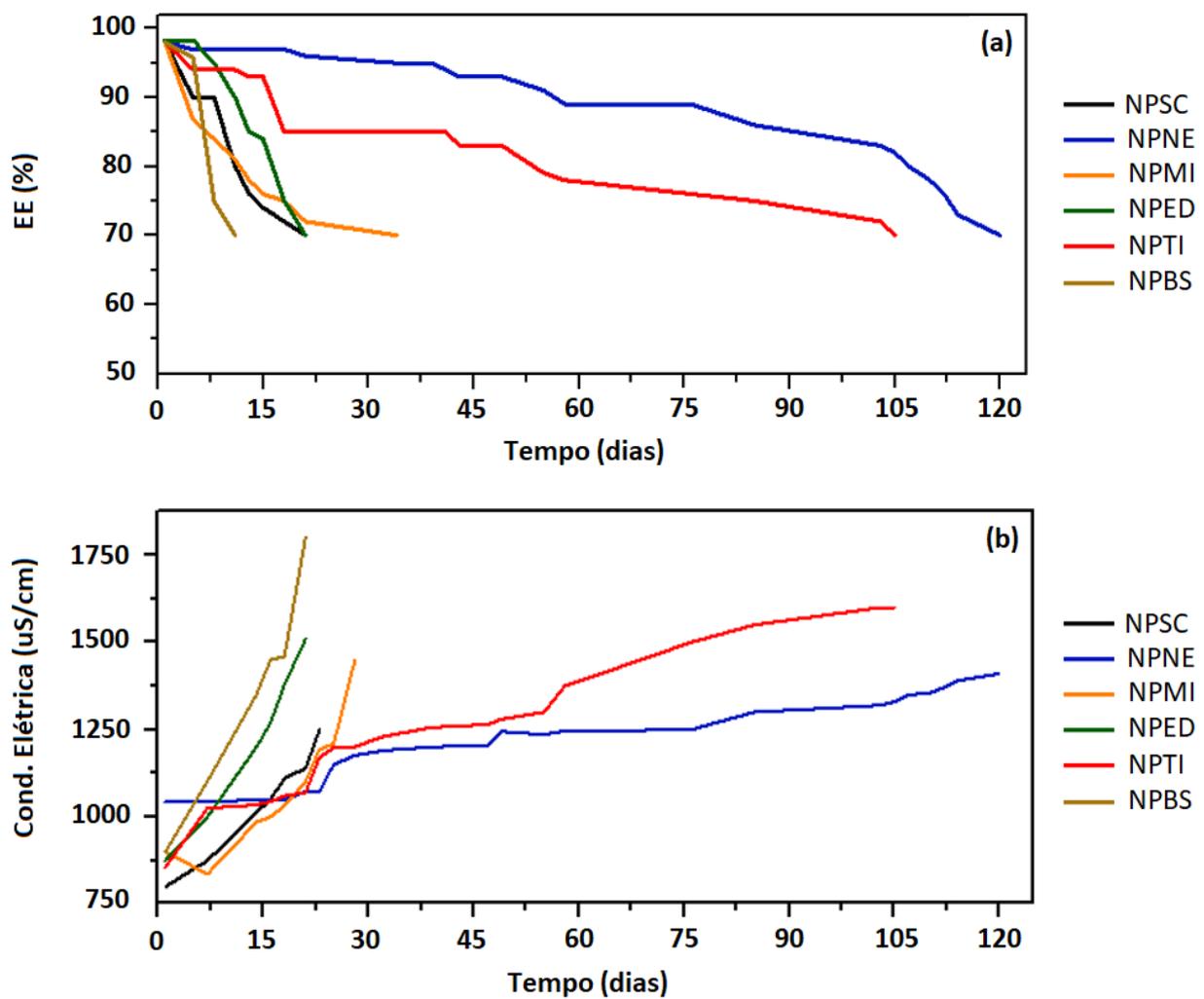
A **Figura 19** mostra graficamente a evolução da EE em função do tempo para todas as formulações. Os sistemas apresentaram  $EE = (98 \pm 2) \%$ , que é altamente satisfatório, mostrando que o método empregado no desenvolvimento das nanopartículas e encapsulação do óleo essencial, bem como a escolha dos carreadores resultaram em elevada EE. No entanto, analisar a EE somente após a finalização da síntese não garante resultados satisfatórios com relação ao sucesso da formulação.

O primeiro sistema a atingir  $EE = 70\%$  foi o NPBS (curva mostarda) após 13 dias de avaliação. Esse sistema, inclusive, atingiu o limite de 70% antes do sistema NPSC (curva preta). Esse resultado sugere que o conservante benzoato de sódio pode ter contribuído para a desestabilização mais rápida do sistema pois o mesmo em meio aquoso é convertido em ácido benzóico (diminuindo o pH da formulação) (OLIVEIRA; REIS, 2017), quando comparado com o sistema sem conservantes. Essa conversão em ácido benzóico pode contribuir para que o sistema se aproxime mais de seu ponto isoelétrico (OLIVEIRA; REIS, 2017).

Os sistemas NPSC (curva preta) e NPED (curva verde) atingiram  $EE = 70\%$  após 20 dias. O sistema NPMI apresentou estabilidade similar aos sistemas NPSC, NPBS e NPED, atingindo o limite considerado de EE após 34 dias. Portanto, os conservantes benzoato de sódio e EDTA não foram eficientes para prolongar o tempo de vida das formulações, uma vez que a EE desses sistemas atingiu 70% em tempo igual ou inferior ao sistema NPSC. A ineficiência dos conservantes também pode ser

verificada pela avaliação das propriedades organolépticas desses sistemas, as quais estavam intensamente alteradas (IA) após o final das avaliações.

Como não se pode prescindir o uso de conservantes, a escolha dos mesmos deve ser adequada para que sejam efetivos. Além disso, deve-se considerar que os conservantes podem ser inativados (total ou parcialmente, como observado nos sistemas NPBS e NPED), deixando o produto sem a proteção esperada (ANVISA, 2004)



**Figura 19.** (a) Eficiência de encapsulação (EE) do óleo essencial da *P.nigrum* e (b) condutividade elétrica das formulações em função do tempo.

Como um dos carreadores usados para o desenvolvimento das nanopartículas (gelatina) é também considerado um alimento, pode ocorrer a proliferação de microrganismos que leva à

desestabilização da formulação (CZERNER et al., 2016). Segundo (BRITO et al., 2011), microrganismos podem levar à degradação de um material orgânico causada por atividade biológica, principalmente pela ação enzimática. A biodegradação de um material ocorre quando o mesmo é usado como nutriente por um determinado conjunto de microrganismos (bactérias, fungos e algas), os quais devem possuir enzimas adequadas para romper algumas das ligações químicas da cadeia principal do polímero.

Embora não tenham sido realizados ensaios microbiológicos para determinar especificamente o tipo de microrganismo associado às modificações das propriedades organolépticas, pode-se sugerir indícios de proliferação, como apontado por (FLEMMING, 1998). Quando isso acontece, esses microrganismos (geralmente fungos e bactérias) podem contribuir para o rompimento das paredes das nanopartículas e expor o óleo essencial na formulação, diminuindo a EE. Segundo a Resolução 481/99 da ANVISA, a presença de água e componentes orgânicos na formulação favorece o crescimento de microrganismos. Em alguns casos, estes afetam a estrutura dos agentes conservantes influenciando na estabilidade do produto e consequentemente na EE (ANVISA, 2004).

Para verificarmos se de fato pode ocorrer a proliferação de microrganismos nos sistemas NPNE e NPMI, essas formulações foram submetidas a testes microbiológicos qualitativos, conforme mostra a **Figura 20**.



**Figura 20.** Ensaio microbiológico qualitativo para os sistemas (a) NPNE e (b) NPPI.

Como é possível observar, os sistemas, mesmo contendo conservantes, apresentaram crescimento de microrganismos. O plaqueamento das amostras permitiu concluir a hipótese que a contaminação microbiológica pode ser um dos motivos da desestabilização das nanopartículas dos sistemas. Esse fato pode estar relacionado às concentrações dos conservantes (que seguiram as normas da ANVISA), e também a volatilidade pronunciada do timol. Porém, devido às diferentes características químicas dos conservantes, essa desestabilização acontece em diferentes momentos.

Sabe-se que os principais microrganismos comuns como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* podem se proliferar facilmente em meios aquosos. O *S. aureus*, quando em meios líquidos, pode apresentar coloração esbranquiçada, creme e algumas vezes amarelada, proliferando-se rapidamente em temperaturas entre 25 e 37 °C (CDC, 2019). A *P. aeruginosa* é uma bactéria aeróbica, mas que se adapta em ambientes com baixa concentração de oxigênio, sendo frequentemente encontrada em água destilada em laboratório, o que evidencia suas necessidades mínimas de nutrientes (CDC, 2019; MARANGON, 2015).

Os sistemas que apresentaram claramente maior estabilidade a  $(25 \pm 2)$  °C em função do tempo foram o NPTI e NPNE. O sistema NPTI atingiu EE = 70% após 105 dias, podendo-se aferir que o timol é um conservante que mostrou afinidade química com a formulação, contribuindo para o aumento de seu tempo de vida. O timol vem sendo utilizado em formulações antissépticas com propriedades antifúngica e antibacteriana, e pode ser encontrado como o componente majoritário do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) (EL-SAYED; EL-SAYED, 2020).

Ainda, o sistema NPNE destacou-se dentre os sistemas avaliados pelo seu maior tempo de vida, atingindo EE =  $(70 \pm 2)$  % após 120 dias. A química desse conservante consiste na associação de dois compostos conhecidamente utilizados como conservantes, o fenoxetanol e o 2-metil-Isotiazolin-3-ona. A combinação de diferentes conservantes tem se mostrado eficiente para um amplo espectro de fungos e bactérias, e vem sendo usada como estratégia para rentabilizar e potencializar a eficácia dos mesmos (DAULISIO; SCHNEIDER, 2020; PUSCHMANN; HERBIG; MÜLLER-GOYMANN, 2018).

Conclui-se, através da avaliação de EE, que a adição de determinados conservantes pode ou não contribuir para o aumento do tempo de vida de formulações poliméricas. No caso dos sistemas avaliados, foi possível comparar o tempo de vida do sistema NPSC com o sistema NPNE. Levando-se em consideração que o sistema NPSC atingiu EE = 70% após 20 dias e o sistema NPNE atingiu o mesmo percentual após 120 dias, podemos sugerir que o conservante NE contribuiu para o aumento de 100 dias adicionais no tempo de vida do sistema NPNE.

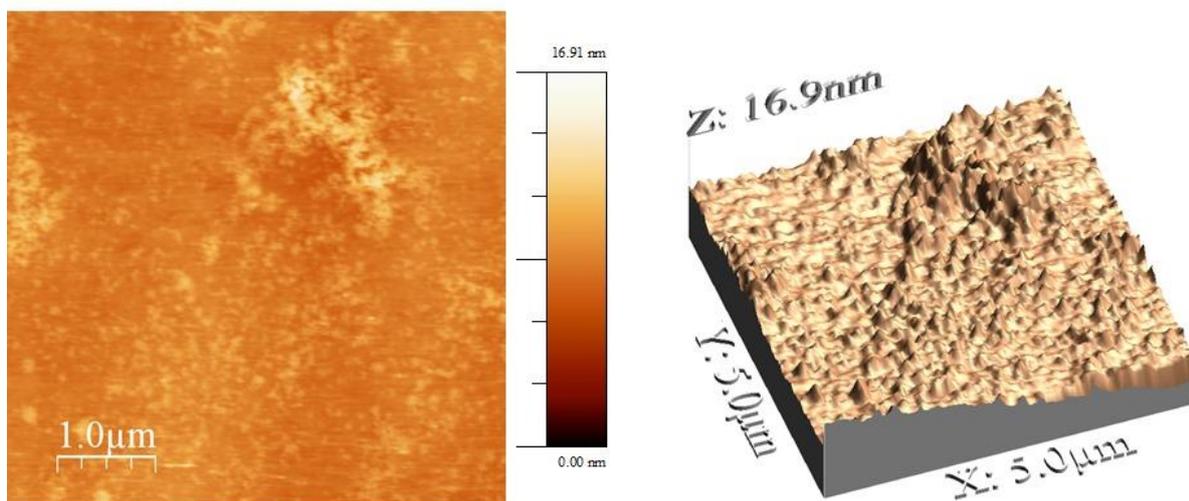
Os resultados da avaliação de estabilidade em função da condutividade elétrica estão apresentados na **Figura 19(b)**. O sistema NPSC apresentou variação de condutividade elétrica de  $(800 \pm 4) \mu\text{S/cm}$  a  $(1250 \pm 4) \mu\text{S/cm}$  após aproximadamente 21 dias. Com a adição de conservantes observou-se um aumento na condutividade elétrica ao longo do tempo em todos os sistemas, logo após o primeiro dia de avaliação. A condutividade elétrica variou de  $(875 \pm 5) \mu\text{S/cm}$  para  $(1509 \pm 5) \mu\text{S/cm}$  no sistema NPED; de  $(900 \pm 4) \mu\text{S/cm}$  a  $(1446 \pm 4) \mu\text{S/cm}$  no sistema NPMI, e de  $(900 \pm 5) \mu\text{S/cm}$  a  $(1800 \pm 5) \mu\text{S/cm}$  na formulação NPBS. Esses sistemas apresentaram uma variação mais acentuada nos valores de condutividade elétrica. Ainda, foram os sistemas que desestabilizaram em menos de 30 dias de avaliação. A variação brusca da condutividade elétrica corrobora com a sugestão de desestabilização dos sistemas, especialmente quando correlacionamos esses dados com aqueles obtidos pela EE. Esses quatro sistemas (NPMI, NPBS, NPED e NPSC) também atingiram EE~70% após aproximadamente 30 dias. Dessa forma, o aumento da condutividade elétrica desses sistemas pode estar relacionado à exposição do óleo essencial no meio (SILVA et al., 2020). A condutividade elétrica foi aumentada conforme a concentração de óleo essencial exposto (TUREK; STINTZING, 2013) provavelmente pelo rompimento das nanopartículas (SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2002).

O sistema NPTI apresentou condutividade elétrica entre  $(856 \pm 5) \mu\text{S/cm}$  e  $(1600 \pm 5) \mu\text{S/cm}$  após 105 dias de avaliação. Já o sistema NPNE, após 120 dias de avaliação, apresentou aumento de condutividade elétrica de  $(1043 \pm 5) \mu\text{S/cm}$  para  $(1410 \pm 5) \mu\text{S/cm}$ . Esses valores corroboram com os resultados obtidos na avaliação da EE. Segundo (ANVISA, 2004), alteração na condutividade elétrica de sistemas dispersos pode ser um indicativo de instabilidade, e pode estar relacionada ao fenômeno

de ruptura, enquanto a diminuição da condutividade elétrica está relacionada à agregação das nanopartículas. Analisando a **Figura 19(b)**, observa-se que o aumento da condutividade elétrica dos sistemas NPTI e NPNE não é brusco, mas acontece gradativamente ao longo de todo o período de avaliação, sendo acompanhado também pela diminuição da EE.

Dessa forma, podemos sugerir que a condutividade elétrica desses sistemas aumentou pela exposição do óleo essencial à medida em que a EE diminuía pelo processo de ruptura no qual possivelmente houve a contribuição microbiana para a desestabilização, resultando em reações que resultam em elétrons livres, como sugere (TUREK; STINTZING, 2011). Esses resultados serão associados também às variações de turbidez.

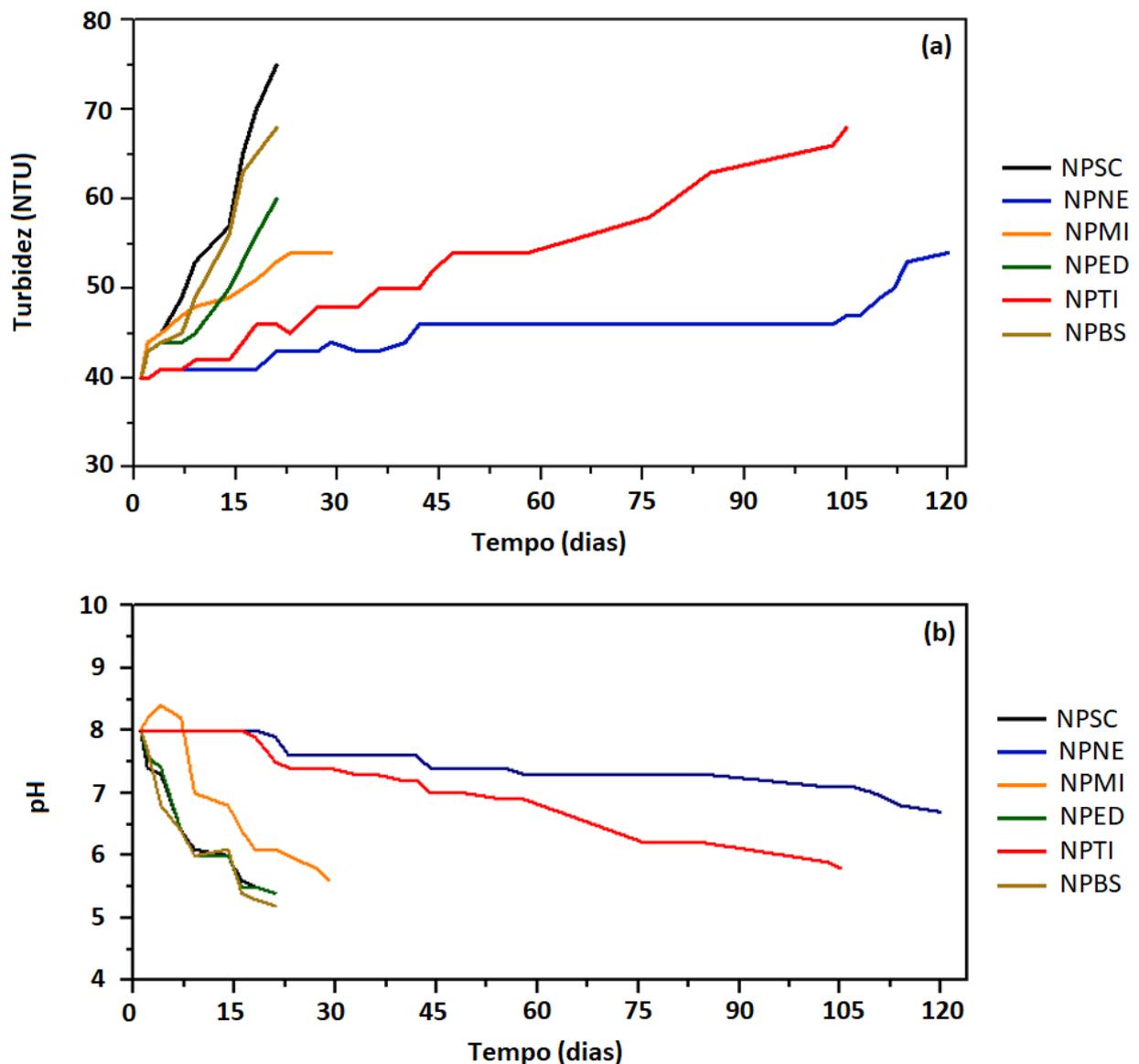
Para verificar visualmente a desestabilização das nanopartículas, o sistema NPNE totalmente desestabilizado foi submetido à análise por AFM. A **Figura 21(a)** mostra a morfologia predominante nesse sistema. Essa imagem evidencia o desaparecimento das nanopartículas anteriormente vistas no sistema estabilizado. Além disso, se observamos detalhadamente, é possível verificar fragmentos de nanopartículas gerados por ruptura, os quais resultam em um mapa topográfico visualizado na (**Figura 21(b)**).



**Figura 21.** (a) Sistema NPNE totalmente desestabilizado e (b) mapa topográfico.

#### 5.4.2.2. Avaliação da turbidez e pH

A **Figura 22(a)** mostra graficamente a evolução (a) da turbidez e (b) do pH em função do tempo para todas as formulações. No início da avaliação ( $t = 0$ ), todos os sistemas apresentaram turbidez em torno de  $(40 \pm 1)$  NTU. Esse fato mostra que a adição dos conservantes não influenciou na turbidez inicial das formulações. No entanto, assim como na avaliação da EE e condutividade elétrica, as maiores variações de turbidez foram observadas nos sistemas NPSC, NPMI, NPBS e NPED.



F

figura 22. (a) Avaliação da turbidez e (b) do pH das formulações.

A turbidez atingiu ( $75 \pm 3$ ) NTU no sistema NPSC, ( $68 \pm 2$ ) NTU no sistema NPBS, ( $60 \pm 2$ ) NTU no sistema NPED e ( $54 \pm 4$ ) NTU no NPMI em até 30 dias de avaliação. Pode-se sugerir que o aumento observado na escada da turbidez possivelmente está relacionado à desestabilização das formulações. Ao avaliar o aspecto das amostras, era visível a deposição de sedimentos e fragmentos suspensos, alterando a turbidez dos sistemas.

A turbidez do sistema NPTI atingiu ( $68 \pm 2$ ) NTU após 105 dias de análise, enquanto o sistema NPNE atingiu ( $54 \pm 4$ ) NTU após 120 dias. A variação da turbidez para esses dois sistemas manteve-se similar à variação da EE e condutividade elétrica: os valores de turbidez aumentaram à medida em que os sistemas desestabilizavam gradativamente, acompanhados pela diminuição da EE e aumento da condutividade elétrica (ANVISA, 2004).

A variação do pH dos sistemas em função do tempo está representado na **Figura 22(b)**. De acordo com a análise de potencial zeta (**Figura 14**), todos os sistemas foram ajustados inicialmente em pH = 8. Novamente, os sistemas NPMI, NPBS, NPED e NPSC apresentaram variações abruptas de pH após aproximadamente 30 dias, quando esses sistemas atingiram EE ~ 70%. O pH dos sistemas NPSC, NPED, NPBS e NPMI diminuíram para ( $5,40 \pm 0,03$ ), ( $5,40 \pm 0,03$ ), ( $5,20 \pm 0,02$ ) e ( $5,60 \pm 0,02$ ), respectivamente. A diminuição do pH pode ser possivelmente explicada pela exposição do óleo essencial no meio (como consequência da ruptura das nanopartículas - sugestão baseada nos resultados de EE, condutividade elétrica, turbidez e AFM) (BASTOS et al., 2020). Como o pH do óleo essencial da *P. nigrum* é de aproximadamente ( $5,40 \pm 0,04$ ), os sistemas tornaram-se mais ácidos à medida em que o óleo essencial deixava o interior das nanopartículas e era exposto na formulação (SILVA et al., 2020). No entanto, segundo (GONZÁLEZ-REZA et al., 2018), a diminuição dos valores de pH ao longo do tempo em sistemas coloidais pode também estar associada à degradação dos materiais contidos na formulação, os quais podem induzir a acidificação do meio ou a produção de ácidos como o ácido  $\epsilon$ -hidroxicapróico, produto da degradação do PCL. Ainda, (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007) afirmam que a redução do pH pode indicar especificamente degradação polimérica atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos quanto à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do

polímero. A possibilidade de degradação da gelatina por reações com os grupamentos carboxílicos livres pode se enquadrar nessa análise (ELZOGHBY, 2013).

Novamente, os dois sistemas com variações gradativas e menos abruptas de pH foram o NPNE e NPTI. O pH do sistema NPTI manteve-se estável por 18 dias em  $(8,00 \pm 0,02)$ , apresentando uma leve diminuição para  $(7,50 \pm 0,04)$  e mantendo-se estável por aproximadamente 31 dias. Então, houve uma redução para  $\text{pH} = (5,80 \pm 0,03)$  após 105 dias avaliação. A formulação NPNE apresentou a variação mais regular e menos abrupta de pH, permanecendo em  $(8,00 \pm 0,02)$  por 21 dias. Após uma leve queda, manteve-se em  $(7,50 \pm 0,04)$  por 89 dias, e então a avaliação foi finalizada em  $\text{pH} = (6,80 \pm 0,01)$  após 120 dias.

A análise da variação de pH em sistemas poliméricos coloidais em função do tempo é importante para assegurar a estabilidade química do polímero carreador, pois alterações de valores podem indicar degradação do polímero e conseqüente desestabilização do sistema, gerando cadeias menores que levam à acidificação da formulação (SAULNIER et al., 2003). Em todos os sistemas, o pH tendeu atingir a escala mais ácida, e este fato pode ter contribuído, além da desestabilização das nanopartículas e exposição do óleo essencial, à tendência de as cargas superficiais atingirem o ponto isoelétrico (tendência ao  $\text{pH} = 4$ ), conforme ilustrado na **Figura 14**.

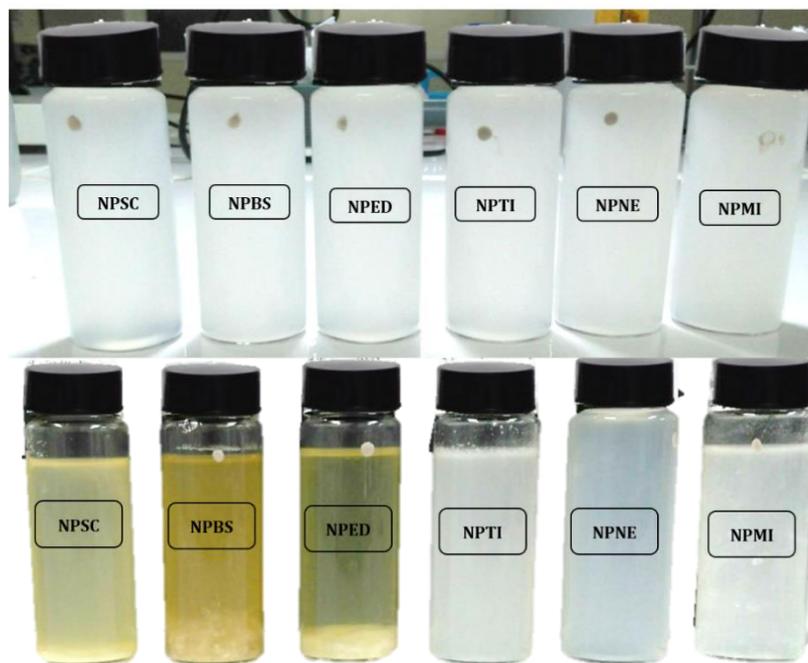
Em síntese, a avaliação da estabilidade das formulações sob manipulação constante mostrou que, a  $(25 \pm 2)$  °C, dois conservantes contribuíram significativamente para aumentar os tempos de vida das formulações: o NE e o timol. Os fenômenos de desestabilização também foram observados nesses sistemas (NPNE e NPTI); no entanto, as desestabilizações aconteceram gradativamente, sem mudanças abruptas dos parâmetros avaliados.

De forma geral, observou-se a retardação da diminuição da EE, acompanhada do aumento da condutividade elétrica, aumento da turbidez e diminuição do pH. Entender o comportamento desses parâmetros físicos pode ser útil para o ajuste tanto dos componentes das formulações, quanto de suas concentrações. Além disso, essas avaliações sugerem a compatibilidade química de alguns conservantes com o sistema polimérico desenvolvido, sendo possível propor conservantes adequados

para sistemas a base de gelatina e PCL. Avaliando o comportamento de todos os parâmetros, pode-se concluir que os sistemas NPNE e NPTI foram os que mais mantiveram-se estáveis a  $(25 \pm 2)$  °C ao longo do tempo.

#### 5.4.2.3. Avaliação das propriedades organolépticas

A avaliação de cor dos sistemas mantidos sob manipulação constante a  $(25 \pm 2)$  °C está representada na **Figura 23**. Essa avaliação permitiu a percepção de mudanças no aspecto (**Figura 23(a)**), quando os sistemas foram comparados com as amostras controle (**Figura 23(b)**). Além disso, o odor das formulações também foi avaliado em função do tempo.



**Figura 23.** (a) Formulações controle e (b) Formulações ao final do período de avaliação da estabilidade sob manipulação constante.

Visualmente, os sistemas NPNE e NPTI foram aqueles que não apresentaram mudanças significativas de cor em relação aos seus respectivos sistemas controle. Além disso, esses sistemas não apresentaram alteração de odor após o final da análise. Já os sistemas NPBS, NPED e NPSC apresentaram intensas modificações de cor e odor após as análises, atingindo tonalidades amareladas.

O sistema NPMI não apresentou intensa modificação de cor, mas seu odor ficou intensamente alterado após o período de análise. Alterações bruscas na coloração geralmente estão relacionadas a modificações químicas e/ou proliferação de microrganismos, sugestão que corrobora com a alteração de odor de alguns sistemas (ANVISA, 2004).

Ainda, os aspectos das formulações visualmente mostram alterações macroscópicas em relação às formulações de controle: os sistemas NPSC, NPBS, NPED e NPMI apresentaram também corpo de fundo, corroborando com a proposta de desestabilização das nanopartículas por ruptura (MCCLEMENTS, 2016). A **Figura 21** mostrou a imagem de AFM do sistema NPSC, destacando o filme produzido a partir da suspensão da formulação sem a presença de nanopartículas. No entanto, ficam evidentes os fragmentos das nanopartículas dispersos pelo filme, ainda mais evidentes no mapa de topografia (**Figura 21(b)**), sugerindo desestabilização por ruptura. Esse fato pode resultar, inclusive, na sedimentação das nanopartículas (HOMS et al., 2018). O odor dos sistemas em relação à formulação controle manteve-se intensamente modificado nos sistemas NPSC, NPBS, NPED e NPMI. Somente os sistemas NPNE e NPTI não apresentaram alteração de cor e de odor, além de não apresentarem corpo de fundo associado às nanopartículas desestabilizadas.

#### 5.4.3. Estabilidade de prateleira a 25 °C e 35 °C

A estabilidade em prateleira a 25 °C foi realizada somente para os sistemas NPNE e NPTI pois foram aqueles que apresentaram os melhores resultados durante o ensaio de estabilidade sob manipulação constante. Durante a avaliação de prateleira, a estabilidade dos sistemas NPNE e NPTI foi comparada com o sistema NPSC. Os resultados estão apresentados na **Tabela 3**.

A avaliação foi realizada para cada sistema até que a EE dos mesmos atingisse 70%. O sistema NPNE manteve-se estável por 210 dias considerando suas propriedades organolépticas sem alteração (SA). Nesse período, a EE apresentou redução de 14% [(de  $98 \pm 2$  % para  $84 \pm 1$  %)], com pH final de  $(7,40 \pm 0,09)$ , turbidez igual a  $(50 \pm 2)$  NTU e condutividade elétrica próxima a  $(1532 \pm 4)$

$\mu\text{S/cm}$ . Na sequência, entre 210 e 270 dias esse sistema passou a apresentar propriedades organolépticas levemente alteradas (LA), atingindo  $EE = (70 \pm 1) \%$  após 270 dias de avaliação.

**Tabela 3.** Estabilidade em prateleira dos sistemas NPNE, NPTI e NPSC avaliada a  $25^\circ\text{C}$  a cada 30 dias.

Sistemas	Tempo (dias)	EE (%)	Condutividade Elétrica ( $\mu\text{S/cm}$ )	Turbidez (NTU)	pH	Cor	Odor
NPNE	0	(98 $\pm$ 2)	(1043 $\pm$ 2)	(40 $\pm$ 1)	(8,00 $\pm$ 0,02)	SA	SA
	30	(98 $\pm$ 2)	(1140 $\pm$ 3)	(40 $\pm$ 2)	(8,00 $\pm$ 0,03)	SA	SA
	60	(97 $\pm$ 1)	(1204 $\pm$ 4)	(42 $\pm$ 3)	(7,90 $\pm$ 0,04)	SA	SA
	90	(95 $\pm$ 2)	(1301 $\pm$ 3)	(45 $\pm$ 2)	(7,80 $\pm$ 0,06)	SA	SA
	120	(90 $\pm$ 2)	(1400 $\pm$ 4)	(45 $\pm$ 2)	(7,70 $\pm$ 0,06)	SA	SA
	150	(89 $\pm$ 2)	(1450 $\pm$ 3)	(46 $\pm$ 3)	(7,60 $\pm$ 0,07)	SA	SA
	180	(85 $\pm$ 2)	(1500 $\pm$ 3)	(48 $\pm$ 2)	(7,50 $\pm$ 0,08)	SA	SA
	<b>210</b>	<b>(84 <math>\pm</math> 1)</b>	<b>(1532 <math>\pm</math> 4)</b>	<b>(50 <math>\pm</math> 2)</b>	<b>(7,40 <math>\pm</math> 0,09)</b>	<b>SA</b>	<b>SA</b>
	240	(80 $\pm$ 1)	(1580 $\pm$ 6)	(53 $\pm$ 2)	(7,3 $\pm$ 0,1)	LA	LA
270	(70 $\pm$ 1)	(1630 $\pm$ 7)	(55 $\pm$ 2)	(7,1 $\pm$ 0,1)	LA	LA	
NPTI	0	(98 $\pm$ 3)	(856 $\pm$ 2)	(40 $\pm$ 3)	(8,00 $\pm$ 0,02)	SA	SA
	30	(95 $\pm$ 2)	(1000 $\pm$ 4)	(41 $\pm$ 1)	(7,70 $\pm$ 0,02)	SA	SA
	60	(90 $\pm$ 4)	(1121 $\pm$ 4)	(44 $\pm$ 2)	(7,50 $\pm$ 0,04)	SA	SA
	90	(85 $\pm$ 4)	(1203 $\pm$ 5)	(47 $\pm$ 2)	(7,20 $\pm$ 0,04)	SA	SA
	<b>120</b>	<b>(80 <math>\pm</math> 2)</b>	<b>(1342 <math>\pm</math> 5)</b>	<b>(48 <math>\pm</math> 1)</b>	<b>(7,00 <math>\pm</math> 0,02)</b>	<b>SA</b>	<b>SA</b>
	150	(75 $\pm$ 2)	(1389 $\pm$ 6)	(50 $\pm$ 3)	(6,80 $\pm$ 0,03)	LA	LA
	180	(72 $\pm$ 2)	(1409 $\pm$ 7)	(55 $\pm$ 4)	(6,50 $\pm$ 0,03)	LA	LA
	210	(70 $\pm$ 2)	(1500 $\pm$ 10)	(60 $\pm$ 5)	(5,90 $\pm$ 0,03)	LA	LA
NPSC	<b>0</b>	<b>(98 <math>\pm</math> 2)</b>	<b>(800 <math>\pm</math> 2)</b>	<b>(40 <math>\pm</math> 3)</b>	<b>(8,00 <math>\pm</math> 0,03)</b>	<b>SA</b>	<b>SA</b>
	30	(90 $\pm$ 2)	(1100 $\pm$ 2)	(50 $\pm$ 7)	(7,00 $\pm$ 0,03)	LA	LA
	60	(70 $\pm$ 2)	(1500 $\pm$ 9)	(60 $\pm$ 5)	(5,40 $\pm$ 0,03)	LA	LA

**Legenda:** SA: Sem Alteração; LA: Levemente Alterado. Os erros foram determinados a partir do desvio padrão obtido pela média ponderada de medidas em triplicata.

O sistema NPTI manteve-se estável por 120 dias considerando suas propriedades organolépticas sem alteração (SA). Nesse período, a EE apresentou redução de 18% [(de  $(98 \pm 3) \%$  para  $(80 \pm 2) \%$ ], com pH final de  $(7,00 \pm 0,02)$ , turbidez igual a  $(48 \pm 1)$  NTU e condutividade elétrica próxima a  $(1342 \pm 5) \mu\text{S/cm}$ . Na sequência, entre 150 e 210 dias esse sistema passou a apresentar propriedades organolépticas levemente alteradas (LA), atingindo  $EE = (70 \pm 2) \%$  após 210 dias de avaliação.

Considerando a avaliação mensal, o sistema NPSC manteve-se estável somente no primeiro dia de análise, quando apresentou propriedades organolépticas sem alteração (SA),  $EE = (98 \pm 2) \%$ , pH próximo a  $(8,00 \pm 0,03)$ , turbidez igual a  $(40 \pm 3)$  NTU e condutividade elétrica próxima a

( $800 \pm 2$ )  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Após 30 dias, esse sistema já apresentou propriedades organolépticas levemente alteradas (LA), atingindo EE = ( $70 \pm 2$ ) % após 60 dias de avaliação.

A variação de pH, turbidez e condutividade elétrica dos sistemas NPNE, NPTI e NPSC seguem os mesmos critérios descritos nos itens 5.4.2.2 e 5.4.2.1, e estão relacionados diretamente à diminuição da EE em função do tempo de análise devido à gradativa desestabilização das nanopartículas por ruptura provavelmente devido à ação de microrganismos (GOODWIN, 2004). É possível notar na **Tabela 3** que, para todos os sistemas, os valores de condutividade elétrica foram aumentados ao longo do tempo tanto pela exposição do óleo essencial no meio (rico em moléculas contendo sítios eletronegativos) (SILVA et al., 2020), quanto pela desestabilização das nanopartículas, desencadeando possíveis reações que resultam em elétrons livres (SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2002). Em contrapartida, os valores de pH diminuíram ao longo do tempo para todos os sistemas. Esse fato se dá tanto pela exposição de óleo essencial na formulação, quanto pela tendência de as cargas superficiais atingirem o ponto isoelétrico (tendência ao pH = 4) devido à desestabilização das nanopartículas. Os valores de turbidez apresentaram leves alterações ao longo do tempo, as quais estão possivelmente relacionadas à desestabilização das formulações por ruptura, modificando a concentração das nanopartículas no sistema coloidal (MCCLEMENTS, 2016) e interferindo em sua turbidez.

Os dados da avaliação em prateleira mostram que a preservação desses sistemas das adversidades externas contribuiu para a melhor ação dos conservantes. Os resultados sugerem o sistema NPNE como o mais estável, podendo atingir 210 dias de armazenamento a 25 °C em frasco transparente (no caso da avaliação sob manipulação constante, a estabilidade alcançou 120 dias). O sistema NPTI também apresentou boa estabilidade em prateleira, podendo atingir 120 dias de armazenamento a 25 °C em frasco transparente (no caso da avaliação sob manipulação constante, a estabilidade alcançou 105 dias). Esses resultados nos levam a sugerir que a ação e eficiência dos conservantes NE e timol foram primordiais para retardar a desestabilização das formulações, mesmo ambos os sistemas estando sujeitos à ação de microrganismos e biodegradação natural. Sugere-se que

a estabilidade prolongada para o sistema NPNE se dá pelo fato de o conservante conter substâncias combinadas (Fenoxietanol/2-Metil-2H-Isotiazolin-3-Ona) que apresentam amplo espectro de ação antimicrobiana, atuando contra fungos e bactérias tanto gram-positivas quanto gram-negativas. O fenoxietanol é um composto orgânico solúvel em água, e sua associação com a 2-Metil-2H-Isotiazolin-3-Ona, um composto orgânico heterocíclico hidrofílico, que pode ter potencializado sua ação (ALVAREZ-RIVERA et al., 2012; DAULISIO; SCHNEIDER, 2020; MARDONES et al., 2018; PUSCHMANN; HERBIG; MÜLLER-GOYMANN, 2018). No entanto, para o sistema contendo apenas o timol como conservante (um composto orgânico também com eficácia para diversos microrganismos) (PANDEY et al., 2021; PE; ROMANELLI; BLUSTEIN, 2020), sugere-se que este tenha perdido eficiência ao longo das avaliações devido à baixa estabilidade quando exposto ao ambiente e baixa solubilidade em meio aquoso, além de ser uma substância volátil (ASPREA et al., 2017; LIOLIOS et al., 2009).

A estabilidade em prateleira a 35 °C também foi realizada para os sistemas NPNE e NPTI a fim de avaliar o comportamento desses sistemas durante o armazenamento em temperaturas mais elevadas, como por exemplo as que se dão no Estado do Amazonas. Durante a avaliação de prateleira a 35 °C, a estabilidade dos sistemas NPNE e NPTI foi comparada com a do sistema NPSC. Os resultados estão apresentados na **Tabela 4**.

A avaliação foi realizada para cada sistema até que a EE dos mesmos atingisse 70%. O sistema NPSC atingiu EE abaixo desse valor logo na primeira avaliação após 30 dias. Considerando a avaliação mensal, o sistema NPSC manteve-se estável somente no primeiro dia de análise ( $t = 0$ ), quando apresentou propriedades organolépticas sem alteração (SA), EE de  $(98 \pm 2) \%$ , pH próximo a  $(8,00 \pm 0,03)$ , turbidez igual a  $(40 \pm 3)$  NTU e condutividade elétrica próxima a  $(800 \pm 2)$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Após 30 dias, esse sistema passou a apresentar propriedades organolépticas intensamente alteradas (IA), atingindo EE =  $(50 \pm 2) \%$ .

O sistema NPNE manteve-se estável por 90 dias considerando suas propriedades organolépticas sem alteração (SA). A estabilidade a 35 °C, portanto, foi menor que a observada a 25 °C (210 dias). Após 90 dias a 35 °C, a EE do sistema NPNE apresentou redução de 25% [(de  $(98 \pm 2) \%$  para

(73 ± 2) %], com pH final de (7,00 ± 0,08), turbidez igual a (49 ± 2) NTU e condutividade elétrica próxima a (1070 ± 3) μS/cm. Os valores finais de pH, turbidez e condutividade elétrica finais foram similares aos observados na avaliação a 25 °C. Apenas o valor da condutividade elétrica observada a 35 °C [(1070 ± 3) μS/cm] foi inferior ao observado a 25 °C [(1532 ± 4) μS/cm] após 210 dias provavelmente devido à influência da mais elevada temperatura (SANT'ANNA, 2013). Na sequência, entre 90 e 120 dias, esse sistema passou a apresentar propriedades organolépticas levemente alteradas (LA), atingindo EE = (70 ± 2) % após 120 dias de avaliação.

**Tabela 4.** Estabilidade em prateleira dos sistemas NPNE, NPTI e NPSC avaliada a 35 °C a cada 30 dias.

Sistemas	Tempo (dias)	EE (%)	Condutividade Elétrica (μS/cm)	Turbidez (NTU)	pH	Cor	Odor
NPNE	0	(98 ± 2)	(1043 ± 5)	(40 ± 1)	(8,00 ± 0,02)	SA	SA
	30	(90 ± 2)	(1043 ± 4)	(42 ± 3)	(7,90 ± 0,03)	SA	SA
	60	(78 ± 2)	(1060 ± 4)	(45 ± 3)	(7,70 ± 0,06)	SA	SA
	<b>90</b>	<b>(73 ± 2)</b>	<b>(1070 ± 3)</b>	<b>(49 ± 2)</b>	<b>(7,00 ± 0,08)</b>	<b>SA</b>	<b>SA</b>
	120	(70 ± 2)	(1080 ± 5)	(50 ± 3)	(6,50 ± 0,05)	LA	LA
NPTI	<b>0</b>	<b>(98 ± 2)</b>	<b>(856 ± 2)</b>	<b>(40 ± 3)</b>	<b>(8,00 ± 0,02)</b>	<b>SA</b>	<b>SA</b>
	30	(70 ± 4)	(1621 ± 4)	(70 ± 2)	(5,00 ± 0,04)	IA	IA
NPSC	<b>0</b>	<b>(98 ± 2)</b>	<b>(800 ± 2)</b>	<b>(40 ± 3)</b>	<b>(8,00 ± 0,03)</b>	<b>SA</b>	<b>SA</b>
	30	(50 ± 2)	(1550 ± 4)	(70 ± 7)	(5,00 ± 0,03)	IA	IA

**Legenda:** SA: Sem Alteração; LA: Levemente Alterado; IA: Intensamente Alterado. Os erros foram determinados a partir do desvio padrão obtido pela média ponderada de medidas em triplicata.

O sistema NPTI manteve-se estável somente na primeira leitura em t = 0. Após 30 dias de avaliação, EE apresentou redução de 28% [(de (98 ± 3) % para (70 ± 4) %], com pH final de (5,00 ± 0,04), turbidez igual a (70 ± 2) NTU e condutividade elétrica próxima a (1621 ± 4) μS/cm. Além disso, após 30 dias esse sistema apresentou propriedades organolépticas intensamente alteradas (IA). Portanto, a estabilidade a 35 °C (entre 0 e 30 dias) foi menor que a observada a 25 °C (120 dias).

Conclui-se, portanto, que a influência da temperatura durante o armazenamento a 35 °C foi significativa para a desestabilização das formulações. Foi observada a redução de tempo de vida nos sistemas NPNE (de 210 dias a 25 °C para 90 dias a 35 °C) e NPTI (de 120 dias a 25 °C para 0 dias a 35 °C). Sugere-se que o aumento da temperatura pode ter influenciado a ação dos conservantes, diminuindo seu tempo de atuação e resultando em um período menor de estabilidade quando os

sistemas foram armazenados a 35 °C. A diferença de estabilidade atribuída ao NPNE e NPTI pode ser explicada pelo fato de os componentes dos conservantes apresentarem diferenças quanto a volatilidade, solubilidade e ação em função da temperatura. Em maiores temperaturas o timol, além de sua baixa solubilidade, tende a ser eliminado do sistema mais facilmente, deixando a formulação mais desprotegidas ao longo do tempo. No caso da estabilidade em prateleira, os frascos permaneceram vedados durante toda a análise, sugerindo que o timol pode ter sido influenciado pela ação da temperatura (ASPREA et al., 2017). Já no NPNE os componentes acabam interagindo mais fortemente com a formulação mantendo-a por mais tempo protegida de possíveis microrganismos degradadores, mas tendo sua ação comprometida em parte pela ação da temperatura (MARDONES et al., 2018; PUSCHMANN; HERBIG; MÜLLER-GOYMANN, 2018). Embora a literatura reporte que a gelatina pode sofrer desestabilização quando mantida por longos períodos em temperaturas elevadas (KCHAOU et al., 2019; LIU et al., 2017b), esse fato não foi observado nos ensaios de estabilidade: tanto a 25 °C quanto a 35 °C, o sistema NPSC sofreu desestabilização logo na primeira medida (t = 0).

Pelas razões descritas acima, podemos concluir:

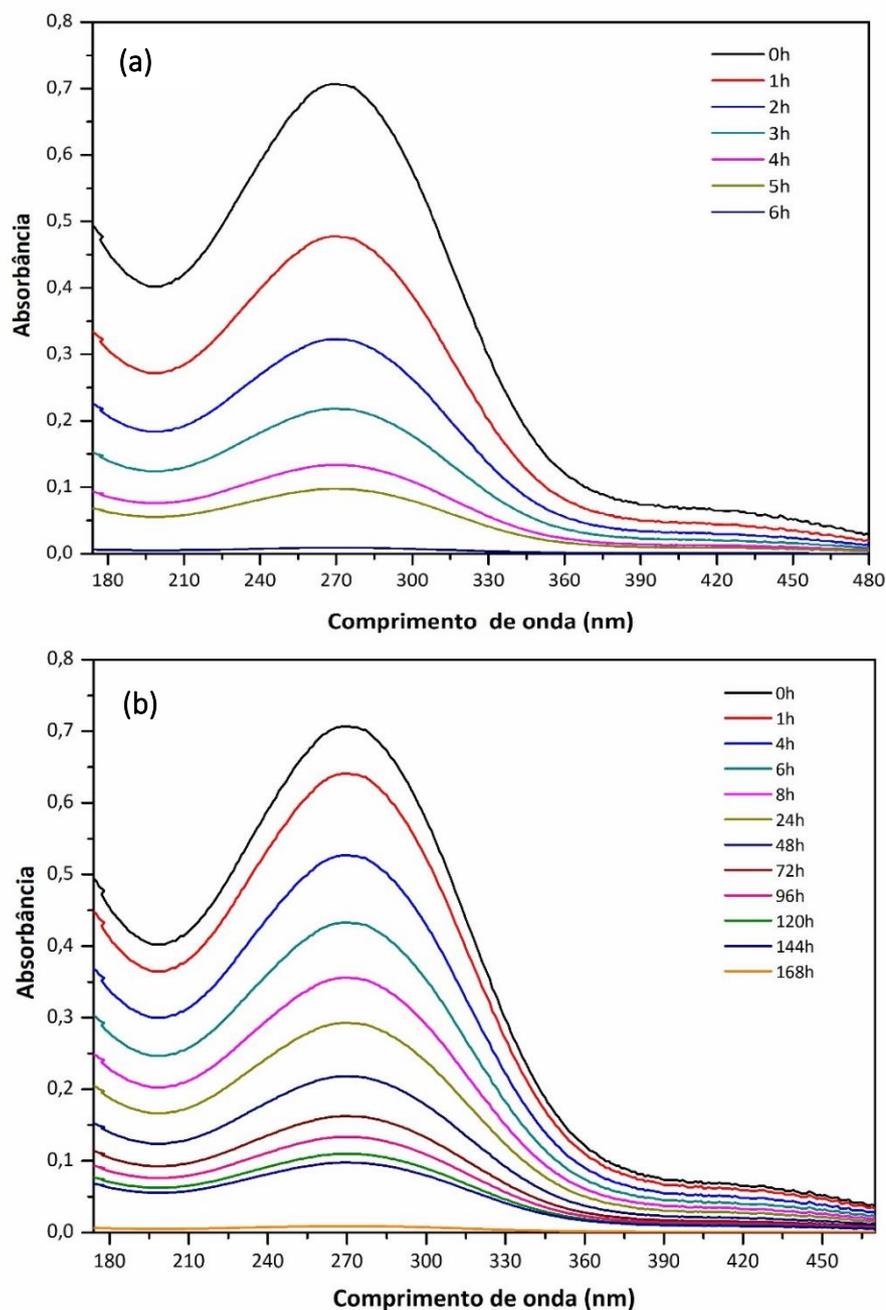
(i) Se as formulações forem armazenadas em locais com temperatura ambiente em torno de 25 °C, tanto o sistema NPNE quanto o NPTI poderiam ser abertos e utilizados em até 7 e 4 meses, respectivamente. Esse período mostrou que ambos os sistemas conseguem manter pelo menos 70% do óleo essencial encapsulado.

(ii) Se as formulações forem armazenadas em locais com temperatura mais elevada, em torno de 35 °C, somente o sistema NPNE poderia ser aberto e utilizado (em até 3 meses), uma vez que o sistema NPTI não apresentou estabilidade nessa temperatura. Esse período mostrou que o sistema NPNE manteve pelo menos 70% do óleo essencial encapsulado.

#### **5.4.4. Fotoestabilidade**

A fotoestabilidade do sistema encapsulado foi avaliada frente à influência da luz ultravioleta ( $\lambda = 274$  nm) para entendermos o papel dos carreadores na proteção do óleo essencial

contra os raios solares, avaliando também a possibilidade de aplicação desta formulação em meio ambiente. Os resultados da avaliação de fotoestabilidade estão apresentados a seguir. A **Figura 24(a)** mostra a variação da absorbância do óleo essencial *in natura* da *P. nigrum* em função do tempo de exposição à radiação ultravioleta, variando de 0 a 6 h de exposição. A **Figura 24(b)** mostra a variação da absorbância do sistema encapsulado em função do tempo de exposição à radiação ultravioleta, variando de 0 a 168 h.



**Figura 24.** (a) Fotodegradação do óleo essencial *in natura* da *P. nigrum* e (b) do óleo essencial encapsulado no sistema NPNE.

A **Figura 24(a)** mostra que, no tempo  $t = 0$ , o óleo essencial apresentou absorvância correspondente à concentração absoluta de 500  $\mu\text{g/mL}$  e  $EE = (98 \pm 2) \%$ . Com o aumento do tempo de exposição foi nítida a diminuição da absorvância. Essa diminuição pode ser resultante da fotodegradação do óleo essencial, uma vez que o mesmo foi mantido em frasco vedado durante todo o experimento para evitar sua evaporação para o meio externo. Após 6 h de exposição, verificou-se a degradação total do óleo essencial. Comparativamente, o óleo essencial *in natura* mantido protegido da radiação (frasco controle) apresentou degradação inferior a 5 %.

Em geral, os óleos essenciais são instáveis na presença de oxigênio, luz, calor, umidade e metais, sofrendo inúmeras reações de degradação. Essa instabilidade às condições externas dificulta sua conservação, fazendo com que o seu processo de armazenamento seja fundamental para a manutenção de sua qualidade e bioatividades (TUREK; STINTZING, 2013).

Uma das notáveis desvantagens do uso de produtos naturais nas mais variadas aplicações está relacionada à sua elevada degradação. Para superar essa barreira, sugere-se o emprego da técnica de encapsulação, garantindo maior proteção contra o meio externo. A encapsulação permite, inclusive, a proteção de óleos essenciais contra a fotodegradação (KAH; HOFMANN, 2014): a luz ultravioleta pode alterar as propriedades físicas e químicas dos óleos essenciais, podendo modificar suas atividades biológicas (GUIMARÃES et al., 2008; TUREK; STINTZING, 2013).

(LOBO; CIPRIANO; ROSA, 2014) avaliaram o comportamento fotoquímico do óleo essencial de tomilho através de espectroscopia UV-Vis. Os autores verificaram a fotossensibilidade do óleo essencial através das absorvâncias: os valores observados diminuíram com o aumento do tempo de incidência de radiação nos óleos essenciais. Dessa forma, concluiu-se que a radiação promoveu a degradação dos componentes químicos do óleo essencial. (TUREK; STINTZING, 2013) reportam que os óleos essenciais são extremamente fotossensíveis. A exposição à luz acelera as reações de degradação causando diminuição da massa dos componentes químicos.

A **Figura 24(b)** mostra os valores de absorvância do óleo essencial no sistema encapsulado. No tempo  $t = 0$ , o óleo essencial apresentou absorvância próximo à concentração

absoluta (500 µg/mL), uma vez que foi observada EE = (98 ± 2) %. Após 1 h de exposição não foram observadas alterações significativas. No entanto, após 24 h de exposição, o valor da absorbância diminuiu 2,5 vezes em relação a absorbância inicial. A maior degradação foi observada após 196 h, restando apenas 1,9 µg/mL de óleo essencial no sistema.

Os espectros de absorbância mostram que a concentração do óleo essencial ao longo do tempo diminuiu. Diferentemente da avaliação da fotoestabilidade do óleo essencial *in natura*, a fotoestabilidade do sistema encapsulado foi realizada em sistema aberto visando simular sua aplicação em meio ambiente, sob a ação da luz ultravioleta. Os dados obtidos mostram que a luz ultravioleta auxiliou na degradação das nanopartículas contendo óleo essencial, fazendo com que o mesmo fosse exposto ao meio externo. Como os sistemas estavam abertos, o óleo essencial liberado pela fotodegradação sofreu evaporação ao longo do tempo, facilitada principalmente pela sua densidade menor que a da água. Assim, possivelmente o óleo essencial exposto na formulação mantinha-se próximo à superfície, facilitando sua evaporação. É importante mencionar que algumas leituras tiveram intervalos de várias horas para serem realizadas, tornando possível a completa evaporação do óleo essencial exposto na formulação, levando em consideração que a evaporação do óleo possui uma velocidade maior que a velocidade de degradação das nanopartículas pela luz UV-Vis (TUREK; STINTZING, 2013). Dessa forma, é compreensível que toda leitura do ensaio de fotoestabilidade seja relacionada ao óleo essencial que permanecia encapsulado no sistema. Os resultados mostraram que os carreadores PCL/gelatina protegeram o óleo essencial por um período de 7 dias. Comparativamente, o óleo essencial encapsulado e protegido da radiação (frasco controle) apresentou degradação inferior a 5 %.

(CHRISTOFOLI et al., 2015) avaliaram a degradação do óleo essencial de *Z. rhoifolium in natura* e encapsulado em nanopartículas de PCL. De acordo com os autores, após 7 h de exposição à luz UV-Vis, o óleo essencial *in natura* sofreu uma degradação de 94,33%, enquanto o óleo essencial encapsulado degradou 44,76% no mesmo intervalo de tempo. O controle foi mantido no mesmo ambiente e ao abrigo da luz, apresentando uma degradação 4,04% após 7 h.

(PEREIRA et al., 2018) encapsularam o óleo essencial de *Z. riedelianum* e avaliaram também a fotoestabilidade do óleo essencial não encapsulado. Após 9 h de exposição à radiação UV-Vis, o óleo essencial livre e o encapsulado atingiram níveis de degradação de 76% e 43%, respectivamente. Estes resultados demonstram os importantes papéis desempenhados pelos carreadores na proteção do óleo essencial contra a fotodegradação pela luz UV-Vis.

A encapsulação protege os compostos ativos no óleo essencial de fatores ambientais que afetam suas estruturas moleculares. A radiação UV-Vis é capaz de quebrar ligações entre átomos de carbono de moléculas orgânicas, gerando radicais que aceleram a taxa de oxidação dos compostos (WILKIE, 2006). Este efeito pode ser minimizado ou retardado por polímeros de revestimento, tais como o PCL e a gelatina, uma vez que estes funcionam como uma barreira protetora, conduzindo a uma liberação lenta dos compostos adsorvidos na sua matriz polimérica à medida que se degradam pela ação da luz UV-Vis (PEREIRA et al., 2018).

Diante do exposto, podemos sugerir que o sistema encapsulado pode ser aplicado em locais onde ocorre a exposição à luz solar, pois a proteção e a liberação do óleo essencial irão ocorrer sob taxas controladas e, mesmo quando exposto, ainda leva algumas horas para dar início à degradação do óleo essencial *in natura* pela luz UV-Vis. Dessa forma, a luz ultravioleta pode agir, inclusive, como um agente de desestabilização do sistema (como sugerido na **Figura 6**), provocando a liberação do óleo essencial no meio. Considerando que a bioatividade de óleos essenciais (geralmente observada pelos valores de suas doses letais em 50% e 90%) (AYVAZ et al., 2010) é usualmente aferida após 24 h de aplicação, seria então conveniente sugerir que o sistema encapsulado possa ser aplicado na ausência de luz ultravioleta, como por exemplo, em períodos noturnos. Essa sugestão vai de encontro ao fato de que, após 1 h de exposição do óleo essencial *in natura* na luz ultravioleta, observou-se o valor de absorvância reduzido pela metade em comparação ao tempo inicial. Alguns trabalhos publicados também mostram a influência da luz na fotodegradação do óleo essencial (CHRISTOFOLI et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2008; PEREIRA et al., 2018; WILKIE, 2006) reforçando a ideia de aplicação no período de ausência de luz solar.

## 5.5. Liberação controlada

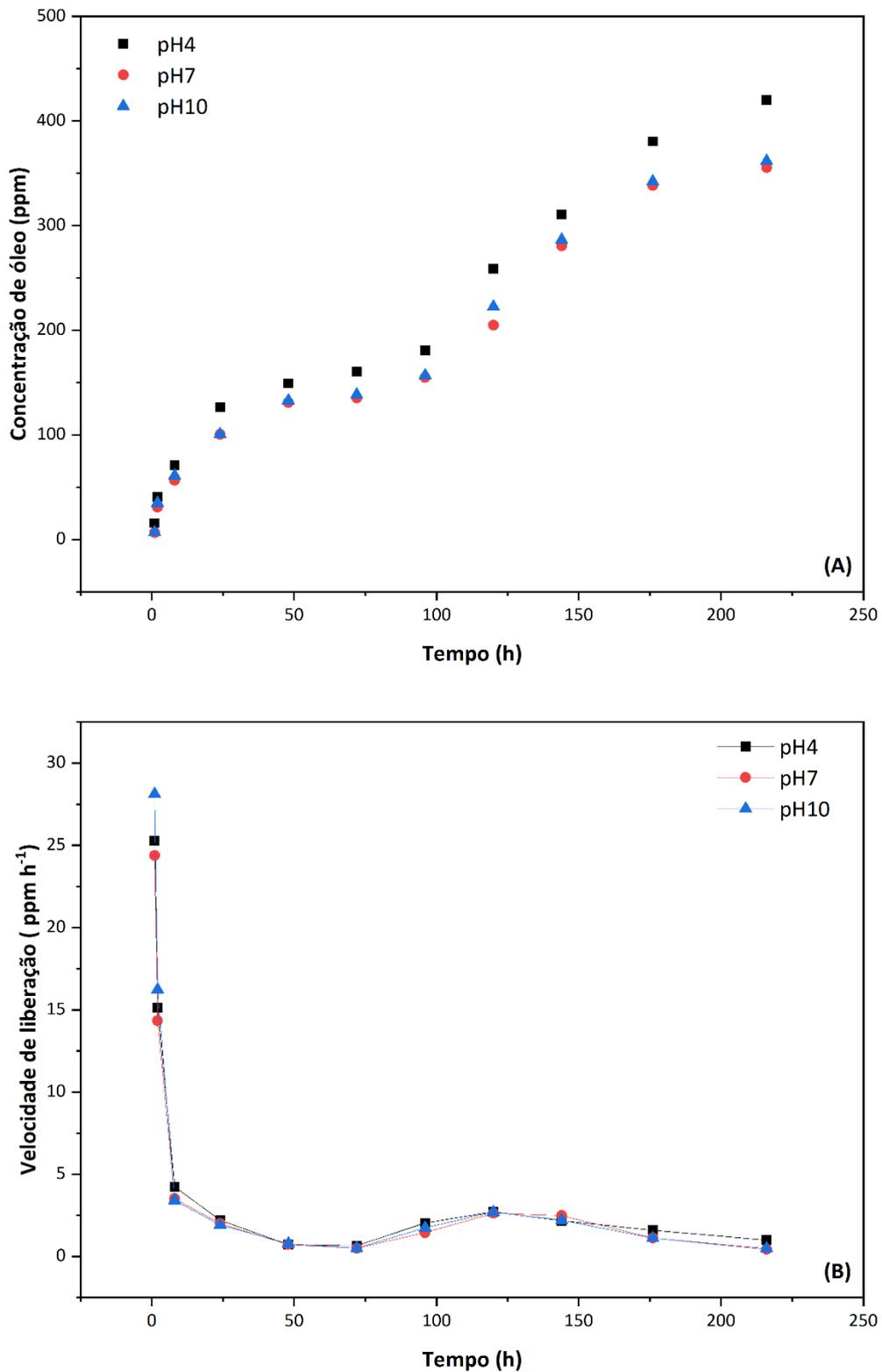
Neste tópico estão apresentados os resultados dos ensaios de liberação controlada do óleo essencial da *P. nigrum* encapsulado, bem como a avaliação das curvas de liberação e suas correlações com modelos matemáticos, de modo a propor o mecanismo de liberação mais adequado para o sistema NPNE. Esse sistema foi o escolhido para os ensaios de liberação controlada, uma vez que foi o sistema que apresentou estabilidade tanto a 25 °C quanto a 35 °C.

As curvas de liberação controlada do óleo essencial em pH 4, 7 e 10 e a derivada dessas curvas estão apresentadas na **Figura 25**. Considerando-se os diferentes pH, as curvas de liberação controlada mostram claramente duas situações de liberação do óleo essencial: (i) o comportamento do sistema em pH ácido (pH = 4) difere do comportamento em (ii) pH neutro e básico (pH = 7 e 10), sendo que a concentração de óleo essencial liberada em pH ácido foi sempre ligeiramente maior que aquelas liberadas em pH neutro e básico.

Além disso, ficou evidente que a liberação do óleo essencial pode ser considerada gradativa durante todo o tempo de avaliação, mas acontece significativamente em dois momentos: (i) a velocidade de liberação do óleo essencial se inicia em aproximadamente 27 ppm/h e vai diminuindo até atingir 3 ppm/h nas primeiras 10 h. A partir daí, a velocidade de liberação tornou-se mais lenta até atingir aproximadamente 75 h (atingindo 1 ppm/h). A partir de 75 h, observou-se um segundo momento de liberação controlada: (ii) a velocidade de liberação voltou a aumentar (entre 75 h e 175 h, atingindo o pico máximo de 3 ppm/h) e, em seguida, voltou a diminuir. Todas as curvas apresentaram essas mesmas características, independente da influência do pH.

O ensaio foi realizado por 225 h e a concentração total de óleo essencial liberada foi de [(420 ± 2) µg/mL; 86% de óleo essencial liberado] em pH ácido, [(355 ± 3) µg/mL; 72% de óleo essencial liberado] em pH neutro e [(362 ± 2) µg/mL; 74% de óleo essencial liberado] em pH básico, confirmando a maior quantidade de óleo essencial liberada em pH ácido. Esse fato pode ser explicado pela maior tendência à desestabilização do sistema em pH ácido: conforme a avaliação do potencial

zeta, quanto mais próximo o sistema estiver do pH = 8, mais estável ele será. É neste pH que o sistema apresentou maior carga superficial, garantindo sua estabilidade enquanto sistema coloidal.



**Figura 25.** (a) Ensaio de liberação controlada do óleo essencial da *P. nigrum* em pH 4, 7 e 10 e (b) derivada das curvas de liberação controlada.

Os perfis das curvas de liberação são importantes para a proposição de mecanismos de liberação. Curvas com essas características, onde existem momentos distintos de maiores concentrações de óleo essencial liberadas (entre 0 e 75 h, e entre 75 h e 175 h), sugerem sistemas que apresentam mecanismos de liberação conhecidos como liberação pulsada (KIKUCHI et al., 1997; ZHANG; ZHANG; WU, 2003). Este tipo de liberação geralmente está relacionado aos sistemas encapsulantes multicamadas, onde provavelmente o ativo encapsulado se localiza em diferentes partes das nanopartículas que, após se romperem em diferentes momentos, liberam porções do ativo. Ainda, esse mecanismo de liberação depende das características químicas dos materiais carreadores e do *design* das nanopartículas que, em contato com a água (de diferentes pH) durante os ensaios de liberação, tenderam a se solubilizar em tempos diferentes, por serem materiais diferentes que constituem cada camada. Esse resultado era esperado uma vez que o sistema proposto é formado por dois diferentes carreadores, gelatina e PCL, que possuem comportamentos químicos distintos quando em contato com a água, especialmente relacionados à solubilidade e capacidade de hidratação (LI et al., 2012; YASMIN et al., 2017).

Vários estudos focam na produção de nanopartículas a base de gelatina devido às suas características bioquímicas, principalmente como carreadoras de fármacos e medicamentos. Além disso, diferentes *designs* vêm sendo propostos visando propriedades específicas para os sistemas desenvolvidos, inclusive adicionando mais de uma camada (AZIMI et al., 2013; EL-ASSAL, 2016; LIU; LIU; WANG, 2012; NAIDU; PAULSON, 2011; SABET et al., 2017; YASMIN et al., 2017; YOUNG et al., 2005).

Observando a **Figura 25(a)** ficam evidentes dois momentos distintos relacionados ao aumento da concentração de óleo essencial liberado. O primeiro momento, que aconteceu entre  $t = 0$  e  $t = 75$  h, pode estar associado à hidratação da camada mais externa das nanopartículas formada por gelatina. Esse dado corrobora com a rápida velocidade de liberação (27 ppm/h) logo no início do ensaio. Conforme o *design* projetado para o desenvolvimento dos sistemas, o carreador gelatina configura a camada mais externa das nanopartículas. Essa camada, ao entrar em contato com a água

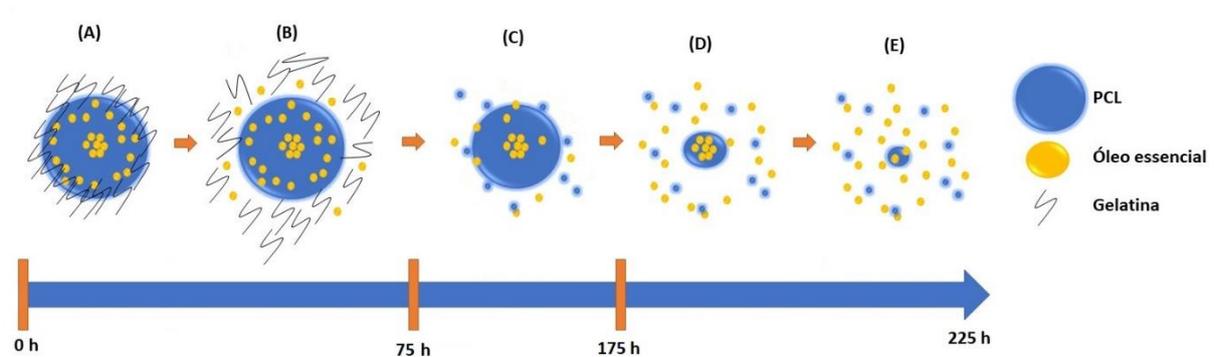
do ensaio de liberação, tornou-se mais hidratada e túrgida (além de estar mais solubilizada), possivelmente aumentando os poros da camada externa e expondo o óleo essencial (YASMIN et al., 2017). Como a gelatina representa a camada mais externa das nanopartículas e é altamente solúvel em água (GHASEMISHAHRESTANI et al., 2015), ela passou a ser rapidamente solubilizada (iniciando o processo de liberação com velocidade superior a 25 ppm/h).

Como foram observados claramente dois momentos de aumento de concentração de óleo essencial liberado, separados por um período de liberação praticamente nula (entre 50 e 75 h), sugere-se que a primeira concentração de óleo essencial liberada (aproximadamente 150 µg/mL) estava localizada na interface das camadas de PCL e gelatina. A proposição de que parte do óleo essencial estava encapsulado nesta interface é suportada pelo segundo momento da liberação controlada, que acontece a partir de 75 h: essa segunda concentração liberada pode estar relacionada à quantidade de óleo essencial encapsulada no carreador PCL. Este carreador, menos solúvel em água quando comparado com a gelatina (GRILLO et al., 2012b), passou a ser solubilizado quando exposto ao meio aquoso a partir da solubilização da gelatina.

De acordo com a curva de liberação, essa provável solubilização do PCL acontece a partir de 75 h, mas é muito mais bem observado entre 75 h e 175 h, quando é visível um segundo aumento da concentração de óleo essencial liberada. A partir de 175 h não foi observada concentração considerável de óleo essencial liberada.

A partir de 75 h de liberação, pela solubilização do PCL em processo, o óleo essencial mais interno neste carreador passou a ser liberado no meio, resultando em aproximadamente 150-200 µg/mL de óleo essencial liberado (a depender do pH). As curvas de liberação trouxeram informações novas para a proposição do *design* das nanopartículas desenvolvidas. O perfil de liberação em todos os pH sugere que parte do óleo essencial encapsulado foi liberada antes da solubilização do PCL, o que indica que o óleo essencial pode estar incorporado junto a este carreador, inclusive fazendo parte de sua superfície externa. Essa informação se dá ao fato de ter sido observado o segundo momento de liberação controlada, a partir de 75 h.

A **Figura 26** mostra esquematicamente uma proposta especulativa da interpretação da liberação controlada a partir das curvas de liberação, associada ao *design* das nanopartículas (DA COSTA et al., 2021; GAUTAM; DINDA; MISHRA, 2013).



**Figura 26.** Diagrama esquemático da proposta especulativa da interpretação da liberação controlada associada ao *design* das nanopartículas em função do tempo.

A **Figura 26(a)** mostra a nanopartícula constituída por PCL, gelatina e óleo essencial. Nessa nanopartícula, como discutido anteriormente, o carreador gelatina constitui a camada mais externa. No entanto, como indicado nas curvas de liberação controlada, o óleo essencial pode estar distribuído juntamente às cadeias moleculares de PCL, tanto encapsulado mais internamente, quanto mais exposto e localizado na interface PCL/gelatina.

A **Figura 26(b)** propõe que, nas primeiras horas (e com elevada velocidade de liberação), a camada de gelatina passou por um processo de hidratação/solubilização, permitindo a liberação do óleo essencial encapsulado na interface PCL/gelatina.

Neste momento, podemos propor que também se dá o início da degradação do PCL, [**Figura 26(c)**]. Entre 50 h e 75 h, a concentração de óleo essencial liberada se manteve praticamente nula, uma vez que parte do óleo localizada na interface PCL/gelatina já havia sido liberada. Então, a segunda bicamada mais interna, formada pelo carreador PCL, começa a sofrer processo de degradação pela exposição em água: entre 75 h e 175 h se dá um novo pico de liberação de óleo essencial, sugerindo que o PCL atua também como encapsulante do óleo essencial em sua estrutura interna. Finalmente, a partir de 75 h [**Figura 26(d)**], observou-se o aumento da concentração de óleo essencial

liberado. Essa liberação seguiu um aumento gradativo da liberação de óleo essencial até 225 h, [Figura 26(e)].

A fim de termos mais indícios da possibilidade de o óleo essencial estar encapsulado juntamente à estrutura do PCL, foi realizada a medida de FTIR da solução (PCL + óleo essencial), a qual representa uma das etapas de síntese. Os espectros estão mostrados na Figura 27.

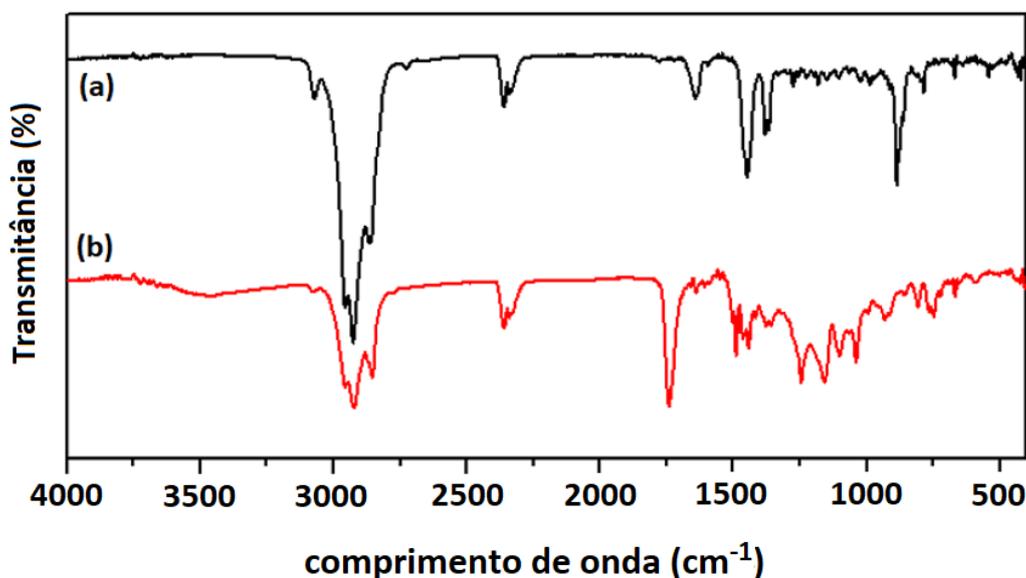


Figura 27. (a) Espectro de FTIR do óleo essencial da *P. nigrum* e (b) da fase orgânica contendo PCL e óleo essencial.

As bandas de absorção das fases individuais de óleo essencial e PCL já foram descritas anteriormente e identificadas, respectivamente, nas Figura 15(a) e Figura 15(b). No entanto, qualitativamente, a Figura 27 indica uma possível interação entre PCL e gelatina (fase orgânica) no momento da síntese do sistema coloidal. Bandas evidentes do óleo essencial (especialmente as bandas localizadas em  $1643\text{ cm}^{-1}$ ,  $1446\text{ cm}^{-1}$  e em  $863\text{ cm}^{-1}$ ) não foram mais verificadas na fase orgânica. Esses resultados mostram que essa interação pode favorecer a distribuição do óleo essencial em diferentes partes do núcleo de PCL, isto é, mais internamente. Além disso, novas bandas surgiram a partir dessa interação, como as localizadas em  $1720\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos da carbonila (C=O). A banda em  $1296\text{ cm}^{-1}$  é característica do estiramento de C–O e C–C. Além disso, foi observado o estiramento assimétrico em  $1238\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao C–O–C (DOUSTGANI et al., 2012) e bandas em 1000 a  $500\text{ cm}^{-1}$ , de difícil identificação, sugerindo uma interação química entre as fases PCL e óleo essencial.

Interações químicas entre carreadores e ativos a serem liberados foram reportadas anteriormente (BASTOS et al., 2020; GRILLO et al., 2012b; JIMÉNEZ et al., 2018; MAZZARINO et al., 2012; SILVA et al., 2011; ZANETTI et al., 2019). Dessa forma, sugere-se, finalmente, que no sistema bicamada desenvolvido, o óleo essencial tem uma interação química com o PCL no momento da síntese, possivelmente fazendo com que parte desse óleo essencial se localize em diferentes partes desse carreador (tanto mais internamente quanto na interface dos carreadores).

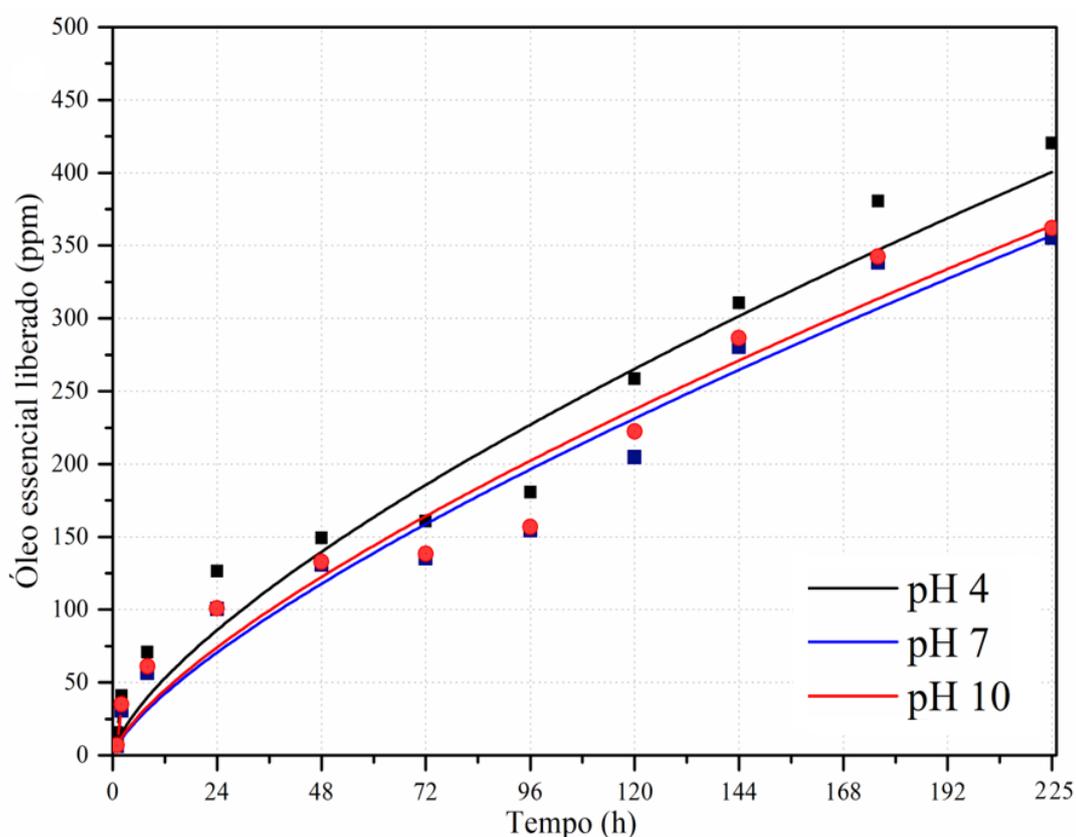
Com relação aos modelos teóricos de liberação (Korsmeyer-Peppas, Higuchi, 1ª ordem e ordem zero) (TAVARES et al., 2016), não foi possível associar o sistema NPNE a nenhum deles. Esse fato se dá, principalmente, porque esses modelos são aplicados a curvas exponenciais ou lineares de liberação (KARSA; STEPHENSON, 2005). Esses modelos teóricos não se enquadram nas liberações do tipo pulsada, que é o caso encontrado no sistema NPNE.

Para justificar esse fato, foram feitos os ajustes teóricos para quatro modelos: Korsmeyer-Peppas, Higuchi, 1ª ordem e ordem zero. A **Tabela 5** mostra os valores dos parâmetros cinéticos para esses modelos de liberação controlada. Estes parâmetros são utilizados quando não se conhece o mecanismo de liberação dos princípios ativos encapsulados, e então os valores de  $R^2$  podem ser indicativos para a escolha do melhor modelo de liberação (TAVARES et al., 2016). Segundo os dados da **Tabela 5**, o modelo que mais se adequaria à liberação controlada desse sistema é o de Korsmeyer-Peppas, com valores de  $R^2$  superiores a 0,98. A **Figura 28**, portanto, mostra a adequação desse modelo às curvas experimentais de liberação controlada.

Observa-se que o modelo de Korsmeyer-Peppas melhor ajustou os dados de liberação controlada (maior valor médio de  $R^2$ ), sendo um indicativo para uma possível proposição de mecanismo de liberação do óleo essencial. As curvas em linhas cheias representam os dados ajustados a partir dos valores de  $k \cdot t^n$ , sendo possível perceber que os valores experimentais se dispõem ao longo de cada curva ajustada através dos pontos experimentais e, apesar de resultados satisfatórios de  $R^2$ , nossos dados não corroboram com o modelo de liberação segundo Korsmeyer-Peppas (CHRISTOFOLI et al., 2015).

**Tabela 5.** Modelos e coeficientes de liberação controlada do óleo essencial.

Modelos	Coeficientes	pH		
		4	7	10
Korsmeyer-Peppas	K	9,30	6,78	7,42
	N	0,70	0,74	0,72
	R <sup>2</sup>	<b>0,99</b>	<b>0,98</b>	<b>0,98</b>
Higuchi	K	25,20	21,62	22,16
	R <sup>2</sup>	0,89	0,88	0,89
1ª Ordem	K	30,00	24,86	24,87
	R <sup>2</sup>	0,87	0,89	0,90
Ordem zero	K	2,09	1,80	1,84
	R <sup>2</sup>	0,85	0,83	0,87



**Figura 28.** Valores experimentais e ajustados segundo o modelo de Korsmeyer e Peppas para o estudo de liberação controlada em diferentes pH.

O coeficiente  $n$ , o qual está relacionado com o mecanismo de liberação do óleo essencial a partir da matriz polimérica (DE OLIVEIRA et al., 2019; SILVA et al., 2018), vem sendo amplamente usado para indicar os mecanismos de saída do princípio ativo do sistema encapsulado. No entanto, ao

observamos a **Figura 28** na região entre 75 h e 120 h, fica evidente que os pontos experimentais (tempo; concentração de óleo essencial liberado), não fazem parte da curva teórica ajustada segundo o modelo de Korsmeyer-Peppas. Esse fato pode ser facilmente explicado pois esses modelos preveem liberação controlada exponencial ou linear. Fica evidente, portanto, que o sistema NPNE caracteriza-se pela liberação controlada do tipo pulsada, uma vez que o ajuste teórico não foi satisfeito. Dessa forma, não foi possível associar a liberação do óleo essencial do sistema NPNE a nenhum modelo teórico, o que torna a interpretação da liberação e do *design* das nanopartículas um pouco mais complicada, desafiadora e subjetiva. Mesmo assim, a liberação pulsada torna-se um mecanismo interessante de liberação pois prevê diferentes concentrações de óleo essencial sendo liberadas em diferentes momentos, o que pode ser favorável para algumas aplicações ([PENHASI; GOMBERG, 2018](#); [SANCHEZ et al., 1996](#)).

## 6. CONCLUSÃO

A presente pesquisa desenvolveu um sistema de liberação controlada baseado em carreadores poliméricos biodegradáveis para encapsulação dos ativos naturais contidos no óleo essencial da espécie *P. nigrum*. A maior preocupação dessa pesquisa foi acompanhar o sucesso do encapsulamento (em torno de 98%) não só imediatamente após a síntese, mas por longos períodos para que, diferentemente da grande maioria dos trabalhos reportados, essa análise de estabilidade não se tornasse apenas momentânea, mas pudesse ser realizada de forma real ao longo do tempo, tentando entender os acontecimentos relacionados às suas desestabilizações gradativas.

A compreensão do comportamento dessas nanopartículas poliméricas durante armazenamento (manipulado ou em prateleira) representou parte das dificuldades encontradas nesta pesquisa. Além de não serem encontrados muitos trabalhos em literatura que pudessem nos direcionar, essas dificuldades também estiveram representadas pelo entendimento da estabilização das formulações como consequência do tamanho reduzido das partículas, do *design* sofisticado da interação bicamada de PCL e gelatina, do mecanismo de liberação pulsada do óleo essencial e da degradação gradativa dos sistemas possivelmente pela ruptura das nanopartículas. Ainda, muitas foram as variáveis encontradas para explicar tais rupturas, todas influenciando simultaneamente as formulações. As respostas para a maioria dos questionamentos acerca da estabilidade dos sistemas desenvolvidos só foram possíveis, em parte, pela combinação de diversas técnicas de análise e por interpretações, muitas vezes subjetivas, mas conclusivas. No entanto, associando as diversas informações encontradas aos inúmeros parâmetros influenciadores na estabilidade dos sistemas coloidais, foi possível propor um cenário razoável para essa compreensão, chegando pelo menos ao sistema NPNE com estabilidade satisfatória diante da proposta de aplicação enquanto biodefensivo agrícola.

Os maiores desafios dessa pesquisa e que ainda persistirão em avaliações futuras são (i) a elucidação da associação dos carreadores bicamadas dessas nanopartículas e de que forma eles efetivamente encapsulam e liberam o óleo essencial, visando a compreensão dos fatores que

influenciam o perfil de liberação, e (ii) a proposição de mecanismos concretos de desestabilização das formulações considerando o papel dos conservantes. Entretanto, algumas generalizações puderam ser assumidas com base na análise dos perfis das curvas de liberação em diferentes pH, e também na proposta genérica, porém convincente, da influência de microrganismos resultando na ruptura das nanopartículas e na exposição do óleo essencial na formulação. Estes mesmos fatores, somados à biodegradabilidade natural dos carreadores, influenciaram na dificuldade de estabilização bem como em um entendimento mais aprofundado (além do que foi reportado aqui) dos mecanismos de desestabilização.

De uma forma geral, a presente pesquisa permitiu diversos avanços, tanto no acúmulo de informações relativas aos fenômenos físico-químicos envolvidos, quanto em relação ao desenvolvimento de formulações de nanopartículas biodegradáveis mais estáveis, ampliando o cenário de pesquisas envolvendo o uso de conservantes em sistemas coloidais. No entanto, por se tratar de sistemas altamente biodegradáveis e propensos à ação de microrganismos, ficou claro que a ação de diferentes conservantes vai retardar esse efeito por diferentes períodos, mas não vai impedir que esse processo natural de biodegradabilidade persista nos sistemas de forma gradativa.

Com relação às viabilidades reais consideramos os sistemas mais estáveis (NPNE e possivelmente o NPTI) como biodefensivos alternativos, e acreditamos que essa possibilidade pode ser promissora por alguns fatores. O período em que estes sistemas se mantiveram estáveis os coloca numa posição de possível produto, considerando evidentemente que análises futuras (inclusive novos ensaios de estabilidade) precisam ser realizadas. No entanto, foram apresentados resultados interessantes relacionados à rugosidade das nanopartículas (característica promissora que garante aderência em superfície e contribui para a liberação do ativo) e com relação à concentração do óleo essencial liberada, mostrando que aproximadamente 86% do óleo essencial consegue deixar as nanopartículas e atingir o meio externo. Esse fato coloca o sistema desenvolvido num patamar de sucesso, uma vez que um dos principais requisitos para sistemas de liberação controlada é a liberação eficiente do ativo. Muitos sistemas podem apresentar elevada EE, mas no momento da liberação, o

ativo acaba ficando aderido aos carreadores por diversas razões que impedem sua saída, reduzindo sua ação.

De acordo com os resultados apresentados, consideramos que esta proposta de tese foi desenvolvida e concluída com sucesso. Nossa formulação de destaque, o sistema NPNE, poderá ser objeto de estudo em novas pesquisas a partir dos dados reportados nesse trabalho, contribuindo cada vez mais para que em algum momento ela possa, de fato, se tornar um produto alternativo. Esperamos que este trabalho também inspire pesquisadores a inserir nanotecnologia em produtos naturais e a continuarem desenvolvendo produtos alternativos, os quais sempre têm um papel de destaque por terem a proposta de substituir produtos que geralmente não estão sendo 100% benéficos ao homem e ao meio ambiente.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULAZEEZ, M. A. et al. Black pepper (*Piper nigrum* L.) oils. In: **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. 1. ed. Nigeria: Elsevier Inc., 2015. p. 277–285.
- ABOUTABL, E. A. et al. Composition and Bioactivity of Essential Oils from Leaves and Fruits of *Myrtus communis* and *Eugenia supraxillaris* (Myrtaceae) Grown in Egypt. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 14, n. 2, p. 192–200, jan. 2011.
- ABRIATA, J. P. et al. Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 96, n. November 2018, p. 347–355, 2019.
- ADAMS, R. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. USA: Carol Stream, 2010.
- AHMAD, H. et al. Antioxidative study of Cerium Oxide nanoparticle functionalised PCL-Gelatin electrospun fibers for wound healing application. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 2, p. 201–211, 2018.
- AHMAD, N. et al. Tropical Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, n. 12, p. 1–10, 2012.
- ALVAREZ-RIVERA, G. et al. Determination of isothiazolinone preservatives in cosmetics and household products by matrix solid-phase dispersion followed by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry &. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 41–50, 2012.
- ANVISA. RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 29, DE 1 DE JUNHO DE 2012. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 2012, p. 1–13, 2012.
- ANVISA, A. N. DE V. S. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. v. 1
- ARABPOUR, Z. et al. Design and characterization of biodegradable multi layered electrospun nanofibers for corneal tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 107, n. 10, p. 2340–2349, out. 2019.
- ASBAHANI, A. EL et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.
- ASPREA, M. et al. Thyme essential oil loaded in nanococheates: Encapsulation efficiency, in vitro release study and antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 497–502, 2017.
- AWASTHI, M. K. et al. Refining biomass residues for sustainable energy and bio-products: An assessment of technology, its importance, and strategic applications in circular bio-economy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 127, p. 1098, jan. 2020.
- AYVAZ, A. et al. Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects. **Journal of Insect Science (Tucson, AZ, United States)**, v. 10, p. No pp. given, 2010.

AZEVEDO, F. R. DE; FREIRE, F. DAS C. O. **Tecnologia de aplicação de defensivos agrícolas**. Disponível em: <<http://www.bibliotekevirtual.org/index.php/2013-02-07-03-02-35/livro/859-livros/978-85-68205-03-7/8124-ciencias-agrarias-tecnologias-e-perspectivas-11.html>>. Acesso em: 21 fev. 2019.

AZEVEDO, S. G. et al. Bioactivity of Licaria puchury-major Essential Oil Against *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Records of Natural Products**, v. 12, n. 3, p. 229–238, 2018.

AZIMI, B. et al. Producing gelatin nanoparticles as delivery system for bovine serum albumin. **Iranian Biomedical Journal**, v. 18, n. 1, p. 34–40, 2013.

AZIZ, S.; NAHER, S.; ROY, S. K. Comparative Studies on Physicochemical Properties and GC-MS Analysis of Essential Oil of the Two Varieties of the Black Pepper (*Piper nigrum* Linn.). **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, v. 2, n. 2, p. 67–70, 2012.

BAISHYA, H. Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets. **Journal of Developing Drugs**, v. 06, n. 02, p. 1–8, 2017.

BASTOS, L. P. H. et al. Encapsulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil with gelatin and sodium alginate by complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 102, n. September 2019, 2020.

BENELLI, G. et al. The essential oil from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products as an effective tool for insect pest management in organic crops. **Industrial Crops & Products**, v. 122, n. May, p. 308–315, 2018.

BENELLI, G. et al. Insecticidal efficacy of the essential oil of jambú (*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen) cultivated in central Italy against filariasis mosquito vectors, houseflies and moth pests. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, n. August 2018, p. 272–279, 2019.

BEZERRA, F. M. et al. Controlled release of microencapsulated citronella essential oil on cotton and polyester matrices. **Cellulose**, v. 23, n. 2, p. 1459–1470, 2016.

BILIA, A. R. et al. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 14, 2014.

BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistema de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1–12, 2016.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.

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

BRAVO CADENA, M. et al. Enhancing cinnamon essential oil activity by nanoparticle encapsulation to control seed pathogens. **Industrial Crops and Products**, v. 124, n. June, p. 755–764, 2018.

BRITO, G. F. et al. Biopolímero, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, p. 127–139, 2011.

CADONÁ, F. C. et al. Chapter 2 - Natural product-based nanomedicine: polymeric nanoparticles as delivery cargoes of food bioactives and nutraceuticals for anticancer purposes. In: SINGH, M. R. et al. (Eds.). . **Advances and Avenues in the Development of Novel Carriers for Bioactives and Biological Agents**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 37–67.

CAMPELO, M. DA S. et al. Clove essential oil encapsulated on nanocarrier based on polysaccharide: A strategy for the treatment of vaginal candidiasis. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 610, p. 125732, fev. 2021.

CAMPELO, P. H. et al. Stability of Lime Essential Oil Emulsion Prepared Using Biopolymers and Stability of Lime Essential Oil Emulsion Prepared Using Biopolymers and Ultrasound Treatment. n. May 2018, 2017.

CAMPELO, P. H. et al. Stability of lime essential oil microparticles produced with protein-carbohydrate blends. **Food Research International**, v. 105, n. December 2017, p. 936–944, 2018.

CARNEVALLI, D. B.; ARAÚJO, A. P. S. DE. Atividade biológica da pimenta preta (*Piper nigrum* L.): Revisão de literatura. **Uniciências**, v. 17, n. 1, p. 41–46, 2013.

CARPENA, M. et al. Essential Oils and Their Application on Active Packaging Systems: A Review. **Resources**, v. 10, n. 1, p. 7, jan. 2021.

CDC, C. FOR D. C. AND P. **Antibiotic resistance threats in the United States**. Disponível em: <<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>>. Acesso em: 17 jun. 2021.

CEBI, N. et al. An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. **Food Chemistry**, v. 190, p. 1109–1115, jan. 2016.

CEREMPEI, A.; MURESAN, E. I.; CIMPOESU, N. Biomaterials with controlled release of geranium essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 4, p. 267–273, 2014.

CHAAR, J. DA S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial espécie de Aniba duckei Kostermans**. São carlos: Universidade de São Paulo, 2000.

CHAN, Y. et al. Revolutionizing polymer-based nanoparticle-linked vaccines for targeting respiratory viruses : A perspective. v. 280, n. February, 2021.

CHENG, S.-S. et al. Chemical Composition and Mosquito Larvicidal Activity of Essential Oils from Leaves of Different *Cinnamomum osmophloeum* Provenances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4395–4400, jul. 2004.

CHRISTOFOLI, M. et al. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 301–308, 2015.

CLARINVAL, A. M.; HALLEUX, J. Classification of biodegradable polymers. In: SMITH, R. (Ed.). . **Biodegradable Polymers for Industrial Applications**. 1. ed. India: Elsevier, 2005. p. 3–31.

COLEMAN, M. M.; ZARIAN, J. Fourier-transform infrared studies of polymer blends. II. Poly( $\epsilon$ -caprolactone)–poly(vinyl chloride) system. **Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition**, v. 17, n. 5, p. 837–850, maio 1979.

COSTA, Í. C.; AZEVEDO, S. G.; SANCHES, E. A. Caracterização de nanopartículas poliméricas preenchidas com óleo essencial de Piper nigrum por microscopia de força atômica. **Matéria**, v. 26, n. 2, p. e12981, 2021.

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 America Journal of Pharmacy**, v. 29, n. March 2016, p. 2383, 2010.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. DE. **Óleos Essenciais e Química Fina** Química Nova Fortaleza-CE, nov. 1993.

CRIADO-GONZALEZ, M. et al. Local and controlled release of tamoxifen from multi (layer-by-layer) alginate/chitosan complex systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, p. 428–434, fev. 2019.

CZERNER, M. et al. Deformation and fracture behavior of physical gelatin gel systems. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 299–307, 2016.

D’AVILA, A. A. F. et al. Agrotóxicos Ou Defensivos Agrícolas: Estudo Bibliométrico Na Biblioteca Digital De Teses E Dissertações. **II Simpósio Internacional de Inovação em Cadeias Produtivas do Agronegócio**, p. 12, 2015.

DA COSTA, Í. C. et al. Microscopy-based infrared spectroscopy as a tool to evaluate the influence of essential oil on the surface of loaded bilayered-nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 32, n. 34, p. 345703, 2021.

DA SILVA, J. K. R. et al. Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 55–60, jul. 2014.

DAULISIO, M. DO C. Z.; SCHNEIDER, R. P. Inactivation of Pseudomonas aeruginosa MDC by isothiazolones and biocide stabilizing agents. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 155, n. November 2017, 2020.

DAZZI, A. et al. AFM-IR: Combining atomic force microscopy and infrared spectroscopy for nanoscale chemical characterization. **Applied Spectroscopy**, v. 66, n. 12, p. 1365–1384, 2012.

DE ÁVILA, L. G. et al. Formulações de atrazina em xerogéis: síntese e caracterização. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1727–1733, 2009.

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 OLIVEIRA, L. M. et al. Alternative Biodefensive based on the Essential Oil from Allium sativum Encapsulated in PCL/Gelatin Nanoparticles. **Journal of Food Engineering and Technology**, v. 8, n. 2, p.

65–74, 2019.

DE OLIVEIRA, L. M. et al. Evaluation of the nanoscale surface applied to biodegradable nanoparticles containing *Allium sativum* essential oil. **Materials Letters**, v. 275, p. 128111, 2020.

DONSÌ, F. et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 1908–1914, 2011.

DOUSTGANI, A. et al. Physical and chemical investigation of polycaprolactone, nanohydroxyapatite and poly (vinyl alcohol) nanocomposite scaffolds. **International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 172–175, 2012.

DURAN, N.; CAPPARELLI, M.; MORAES, C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Artliber, 2006.

DUTTA, D.; DAS, B. M. Scope of green nanotechnology towards amalgamation of green chemistry for cleaner environment: A review on synthesis and applications of green nanoparticles. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 15, n. November 2020, p. 100418, maio 2021.

EL-ASSAL, M. I. A. Gelatin-Based Nanoparticles as Drug Delivery System of Lornoxicam Gel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 40, n. 32, p. 153–161, 2016.

EL-SAYED, S. M.; EL-SAYED, H. S. Antimicrobial nanoemulsion formulation based on thyme ( *Thymus vulgaris* ) essential oil for UF labneh preservation. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 10, p. 1029–1041, 2020.

ELZEIN, T. et al. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 273, n. 2, p. 381–387, maio 2004.

ELZOGHBY, A. O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 1075–1091, 2013.

FARBER, C. et al. Nanoscale Structural Organization of Plant Epicuticular Wax Probed by Atomic Force Microscope Infrared Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 2472–2479, 2019.

FERNANDES, M. DO C. DE A.; LEITE, E. C. B.; MOREIRA, V. E. **Defensivos alternativos: ferramenta para uma agricultura ecológica, não poluente, produtora de alimentos saudáveis**. Niterói: Pesagro-Rio, 2006.

FESSI, H. et al. Nanocapsule Formation By Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1989.

FIRMINO, C. R. et al. Avaliação da qualidade de bases farmacêuticas manipuladas. **Revista Multidisciplinar da Saúde**, v. 5, p. 1–95, 2011.

FLEMMING, H. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. **polymer Degradation and Stability**, v. 3910, n. 97, p. 309–315, 1998.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões : um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico , catiônico e não-iônico Emulsion stability : a case study involving anionic , cationic and nonionic emulsifiers. **Polímeros**, v. 25, n. December, p. 9, 2015.

GADELMAWLA, E. S. et al. Roughness parameters. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 123, p. 133–145, 2002.

GARCÍA-DÍEZ, J. et al. Behaviour of food-borne pathogens on dry cured sausage manufactured with herbs and spices essential oils and their sensorial acceptability. **Food Control**, v. 59, p. 262–270, 2016.

GASPERINI, L.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Natural polymers for the microencapsulation of cells. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 11, n. 100, p. 20140817, nov. 2014.

GAUTAM, S.; DINDA, A. K.; MISHRA, N. C. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1228–1235, 2013.

GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099–9104, 2008.

GHADERI-GHAHFAROKHI, M. et al. Chitosan-cinnamon essential oil nano-formulation: Application as a novel additive for controlled release and shelf life extension of beef patties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, n. July, p. 19–28, 2017.

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. 07, p. 1365–1381, 2015.

GIRARD, E. A.; KOEHLER, H. S.; NETTO, S. P. Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Ladrum. **Rev. Acad.**, n. 2, p. 147–165, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GONZÁLEZ-REZA, R. M. et al. Effect of sucrose concentration and pH onto the physical stability of  $\beta$  - carotene nanocapsules. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, n. December 2017, p. 354–361, 2018.

GOODWIN, J. W. The stability of dispersions. In: **Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers - An Introduction**. 2. ed. Oregon: John Wiley and Sons LTD, 2004. v. 2p. 281.

GOUDARZI, Z. M. et al. An investigation into influence of acetylated cellulose nanofibers on properties of PCL / Gelatin electrospun nanofibrous scaffold for soft tissue engineering. **Polymer**, v. 213, n. November 2020, p. 123313, 2021.

GRAZIOLA, F. et al. Gelatin-based microspheres crosslinked with glutaraldehyde and rutin oriented to cosmetics. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 4, p. 603–612, dez. 2016.

GRILLO, R. et al. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 2–3, p. 1645–1651, 2011.

GRILLO, R. et al. Nanopartículas poliméricas como sistemas de liberação para herbicidas. In: CARLOS

GRAEFF (Ed.). . **Nanotecnologia: ciência e engenharia**. 1. ed. São Paulo: Cultura academica, 2012a. p. 83–124.

GRILLO, R. et al. Poly( $\epsilon$ -caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 231–232, p. 1–9, 15 set. 2012b.

GUIMARÃES, L. G. DE L. et al. Influencia da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC)). **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1476–1480, 2008.

GUTERRES, S. S. et al. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 1, p. 57–63, jan. 1995.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. **Polymeric Nanoparticles , Nanospheres and Nanocapsules , for Cutaneous Applications Drug Target Insights**, 2007.

HALEVAS, E. et al. Synthesis and encapsulation of V ( IV , V ) compounds in silica nanoparticles targeting development of antioxidant and antiradical nanomaterials OH OH OH. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 194, n. December 2018, p. 180–199, 2019.

HALFELD-VIEIRA, B. D. A. et al. **Defensivos Agrícolas Naturais: Uso e Perspectivas**. 1. ed. Brasília: Embrapa Meio Ambiente, 2016.

HASANI, S.; OJAGH, S. M.; GHORBANI, M. Nanoencapsulation of lemon essential oil in Chitosan-Hicap system. Part 1: Study on its physical and structural characteristics. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 115, p. 143–151, abr. 2018.

HASHIM, D. M. et al. Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 856–860, fev. 2010.

HAYOUNI, E. A. et al. Comparison of the modes of action, on LAB, of two Myrtaceae essential oils by flow cytometry and predictive microbiology. **Acta Horticulturae**, v. 853, n. Proceedings of the International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, 2009, p. 403–418, 2010.

HOMS, M. et al. Influence of polymer concentration on the properties of nano-emulsions and nanoparticles obtained by a low-energy method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 536, n. September 2016, p. 204–212, 2018.

HUANG, L. et al. Nanoscale chemical and mechanical heterogeneity of human dentin characterized by AFM-IR and bimodal AFM. **Journal of Advanced Research**, v. 22, p. 163–171, 2020.

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, p. 57402, 4 ago. 2011.

ISO22412, I. O. FOR S.-. **Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS)**. Disponível em: <<https://www.sis.se/produkter/provning-4361e6b5/analys-av-partikelstorlek-siktning/iso224122017/>>. Acesso em: 29 jun. 2021.

JEENA, K. et al. Antioxidant, Anti-inflammatory and Antinociceptive Properties of Black Pepper

Essential Oil (*Piper nigrum* Linn). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2 jan. 2014.

JIMÉNEZ, M. et al. Elaboration and characterization of O/W cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and black pepper (*Piper nigrum*) emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 902–910, 2018.

JIROVETZ, L. et al. Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction–gas chromatography, solid-phase microextraction–gas chromatography– mass spectrometry and olfactometry. **Journal of Chromatography**, v. 976, p. 265–275, 2002.

KAH, M.; HOFMANN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International**, v. 63, p. 224–235, 2014.

KAMARAJ, C. et al. Ag Nanoparticles Synthesized Using  $\beta$ -Caryophyllene Isolated from *Murraya koenigii*: Antimalarial (*Plasmodium falciparum* 3D7) and Anticancer Activity (A549 and HeLa Cell Lines). **Journal of Cluster Science**, v. 28, n. 3, p. 1667–1684, 2017.

KAPOOR, I. P. S. et al. Chemistry and in vitro antioxidant activity of volatile oil and oleoresins of black pepper (*Piper nigrum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5358–5364, 2009.

KARSA, D. R.; STEPHENSON, R. . **Encapsulation and Controlled Release**. [s.l: s.n.]. v. 53

KCHAOU, H. et al. Influence of Maillard reaction and temperature on functional , structure and bioactive properties of fish gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 97, n. June, p. 105196, 2019.

KHAN, H. A. A. Toxicity, repellent and oviposition deterrent effects of select essential oils against the house fly *Musca domestica*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 24, n. 1, p. 15–20, 2021.

KICHI, M. K. et al. Electrochemical and in vitro bioactivity behavior of poly (  $\epsilon$  -caprolactone ) ( PCL ) - gelatin-forsterite nano coating on titanium for biomedical application. **Materials Today Communications**, v. 24, n. May, p. 101326, 2020.

KIKUCHI, A. et al. Pulsed dextran release from calcium-alginate gel beads. **Journal of Controlled Release**, v. 47, n. 1, p. 21–29, 1997.

KORSMEYER, R. W. et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **international Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 25–35, 1983.

KRAMIDA, A.; RALCHENKO, Y.; READER, J. Atomic Data and Nuclear Data Tables. **NIST Atomic Spectra Database (version 5.8)**, v. 140, 2021.

KUMARI, A. et al. Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 80, n. 2, p. 184–92, 15 out. 2010.

KUSUMASTUTI, Y. et al. Chitosan-Based Polyion Multilayer Coating on NPK Fertilizer as Controlled Released Fertilizer. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2019, 2019.

LAI, P. et al. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine , chitosan , poly ( d , l -lactide-co-glycolic acid ) and polyalkylcyanoacrylate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, p. 154–163, 2014.

LAZZARI, S. et al. Colloidal stability of polymeric nanoparticles in biological fluids. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 6, p. 920, jun. 2012.

LEE, S. et al. Surface Roughness Parameter and Modeling for Fatigue Behavior of Additive Manufactured Parts: A Non-destructive Data-driven Approach. **Additive Manufacturing**, v. 46, n. May, p. 102094, 2021.

LEMOINE, D. et al. Stability study of nanoparticles of poly( $\epsilon$ -caprolactone), poly(d,l-lactide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v. 17, n. 22, p. 2191–2197, nov. 1996.

LI, F. et al. Biodegradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) by a new *Penicillium oxalicum* strain DSYD05-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 2929–2935, 2012.

LI, Y. et al. Analysis of chemical components and biological activities of essential oils from black and white pepper ( *Piper nigrum* L .) in five provinces of southern China. **LWT - Food Science and Technology**, v. 117, n. September 2019, 2020.

LIOLIOS, C. C. et al. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L . and in vitro antimicrobial activity. v. 112, p. 77–83, 2009.

LIU, C. et al. Morphology and Characteristics of Starch Nanoparticles Self-Assembled via a Rapid Ultrasonication Method for Peppermint Oil Encapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 38, p. 8363–8373, 2017a.

LIU, J. et al. Influence of environmental temperature during grain filling period on granule size distribution of rice starch and its relation to gelatinization properties. **Journal of Cereal Science**, v. 76, p. 42–55, 2017b.

LIU, Y.; LIU, X.; WANG, X. Biomimetic synthesis of gelatin polypeptide-assisted noble-metal nanoparticles and their interaction study. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, p. 1–11, 2012.

LOBO, V.; CIPRIANO, F. T.; ROSA, M. F. **Análise do comportamento fotoquímico do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) em solventes de diferentes polaridades**. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2014/trabalhos/7/5507-2053.html>>. Acesso em: 18 abr. 2019.

LOPES, M. E. B. DE M. **Agrotóxicos na imprensa: análise de algumas revistas e jornais brasileiros**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 25 ago. 2010.

MADKHALI, O.; MEKHAIL, G.; WETTIG, S. D. Modified gelatin nanoparticles for gene delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 554, p. 224–234, jan. 2019.

MAES; BOUQUILLON; FAUCONNIER. Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2539, jul. 2019.

MAHAPATRO, A.; SINGH, D. K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. **Journal of nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 55, 2011.

MAHMOUDI SABER, M. Strategies for surface modification of gelatin-based nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 183, n. April, p. 110407, 2019.

MAR, J. M. et al. Lippia organoides essential oil: An efficient alternative to control Aedes aegypti, Tetranychus urticae and Cerataphis lataniae. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. June 2017, p. 292–297, 2018.

MARANGON, C. A. **Atividade antimicrobiana e citotoxicidade de emulsões de quitosana/gelatina/óleo de copaíba**. [s.l.] USP DE SÃO CARLOS, 2015.

MARDONES, L. E. et al. Progress in Organic Coatings Long-lasting isothiazolinone-based biocide obtained by encapsulation in micron-sized mesoporous matrices. **Progress in Organic Coatings**, v. 119, n. February, p. 155–163, 2018.

MARGHALANI, H. Y. Effect of finishing/polishing systems on the surface roughness of novel posterior composites. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 22, n. 2, p. 127–138, 2010.

MARTINS, I. M.; BARREIRO, M. F.; RODRIGUES, A. E. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. **The Chemical Engineering Journal**, v. 245, n. August, p. 191–200, 2016.

MATTANA, R. S. et al. Efeitos de diferentes tempos de extração no teor e composição química do óleo essencial de folhas de pariparoba [ Pothomorphe umbellata ( L .) Miq .]. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, v. 17, n. 1, p. 150–156, 2015.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, 1996.

MAZZARINO, L. et al. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 370, n. 1, p. 58–66, 2012.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, practices and techniques**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2016.

MD MEFTAUL, I. et al. Pesticides in the urban environment: A potential threat that knocks at the door. **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 134612, 2020.

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

MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 19–20, p. 842–850, 2010.

MOHAMMAD, G.; JAWAD, M.; HUSSEIN, H. Characterization of bioactive chemical compounds from aspergillus terreus and evaluation of antibacterial and antifungal activity. v. 8, p. 889–905, 1 jun. 2016.

MOLPECERES, J. et al. Stability of cyclosporine-loaded poly-X-caprolactone nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 14, n. 6, p. 777–787, jan. 1997.

MONDAL, S. Phase change materials for smart textiles - An overview. **Applied Thermal Engineering**, v. 28, n. 11–12, p. 1536–1550, 2008.

MONTANARI, R. M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from

verbenaceae species: Alternative sources of (E)-Caryophyllene and germacrene-D. **Quimica Nova**, v. 34, n. 9, p. 1550–1555, 2011.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–42, 29 jan. 2010.

MORAIS, L. A. S. DE. Plantas medicinais e aromáticas como defensivos naturais. In: **Defensivos Agrícolas Naturais Uso e Perspectivas**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Meio Ambiente, 2016. v. 1p. 1–4.

MOROZOVA, T. I. et al. On the Stability of Polymeric Nanoparticles Fabricated through Rapid Solvent Mixing. **Langmuir**, v. 35, n. 3, p. 709–717, jan. 2019.

MORSLED, S. et al. Physicochemical characteristics of essential oil of black pepper (*Piper nigrum*) cultivated in Chittagong, Bangladesh. **Journal of Food Quality and Hazards Control**, v. 4, n. 3, p. 66–69, 2017.

MOURA, W. S. et al. Cassava starch-based essential oil microparticles preparations: Functionalities in mosquito control and selectivity against non-target organisms. **Industrial Crops and Products**, v. 162, p. 113289, abr. 2021.

MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 81–89, mar. 2004.

NAIDU, B. V. K.; PAULSON, A. T. A New Method for the Preparation of Gelatin Nanoparticles: Encapsulation and Drug Release Characteristics B. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, p. 3495–3500, 2011.

NAIR, R. et al. Nanoparticulate material delivery to plants. **Plant Science**, v. 179, n. 3, p. 154–163, set. 2010.

NEČAS, D.; KLAPETEK, P. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. **Open Physics**, v. 10, n. 1, jan. 2012.

NERI-BADANG, M. C.; CHAKRABORTY, S. Carbohydrate polymers as controlled release devices for pesticides. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 67–85, 2019.

OGLIARI, P. J.; PACHECO, J. A. **ANÁLISE ESTATÍSTICA USANDO O STATISTICA® 6.0**. Disponível em: <[https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/1265138/mod\\_resource/content/0/statistica.pdf](https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/1265138/mod_resource/content/0/statistica.pdf)>. Acesso em: 29 jun. 2021.

OLALERE, O. A.; ABDURAHMAN, N. H.; ALARA, O. R. Extraction, radical scavenging activities and physicochemical fingerprints of black pepper (*Piper nigrum*) extract. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 11, n. 4, p. 2195–2201, 2017.

OLIVEIRA, L. M. DE et al. Controlled release of Licaria puchury-major essential oil encapsulated in PCL / gelatin-based colloidal systems and membranes. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 7, n. 2, p. 23–29, 2019.

OLIVEIRA, P. H. R. DE; REIS, R. R. Ácido Benzoico (CAS 65-85-0). **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6,

p. 2673–2687, 2017.

ORAV, A. et al. Effect of Storage on the Essential Oil Composition of *Piper nigrum* L. Fruits of Different Ripening States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2582–2586, 2004.

ORMEÑO, E.; GOLDSTEIN, A.; NIINEMETS, Ü. Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 978–989, jul. 2011.

PAES, L. S. O. P. **Biofertilizantes e defensivos naturais na agricultura orgânica: Receitas e Recomendações**. Disponível em: <[https://docplayer.com.br/19304822-Biofertilizantes-e-defensivos-naturais-na-agricultura-organica-receitas-e-recomendacoes.html#show\\_full\\_text](https://docplayer.com.br/19304822-Biofertilizantes-e-defensivos-naturais-na-agricultura-organica-receitas-e-recomendacoes.html#show_full_text)>. Acesso em: 5 fev. 2021.

PANDEY, A. K. et al. Essential oils from the genus *Thymus* as antimicrobial food preservatives : Progress in their use as nanoemulsions-a new paradigm. **Trends in Food Science & Technology**, v. 111, n. November 2020, p. 426–441, 2021.

PARRIS, N.; COOKE, P. H.; HICKS, K. B. Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. July 2005, p. 4788–4792, 2005.

PARTICLE SCIENCES. **Technical Brief: Emulsion Stability and Testing** Technical Brief. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://www.particlesciences.com/docs/technical%7B\\_%7Dbriefs/TB%7B\\_%7D2011%7B\\_%7D2.pdf](http://www.particlesciences.com/docs/technical%7B_%7Dbriefs/TB%7B_%7D2011%7B_%7D2.pdf)>

PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. et al. Encapsulated Essential Oils as an Alternative to Insecticides in Funnel Traps. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 4, p. 2117–2120, 2015.

PAUMGARTTEN, F. J. R. **Pesticides and public health in Brazil** *Current Opinion in Toxicology* Elsevier B.V., , ago. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S246820202030005X>>

PAVLOVIĆ, V. B.; PAVLOVIĆ, V. P. Polymer-Ceramic Nanocomposites and Converging Technologies. In: **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**. 1. ed. Sérvia: Elsevier, 2021. p. 342.

PE, M.; ROMANELLI, G.; BLUSTEIN, G. Thymol bioactivity : A review focusing on practical applications. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 9243–9269, 2020.

PENHASI, A.; GOMBERG, M. A specific two-pulse release of rivastigmine using a modified time-controlled delivery system: A proof of concept case study. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 47, p. 404–410, 2018.

PEREIRA, K. D. C. et al. Characterization of nanospheres containing *Zanthoxylum riedelianum* fruit essential oil and their insecticidal and deterrent activities against *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Molecules**, v. 23, n. 8, 2018.

PEREZ-GUAITA, D. et al. Multispectral Atomic Force Microscopy-Infrared Nano-Imaging of Malaria Infected Red Blood Cells. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 5, p. 3140–3148, 2018.

PHILLIPSON, K.; HAY, J. N.; JENKINS, M. J. Thermal analysis FTIR spectroscopy of poly( $\epsilon$ -caprolactone). **Thermochimica Acta**, v. 595, p. 74–82, nov. 2014.

POLMAN, E. M. N. et al. Comparison of the aerobic biodegradation of biopolymers and the corresponding bioplastics: A review. **Science of the Total Environment**, v. 753, p. 141953, 2021.

PRADINI, D. et al. A preliminary study of identification halal gelatin using Quartz Crystal Microbalance (QCM) sensor. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 14, n. 3, p. 325–330, 2018.

PRANOTO, Y.; LEE, C. M.; PARK, H. J. Characterizations of fish gelatin films added with gellan and  $\kappa$ -carrageenan. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 766–774, jun. 2007.

PUHL, A. C. et al. Preparation and characterization of polymeric nanoparticles loaded with the flavonoid luteolin, by using factorial design. **International Journal of Drug Delivery**, v. 3, p. 683–698, 2011.

PUSCHMANN, J.; HERBIG, M. E.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Correlation of antimicrobial effects of phenoxyethanol with its free concentration in the water phase of o/w-emulsion gels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 131, n. August, p. 152–161, 2018.

QIU, Q. et al. pH-triggered sustained drug release of multilayer encapsulation system with hollow mesoporous silica nanoparticles/chitosan/polyacrylic acid. **Materials Letters**, v. 260, p. 126907, fev. 2020.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. **Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique** *Pharmaceutical Research*, 1998a.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113–1128, 1 jan. 1998b.

RAJKUMAR, V. et al. Development of encapsulated peppermint essential oil in chitosan nanoparticles : characterization and biological efficacy against stored-grain pest control. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 170, n. March, p. 104679, 2020.

RAKES, M. et al. Pesticide selectivity to the parasitoid *Trichogramma pretiosum* : A pattern 10-year database and its implications for Integrated Pest Management. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111504, 2021.

RAKMAI, J. et al. Physico-chemical characterization and evaluation of bio-efficacies of black pepper essential oil encapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Food Hydrocolloids**, v. 65, p. 157–164, 2017a.

RAKMAI, J. et al. Encapsulation of yarrow essential oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: physiochemical characterization and evaluation of bio-efficacies. **CyTA - Journal of Food**, v. 15, n. 3, p. 409–417, jul. 2017b.

RAMACHANDRAIAH, K.; HONG, G. Food Bioscience Polymeric nanomaterials for the development of sustainable plant food value chains. **Food Bioscience**, v. 41, n. June 2020, p. 100978, 2021.

RAMÍREZ-AGUDELO, R. et al. Hybrid nanofibers based on poly-caprolactone/gelatin/hydroxyapatite nanoparticles-loaded Doxycycline: Effective anti-tumoral and antibacterial activity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 83, p. 25–34, fev. 2018.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

RAVINDRAN, P. N.; BEVERAGES, T. G.; KALLUPURACKAL, J. A. Black pepper. In: **Handbook of Herbs and Spices**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2012. v. 1p. 86–115.

REDDY, L. H. et al. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 11, p. 5818–5878, 2012.

REZENDE SCHAFFAZICK, S. et al. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99–106, 2002.

RISCH, S. J.; REINECCIUS, G. A. Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients. In: COMSTOCK, M. J. (Ed.). . **AC S SYMPOSIUM SERIES 590**. 1. ed. ILLinois,Chicago: American Chemical Society, 1995. p. 214.

ROLAND, I. et al. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, n. 1–2, p. 85–94, 2003.

ROMERO-CANO, M. S.; VINCENT, B. Controlled release of 4-nitroanisole from poly (lactic acid) nanoparticles. **Journal of controlled release**, v. 82, p. 127–135, 2002.

ROY, A. et al. Controlled pesticide release from biodegradable polymers. **Central European Journal of Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 453–469, 2014.

SABET, S. et al. Gelatin nanoparticles enhance delivery of hepatitis C virus recombinant NS2 gene. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–15, 2017.

SADAQUAT, H. et al. Biodegradable and biocompatible polymeric nanoparticles for enhanced solubility and safe oral delivery of docetaxel : In vivo toxicity evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 598, n. November 2020, p. 120363, 2021.

SAEZ, A. et al. Freeze-drying of polycaprolactone and poly( d,l -lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 3, p. 379–387, nov. 2000.

SAHOO, N. et al. Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 317–331, 2015.

SAHU, P. et al. Assessment of penetration potential of pH responsive double walled biodegradable nanogels coated with eucalyptus oil for the controlled delivery of 5-fluorouracil: In vitro and ex vivo

studies. **Journal of Controlled Release**, v. 253, p. 122–136, 2017.

SAIRAM, M. et al. Encapsulation efficiency and controlled release characteristics of crosslinked polyacrylamide particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 320, n. 1–2, p. 131–136, 2006.

SALAMA, D. M. et al. Chemosphere Applications of nanotechnology on vegetable crops. **Chemosphere**, v. 266, p. 129026, 2021.

SANCHEZ, A. et al. Pulsed Controlled-Release System for Potential Use in Vaccine Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 6, p. 547–552, 1996.

SANITÁRIA, A. N. DE V. **Farmacopeia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

SANT'ANNA, T. B. A interferência do material de embalagem na estabilidade de um medicamento - estudo de caso (Dietilcarbamazina 50mg). **Farmanguinhos/ Fiocruz**, v. 1, p. 77, 2013.

SAULNIER, P. et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283–4300, 2003.

SAWICKA, B. et al. Alternative and new plants. In: EGBUNA, C.; MISHRA, A. P.; GOYAL, M. R. B. T.-P. OF P. FOR THE M. OF D. (Eds.). . **Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders**. 1. ed. Polônia: Elsevier, 2021. p. 491–537.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. **Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration** *Quimica Nova*, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99–106, 2002.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SCHÖLER, N. et al. Preserved solid lipid nanoparticles (SLN) at low concentrations do cause neither direct nor indirect cytotoxic effects in peritoneal macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 235–239, mar. 2000.

SCOTT, I. M. et al. A review of Piper spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 65–75, 2008.

SEVERO, E. S. et al. Ecological risk of pesticide contamination in a Brazilian river located near a rural area: A study of biomarkers using zebrafish embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, n. December 2019, p. 110071, 2020.

SHAW, D. J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1992.

SIDDIQUI, B. S. et al. Piptigrine, a new Insecticidal Amide from Piper Nigrum Linn. **Natural Product Research**, v. 18, n. 5, p. 473–477, out. 2004.

SILVA, C. J. et al. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of Myrtaceae

species planted in Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 104–108, 2010.

SILVA, J. S. M. et al. Biodegradable nanoparticles loaded with *Lippia alba* essential oil : a sustainable alternative for *Aedes aegypti* larvae control. **European Academic Research**, v. VII, n. 12, p. 6237–6258, 2020.

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 Science Food Agriculture**, n. July, p. 11, 2018.

SILVA, M. D. S. et al. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of hazardous materials**, v. 190, n. 1–3, p. 366–374, 15 jun. 2011.

SIMOES, C. M. . et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Universidade UFRGS, 2004.

SINGH, A. et al. Advances in controlled release pesticide formulations: Prospects to safer integrated pest management and sustainable agriculture. **Journal of Hazardous Materials**, v. 385, p. 121525, 2020.

SINHA, V. R. et al. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International journal of pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1–23, 18 jun. 2004.

SMITTARELLO, D. et al. Characterizing the physical properties of gelatin, a classic analog for the brittle elastic crust, insight from numerical modeling. **Tectonophysics**, v. 812, n. May, p. 228901, 2021.

SOUSA, P. J. C. et al. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 217–221, 2008.

SOUZA, G. H. B. DE; MELLO, J. C. P. DE; LOPES, N. P. **Farmacognosia : coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 2011.

SOUZA, J. M. et al. Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 6, p. 691–698, 2014.

STOYANOVA, A. et al. Oleoresins of Black Pepper ( *Piper Nigrum* L .) And Ginger ( *Zingiber Officinale* ( L .) ROSC .) From Vietnam : Antimicrobial Testings, Gas Chromatographic Analysis And Olfactoric Evaluation. **Electronic Journal of Environmetal Agricultural and Food Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 1615–1623, 2006.

SWATHY, J. S. et al. Antimicrobial potency of high-energy emulsified black pepper oil nanoemulsion against aquaculture pathogen. **Aquaculture**, v. 491, n. March, p. 210–220, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. trad. SANTAREM et al. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAVARES, J. K. et al. Modeling of the controlled release of betacarotene into anhydrous ethanol from microcapsules. **OpenNano**, v. 1, p. 25–35, 2016.

TEIXEIRA, B. N. et al. Synthesis and Characterization of Nano-Encapsulated Black Pepper Oleoresin using Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrin for Antioxidant and Antimicrobial Applications. **Journal of Food**

**Science**, v. 78, n. 12, p. 1913–1920, 2013.

TSUIJI, K. Microencapsulation of pesticides and their improved handling safety. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, n. 2, p. 137–147, 2001.

TU, X. et al. Comparison of antibacterial effects and fumigant toxicity of essential oils extracted from different plants. **Industrial Crops & Products**, v. 124, n. July, p. 192–200, 2018.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Evaluation of Selected Quality Parameters to Monitor Essential Oil Alteration during Storage. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, 2011.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40–53, 2013.

ÜNER, M.; KARAMAN, E. F.; AYDOĞMUŞ, Z. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers of loratadine for topical application: Physicochemical stability and drug penetration through rat skin. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 5, p. 653–660, 2014.

UPADHYAY, R. K.; JAISWAL, G. Evaluation of biological activities of Piper nigrum oil against Tribolium castaneum. **Bulletin of Insectology**, v. 60, n. 1, p. 57–61, 2007.

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463–471, 1963.

VIDEIRA-QUINTELA, D.; MARTIN, O.; MONTALVO, G. Recent advances in polymer-metallic composites for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, n. November 2020, p. 230–244, 2021.

WANG, B. et al. Controlled release of dexamethasone sodium phosphate with biodegradable nanoparticles for preventing experimental corneal neovascularization. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 17, p. 119–123, 2019.

WILKIE, C. A. Polymer degradation and stabilization. **Polymer News**, v. 29, n. 3, p. 81–83, 2006.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. **Journal of Controlled Release**, v. 81, n. 3, p. 225–233, jun. 2002.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 2010.

XAVIER, L. O. et al. Chitosan packaging functionalized with Cinnamodendron dinisii essential oil loaded zein: A proposal for meat conservation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 183–193, fev. 2021.

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, n. 4, p. 1–7, 2017.

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.

YAN, L. et al. Layered double hydroxide nanostructures and nanocomposites for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 37, p. 5583–5601, 2019.

YANG, D.; LI, Y.; NIE, J. Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 538–543, jun. 2007.

YASMIN, R. et al. Gelatin nanoparticles: A potential candidate for medical applications. **Nanotechnology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 191–207, 2017.

YOUNG, S. et al. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. **Journal of Controlled Release**, v. 109, n. 1–3, p. 256–274, 2005.

ZANETTI, M. et al. Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, n. November 2018, p. 198–207, 2019.

ZHANG, C. et al. Antioxidant, hepatoprotective and antifungal activities of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Food Chemistry**, v. 346, n. November 2020, p. 128845, 2021.

ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; WU, F. A novel pulsed-release system based on swelling and osmotic pumping mechanism. **Journal of Controlled Release**, v. 89, n. 1, p. 47–55, 2003.