UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

GEISIANE ROSA DA SILVA

**Estudo de formação e estabilidade de nanopartículas de
poliácido láctico para liberação controlada do óleo essencial de
Shinus Molle L.**

São Carlos
2015

GEISIANE ROSA DA SILVA

**Estudo de formação e estabilidade de nanopartículas de
poliácido láctico para liberação controlada do óleo essencial de
*Shinus Molle L.***

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento, caracterização e aplicação dos Materiais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Yvonne Primerano Mascarenhas

São Carlos

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

S586e Silva, Geisiane Rosa da
Estudo de formação e estabilidade de nanopartículas
de poliácido láctico para liberação controlada do óleo
essencial de *Shinus Molle L.* / Geisiane Rosa da Silva;
orientadora Yvonne Primerano Mascarenhas. São Carlos,
2015.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
em Ciências e Engenharia de Materiais e Área de
Concentração em Desenvolvimento Caracterização e
Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São
Carlos da Universidade de São Paulo, 2015.

1. Nanotecnologia. 2. Nanopartículas poliméricas.
3. Liberação controlada. 4. Poliácido láctico. 5. Óleo
essencial. 6. *Schinus molle L.* . 7. Pimenta Rosa. I.
Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **GEISIANE ROSA DA SILVA**.

Título da dissertação: "Estudo de formação e estabilidade de nanopartículas de poliácido láctico para liberação controlada do óleo essencial de *Shinus Molle L.*".

Data da defesa: 03/07/2015

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Titular **Yvonne Primerano Mascarenhas (Orientadora)** aprovada
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Prof. Associado **Valtencir Zucolotto**
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

aprovado

Prof. Dr. **Rodrigo Fernando Costa Marques** aprovado
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP - Araraquara)

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais:

Prof. Titular **Antonio José Felix de Carvalho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Paulo Sérgio Lima Segantine**

“A quem caminha a vitória.”

Aos meus pais **Servilho** e **Maria** pela luta na vida e o exemplo de caráter.

Ao meu tato **Wanderson** por ter me dado o melhor sorriso do mundo: **Manu**.

Ao **Daniel** por estar presente em toda caminhada sempre pronto ao abraço sincero.

Aos meus avós (*in memoriam*) **Benedicta** e **João** por em algum lugar se orgulharem.

À minha madrinha **Sueli** (*in memoriam*) pelo laço de amor e por estar sempre comigo.

Conseguimos!

AGRADECIMENTOS

“Se uma única pessoa, apenas uma, colocar o Coração naquilo que faz, então ela bastará para incentivar o mundo a mover o Mundo.” (Geisiane Rosa)

Ao meu **Deus** por estar comigo me guiando, me protegendo e ensinando. Sem Ele não há nenhum sentido estarmos aqui. Ao meu **Anjinho da Guarda** que me rege, me protege e ilumina. Tudo acontece no seu devido tempo!

À Professora **Yvonne Primerano Mascarenhas** pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À **Amanda Luizetto dos Santos** por acompanhar este projeto desde o início.

Ao senhor **Peter Lemos** pela doação das Pimentas Rosas.

Ao **Daniel Cosmo Pizetta** (aos nossos *Amigos*) pela ajuda com os “erros de medida”, as dicas com os desenhos e formatações.

Ao **Instituto de Física de São Carlos (IFSC)** por me proporcionar o melhor ensino na **Licenciatura**. Pela ajuda em anos desde a graduação: **Letícia Melocro, Andrey Coatrini, Robson D. S. Martins, Armando Zuffi e Emerson Barbano**. Ao **Grupo de Cristalografia** e ao apoio dos técnicos **José Geraldo Catarino e José Augusto Lopes da Rocha**. Ao **Laboratório de Nanotecnologia e Nanotoxicologia** pela disponibilidade de trabalho em grupo: à **Valéria S. Marangoni, Henrique A.M. Faria, Edson Fernandes, Juan A.R. Guivar** pela ajuda com as análises no DLS. Ao **Grupo de Polímeros Bernard Gross** e à técnica **Débora Balogh** pelas medidas de GPC. À todos da **Biblioteca Prof. Bernhard Gross** em especial à **Neusa** pela ajuda na revisão.

À **Escola de Engenharia de São Carlos (EESC)** pela formação e apoio. À **Secretaria de pós-graduação**, pela atenção, paciência e respeito do secretário **Victor L. Barioto e Bruno**. Aos professores e colegas que nos apoiam e nos incentivam a seguir.

Ao **Instituto de Química de São Carlos (IQSC)** em especial à **Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI)** e aos técnicos **André L. Tognon e Aldimar T. J. Constante** pelas análises e explicações sobre o FTIR. Ao **Laboratório de Microscopia Eletrônica** e ao técnico **Márcio de Paula** pela ajuda com as análises de SEM. Ao **Grupo de Química Ambiental** e à técnica **Maria Diva Landgraf** pelas medidas de CG-MS.

Às dependências do **Parque Tecnológico de São Carlos**, em especial à empresa **Nanomed** por acolher a pesquisa e à todos que ali estiveram: **Larrisa Banchi, Beatriz S.F.**

Cury, Caio Prado, Samuel G. Aguiar, Isabela Pezopanne e Bruna Rodrigues. À empresa **Afinko** pelas medidas de térmica.

À empresa **Formilab** pela colaboração e tempo disponibilizados do senhor **Cláudio M. T. Formigoni** e aos senhores **Oswaldo Grande Júnior** e **Julien J. F. Fauvel**.

Ao **Edgar Ap. Sanches** (UFAM) e a **Graziella Trovati** pela atenção com as medidas de XRD e térmica.

Ao Professor **Vitório Marletta, Naiara H. Silva, Higor R. M. Estival, Treyce Donatoni e Luciane A. Terra** pela ajuda de outras horas.

À banca examinadora, aos professores **Valtencir Zucolotto** e **Rodrigo Fernando Costa Marques** pelas contribuições para melhorias futuras nesta e em novas pesquisas.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (**CNPq**). Ao **CNPq** pela bolsa concedida.

À **FAPESP, CNPq** e **Capes** pelo apoio aos demais pesquisadores envolvidos.

“O pensar é para os homens, o que é voar para os pássaros”
Albert Einstein, 1951.

RESUMO

SILVA, G. R. **Estudo de formação e estabilidade de nanopartículas de poliácido láctico para liberação controlada do óleo essencial de *Schinus Molle* L.** 129 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

A nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar onde se desenvolve nanomateriais para uso em diversas áreas como a farmácia, cosmética e agroindústria. Um de seus objetivos é aprimorar propriedades de ativos para novas aplicações, por exemplo, através de sistemas para liberação controlada através do uso de biomaterias. Dentre estes biomateriais destaca-se o poliácido láctico (PLA) que é constantemente aplicado como matriz polimérica de várias nanoestruturas para o encapsulamento de ativos. Na área cosmética, ativos como os óleos essenciais são de grande interesse. O óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus molle* L.) é composto por terpenos que apresentam, entre outras, atividade antioxidante e inseticida. No presente trabalho desenvolvemos um novo sistema de nanopartículas de PLA em solução aquosa, para liberação controlada do óleo essencial *Schinus molle* L. visando a utilização cosmética. As nanopartículas de PLA foram avaliadas quanto a estabilidade através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). A formação foi estudada através do uso de difração de raios X (XRD) e espectroscopia vibracional (FTIR). A morfologia foi observada por microscopia eletrônica de varredura (SEM) comparando-se alguns dos resultados obtidos por DLS. Os resultados obtidos mostraram que o sistema é estável por aproximadamente 100 dias quanto ao tamanho, polidispersão e carga de superfície, mesmo com a variação de pH da solução em relação ao tempo. A estabilidade do nanossistema foi atribuída ao tensoativo dodecil sulfato de sódio (SDS), além da própria semicristalinidade e alta massa molar do PLA. Os componentes do sistema apresentaram interações químicas comprovadas por FTIR. O estudo por SEM mostrou que as nanopartículas obtidas têm aparência esférica, com a matriz polimérica contínua e com vários tamanhos constituindo assim um sistema polidisperso, como observadas também por DLS. A eficiência de encapsulação de 83% avaliada por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a liberação do ativo analisada por gravimetria mostraram-se satisfatórias. O sistema de nanopartículas obtido é estável e, por tanto, com potencial adequado para aplicação em produtos cosméticos.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanopartículas poliméricas. Liberação controlada. Poliácido láctico. Óleo essencial. *Schinus molle* L. Pimenta Rosa.

ABSTRACT

SILVA, G. R. **Study of the formation and stability of poly lactic acid nanoparticles for the controlled release of essential oil *Shinus Molle L.*** 129 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Nanotechnology is an interdisciplinary science through which nanomaterials are developed for use in areas, such as pharmaceutical, cosmetology and agribusiness. One of its objectives is the improvement in the properties of active compounds for new applications by, for example, systems that use biomaterials for controlled release. Lactic polyacid (PLA), one of such biomaterials, has been constantly applied as a polymer matrix of various nanostructures for the encapsulation of active compounds. In cosmetics, active compounds, as essential oils are of great interest. The essential oil of *pimenta rosa* (*Schinus molle L.*) is composed of terpenes, which display antioxidant and insecticide activities. This dissertation addresses the development of a new system of PLA nanoparticles in an aqueous solution for the controlled release of essential oil *Shinus molle L.* to be applied to cosmetology. The stability of PLA nanoparticles was evaluated by dynamic light scattering (DLS). The formation of the system was studied by X-ray diffraction (XRD) and vibrational spectroscopy (FTIR) and its morphology and polydispersivity were verified by scanning electron microscopy (SEM), comparing some of the results obtained by DLS. The results show that the system is stable for approximately 100 days regarding size, polydispersion and surface charge, even when the pH of the solution varies over time. Stability was assigned to surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS), PLA's semi crystallinity and high molecular weight. The chemical interactions of the system's components were evidenced by FTIR. SEM revealed spherical nanoparticles with a continuous polymeric matrix and polydispersivity, also observed by DLS. Satisfactory results were provided by the 83% of encapsulation efficiency calculated by differential scanning calorimetry (DSC) and the drug release analyzed by gravimetric technique. The nanoparticle system obtained is stable and, therefore, suitable for application to cosmetics.

Keywords: Nanotechnology. Polymeric nanoparticles. Controlled Release. Poly lactic acid. Essential oil. *Schinus molle L.* *Pimenta rosa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos sistemas (a) óleo/água, (b) água/óleo e (c) água/óleo/água.	30
Figura 2 - Estrutura representativa das micelas formadas nos nanossistemas do tipo (a) óleo/água e (b) água/óleo.	30
Figura 3 - Formação micelar representando as moléculas anfipáticas dos tensoativos em emulsão óleo/água. (a) Abaixo da CMC, com monômeros dispersos; (b) acima da CMC, com a formação de micelas na forma esférica.	32
Figura 4 - Representação esquemática da camada dupla elétrica e seus efeitos para a estabilização por repulsão eletrostática.	35
Figura 5 - Representação esquemática da estabilização por repulsão estérica.	36
Figura 6 - Representação esquemática das nanopartículas poliméricas de acordo com a organização estrutural (nanocápsulas e nanoesferas). (a) Ativo absorvido no núcleo (b) Ativo adsorvido à parede polimérica; (c) Ativo retido na matriz polimérica; (d) Ativo adsorvido na matriz polimérica.	38
Figura 7 - Representação do monômero do PLA.	39
Figura 8 - Estrutura cristalográfica para o PLLA α	40
Figura 9 - Aroeiras (A) <i>Schinus terebinthifolius Raddi</i> e (B) <i>Schinus molle L.</i>	45
Figura 10 - Fórmula estrutural do dodecil sulfato de sódio (SDS).	51
Figura 11 - Fórmula estrutural do bicarbonato de sódio.	51
Figura 12 - Separação por exclusão de tamanho para amostra de polímero por GPC: (A) injeção da amostra; (B) separação por tamanho (as massas molares menores são retidas por mais tempo no gel poroso); (C) separação das massas molares maiores; (D) separação das massas molares menores.	52
Figura 13 - Aparelho de Clevenger modificado para destilação do óleo essencial: (A) manta aquecedora com termostato; (B) aparato de Clevenger; (C) adaptação ao aparato de Clevenger (condensador reto inclinado).	54
Figura 14 - Condições de medidas para o DLS: (A) montagem experimental e (B) exemplo de gráfico de distribuição de tamanho em função da intensidade.	57
Figura 15 - Representação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas em função das moléculas de tensoativos adsorvidas na parede polimérica.	58
Figura 16 - Representação do potencial Zeta.	59
Figura 17 - Reflexão de um feixe de XRD pelos planos (hkl) de um cristal para o	

ângulo de Bragg θ , onde os raios refletidos estão em fase, representando o fenômeno de difração.....	60
Figura 18 - Amostra de PLA para síntese das nanopartículas poliméricas.	71
Figura 19 - (A) Nanopartícula com ativo e (B) Nanopartícula sem ativo. Ambas sem diluição.	75
Figura 20 - Cromatogramas PLA sobrepostos à curva de calibração de poliestireno monodisperso em THF à 35°C.	76
Figura 21 - Distribuição da massa molar do PLA e sua respectiva polidispersão.	77
Figura 22 - Cromatograma do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> L. (pimenta rosa).	79
Figura 23 - Fórmulas estruturais para os compostos majoritários do óleo essencial.	80
Figura 24 - Curvas TGA e DTG (primeira derivada) para as amostras de : (A) óleo essencial (ativo) e (B) nanopartícula polimérica com ativo.	82
Figura 25 - Comparação das análises de DSC (A) óleo essencial (ativo) e (B) nanopartícula polimérica com ativo.	83
Figura 26 - Porcentagem de nanopartículas sem ativo em função do diâmetro: (A) 1 dia, (B) 2 dias, (C) 100 dias e (D) 115 dias.	85
Figura 27 - Porcentagem de nanopartículas com ativo lipofílico em função do diâmetro: (A) 1 dia, (B) 2 dias, (C) 100 dias e (D) 110 dias após a síntese.	86
Figura 28 - Variação do tamanho (nm) e do PDI em função do tempo (dias): (A) nanopartícula sem ativo e (B) nanopartícula com ativo.	87
Figura 29 - Variação do potencial Zeta (mV) e pH em função do tempo (dias): (A) nanopartícula sem ativo e (B) nanopartícula com ativo.	88
Figura 30 – Relação entre tamanho, PDI e potencial Zeta para titulação potenciométrica pH 12 ao pH 2: (A) sem ativo e (B) com ativo.	90
Figura 31 - Análise térmica para o PLA: (A) TGA e DTG e (B) DSC.	92
Figura 32 - Avaliação da liberação do ativo em função do tempo em horas.	93
Figura 33 - Perfil cristalográficos para as nanopartículas poliméricas e para o PLA: (A) sem ativo (pH 2, pH 9, pH 12) e (B) com ativo (pH 2, pH 8, pH 12).	95
Figura 34 - Determinação do percentual de cristalinidade do PLA: (A) polímero em pó; (B) polímero solubilizado em acetona e seco em vidro (placa).	95
Figura 35 - Difratoogramas para análise do percentual de cristalinidade com a decomposição da área cristalina e total (A) nanopartícula pH 2; (B) nanopartícula pH 9 e (C) nanopartícula pH 12 sem ativo.	96
Figura 36 - Difratoogramas para análise do percentual de cristalinidade com a	

decomposição da área cristalina e total (A) nanopartícula pH 2; (B) nanopartícula pH 8 e (C) nanopartícula pH 12 com ativo.....	97
Figura 37 - Difração de raios X: (A) SDS (pó e placa); (B) Bicarbonato de sódio (pó e placa).....	98
Figura 38 - Comparação do espectro da nanopartícula polimérica com ativo com os espectros: (A) nanopartícula sem ativo; (B) PLA; (C) óleo essencial; (D) SDS e (E) bicarbonato de sódio.....	100
Figura 39 - Análise por FTIR para o PLA.	101
Figura 40 - Análise por FTIR para o óleo essencial de pimenta rosa.	102
Figura 41 - Análise por FTIR para a nanopartícula polimérica em solução aquosa comparação (A) sem ativo e (B) com ativo.	103
Figura 42 - Imagens das nanopartículas poliméricas sem ativo por SEM em diferentes concentrações: (A) e (B) pH 2 (C) e (D) pH 8; (E) e (F) pH 12.	106
Figura 43 - Imagens das nanopartículas poliméricas com ativo por SEM em diferentes concentrações: (A) e (B) pH 2; (C) e (D) pH 8; (E) e (F) pH 12.	107
Figura 44 - Análise de distribuição do diâmetro médio das nanopartículas calculadas através do ajuste gaussiano.	109
Figura 45 - Processo de: (1) solubilização do PLA em acetona; (2) formação das nanopartículas poliméricas sem ativo; e (3) formação das nanopartículas poliméricas com ativo em solução aquosa. As informações da figura são descritas no texto.	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados experimentais para as análises de TG.....	68
Tabela 2 - Dados experimentais para as análises de DSC.	68
Tabela 3 - Massas molares experimental e teóricas máximas e mínimas para o PLA.	77
Tabela 4 - Compostos majoritários do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> L. (pimenta rosa).	80
Tabela 5 - Comparação da composição do óleo essencial de <i>Shinus molle</i> L. (pimenta rosa) obtidos neste trabalho e reportados da literatura.	81
Tabela 6 - Análise DSC para óleo essencial e soluções de nanopartículas com ativos.	83
Tabela 7 - Variação de volume de nanopartículas sem e com ativo.	87
Tabela 8 - Relação entre tamanho, PDI e potencial Zeta antes e após a titulação potenciométrica para as soluções de nanopartículas sem e com ativo.	90
Tabela 9 - Resultados resumidos obtidos com as técnicas de XRD e DLS em função do pH.	98
Tabela 10 - Análise de FTIR para PLA.	101
Tabela 11 - Análise de FTIR para óleo essencial de <i>Schinus molle</i> L. (pimenta rosa).....	102
Tabela 12 - Análise de FTIR para a solução de nanopartícula sem óleo essencial.....	103
Tabela 13 - Análise de FTIR para a solução de nanopartícula com óleo essencial.	104
Tabela 14 - Análise de distribuição do diâmetro médio (nm) das nanopartículas sem e com ativo obtidas através das técnicas SEM e DLS.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

CG-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro De Massas
CMC	Concentração Micelar Crítica
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GPC	Cromatografia por Permeação em Gel
HCl	Ácido Clorídico
NP	Nanopartícula Polimérica
PDI	Índice de Polidispersão
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLA	Poliácido Lático
SDS	Dodecil Sulfato De Sódio
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
SLS	Espalhamento Estático de Luz
TGA	Termogravimetria
THF	Tetrahidrofurano
XRD	Difração de Raios X pelo método do pó

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1	A NANOCIÊNCIA E A NANOTECNOLOGIA.....	27
2.2	A FORMAÇÃO DOS NANOMATERIAIS	29
2.3	TENSOATIVOS	31
2.3.1	<i>Classificação dos tensoativos.....</i>	<i>32</i>
2.4	A ESTABILIDADE DOS NANOMATERIAIS	33
2.4.1	<i>A energia livre de Gibbs</i>	<i>33</i>
2.4.2	<i>Formas de estabilização das nanoemulsões</i>	<i>34</i>
2.5	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	36
2.6	POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS.....	39
2.7	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	41
2.7.1	<i>Polimerização de monômeros.....</i>	<i>42</i>
2.7.2	<i>Dispersão de polímeros pré-formados.....</i>	<i>42</i>
2.7.3	<i>O nanoencapsulamento e a liberação de ativos.....</i>	<i>43</i>
2.8	ÓLEOS ESSENCIAIS	44
2.8.1	<i>Óleo essencial de Schinus molle L. (pimenta rosa).....</i>	<i>45</i>
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1	MATERIAIS.....	49
4.1.1	<i>Reagentes</i>	<i>49</i>
4.1.2	<i>Material Vegetal</i>	<i>49</i>
4.2	MÉTODOS	50
4.2.1	<i>Emulsificação seguida de evaporação do solvente.....</i>	<i>50</i>
4.2.2	<i>Cromatografia por Permeação em Gel (Gel Permeation Chromatography, GPC)</i>	<i>51</i>
4.2.3	<i>Extração do óleo essencial de Pimenta Rosa através da técnica por hidrodestilação</i>	<i>53</i>
4.2.4	<i>Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (Gas chromatography-mass spectrometry, CG-MS).....</i>	<i>55</i>
4.2.5	<i>Espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering -DLS).....</i>	<i>56</i>
4.2.6	<i>Difração de Raios X pelo método do pó (X-ray Diffraction, XRD).....</i>	<i>59</i>
4.2.7	<i>Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (Infrared Spectroscopy Fourier Transform, FTIR).....</i>	<i>62</i>
4.2.8	<i>Termogravimetria (Thermogravimetric analysis, TGA) e Calorimetria Exploratória</i>	

<i>Diferencial (Differential Scanning Calorimetry, DSC)</i>	62
4.2.9 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (Scanning Electron Microscopy, SEM)</i>	63
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	64
4.3.1 <i>Síntese das nanopartículas poliméricas de PLA através da técnica de emulsificação</i> <i>seguida de evaporação do solvente</i>	64
4.3.2 <i>Determinação da massa molar do PLA por GPC</i>	66
4.3.3 <i>Extração do óleo essencial através da técnica de hidrodestilação</i>	66
4.3.4 <i>Densidade e rendimento do óleo essencial de Pimenta Rosa</i>	67
4.3.5 <i>Quantificação da composição do óleo essencial por CG-MS</i>	67
4.3.6 <i>Eficiência de encapsulação determinada por DSC</i>	67
4.3.7 <i>Determinação do tamanho, PDI e potencial Zeta por DLS</i>	69
4.3.8 <i>Estudo de liberação</i>	70
4.3.9 <i>Determinação do percentual de cristalinidade e análise estrutural por XRD pelo método</i> <i>do pó</i>	71
4.3.10 <i>Caracterização da composição estrutural por FTIR</i>	72
4.3.11 <i>Avaliação morfológica e tamanho por SEM das nanopartículas poliméricas sem e com</i> <i>a incorporação de ativo lipofílico</i>	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	74
5.1.1 <i>Determinação da massa molar da matriz de PLA por GPC</i>	75
5.1.2 <i>Caracterização do óleo essencial Schinus molle L.</i>	78
5.1.3 <i>Eficiência de encapsulação</i>	81
5.1.4 <i>Diâmetro hidrodinâmico e Índice de Polidispersão (PDI)</i>	84
5.1.5 <i>Potencial Zeta e variação de pH</i>	88
5.1.6 <i>Estudo de liberação do ativo</i>	91
5.2 ESTUDO DE FORMAÇÃO	94
5.2.1 <i>Percentual de cristalinidade e do perfil de difração das nanopartículas poliméricas por</i> <i>XRD</i>	94
5.2.2 <i>Caracterização qualitativa da composição estrutural por FTIR</i>	99
5.2.3 <i>Avaliação morfológica das nanopartículas poliméricas por SEM</i>	105
5.2.4 <i>Modelo teórico para formação das nanopartículas poliméricas com e sem ativo</i>	110
6 CONCLUSÕES	115
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	117
REFERÊNCIAS	119

1 Introdução

“Na Natureza nada se perde, nada se cria, tudo se transforma”.

Antonie Lavoisier

A tecnologia associada ao controle da liberação de substâncias ativas tem ganhado um espaço promissor na Ciência. São vários os estudos que envolvem estes sistemas tais como, as nanopartículas poliméricas, metálicas e lipídicas. Estes nanossistemas apresentam, principalmente, maior estabilidade em sítios de ações específicas e maior tempo de meia-vida. (SCHAFFAZICK et al., 2003; SOPPIMATH et al., 2001)

As aplicações das nanopartículas como sistemas de liberação controlada de drogas (*drug delivery systems*) vão desde a área farmacêutica (LOPES; LOBO; COSTA, 2005) e cosmética (DAUDT et al., 2005) até a agroindústria (SILVA et al., 2010) e alimentícia (ASSIS et al., 2012).

Em particular, quando em soluções cujos solventes são polares, como, por exemplo, a água substâncias ativas lipofílicas (óleos essenciais) apresentam algumas limitações quanto ao uso em aplicações farmacológicas e cosméticas. Como as propriedades dos materiais estão diretamente ligadas ao seu tamanho, a nanotecnologia permite alterar, com processos adequados, as propriedades de um material para uma aplicação específica. Assim, para se aumentar o potencial de uso, substâncias lipofílicas podem ser nanoencapsuladas em sistemas hidrofílicos. (ZARBIN, 2007)

Apesar do avanço na área da nanotecnologia são poucos os estudos voltados para o entendimento entre sistemas poliméricos e substâncias ativas lipofílicas, principalmente quanto à formação e estabilidade. Sabe-se que ao mudar as propriedades de um material com o uso de nanossistemas, deve-se levar em conta que as nanopartículas são termodinamicamente instáveis e, por tanto, com tendência a se agregarem e mudar o seu tamanho em função do tempo. Logo, é importante entender a relação entre a substância ativa e o sistema em estudo para que este apresente estabilidade, isto é, não tenha mudanças físicas ou químicas durante um período de tempo razoável, para ser posteriormente aplicado. (ZARBIN, 2007)

Este trabalho tem por objetivo a síntese, caracterização estrutural e a morfologia de

nanopartículas poliméricas de poliácido láctico, visando o entendimento da formação e a estabilidade deste sistema para o encapsulamento de substâncias lipofílicas, como óleo essencial de Pimenta Rosa (*Schinus molle* L.). Busca-se, deste modo, que as nanopartículas desenvolvidas possam apresentar aplicação como sistema de liberação controlada para ativos lipofílicos e com estabilidade adequada.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 A nanociência e a nanotecnologia

“Plenty of Room at the Bottom”

Richard P. Feynman (Dated: Dec. 1959) (FEYNMAN, 1959; TOUMEY, 2008)

O estudo e desenvolvimento dos materiais nanoestruturados, em meados do século XX, promoveu o crescimento e destaque a nível mundial da nanotecnologia e da nanociência. No século XXI a nanotecnologia se tornou um dos ramos da Ciência mais investigados e amplamente citados em diversas áreas como física, química, biologia e suas aplicações em farmácia, cosmética, medicina, agrotóxicos, eletrônica entre outros, tendo em comum a escala em que são desenvolvidas e aplicadas. (NANOSCIENCE ..., 2004; SOUSA; RANGEL, 2009; ZANETTI-RAMOS, 2015)

A nanociência e nanotecnologia se baseiam fundamentalmente no fato de que as propriedades dos materiais são fortemente dependentes do tamanho de suas partículas quando em escala nanométrica. A nanotecnologia consiste na habilidade de caracterizar, produzir e aplicar estruturas, dispositivos e sistemas fundamentalmente novos, por meio do controle de forma e tamanho na escala nanométrica. É nesta escala que as propriedades diferenciam-se significativamente daquelas que se manifestam em escala maior. Por sua vez, a nanociência pode ser definida como a área do conhecimento que estuda os princípios fundamentais dos materiais nos quais pelo menos uma das dimensões está compreendida entre 1 e 100 nanômetros. (NANOSCIENCE ..., 2004; SOUSA; RANGEL, 2009)

Embora não com esta denominação, o processo de obtenção de nanomateriais consta na literatura desde 1857 quando Michael Faraday, importante cientista inglês, relatou a síntese do ouro coloidal. No final do ano de 1959, em Pasadena (Califórnia), o físico teórico norte-americano Richard Philips Feynman, apresentou uma palestra para a Sociedade Americana de Física intitulada *“Plenty of Room at the Bottom”* explorando as inúmeras possibilidades oferecidas pela miniaturização. Neste encontro, Feynman falou sobre a manipulação de materiais em escala nanométrica, átomo por átomo. Sobre esta perspectiva, explicou que nanomateriais não se comportam como o mesmo material em escala macroscópica, e deste modo, trabalha-se

com propriedades e comportamentos diferentes. Estes são os principais motivos para se desenvolver novos materiais em escala nanométrica. (BENNISTON; MACKIE, 2002; PLENTY ..., 2009; FEYNMAN, 1959; SOUSA; RANGEL, 2009; TOUMEY, 2008)

As propriedades dos materiais nanoestruturados são diferentes por duas razões. Em primeiro lugar, os nanomateriais têm uma área superficial específica (área/volume) relativamente maior do quando comparada com o material produzido em escala macro. Esta característica torna os materiais mais reativos quando produzidos em nanoescala, principalmente porque as transformações químicas se dão ao longo das superfícies, afetando fortemente a cinética das reações. Em segundo lugar, os efeitos quânticos, comuns aos materiais nanoestruturados metálicos, podem começar a dominar o comportamento da matéria o que afeta significativamente, por exemplo, o comportamento óptico, elétrico e magnético dos materiais. (NANOSCIENCE ..., 2004)

As nanoestruturas podem ser produzidas em uma dimensão (para revestimento de superfícies muito finas como camadas lamelares de até 1 nm de espessura e largura e comprimento entre 100 nm e 1000 nm), em duas dimensões (os nanotubos ou nanofios) e em três dimensões (nanopartículas e nanoesferas). Do ponto de vista tecnológico, os métodos para a obtenção de nanoestruturas podem ser sintetizadas fundamentalmente de dois modos: método *bottom up* (de baixo para cima) ou método *top down* (de cima para baixo). (NANOSCIENCE ..., 2004; SOUSA; RANGEL, 2009)

O método *bottom up*, abordado inicialmente por Feynman, refere-se à construção de dispositivos a partir de átomos ou moléculas ligados individualmente. Neste método, as estruturas são vistas como versáteis “blocos de construção” para a obtenção de dispositivos nanométricos, por meio de processos físico-químicos que permitem o controle tridimensional para a formação de estruturas e sistemas cada vez mais complexas. (WANG; XIA, 2004)

O método *top down* refere-se à redução do material de sua forma volumosa natural macroscópica (*bulk*) para dimensões nanométricas por técnicas de litografia o que exige o domínio de outras técnicas como a microeletrônica. Normalmente, estas técnicas utilizam um feixe eletrônico para fabricar estruturas em três dimensões, originando, por exemplo, os pontos quânticos (*quantum dots*) que são produzidos através de técnicas de crescimento de nanocristais, onde os efeitos quânticos são fundamentais. Estes são devidos ao confinamento de elétrons em três dimensões e por isso muitas vezes são referidos como átomos gigantes, e estão diretamente ligados ao desenvolvimento e otimização de dispositivos eletrônicos e à miniaturização destes. Além da litografia, as estruturas em três dimensões também podem ser obtidas a partir da técnica de evaporação-condensação do material de interesse sobre uma

superfície. (CHIKUITO, 2001; WANG; XIA, 2004)

É importante destacar que os materiais nanoestruturados não são novos por apresentarem estrutura ou composição química diferentes do material macroscópico, mas sim por apresentarem forma, orientação ou tamanho das áreas específicas diferentes em relação às escalas micro e macroscópicas. As características das superfícies como carga e tamanho são importantes, pois, são elas que controlam as interações com outros materiais e determinam suas aplicações. Logo, é importante que os sistemas tenham suas características físico-químicas bem definidas para que alcancem sua aplicabilidade final.

2.2 A formação dos nanomateriais

Para que uma substância seja considerada um material algumas de suas propriedades (por exemplo, elétricas, magnéticas ou catalíticas) deve lhe conferir alguma função específica. Logo, materiais são toda e qualquer substância, ou mistura delas, que possuam propriedades que os tornem úteis em estruturas e produtos. (ZARBIN, 2007)

Todas as classes de materiais como polímeros, cerâmica, vidros, metais e semicondutores, além dos compósitos, podem ser obtidos em escala nanométrica, através do controle e formato da partícula, sem alterar a composição química ou sua estrutura tridimensional. Como reportado na sessão anterior, quando se trabalha em escala nanométrica as propriedades dos materiais são modificadas o que podem lhe conferir novas aplicações. Desta forma obtém-se nanopartículas, nanoesferas, nanofios ou nanotubos que são novos materiais com propriedades físico-químicas diferentes dos materiais em escala macrométrica. (ZARBIN, 2007)

Um dos métodos de obtenção de nanopartículas é através dos colóides, que são misturas heterogêneas de pelo menos duas fases, sendo estas chamadas de fase dispersa (interno) e fase contínua (externo), denominadas de meio de dispersão. Emulsão é um tipo de sistema coloidal que é termodinamicamente instável, que resulta da mistura de dois líquidos imiscíveis entre si e uma terceira fase contendo agente emulsificante. As emulsões são classificadas de acordo com a sua fase externa (contínua) chamadas de emulsão água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) ou ainda água-óleo-água (A/O/A), também chamada de emulsão múltipla. Na emulsão A/O a fase dispersa pode ser qualquer substância polar (água) e a fase

contínua qualquer substância apolar (óleo). A figura 1 representa as diferenças entre as emulsões do tipo A/O, O/A e A/O/A. Estas classificações são dependentes das características físico-químicas do tensoativo, baseado no equilíbrio entre as partes polares e apolares. (BRUXEL et al., 2012; JAFELICCI JUNIOR; VARANDA, 1999; KOURNIATIS et al., 2010; MANIASSO, 2001; PIANOVSKI et al., 2008)

Figura 1 - Representação dos sistemas (a) óleo/água, (b) água/óleo e (c) água/óleo/água.

Fonte: Adaptada de BRUN et al., 2011; BARBOSA-CANOVAS et al. 2009.

Quando se estuda as emulsões em escala nanométrica, estas são chamadas de nanoemulsões. Em geral, a fase nanométrica dos sistemas coloidais é composta por micelas sendo estas agregados moleculares que possuem regiões de substâncias anfipáticas. O detalhamento da formação micelar será descrito na Seção 2.3. A figura 2 representa a estrutura das micelas presentes nas nanoemulsões A/O e O/A.

Figura 2 - Estrutura representativa das micelas formadas nos nanossistemas do tipo (a) óleo/água e (b) água/óleo.

Fonte: Adaptada de FORMARIZ et al 2005.

Para formar as nanoemulsões é necessária a ação física e/ou uma variação do potencial químico dos componentes do sistema. Mecanicamente, é necessária uma energia cinética alta para provocar uma tensão de cisalhamento capaz de deformar as partículas (gotas). Logo, não

há formação espontânea de nanoemulsões. Estes efeitos podem ser alcançados através de, por exemplo, agitadores magnéticos em alta velocidade. A alta energia de rotação gera forças de cisalhamento que causa mudanças nas pressões interna e externas das gotas gerando sua deformação e rompimento. (KOURNIATIS et al., 2010; TADROS. et al., 2004)

2.3 Tensoativos

Os tensoativos ou surfactantes são substâncias que possuem superfície ativa e são responsáveis pela formação micelar das nanoemulsões. Dentre as propriedades mais importantes das micelas formadas pelos tensoativos destacam-se a redução da tensão interfacial e a capacidade de solubilizar diferentes solutos ou espécies pouco solúveis. Para que este fenômeno aconteça às gotas presentes na nanoemulsão deve adsorver às moléculas de tensoativo, na interface formada entre a fase contínua e a fase dispersa e, assim, reduzir a tensão superficial do sistema. Um dos tensoativos mais utilizados, descritos na literatura, são os aniônicos como o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). (DALTIM, 2011; KIM; SHAH, 2003; MANIASSO, 2001; REIS, 2011)

Os tensoativos são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, que se organizam dinamicamente em solução aquosa a partir de certa concentração micelar crítica (CMC). Abaixo desta concentração não há formação de micelas, pois, o surfactante está predominantemente na forma de monômeros, e estes se apresentam dispersos na solução, figura 3.a. Se a concentração está abaixo, porém próxima da CMC, há um equilíbrio dinâmico entre as micelas e os monômeros. Por fim, acima da CMC, formam-se agregados moleculares micelares que podem conter de 50 a 100 moléculas, figura 3.b. (MANIASSO, 2001; RIZZATTI; ZANETTE; MELLO, 2009)

Figura 3 - Formação micelar representando as moléculas anfipáticas dos tensoativos em emulsão óleo/água. (a) Abaixo da CMC, com monômeros dispersos; (b) acima da CMC, com a formação de micelas na forma esférica.

Fonte: Adaptada de: MANIASSO, 2001; FORMARIZ et al. 2005.

Estruturalmente as micelas são formadas quando o grupo de cabeça hidrofílica está direcionado para a solução aquosa (polar), e a cadeia linear ou cauda está posicionada do lado inverso da fase aquosa (apolar), como na figura 3.b. A principal razão para a associação de monômeros de tensoativos sob a forma micelar é a diminuição da área de contato entre as cadeias hidrocarbonéticas e a água. Por essa razão a CMC depende da estrutura do surfactante (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições experimentais como, por exemplo, força iônica e temperatura. (MANIASSO, 2001; RIZZATTI; ZANETTE; MELLO, 2009)

Os tensoativos são responsáveis pela formação e pelo aumento da estabilidade das nanoemulsões através de sua adsorção dificultando coalescência do sistema. No entanto, o excesso de tensoativos pode levar a desestabilização, pois, em altas concentrações as micelas não adsorvidas e podem levar a um processo de floculação. Assim, a concentração do tensoativo deve ser diretamente proporcional a quantidade do soluto a ser solubilizado. (SANTOS; BARBOZA, 2013)

2.3.1 Classificação dos tensoativos

Os tensoativos são classificados de acordo com a sua porção polar e apolar em: iônicos, anfotéricos ou não-iônicos.

Os tensoativos iônicos apresentam o grupo aniônico ou catiônico ligados às cadeias

hidrofóbicas. Em particular, quando em solução, as características físico-químicas dos tensoativos aniônicos são influenciadas pela presença de eletrólitos, como sais solubilizados, ou quando em diferentes pHs. Um exemplo de tensoativo aniônico é o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).

Os anfóteros possuem ambos os grupos, aniônico e catiônico, e dependendo do pH da solução podem dominar as cargas positivas ou negativas ou se neutralizarem. Um exemplo desta classe de tensoativo é o 4 –(dodecildimetil amônio) butirato (DAB).

E por fim, os não-iônicos são aqueles cujo o grupo hidrofílico é geralmente uma cadeia poliéster. Um exemplo de tensoativo não-aniônico é o polioxietileno (9-10) p-tercotil fenol (Triton X-100). (DALTIM, 2011; MANIASSO, 2001)

2.4 A estabilidade dos nanomateriais

Um dos maiores desafios da formação das nanoemulsões é mantê-las estáveis. Em geral a estabilidade é dependente de fatores físicos (interfaciais) e químicos. A tendência de uma dispersão coloidal é que as gotas da emulsão se coalesçam, separando as fases do sistema e por consequência, reduzindo a sua área e a tensão superficial e a energia livre do sistema. A velocidade de coalescência é dependente da concentração das nanopartículas no meio onde são formadas, da área superficial e da força de van der Waals. (ATKINS; PAULA, 2008; SILVA JUNIOR; ZANELLA; RAFFIN; SOUZA, 2013; MCCLEMENTS, 2012; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990)

2.4.1 A energia livre de Gibbs

A instabilidade termodinâmica é explicada segundo a relação da variação da energia livre de Gibbs (dG) e a variação na área superficial de uma amostra ($d\sigma$), influenciada pelo número de átomos que estão na região da fronteira das fases da nanoemulsão. À temperatura e

pressão constantes, a variação da energia livre é proporcional ao aumento da área de contato entre a fase aquosa e fase oleosa multiplicada pela tensão interfacial (γ) na interface óleo/água, este valor é representado pela equação 1. (ATKINS; PAULA, 2008; MCCLEMENTS, 2012)

$$dG = \gamma d\sigma \quad (1)$$

Quando a área das partículas diminui a energia livre também tende a diminuir. Então, o equilíbrio termodinâmico de um sistema disperso é dependente da completa separação das fases, levando a uma área interfacial mínima. Como o processo de emulsificação implica em um grande aumento da área interfacial ($S_1 \rightarrow S_2$), o que eleva a energia livre ($G_1 \rightarrow G_2$), uma das alternativas para se aumentar a área interfacial é através da forte agitação mecânica da solução. (ATKINS; PAULA, 2008; OLIVEIRA, et al., 2004)

O estado de equilíbrio sempre é o de menor energia, onde o sistema sempre se opõe à formação das dispersões coloidais, explicando a tendência de coalescência destes sistemas. Portanto, o aumento da estabilidade nestes, pode ser alcançada através da redução da tensão interfacial (γ) com a adsorção de tensoativos pelas partículas presentes no meio da nanoemulsão, como descritos na Seção 2.3. (ATKINS; PAULA, 2008; MCCLEMENTS, 2012)

2.4.2 Formas de estabilização das nanoemulsões

Algumas suspensões coloidais não possuem tendência a separação de fases até alguns meses após sua preparação. Isto ocorre devido à alta viscosidade do meio dispersante uma vez que, o movimento Browniano (movimento irregular de pequenas partículas imersas numa solução) é lento para partículas em escala nano ou micrométricas. No entanto, a aglomeração e a sedimentação podem ocorrer em função do tempo indicando que o sistema desestabilizou. (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990; SCHAFFAZICK et al., 2003; SILVA; LIMA, 2007)

A desestabilização é muito alta na ausência de qualquer agente de repulsão entre as cargas das nanopartículas em solução aquosa. Para neutralizar a atração de van der Waals (interações intermoleculares fracas) presentes no sistema, é necessário criar uma força repulsiva. Assim, as nanoemulsões podem ser estabilizadas por tensoativos carregados (que proporcionam estabilidade eletrostática, formando uma dupla camada de cargas) ou não-iônicos (que proporcionam estabilização estérica). (DURÁN, N. *et al.*, 2010; SHI, 2002)

2.4.2.1 Estabilização eletrostática

Segundo a teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), para estabilizar as cargas das nanopartículas em solventes polares deve-se buscar um equilíbrio entre as forças atrativas de van der Waals e as forças repulsivas eletrostáticas. Na ausência destas forças há a aglomeração do sistema de nanopartículas. (BHATTACHARJEE; ELIMELECH; BORKOVEC, 1998; TADROS, 2013)

Na estabilização eletrostática, a presença de tensoativos iônicos, por exemplo cloreto de estearil dimetil amônio, induz o aparecimento de cargas na interface das nanopartículas, formando, camadas carregadas por diferentes mecanismos. Na região interfacial há, preferencialmente, a aproximação de cargas opostas para manter a eletroneutralidade. Fisicamente, com a formação da dupla camada eletrônica (*electric double layer*), ocorre a repulsão eletrostática destas cargas. Esta repulsão mútua é o que confere estabilidade à solução de nanopartículas, não havendo agregação no sistema coloidal. Mas, para que isso aconteça a intensidade da força eletrostática de Coulomb repulsiva deve ser maior que a intensidade da força atrativa de van der Waals. A figura 4 representa a estabilização eletrostática em uma nanopartícula. (BHATTACHARJEE; ELIMELECH; BORKOVEC, 1998; TADROS, 2013)

Figura 4 - Representação esquemática da camada dupla elétrica e seus efeitos para a estabilização por repulsão eletrostática.

Fonte: Adaptada de MALVERN ... 2011.

2.4.2.2 Estabilização estérica

Na estabilização estérica, a presença de tensoativos não-iônico como moléculas de cadeia muito longa, por exemplo, polímeros, fazem com que as partículas do sistema passem a se repelir através do impedimento estérico (causado pela ocupação de espaço das partes de uma molécula, que impede que uma reação ou desestabilização ocorra). A repulsão ocorre somente quando é energeticamente mais favorável a interação das moléculas do tensoativo adsorvidas na fase contínua do que com as moléculas do tensoativo adsorvidas na fase dispersa. Por conseguinte, este processo permite que as suspensões aquosas de ativos insolúveis em água possa ser estabilizadas. A figura 5 representa a estabilização estérica em uma nanopartícula. (NAPPER, 1977; SLIWKA, 1975; TADROS *et al.*, 2004)

Figura 5 - Representação esquemática da estabilização por repulsão estérica.
Fonte: Adaptada de MALVERN ... 2011.

Com base no que foi descrito, a avaliação da estabilidade química das nanoemulsões pode ser realizada tendo em vista o armazenamento, o tamanho das partículas, o potencial Zeta, condutividade além de pH. (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SILVA; LIMA, 2007)

2.5 Nanopartículas poliméricas

São muitos os materiais miniaturizados utilizados para aumentar a atividade e a

disponibilidade de ativos. Entre estes materiais podemos citar as micropartículas e as nanopartículas. Em muitos trabalhos são considerados micropartículas materiais estruturados entre 1-1000 μm enquanto as nanopartículas compreendem a faixa entre 1-1000 nm. Estas definições variam de acordo com a aplicação destes sistemas em áreas específicas. (KUMARI; YADAV, 2010; RAO; GECKELER, 2011; SURI et al., 2013)

As micropartículas e nanopartículas podem ser obtidas a partir de matrizes de lipídeos (chamadas de lipossomas) e polímeros como o poliácido láctico (PLA) ou a policaprolactona (PCL), além de polímeros sintéticos e proteínas. A escolha destes materiais para matrizes das nanopartículas são dependentes de fatores como o tamanho das nanopartículas requeridas, solubilidade e estabilidade aquosa dos ativos, carga e permeabilidade da superfície, degradabilidade, toxicidade e perfil de liberação. (MOHANRAJ; CHEN, 2007; KUMARI; YADAV, 2010; RAO; GECKELER, 2011; SURI et al., 2013)

Junto aos lipossomas (vesículas esféricas artificiais de tamanho variável que podem ser produzidas com fosfolipídios naturais e colesterol) as nanopartículas são classificadas como sistemas coloidais. No entanto, ao contrário dos lipossomas, as nanopartículas poliméricas possuem uma matriz sólida onde o ativo é adsorvido ou encapsulado e posteriormente liberado no meio de aplicação por difusão ou erosão (dependente de dissolução) da partícula. As principais vantagens do uso de nanopartículas poliméricas em relação aos lipossomas são a redução de custo, maior potencial terapêutico, maior estabilidade nos meios biológicos e maior tempo de armazenamento e a biodegradabilidade. (KUMARI; YADAV, 2010; ROSSI-BERGMANN, 2008; SCHAFFAZICK et al., 2003)

Em geral, as nanopartículas são caracterizadas por possuírem uma alta superfície de contato e são classificadas em nanocápsulas e nanoesferas as quais diferem entre si segundo sua composição e organização estrutural. (DAUDT et al., 2005; RAO; GECKELER, 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003; ZARBIN, 2007) A figura 6 representa esquematicamente a diferença entre nanocápsulas e nanoesferas segundo sua composição e organização estrutural.

Figura 6 - Representação esquemática das nanopartículas poliméricas de acordo com a organização estrutural (nanocápsulas e nanoesferas). (a) Ativo absorvido no núcleo (b) Ativo adsorvido à parede polimérica; (c) Ativo retido na matriz polimérica; (d) Ativo adsorvido na matriz polimérica.

Fonte: Adaptada de SCHAFFAZICK et al., 2003; KUMARI; YADAV, 2010.

As nanocápsulas são constituídas por um invólucro de material sólido polimérico, disposto ao redor de um núcleo de líquido (água ou óleo), podendo o ativo estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Estes sistemas são também chamados de sistemas vesiculares. (RAO; GECKELER, 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003)

As nanoesferas não apresentam óleo em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica com uma massa inteiramente sólida, semelhante a uma esfera maciça, onde o ativo pode ficar encapsulado no interior ou adsorvido na superfície da esfera. Formas não esféricas também são descritas na literatura. (RAO; GECKELER, 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003)

Para a indústria farmacêutica desenvolver sistemas que estejam na escala micro e nanométrica pode significar facilitar a incorporação de ativos ou biomoléculas terapêuticas implicando na melhoria da eficácia clínica e novas possibilidades de aplicações destes ativos. Não diferente, na cosmética, o uso de ativos naturais, que em sua grande maioria são compostos instáveis, como os óleos essenciais, o desenvolvimento de micro e nanomateriais apresenta-se como uma alternativa para aumentar a estabilidade destes ativos evitando a perda da eficácia e a degradação do produto. (DAUDT et al., 2005; SURI et al., 2013)

2.6 Polímeros Biodegradáveis

Polímeros capazes de serem degradados em ambiente biológico ou em solventes como água, metano e outros são denominados polímeros biodegradáveis. Esta definição é estendida atualmente tanto para biopolímeros naturais como os polissacarídeos, ácidos algínicos, polipeptídios e poliésteres bacterianos; quanto para os biopolímeros sintéticos como o poliácido láctico (PLA), poliácido glicólico (PGA), poliácido glicólico ácido láctico (PGLA) e a poli- ϵ -caprolactona (PCL). (ARMENTANO et al., 2013; FRANCHETTI; MARCONATO, 2006)

O ácido láctico, monômero do biopolímero PLA, é uma molécula quiral simples, com uma função álcool e outra função ácido carboxílico bifuncional que possui dois enantiômeros opticamente ativos o dextrogiro (ácido D-lático - DLA) e o levogiro (ácido L-lático - LLA). (Grossman & Nwabunma, 2010).

O PLA ($C_3H_6O_3$), figura 7, é um dos polímeros mais estudados para o uso em matrizes para sistemas de liberação controlada. Ele é um éster alifático, termoplástico e relativamente hidrofóbico devido ao seu grupo metil e é amplamente aplicado em nanopartículas, principalmente, por possuírem cadeias carbônicas hidrolisáveis. (MOTTA; DUEK, 2006; SEVERINO, et al., 2011).

Figura 7 - Representação do monômero do PLA.

Fonte: Adaptada de PUBCHEM, 2015; GROSSMAN; NWABUNMA, 2010.

A quiralidade do carbono permite, também, a síntese de polímeros enantiômeros levogiro (poli- L - ácido láctico - PLLA) e dextrogiro (poli - D - ácido láctico - PDLA), sendo as moléculas de ambos opticamente ativas e imagens especulares. A mistura racêmica dos dois enantiômeros, o poli- D,L- ácido láctico (PDLLA), é opticamente inativa existindo entretanto, a possibilidade de copolímeros em diferentes proporções. (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; LASPRILLA et al., 2010)

Segundo (WASANASUK et al., 2011), foi possível obter cristais de PLLA α , após a amostra do polímero ser esticada, o que induziu a orientação espacial das cadeias poliméricas. Os resultados foram obtidos como um sistema ortorrômbico, de grupo espacial $P2_12_12_1$ e

parâmetros de cela $a=(10,683\pm0,001)$ Å , $b=(6,170\pm0,001)$ Å e c (*eixo da fibra*) $=(28,860\pm0,004)$ Å. A estrutura cristalográfica esta mostrada na figura 8:

Figura 8 - Estrutura cristalográfica para o PLLA α .
Fonte: WASANASUK et al., 2011.

As propriedades físico-químicas, como o comportamento mecânico e a cristalinidade são dependentes da massa molar, da proporção do monômero de origem, além da via de obtenção e da temperatura de processamento do PLA.

A estrutura cristalina de um polímero é um arranjo tridimensional com regularidade a curta distância atômicas ou com amorficidade. A cristalinidade do PLA pode variar de totalmente amorfo até polímeros com grau de cristalinidade maior que 40%. Para o polímero racêmico, PDLA, a distribuição das unidades D e L na cadeia polimérica são aleatórias e assim não possuem domínios cristalinos, sendo amorfos e com propriedades mecânicas inferiores quando comparados ao semicristalino PLLA. Os polímeros PLLA e PDLA possuem cristalinidade de aproximadamente 35%. (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; GROSSMAN; NWABUNMA, 2010; JAHNO, 2005; LASPRILLA et al., 2010; LUANA BECKER PERES, 2012)

Polímeros semicristalinos possuem transição vítrea (T_g) e ponto de fusão (T_m). A T_g é a temperatura de transição a qual o polímero apresenta características de estado borrachoso, acima da T_g , para um estado rígido ou inversamente quando no estado vítreo, abaixo da T_g , por mudanças de conformação não há energia interna suficiente para ocorrer o deslocamento de cadeias poliméricas em relação uma às outras. A temperatura em que um sólido cristalino passa para um estado líquido é chamada de fusão. (CALLISTER, 2007)

A transição vítrea do PLA se encontra entre 55°C à 60°C e o seu ponto de fusão é de 130°C à 180°C. Os polímeros PLLA e PDLA têm as mesmas propriedades, isto é, T_g entre

50°C e 70°C e T_m entre 170°C e 190°C. (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; GROSSMAN; NWABUNMA, 2010; JAHNO, 2005; LASPRILLA et al., 2010; LUANA BECKER PERES, 2012) No trabalho de (HOIDY et al., 2010) os autores indicam as faixas que o PLA começa a se decompor em 65.38°C e em 380.97°C com perda de massa em uma única etapa e corresponde a 98.41%.

Na literatura, cita-se o encapsulamento de hormônios (progesterona), proteínas (BSA) entre outros em matrizes de PLA. (KUMARI; YADAV, 2010)

2.7 Síntese de nanopartículas poliméricas

Em geral, as nanopartículas poliméricas devem ser preparadas sempre respeitando a razão *ativo/polímero* para se obter uma alta eficácia de encapsulação e baixa toxicidade. Estes fatores são dependentes da composição química, carga superficial, perfil de degradação (térmica, temporal) e massa molar dos polímeros. Do mesmo modo, para os ativos, a massa molar, o perfil de degradação (térmica, temporal), carga e localização na matriz polimérica são fatores que influenciam. Além dessas propriedades o pH da solução, o tipo de tensoativo e as condições do método de preparação das nanopartículas são fatores importantes para serem avaliados na síntese de nanopartículas. PERES, 2012; RAO; GECKELER, 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003; SOUTO; SEVERINO.; SANTANA, 2012a)

O ativo pode ser absorvido durante o processo das nanopartículas ou adsorvido depois das partículas já formadas, sendo este o processo menos eficaz. A escolha do método é dependente de uma série de fatores, tais como, tamanho e distribuição da nanopartícula e o local de ação. A metodologia de síntese das nanopartículas poliméricas é determinada, muitas vezes, pelas características de solubilidade do ativo e é independente do método de obtenção dos produtos (emulsões). (PERES, 2012; RAO; GECKELER, 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003; SOUTO; SEVERINO.; SANTANA, 2012a)

Embora muitas metodologias de síntese de nanopartículas poliméricas sejam citados na literatura, os dois principais são polimerização de monômeros e dispersão de polímeros pré-formados. (MOHANRAJ; CHEN, 2007; PINTO REIS et al., 2006; RAO; GECKELER, 2011; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012a, 2012b)

2.7.1 Polimerização de monômeros

A formação de nanopartículas poliméricas em uma fase aquosa contínua é chamada de polimerização de monômeros. Neste método há dois modos do ativo ser incorporado. No primeiro caso o ativo pode ser dissolvido no meio da polimerização e no segundo caso pode ser adsorvido nas nanopartículas após a polimerização. (MOHANRAJ; CHEN, 2007; PINTO REIS et al., 2006)

A polimerização pode ser iniciada quando a molécula do monômero reage com um íon ou quando a molécula do monômero é transformada em um radical que inicia a polimerização pela ação de radiação de alta energia (incluindo, radiação γ , luz visível ou ultravioleta). (MOHANRAJ; CHEN, 2007; PINTO REIS et al., 2006; RAO; GECKELER, 2011)

A separação de fase e formação das nanopartículas podem ocorrer antes ou depois de finalizada a reação de polimerização. A suspensão de nanopartículas passa pelo processo de remoção do excesso de tensoativos e posteriormente são resuspensas em meios isentos de tensoativos. A formação e o tamanho das nanopartículas depende da concentração de tensoativos e estabilizantes utilizados. Várias metodologias por polimerização de monômeros, tais como, o método de obtenção de micro e nanoemulsões, além da polimerização interfacial são reportadas na literatura. (MOHANRAJ; CHEN, 2007; PINTO REIS et al., 2006; RAO; GECKELER, 2011)

2.7.2 Dispersão de polímeros pré-formados

A dispersão de polímeros pré-formados é uma das técnicas mais utilizadas para o preparo de nanopartículas poliméricas de PLA e PCL, por exemplo. Esta técnica é empregada de várias maneiras como pela evaporação de solvente ou por difusão de solvente. Tais métodos são alguns dos mais utilizadas pois, podem ser empregados para substâncias hidrofílicas ou hidrofóbicas. Para ativos hidrofílicos, uma emulsão múltipla água/óleo/água precisa de ser formada para o ativo ser dissolvido na fase aquosa interna. (MOHANRAJ; CHEN, 2007)

No método por evaporação do solvente, o polímero é dissolvido em um solvente orgânico, como clorofórmio ou diclorometano, que também pode vir a solubilizar um ativo hidrofóbico. A mistura do polímero com o ativo solubilizado é, então, emulsionada com uma solução aquosa contendo um agente tensoativo para formar uma emulsão do tipo óleo em água (O/A) ou duplas emulsões água-óleo-água (A/O/A). Este método utiliza a homogeneização em alta velocidade seguido de evaporação do solvente ou utiliza agitação magnética contínua à temperatura ambiente ou sob pressão reduzida. Neste caso, o tamanho das partículas é influenciada pelo tipo e concentração do tensoativo, velocidade de homogeneização e concentração do polímero. Em geral altas velocidades implicam em tamanhos menores de partículas.

No método por difusão do solvente, um solvente miscível em água, junto com uma certa quantidade de outro solvente não miscível é utilizado na fase oleosa. Devido a difusão destas as duas fases conduzem à formação das nanopartículas. Enquanto a concentração de água aumenta, o tamanho das partículas podem tornar-se menores. Outras técnicas, tais como, *salting-out*, nanoprecipitação, tecnologia do fluido supercrítico e diálise, também são descritas na literatura. (MOHANRAJ; CHEN, 2007; PINTO REIS et al., 2006; RAO; GECKELER, 2011)

2.7.3 O nanoencapsulamento e a liberação de ativos

Das seções anteriores destaca-se que o mecanismo de um sistema de liberação controlada, provido de nanopartículas, é dependente das características físico-químicas do polímero, do tensoativo, do ativo e, por fim, do meio onde serão aplicadas.

É importante destacar que a distribuição de tamanho das nanopartículas é um fator importante no desempenho, controle da liberação e na proteção do ativo encapsulado. Nota-se que quanto maior a área superficial das nanopartículas e menores forem seus diâmetros, mais rapidamente o ativo será liberado. A razão entre a adsorção e dessorção do ativo na superfície das partículas, a difusão pela matriz polimérica das nanocápsulas e nanoesferas, o intumescimento e degradação do polímero também são fatores que implicam no funcionamento do sistema. (LEIMANN, 2008; PERES, 2012)

Em geral, a velocidade de liberação inicial rápida dos ativos é devida a sua dessorção

ou fraca ligação na área superficial da matriz polimérica. E posteriormente ocorre a liberação lenta, que é controlada pelo processo de difusão, intumescimento ou erosão da matriz e é um fator que pode indicar o nanoencapsulamento. (LEIMANN, 2008; PERES, 2012) Neste trabalho, o ativo para nanoencapsulamento é o óleo essencial *Schinus molle* L., popularmente conhecido como óleo de Pimenta Rosa.

2.8 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são ativos lipofílicos de grande interesse em diversos campos devido suas propriedades biológicas e, por isso, são comumente explorados para aplicações em formulações farmacológica, cosmética, agrotóxica ou alimentícia. Por ativos lipofílicos pode-se entender como um grupo heterogêneo de moléculas que exibem baixa solubilidade em água, mas, na maioria das vezes solúvel em solventes orgânicos. (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008)

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis aromáticas do metabolismo secundário das plantas, geralmente produzido por células secretoras, contidas em vários órgãos do vegetal (folhas, frutos, caules, raízes). São líquidos de aparência oleosa e voláteis à temperatura ambiente, o que é uma das principais diferenças em relação aos óleos fixos que apresentam composição glicerídica e não evaporam ou volatilizam completamente. Em sua maioria, estes óleos são constituídos por substâncias terpênicas, de moléculas pequenas como álcoois, cetonas e de cadeia curta como ésteres e aldeídos. A composição destas substâncias variam de planta para planta e de órgão para órgão vegetal da planta. (SIANI et al., 1993; SCHERER et al. 2009; TOTTI; MEDEIROS, 2006)

A extração destes óleos pode ser obtida através da destilação por arraste a vapor além de outras técnicas e, geralmente, apresentam aroma intenso e agradável.

2.8.1 Óleo essencial de *Schinus molle* L. (pimenta rosa)

A família *Anacardiaceae*, mais conhecida como Aroeira, é nativa da América do Sul. No Brasil ocorrem por toda a costa principalmente do Pernambuco ao Rio Grande do Sul em diversos tipos de formações vegetais e inclui aproximadamente 29 espécies, sendo as mais comuns a *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha), figura 9 (A), e *Schinus molle* L. (aroeira-periquita), figura 9 (B). Com estas espécies há vários estudos que envolvem a extração e uso dos óleos essenciais, embora, sejam mais comum para a *S. terebinthifolius* Raddi. Os frutos dessas árvores são conhecidos popularmente por vários nomes entre eles pimenta brasileira e pimenta rosa. (SANTOS, et al., 2010; BENDAOU; ROMDHANE; SOUCHARD; CAZAUX; BOUJILA, 2010).

(A)

(B)

Figura 9 - Aroeiras (A) *Schinus terebinthifolius* Raddi e (B) *Schinus molle* L.
Fonte: SCHINUS MOLLE; SCHINUS.

Alguns compostos químicos presentes nos óleos essenciais, de ambas as espécies citadas, são os flavonoides, taninos e os alcaloides que formam o grupo com maior número de substâncias biologicamente ativas. (BENDAOU; ROMDHANE; SOUCHARD; CAZAUX; BOUJILA, 2010)

A espécie *Schinus molle* L. apresenta alto teor de óleo essencial e uma grande variação de população. No trabalho de (GOMES et al., 2013) foram analisados óleos essenciais no Brasil de 11 populações, divididos em grupos com predominância de compostos majoritários

diferentes, entre eles o sabineno, α e β - pineno, cadinol e o mirceno.

Os composto majoritários dos óleos essenciais encontrados em folhas e frutos *Schinus molle* L., são monoterpenos e hidrocarbonetos (α -felandreno, β -felandreno, β -mirceno, limoneno e α -pineno), algumas destas estruturas são identificadas neste trabalho. Ainda segundo o mesmo autor, os óleos essenciais das folhas e frutos de *Schinus Molle* L. demonstraram atividade antioxidante e antimicrobianas sugerindo seu potencial de uso em indústrias de alimentos e farmacêutica. (MARTINS et al., 2014)

Em especial, na agroindústria, os óleos essenciais de *Schinus molle* L., podem atuar na inibição de germinação e atração de polinizadores, além de ser um potencial agente antifúngico (em especial aroeira-vermelha). Na indústria farmacêutica, o uso tópico dos extratos etanoicos é usado em tratamentos de doenças de infecções cutâneas, respiratórias, distúrbios menstruais e diuréticos. (OLIVEIRA, et al., 2013; SANTOS, et al., 2010)

Na medicina popular é comum o uso do óleo essencial livre de *Schinus molle* L., como antibacteriano, antiviral, antisséptico tópico, antifúngico, antioxidante, anti-inflamatório, e analgésicos; (MARTINS et al., 2014), além de ser usado como inseticida (LOPEZ, et al., 2014) e repelente (BRAS et al., 2011).

Os óleos essenciais principalmente por serem lipofílicos, voláteis e instáveis à temperatura ambiente e de alto custo têm o seu uso muito limitado. Os efeitos da oxidação devido a exposição a luz direta, contato com o oxigênio livre e umidade podem ser minimizadas através da proteção do ativo evitando alterações químicas ou organolépticas durante o armazenamento o que garante maior biodisponibilidade. (PINTO REIS et al., 2006)

A proteção do ativo pode ocorrer através da micro ou nanoencapsulação em uma matriz adequada. Segundo (LOPEZ et al., 2014) a síntese pelo método por *Spray-drying* de micropartículas do óleo essencial *Schinus molle* L., com matrizes em todextrin e goma arábica, foi proposta para liberação controlada do ativo, protegendo-o contra o ambiente externo e visando a melhoria concomitante ao seu potencial inseticida em *Haematobia irritans*.

A micro ou nanoencapsulação de ativos lipofílicos, traz outras vantagens em relação ao emprego do óleo essencial livre. As reações químicas entre o óleo essencial e local de ação podem ser evitadas pela separação física fornecida pela parede polimérica das nanopartículas. Além disso, a mudança na cor, forma, volume, odor, fotossensibilidade, hidrofobicidade entre outras propriedades podem ser alteradas e ou melhoradas. (PINTO REIS et al., 2006)

Neste trabalho, o ativo será nanoencapsulado em uma matriz de PLA, obtendo um mecanismo para uso como liberação controlada, para uso em futuras aplicações cosméticas.

3 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi o estudo de formação e estabilidade de nanopartículas de poliácido láctico para liberação controlada de ativos lipofílicos como o óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus molle* L.) para aplicação em cosmética.

3.1 Objetivos específicos

- 1) Estudar e avaliar a síntese de obtenção de nanopartículas poliméricas a partir da técnica de evaporação por solvente;
- 2) Estudar a interação do ativo e da matriz, visando um processo de sistemas de nanopartículas;
- 3) Avaliar o sistema de nanopartículas de PLA em solução aquosa quanto a estabilidade (com o tempo) e formação, através das técnicas de análises físico-químicas:
 - a) Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS);
 - b) Difração de Raios-X pelo método do pó (XRD);
 - c) Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR);
 - d) Análise Termogravimétrica (TGA);
 - e) Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e
 - f) Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Os materiais foram adquiridos pelo Laboratório da empresa Nanomed – Inovação em Nanotecnologia, localizada no Parque Tecnológico de São Carlos – Parquetec. Para a síntese das nanopartículas poliméricas todos os reagentes foram adquiridos como padrão analítico grau (P.A.) da empresa *Synth*.

- Acetona (C_3H_6CO) (P.M. 58,08);
- Água destilada;
- Bicarbonato de Sódio ($NaHCO_3$) (P.M. 84,01);
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) (P.M. 288,38);

O poliácido láctico (PLA) ($C_3H_4O_2$)_n foi sintetizado por terceiros e cedido pelo Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia (LNN), do Instituto de Física de São Carlos – IFSC, USP.

Para a determinação da massa molar do PLA o reagente Tetrahydrofurano (THF) (C_4H_8O) grau (HPLC) da empresa Merck foi utilizado como adquirido pelo Grupo de Polímeros Bernard Gross– IFSC, USP.

4.1.2 Material Vegetal

As amostras de frutos maduros *in natura* de pimenta rosa utilizada para a extração do

óleo essencial foram coletadas no fim do segundo semestre de 2012 entre os meses de setembro e outubro na região nordeste do Brasil, na cidade de Itabuna, coordenadas ($14^{\circ}47'21.0'' S$ e $39^{\circ}16'36.7'' W$), Bahia (BA), cedidas pelo produtor Peter Lemos.

4.2 Métodos

4.2.1 Emulsificação seguida de evaporação do solvente

O método de emulsificação seguida de evaporação de solvente é utilizado segundo sua simplicidade na obtenção de materiais nanoemulsionados. (SUAVE; DALL'AGNOL, 2009)

Em geral, nas nanoemulsões (O/A, A/O ou A/O/A) o polímero se encontra dissolvido em um solvente orgânico na fase interna e o tensoativo está dissolvido na fase externa, normalmente, aquosa. Mas, o solvente orgânico pode ser ou não totalmente solúvel na fase externa assim, este é removido posteriormente por agitação, favorecendo a formação das nanopartículas. A seguir estas podem ser lavadas, liofilizadas, e/ou separadas por centrifugação. O ativo foi emulsionado na fase externa devido à escolha do tensoativo aniônico SDS. (SUAVE; DALL'AGNOL, 2009)

O desenvolvimento e a estabilidade de nanopartículas de PLA foi estudada a partir da associação do tensoativo Dodecil sulfato de sódio (SDS0, figura 10, com o sal bicarbonato de sódio, figura 11.

Figura 10 - Fórmula estrutural do dodecil sulfato de sódio (SDS).
Fonte: PUBCHEM, 2015.

Figura 11 - Fórmula estrutural do bicarbonato de sódio.
Fonte: PUBCHEM, 2015.

O SDS é um tensoativo que apresenta uma região polar com carga negativa que normalmente apresenta átomos de oxigênio (de alta eletronegatividade) que atraem elétrons de carbono e hidrogênio. Os oxigênios ionizam-se em meio aquoso, cedendo seus cátions. A parte polar apresenta alta polaridade e capacidade de atração com moléculas de água, sendo, portanto, muito solúvel em solventes polares. Segundo esta característica de alta polaridade o tensoativo gera uma região de moléculas de água organizadas à sua volta chamada de camada de solvatação. (RIZZATTI; ZANETTE; MELLO, 2009; SANTOS; BARBOZA, 2013)

Já o bicarbonato de sódio é um sal básico e detergente e no sistema é utilizado como um agente tampão. O uso de bicarbonato de sódio associado ao SDS foi adaptado da síntese de (COSTA, 2010).

4.2.2 Cromatografia por Permeação em Gel (*Gel Permeation Chromatography*, GPC)

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura através da distribuição dos componentes em duas fases distintas, chamadas de fases estacionária e móvel. A fase móvel passa pela fase estacionária que retém cada um dos compostos de forma seletiva. É uma das técnicas analíticas que efetua com precisão a separação, identificação e quantificação das espécies químicas quando em conjunto com outras técnicas, por exemplo, a espectroscopia de massas. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006)

A cromatografia por permeação em gel (GPC) é baseada no fracionamento em coluna,

separando diferentes massas moleculares de terminado polímero em solução sendo uma técnica confiável e relativamente rápida. Diferentemente da cromatografia gasosa (CG), esta técnica possui as fases móvel e estacionária iguais. (AKCELRUD, 2007; MOREIRA *et al.*, 2004)

Figura 12 - Separação por exclusão de tamanho para amostra de polímero por GPC: (A) injeção da amostra; (B) separação por tamanho (as massas molares menores são retidas por mais tempo no gel poroso); (C) separação das massas molares maiores; (D) separação das massas molares menores.

Fonte: Adaptada de STRIEGEL *et al.*, 2009.

Para a determinação da massa molecular pelo uso da GPC, figura 12, um solvente é bombeado continuamente por colunas que contém um leito de gel poroso, com distribuição de tamanho conhecido, onde ocorre a separação por tamanho através percolação da solução. As primeiras moléculas eluídas são a de maior tamanho que passam entre poros, percorrendo com a velocidade do volume externo daqueles (neste caso, há também solvente no volume interno dos poros). As moléculas de tamanho menores ficam retidas nos poros, e o tempo de retenção aumenta progressivamente no interior da coluna. As massas são identificadas por detetores de absorção UV ou detetores de índices de refração entre outros (AKCELRUD, 2007).

A GPC separa as massas moleculares correspondentes do polímero e as relacionam com uma massa molecular conhecida, neste caso, padrões de poliestireno (PS) monodispersos.

Como, normalmente um polímero é constituído por cadeias longas de tamanhos não uniformes, obtém-se uma distribuição de massas moleculares. Através da técnica de GPC é possível determinar a massa molecular numérica média $\overline{M}_n$ (sensível a moléculas de menor massa) e a massa molecular pondera média $\overline{M}_w$ (sensível a moléculas de maior massa), além de sua polidispersão (D) dada pela razão entre as massas moleculares equação 2:

$$D = \frac{\overline{M_w}}{\overline{M_n}} \quad (2)$$

De acordo com a equação 2, quanto mais próximas as massas for, o valor de D irá se aproximar de 1 e quanto mais variado forem os tamanhos das massas, maior será D, em geral maior do que 1. Para a análise dos dados extraídos desta técnica, uma curva de calibração converte os dados em massa molecular e em sua distribuição, logo, não é um método absoluto. (AKCELRUD, 2007; MOREIRA *et al.*, 2004) Após a integração da curva de distribuição obtida, considerando-se que o polímero seja constituído por uma quantidade de cadeias (i) com massas molares iguais M_i , temos que a massa molecular numérica média $\overline{M_n}$ e a massa molecular pondera média $\overline{M_w}$, são dadas respectivamente pelas equações 3 e 4: (CALLISTER, 2007; LUCAS; SOARES, 2001)

$$\overline{M_n} = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i} \quad (3)$$

$$\overline{M_w} = \sum_i w_i M_i = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i} \quad (4)$$

Onde, n_i é o número de moléculas que possuem massa M_i e M_i são as massas moleculares de cadeia i.

4.2.3 Extração do óleo essencial de Pimenta Rosa através da técnica por hidrodestilação

A destilação por arraste de vapor é uma técnica utilizada para a extração de óleos essenciais seja ele obtido das folhas, raízes, folhas ou frutos da matéria-prima vegetal. A extração por arraste de vapor foi proposta por ser considerada uma tecnologia em que não se emprega o uso de solventes orgânicos (tais como hexano, benzeno, metanol entre outros).

No método de hidrodestilação o material a ser destilado fica em contato direto com a água, arrastando-se todos os compostos, inclusive o óleo, com uma corrente de vapor d'água. Na etapa seguinte, a água e o óleo se condensam formando uma mistura heterogênea, devido a

diferença de polaridade e densidade entre os compostos. Esta mistura física recebe o nome de hidrolato. A técnica utiliza o aparelho de Clevenger, figura 13, acoplado a um balão, que permite a separação do óleo e água, evitando possíveis decomposições do óleo e resfriando-o. (OLIVEIRA et al., 2013)

Figura 13 - Aparelho de Clevenger modificado para destilação do óleo essencial: (A) manta aquecedora com termostato; (B) aparato de Clevenger; (C) adaptação ao aparato de Clevenger (condensador reto inclinado)

Fonte: Adaptada de Garikapati et al., 2005.

A manta aquecedora figura 13 (A) mantém aquecido em temperatura um balão de fundo redondo figura 13 (B) (i). O aparelho de Clevenger figura 13 (B) (ii–iv) é adaptado a este balão (i) que acondiciona o material vegetal junto com o volume de água adequado. Após o aquecimento do material este entra em ebulição, onde o vapor passa através de um tubo de vidro longo vertical (ii) e é levado condensador vertical (iii). A água fria circula no condensador através da entrada e saída observados na figura. O destilado (hidrolato) é recolhido em um tubo de medição ou bureta (iv) ligado à saída do condensador (iii) onde uma saída de ar aberto para a atmosfera (v) é colocado. Nesta saída é adaptado um condensador inclinado para evitar maiores perdas de saída do vapor, figura 13 (C). O óleo separa-se do destilado na camada superior devido à sua diferença de densidade em relação à água. Um tubo de retorno (vi), é responsável pela reciclagem da parte aquosa do destilado, conectando logo abaixo do tubo de medição (iv) e do tubo vertical (ii). O óleo é coletado na saída do tubo de medição (iv) com a abertura da válvula. (Garikapati et al., 2005)

4.2.4 Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (*Gas chromatography-mass spectrometry, CG-MS*)

Na Cromatografia Gasosa (CG), substâncias voláteis são introduzidas em uma coluna que contém a fase estacionária (sólida ou líquida). Quando esta coluna é levada a uma temperatura adequada, as substâncias são volatilizadas e separadas de acordo com sua massa. Nesta coluna uma corrente de gás passa continuamente, e quando a amostra é volatizada, ela é arrastada através da coluna, ficando retidas na fase estacionária, por tempo determinados até saírem da coluna. A identificação destes compostos pode ser realizada através da comparação do tempo de retenção de um padrão com o da amostra. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006)

Para a identificação e a quantificação das espécies químicas, acopla-se um detetor apropriado na coluna, que gera um registro dos dados. Posteriormente, os compostos são resfriados em um tubo por onde passa o gás eluente com um banho de gelo seco ou nitrogênio líquido. Um destes detetores pode ser um espectrômetro seletivo de massas ou “*ion trap*”, passando a técnica se chamar (CG-MS).

A CG-MS, então, consta de um cromatógrafo (normalmente de uma coluna capilar), uma ligação entre os dois sistemas a serem acoplados, uma câmara de ionização onde os íons são formados, uma câmara que funciona a vácuo onde ocorre a separação dos íons e um sistema de para detecção e registro dos dados obtidos. Quando os íons são formados e deixam a câmara de ionização, estes vão para um filtro ou analisador de massas, onde são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z), através da imposição de um campo magnético externo. O resultado final nos mostra um cromatograma e um espectro de massas, que são característicos para cada substância que se quer identificar. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006)

A técnica de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de massas (CG-MS) é importante para a identificação de compostos voláteis tal como os óleos essenciais. O único detalhe para se usar esta técnica de cromatografia é que a amostra não pode sofrer degradação durante a análise no cromatográfico e a sua quantidade deve ser relativamente grande. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

4.2.5 Espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering -DLS*)

O conjunto de técnicas de espalhamento de luz é considerado não invasivo, pois pode ser realizado em solução o que não implica em mudanças químicas e físicas nos sistemas. Há essencialmente dois tipos de técnicas o Espalhamento de Luz Estático (SLS) e o Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). (MALVERN ... 2004) Estas técnicas podem fornecer informações como tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta, condutividade e massa molecular.

O DLS é embasado na teoria de que pequenas partículas que em suspensão possuem movimentos aleatórios, chamados de movimento Browniano. Os movimentos ocorrem devido as colisões entre as partículas em suspensão e o solvente das moléculas. Uma característica importante do movimento Browniano é que pequenas partículas se movem rapidamente e as grandes partículas movem-se mais lentamente. (MALVERN ... 2004; SILVA; LIMA, 2007)

O equipamento de DLS utiliza um laser que converge para um foco na amostra usando uma lente e analisa as flutuações de intensidade ao longo do tempo, figura 14 (A). A taxa de intensidade é dependente dos tamanhos das partículas e por isso partículas menores são deslocadas para longe, porque as moléculas do solvente se movem rapidamente. A luz é espalhada pelas partículas em todos os ângulos e um único detetor, que no equipamento é colocado à 90° em relação ao feixe incidente, recolhendo aquela luz espalhada. As flutuações de intensidade naquela direção, em escala de tempos curtos, são convertidas em impulsos elétricos, os quais são alimentados para um dispositivo de correlação. A partir do dispositivo de correlação, é gerado uma função de autocorrelação, a partir do qual obtém-se um gráfico de distribuição dos tamanhos das partículas espalhadoras, figura 14 (B). . (MALVERN ... 2012; PECORA, 2000)

Figura 14 - Condições de medidas para o DLS: (A) montagem experimental e (B) exemplo de gráfico de distribuição de tamanho em função da intensidade.

Fonte: Adaptada de MALVERN... 2004.

A análise da intensidade de flutuação permite determinar a relação entre a dimensão de uma partícula e a sua velocidade, definida na equação de *Stokes-Einstein*, equação 5, para pequenas esferas: (MALVERN ... 2004; SILVA; LIMA, 2007)

$$r = \frac{kT}{6\pi nD} \quad (5)$$

Onde

- r é o diâmetro hidrodinâmico
- k é a constante de Boltzmann
- T é a temperatura absoluta
- n é a viscosidade do solvente
- D é o coeficiente de difusão do soluto

O raio hidrodinâmico r , figura 15, indica como uma partícula se difunde no interior de um fluido. O raio é relacionado a uma esfera e esta contém um coeficiente de difusão de translação dependente, não apenas do tamanho do seu núcleo, mas também de qualquer estrutura existente na superfície, como tipo e a concentração de íons do meio. Logo, o raio hidrodinâmico é geralmente maior do que o medido por técnicas como microscopia eletrônica, onde a partícula é removida do seu ambiente nativo. O DLS determina ainda o valor ponderado do tamanho de partícula, o que significa que partículas de dimensões maiores podem dominar o resultado final. (FLORENZANO, 2008; MALVERN ... 2004)

Figura 15 - Representação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas em função das moléculas de tensoativos adsorvidas na parede polimérica.

Fonte: Adaptada de MALVERN... 2012.

O Índice de Polidispersão (PDI) é uma medida relativa da intensidade de luz espalhada em função da distribuição do coeficiente de difusão translacional. Esta medida é dependente do tamanho das partículas e é determinado a partir dos dados de correlação através do gráfico figura 14 (B). Valores menores que 0,05 são raramente determinados pois, são indicativos de monodispersividade da amostra enquanto valores acima de 0,8 são considerados como um valor alto e amplo de distribuição de tamanho e, por essa razão, não são adequados para a determinação por DLS. (MALVERN ... 2012)

Em geral, as nanopartículas possuem uma carga eletrostática superficial, a qual é influenciada por mudanças na interface do meio dispersante em razão da dissociação de grupos funcionais da superfície ou da presença de tensoativos iônicos ou íons em solução. Estes íons são adsorvidos na superfície da nanopartícula, modificando o potencial de superfície total e formando uma dupla camada elétrica. (MAHMOUDI et al., 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003).

A dupla camada (*double layer*) é constituída pela camada de *Stern*, que é camada interna, que se liga fortemente à superfície, e a camada difusa, mais externa. Quando as partículas se movem, os íons, dentro de um certo limite, também entram em movimento com elas, permanecendo juntos sob um mesmo campo potencial. O potencial desta superfície é chamado de potencial Zeta. (MAHMOUDI et al., 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003). A figura 16 mostra a representação do potencial Zeta.

Figura 16 - Representação do potencial Zeta.

Fonte: Adaptada de HORIBA, 2012.

Em geral nanopartículas com alto valor de potencial Zeta se repelem mutualmente, devido as forças repulsivas, e diminuem o efeito de floculação, tornando a solução estável. Os polímeros, em especial os poliésteres, como o PLA, fornecem um potencial negativo à interface e é o principal constituinte das nanopartículas que influi no valor do potencial Zeta. (MAHMOUDI et al., 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003)

4.2.6 Difração de Raios X pelo método do pó (*X-ray Diffraction, XRD*)

Os raios X são ondas eletromagnéticas de alta energia e possuem comprimento de onda aproximadamente igual às distâncias entre os planos atômicos e difratam como consequência da interferência dos feixes refletidos por uma família de planos cristalinos.

A Difração de Raios X (XRD) é também uma das formas de se caracterizar estruturalmente os nanomateriais de forma não destrutiva. A análise por XRD pode ser feita com amostras monocristalinas ou policristalinas. Nas amostras policristalinas admite-se uma orientação aleatória dos cristalitos, fazendo com que sempre parte da amostra esteja orientada em relação ao feixe de raios X para satisfazer a Lei de Bragg. (SMITH; HASHEMI, 2013)

L. Bragg propôs uma interpretação do fenômeno de difração baseado apenas nas

reflexões produzidas pelos planos cristalinis onde vemos claramente que existe uma diferença de caminho ótico entre os raios 1 e 2 incidentes e refletidos como se observa na figura 17. (CULLITY, 1956; SMITH; HASHEMI, 2013)

Figura 17 - Reflexão de um feixe de XRD pelos planos (hkl) de um cristal para o ângulo de Bragg θ , onde os raios refletidos estão em fase, representando o fenômeno de difração.

Fonte: Adaptada de SMITH; HASHEMI, 2013.

Nota-se que, para o raio 2 vale a relação matemática descrita na equação 6:

$$MP + PN \quad (6)$$

Então, para que os raios 1 e 2 estejam em fase, a distância adicional percorrida por 2, deve ser igual à um número inteiro n de comprimento de onda λ , dada pela equação 7, onde $n = 1, 2, 3, \dots$ chamado de ordem de difração.

$$n\lambda = MP + PN \quad (7)$$

Como MP e PN são iguais a $d_{hkl} \sin \theta$, sendo d_{hkl} a distância interplanar dos planos de índices (hkl), para que ocorra interferência construtiva e por tanto ocorra difração é necessário que valha a seguinte condição:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad (8)$$

Onde, n é um número inteiro, λ é o comprimento de onda dos raios X incidentes, d é a distância interplanar e θ é o ângulo de difração. Deste modo, a relação das posições angulares e intensidades dos picos difratados produzem um padrão característico para cada amostra. Para amostras constituídas por várias fases, o difratograma formado será o resultado da superposição do difratograma de cada uma de suas componentes. (CULLITY, 1956; SMITH; HASHEMI, 2013)

Algumas propriedades tais como, tamanho do cristalito e composição da fase, além da cristalinidade parcial de materiais amorfos, como os polímeros, podem ser determinados por esta técnica.

Os polímeros, podem ser classificados em semicristalinos ou amorfos. Nos semicristalinos temos cristalitos em regiões, formadas por um arranjo molecular ordenado, regular e repetitivo tridimensional. Os amorfos são formados por um arranjo molecular desordenado. (SMITH; HASHEMI, 2013; EVORA et al., 2002; LAMPMAN et al., 2010) O cálculo para a cristalinidade é realizado através da equação 9.

$$C(\%) = \frac{A_c - A_A}{A_c} \times 100\% \quad (9)$$

Onde:

- A_A é a área dos picos do halo amorfo e
- A_c é área total cristalina.

Os cristalitos são domínios cristalinos que estão dispersos na fase amorfa. A equação de Scherer, relaciona a largura a meia altura dos picos de difração com o tamanho dos cristalitos equação 10 (AKCELRUD, 2007; CANEVAROLO, 2002; EVORA et al., 2002; LAMPMAN et al., 2010; SMITH; HASHEMI, 2013)

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (10)$$

Onde:

- τ é o tamanho médio dos cristalitos;
- K é uma constate adimensional de valor 0,9;
- λ é o comprimento de onda em Å (neste trabalho, $\text{CuK}\alpha$);
- β é a largura a meia altura da intensidade máxima em radianos e
- θ é o ângulo dado pela Lei de Bragg.

Para realizar as medidas das intensidades dos feixes difratados, utiliza-se um goniômetro de raios X, dotado de um contador de radiação que gira de um ângulo 2θ e registra a intensidade do feixe difratado; enquanto a amostra gira de um ângulo θ . Os valores das intensidades em função do ângulo 2θ são registrados em um computador para análise posterior. (SMITH; HASHEMI, 2013) O valor de β é calculado pela largura a meia altura fornecido pela Gaussiana correspondente ao pico de análise.

4.2.7 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (*Infrared Spectroscopy Fourier Transform, FTIR*)

O Espectro Vibracional no Infravermelho (FTIR) é uma importante técnica de caracterização de investigação e identificação de compostos, sejam eles orgânicos, inorgânicos ou poliméricos.

O que se mede nestas análises é a fração transmitida ou absorvida em relação à incidente para determinado comprimento de onda. Quando as moléculas absorvem em uma dada região do espectro estas são excitadas para atingir um estado de maior energia. O estudo é voltado para a região vibracional do espectro do infravermelho, no qual se identifica radicais presentes na molécula. (EVORA et al., 2002; LAMPMAN et al., 2010)

4.2.8 Termogravimetria (*Thermogravimetric analysis, TGA*) e Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry, DSC*)

As técnicas de Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) são técnicas destrutivas de análise térmica.

O TGA é uma técnica que se analisa o ganho ou a perda de massa de determinada amostra em relação ao tempo ou a temperatura, estudando a decomposição térmica de compostos orgânicos, inorgânicos e de substâncias poliméricas. (BANNACH et al., 2011; SILVA; PAOLA; MATOS, 2007) Com as curvas obtidas do material, obtém-se respostas relativas quanto à composição e estabilidade térmica de seus produtos intermediários e do resíduo formado. Os resultados da TGA são influenciados por parâmetros experimentais como por exemplo, quantidade de amostra, vazão do gás, escolha da atmosfera de gás e a taxa de aquecimento. (BANNACH et al., 2011; SILVA; PAOLA; MATOS, 2007)

O DSC é uma técnica termoanalítica em que se acompanha a variação da energia entre a amostra e a sua referência. Ao ocorrer um processo endotérmico, nota-se um pico positivo (a temperatura do forno deve dissipar calor para manter a temperatura igual à referência) enquanto ao se dissipar calor, um processo exotérmico, o pico é negativo. (TRICAS, 2002) O DSC é dado

pela relação entre a variação da energia da amostra dQ e o seu correspondente aumento de temperatura dt . Quando dt , no limite, tende à zero, a relação da equação 11 é chamada de capacidade calorífica do sistema C . (TRICAS, 2002)

$$C = \frac{dQ}{dt} \quad (11)$$

Esta técnica permite determinações quantitativas, quando o equipamento é devidamente calibrado com padrões, relacionando a área dos picos com a energia envolvida no processo. Métodos termoanalíticos como o DSC contribuem para a análise de polímeros, além de serem utilizadas para investigar as interações nas nanopartículas entre as matrizes poliméricas e seus ativos. (MAINARDES; GREMIÃO; EVANGELISTA, 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003; TRICAS, 2002)

4.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (*Scanning Electron Microscopy*, SEM)

Em comparação a um microscópio óptico convencional, a Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM ou MEV) utiliza um feixe de elétrons de alta energia e pequeno diâmetro ao invés de fótons, permitindo assim a obtenção de imagens com maior resolução que as obtidas com os microscópios óticos que utilizam luz visível.

Neste equipamento um filamento de tungstênio (W) é aquecido para servir de fonte de elétrons que por sua vez são acelerados pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo, em geral entre 1 e 50 kV. Posteriormente, o feixe de elétrons é focalizado por uma série de lentes eletromagnéticas com um *spot* da ordem de 4 nm, aproximadamente. O feixe de elétrons explora a superfície da amostra ponto a ponto, por linhas sucessivas, transmitindo um sinal para o detector (tela catódica). O feixe é guiado de modo a varrer uma malha retangular da amostra. (DEDAVID; GOMES, 2007)

4.3 Procedimentos experimentais

As técnicas experimentais foram utilizadas para caracterização do polímero, do sistema de nanopartículas e para o óleo essencial e em completo do SDS, bicarbonato de sódio. Todo trabalho foi realizado em parceria com o Laboratório de Nanotecnologia e Nanotoxicologia (LNN), Grupo de Cristalografia e o laboratório da empresa Nanomed - Inovação em nanotecnologia.

No Instituto de Física de São Carlos (IFSC), na Universidade de São Paulo (USP) foram realizadas as seguintes etapas e análises:

- Caracterização por DLS e potencial Zeta (LNN));
- XRD (Laboratório de Cristalografia);
- GPC (Grupo de Polímeros Bernard Gross).

As seguintes etapas e análises foram realizadas no Instituto de Química de São Carlos (IQSC- USP):

- FTIR (Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI));
- SEM (Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME));
- CG-MS (Grupo de Química Ambiental)

Nas dependências do Parque Tecnológico de São Carlos - Parquetec, foram realizadas as seguintes etapas:

- Sínteses das nanopartículas, extração do óleo essencial e o estudo de gravimetria (Laboratório da empresa Nanomed) e
- Análises de TGA e DSC (Laboratório da empresa AFINKO – Soluções em Polímeros).

4.3.1 Síntese das nanopartículas poliméricas de PLA através da técnica de emulsificação seguida de evaporação do solvente

Esta síntese sofreu adaptações da referência (COSTA, 2010).

Para a síntese das nanopartículas sem ativo, inicialmente foram preparadas as soluções

orgânicas (polímero e acetona) e soluções aquosas (dodecil sulfato de sódio, bicarbonato de sódio e água). Para a síntese das nanopartículas com ativo também foram preparadas as soluções orgânicas e soluções aquosas com a adição do óleo essencial de pimenta rosa (ativo).

- a) O volume final da solução orgânica de $(100,0 \pm 0,6)$ mL, foi preparado respeitando a proporção de $(0,5000 \pm 0,0001)$ g de polímero para $(100,0 \pm 0,6)$ mL do solvente orgânico acetona, sob agitação magnética em um agitador IKA C-MAG HS 7 e temperatura constante de 45° por 20 minutos. A temperatura da solução foi acompanhada com o uso de um termômetro de mercúrio. Ao final da dissolução a solução fica homogênea e então é resfriada à temperatura ambiente. A temperatura facilita na solubilização do polímero na acetona.
- b) A solução aquosa de bicarbonato de sódio e SDS foi preparada para um volume de $(100,0 \pm 0,6)$ mL, respeitando a proporção de $(0,0400 \pm 0,0001)$ g de bicarbonato de sódio para cada $(0,0150 \pm 0,0001)$ g de SDS, sob agitação magnética constante em banho de gelo à temperatura de $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$, por 15 minutos. A temperatura da solução foi acompanhada com o uso de um termômetro de mercúrio. Ao final da dissolução a solução fica opalescente, com a formação de espuma, após isso é retirada do banho de gelo. A temperatura diminui a formação de espuma em função do uso do detergente SDS.
- c) Para a síntese das nanopartículas com a adição do ativo lipofílico, o óleo essencial é incorporado na solução aquosa seguindo a mesma etapa de descrição do item 4.3.1b) com agitação constante até formar uma solução coloidal turva. Neste caso, procurou-se usar a menor massa em porcentagem do óleo essencial para garantir que o sistema encapsulasse totalmente o ativo. Deste modo foram acrescidos $(0,0750 \pm 0,0001)$ g de óleo sob agitação constante e ainda sob resfriamento. Este valor não foi otimizado ao longo dos testes.
- d) Para o volume de $(100,0 \pm 0,6)$ mL da nanoemulsão sem e com ativo seguiu-se a proporção de $\frac{1}{4}$ da solução de polímero em acetona (orgânica) para $\frac{3}{4}$ da solução aquosa. A primeira solução foi vertida na segunda com agitação constante de aproximadamente 20 minutos.
- e) A acetona foi evaporada por aproximadamente 24 horas após a síntese, através de agitação magnética e resultando uma nanoemulsão em meio aquoso.

4.3.2 Determinação da massa molar do PLA por GPC

As massas molares e a polidispersão do PLA, foram determinadas por GPC utilizando um cromatógrafo líquido *Agilent 1100 Chromatographic System*, equipado com detetor de índice de refração em THF à 35°C, e uma coluna de PLgel HR6+HR4+HR3+500A em série do tipo linear, vazão de 1 mL.min⁻¹.

O polímero (5,4000±0,0001) mg foi solubilizado em (2,00±0,01) mL THF e filtrado em seringa de teflon de 0,45 µm . Foram injetados no cromatógrafo 50 µL da solução. O equipamento foi calibrado com 11 padrões de poliestireno (PS) monodisperso e submetido as mesmas condições de análises do PLA. Para este trabalho, os resultados foram determinados de acordo com os padrões de poliestireno de faixa estreita de M_w .

O principal objetivo desta técnica foi determinar a massa molar de modo a associar esta propriedade física com a estabilidade do sistema.

4.3.3 Extração do óleo essencial através da técnica de hidrodestilação

Uma massa de (50,00±0,01) g de pimenta rosa foi macerada em cadinho de porcelana e imersa imediatamente em (500,0±0,1) mL água em um balão de fundo redondo, com capacidade de (1000,0±0,1) mL. Para a extração do óleo essencial não foi usado nenhum tipo de seleção para a escolha das pimentas. A hidrodestilação ocorreu com a utilização do aparelho do tipo Clevenger modificado. O tempo de extração foi de aproximadamente 12 horas, realizados em quadruplicada. A temperatura do sistema foi mantida constante em torno de (90±1)°C.

O óleo foi separado da água com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* (devido ao pouco volume da amostra) e armazenado a temperatura ambiente em recipiente de vidro, envolto em papel alumínio, longe da luz direta do ambiente para evitar a oxidação do produto até a sua aplicação final. (SIMOES, 2007)

4.3.4 Densidade e rendimento do óleo essencial de Pimenta Rosa

A densidade do óleo líquido foi aferida à temperatura de $(24\pm1)^{\circ}\text{C}$ e 43% de umidade do ar em função do seu volume. O rendimento do óleo essencial foi calculado em relação à massa das sementes secas, equação 12.

$$R(\%) = \frac{\text{volume}_{\text{óleo}} \cdot \text{densidade}_{\text{óleo}}}{\text{massa}_{\text{sementes}}} \quad (12)$$

4.3.5 Quantificação da composição do óleo essencial por CG-MS

A amostra de óleo essencial foi previamente dissolvida em álcool absoluto no volume de (10 ± 1) mL, para $(0,0500\pm0,0001)$ mg da massa do óleo.

A análise de GC/MS foi realizada em cromatógrafo à gás acoplado a detector seletivo de massas. Foi utilizada a coluna capilar de Rtx-5 (5% difenil/95% dimetilsiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); com temperatura do injetor $(280\pm1)^{\circ}\text{C}$; programação coluna: 40°C , $5^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ até $(280\pm1)^{\circ}\text{C}$; volume de injeção 1,0 μL ; Split 10; gás de arraste He, $1\text{mL}.\text{min}^{-1}$. Para o MS a temperatura da fonte de íons foi de $(280\pm1)^{\circ}\text{C}$; temperatura interface $(300\pm1)^{\circ}\text{C}$; m/z: 40-350.

4.3.6 Eficiência de encapsulação determinada por DSC

A temperatura de fusão e a entalpia de fusão para as nanopartículas do óleo essencial e a solução de nanopartículas poliméricas com ativo foram analisadas por DSC.

O TGA foi usado para a determinação da temperatura T_{onset} que indica o início de degradação de cada amostra. Para as curvas de TG foram obtidas utilizando-se um TA60 da

Shimadzu. As massas das amostras foram preparadas em porta amostra de alumínio de 100 μL e foram submetidas a taxa de aquecimento indicadas na tabela 1 em atmosfera de gás nitrogênio com vazão de 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Tabela 1 - Dados experimentais para as análises de TG.

Amostra	Massa TG ($\pm 0,0001$) mg	Taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)	Intervalo de temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Óleo essencial	25,1310	10	10-800
Nanopartícula com ativo (pH 9)	14,0300	10	10-900

Fonte: Elaborada pela autora.

As curvas de DSC foram obtidas utilizando DCS 60 Plus Shimadzu. As amostras foram pesadas em porta amostra selado de platina de 100 μL e foram submetidas a taxa de aquecimento indicadas na tabela 2 em atmosfera de gás nitrogênio a 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A tabela 2 indica a massa, razão de aquecimento e intervalo de temperatura para as respectivas amostras.

Tabela 2 - Dados experimentais para as análises de DSC.

Amostra	Massa DSC ($\pm 0,0001$) mg	Taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)	Intervalo de Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Óleo essencial	8,0000	10	25-250
Nanopartícula com ativo (pH 9)	7,5500	10	25-150

Fonte: Elaborada pela autora.

A liberação do ativo é proporção da quantidade total de teor de óleo essencial incorporadas durante o processo de encapsulamento, definida em função da entalpia do ativo, em porcentagem, equação 13 (BAO et al., 2011):

$$E (\%) = \frac{\Delta H_{NP} - \Delta H_{OL}}{\Delta H_{OL}} \times 100 \quad (13)$$

Onde:

- ΔH_{NP} é o valor de entalpia das nanopartículas poliméricas com ativo e
- ΔH_{OL} é o valor de entalpia do óleo essencial.

Este é um resultado qualitativo, visto que, as amostras de nanopartículas poliméricas foram analisadas em meio aquoso e a água pode influenciar nos resultados.

4.3.7 Determinação do tamanho, PDI e potencial Zeta por DLS

As amostras de nanopartículas sem e com ativo foram diluídas no momento das análises em água na proporção de 1:100, para se realizar as medidas de tamanho, PDI e potencial Zeta para as soluções de nanopartículas nos seguintes dias de síntese:

- 1º, 2º, 100º e 110º dias para o sistema sem ativo e
- 1º, 2º, 100º e 115º dias para o sistema com ativo.

A distribuição de tamanho e o PDI foram determinados utilizando uma cubeta de acrílico e sem a presença de bolhas de ar, com o uso do índice de refração n do PLA de 1,482 (GROSSMAN; NWABUNMA, 2010)

O potencial Zeta foi determinado utilizando uma célula capilar DTS 1060C de acrílico, com dois eletrodos e sem a presença de bolhas de ar no seu interior. Todas as medidas foram realizadas à temperatura de 25°C em triplicata utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, UK).

4.3.7.1 Titulação potenciométrica do sistema de nanopartículas poliméricas

Para nanopartículas lipídicas sólidas é comum se avaliar a estabilidade de soluções coloidais aquosa através da titulação potenciométrica do sistema. (CHARRON et al., 2012) Há exemplo disso, este trabalho propõe o mesmo estudo para se avaliar a estabilidade do sistema polimérico, tendo por base o conhecimento da estrutura e grupos funcionais presentes nas soluções de nanopartículas. (SEVERINO, P et al., 2011)

Para a titulação potenciométrica, amostras de 10 mL, sem nenhuma diluição inicial, das nanopartículas sem e com ativo, foram tituladas com hidróxido de sódio (NaOH) à concentração de 0,1 M e ácido clorídico (HCl) à concentração de 0,1 M e 0,01 M até se chegar ao pH 12 e ao pH 2. Os volumes adicionados variaram para cada solução titulante. Para se atingir a faixa de pH estimado a solução foi mantida sob agitação magnética constante. A titulação potenciométrica foi realizada com o Autotitrator MPT-2 da Malvern (titulador automático) acoplado ao aparelho Zetasizer Nano ZS90 da Malvern. O pHmetro acoplado ao equipamento foi calibrado com tampões no pH 4, 7 e 9.

As medidas de tamanho e potencial Zeta foram determinadas concomitantemente com os intervalos de pH, registrados pelo *software* da Malvern, utilizando-se uma célula capilar DTS 1060C de acrílico.

As medidas foram confirmadas de acordo com o mesmo método citado para a determinação de tamanho e PDI. Todas as medidas foram realizadas à temperatura de 25°C e em triplicata e os resultados foram avaliados para o estudo de formação do sistema de nanopartículas.

4.3.8 Estudo de liberação

A técnica de gravimetria foi utilizada para mostrar a liberação sistema com ativo.

Foram centrifugados em uma proporção de 1:1 em álcool etílico absoluto 16 µL da solução as nanopartículas com ativo. As amostras foram preparadas em uma centrífuga para tubos tipo Eppendorf® SOLAB Científica SL 702, por 10 minutos, com rotação de 10000 rpm com aceleração de 10192 XG. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante, o qual foi colocado em papel filtro e este em um vidro de relógio, levado ao dessecador por cerca de 2 horas e aferido em balança analítica para cálculo da massa inicial da nanopartícula, à 24°C. A água restante foi descartada. A massa de nanopartículas foi levada à uma estufa para secagem e esterilização a 60°C e teve sua massa aferida de 1 hora em 1 hora, até o total de 6 horas. A temperatura de 60°C foi definida em função da T_g do polímero determinada por DSC.

O TGA foi usado para a determinação da temperatura T_{onset} que indica o início de degradação da amostra de PLA. Para a curva de TG foram obtidas utilizando-se um TA60 da Shimadzu. A massa de $(7,7260 \pm 0,0001)$ mg de PLA foi preparada em porta amostra de alumínio de 100 µL e foi submetida a taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ em atmosfera de gás nitrogênio com vazão de 50 mL.min⁻¹, no intervalo de temperatura de 5°C à 700°C.

As curvas de DSC foram obtidas utilizando DCS 60 Plus Shimadzu. A amostra de $(9,1400 \pm 0,0001)$ mg de PLA foi aferida em porta amostra selado de platina de 100 µL e foi submetida a taxa de aquecimento de 5°C.min⁻¹ em atmosfera de gás nitrogênio a 50 mL.min⁻¹, no intervalo de temperatura de 25°C à 150°C.

4.3.9 Determinação do percentual de cristalinidade e análise estrutural por XRD pelo método do pó

O perfil cristalográfico das amostras de PLA, SDS e bicarbonato de sódio foram utilizados para a interpretação dos perfis das nanopartículas com e sem ativo. As seguintes amostras foram analisadas:

- PLA em pó e (2±1) mL da solução de polímero solubilizada em acetona, descrita na seção 4.3.1;
- (2±1) mL das soluções de nanopartículas com ativo (pHs 2; 8 e 12) e sem ativo (pHs 2; 9 e 12), também descritas na seção 4.3.1;
- SDS em pó e (10,0000±0,0001) mg de SDS solubilizado em 10 mL de água destilada e
- Bicarbonato de sódio em pó e (10,0000±0,0001) mg de bicarbonato de sódio solubilizado em (10±1) mL de água destilada.

Para as amostras de SDS, bicarbonato de sódio e PLA (disponíveis em grãos irregulares, figura 18) em pó não houve nenhum preparo inicial.

Figura 18 - Amostra de PLA para síntese das nanopartículas poliméricas.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para cada uma das amostras em solução, um volume da solução foi depositada sobre uma placa de vidro e seca em dessecador por 10 dias. Estas etapas foram repetidas **n** vezes até, que se pudesse observar uma espécie de filme na placa de vidro.

A coleta de dados de XRD foi realizada utilizando o equipamento Rigaku Rotaflex

equipado com monocromador de grafite e ânodo rotatório, operando com $\text{CuK}\alpha$ Å ($\text{CuK}\alpha = 1,5418$ Å), 50kV e 100mA. Os difratogramas foram obtidos em modo contínuo, $2\theta = 5^\circ - 80^\circ$ com passo de $0,02^\circ$ e 2 segundos/passo.

Neste trabalho, o percentual de cristalinidade foi calculado utilizando a ferramenta *Peak Analyzer*, incluso no programa *Microcal OriginPro* versão 9.1. Através desta ferramenta é possível determinar múltiplos picos no difratograma em análise. A função Gaussiana é utilizada como função de ajuste para a linha de base, através da ferramenta *Control Fit*. A cristalinidade é obtida pela razão entre as áreas dos picos cristalinos (*Cumulative Fit Peak*) e a área de contribuição da fase amorfa (*Baseline*) no difratogramas. A relação entre a região amorfa e cristalina de cada amostra é expressa em termos de porcentagem de cristalinidade equação 9.

4.3.10 Caracterização da composição estrutural por FTIR

O FTIR das amostras de PLA, SDS, bicarbonato de sódio óleo essencial foram utilizados para a interpretação dos perfis das nanopartículas com e sem ativo. As seguintes amostras foram analisadas:

- PLA, SDS e bicarbonato de sódio em pó;
- Óleo essencial de pimenta rosa;
- (2 ± 1) mL das soluções de nanopartículas com ativo (pH 9) e sem ativo (pH 8);

As nanopartículas não sofreram nenhum tipo de tratamento para a secagem das mesmas. As mesmas condições foram utilizadas para as demais análises. Análises qualitativas foram realizadas a partir da construção de uma pastilha sólida formada pela mistura de aproximadamente 1 mg da amostra com cerca de 100 mg de brometo de potássio (*KBr*). Esta mistura foi triturada em um almofariz com pistilo e posteriormente moldada na forma de uma pastilha circular de aproximadamente 13 mm de diâmetro usando-se uma prensa. A pastilha foi, então, direcionada frente ao feixe de radiação infravermelho (*IR*) do equipamento Shimadzu, modelo *IRAffinity-1* com resolução de 4 cm^{-1} com 32 acumulações e faixa espectral de 400 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} .

4.3.11 Avaliação morfológica e tamanho por SEM das nanopartículas poliméricas sem e com a incorporação de ativo lipofílico

Foram realizadas medidas para as com (pHs 2; 8 e 12) e sem ativo (pHs 2; 9 e 12). Os pHs de 2 e 12 foram obtidos com a titulação potenciométrica do sistema.

Para se obter melhor imagens no pH 9 e 8, as suspensões foram diluídas em duas proporções:

- Foi pipetado 1 μL da solução de nanopartícula em 99 μL de água destilada , obtendo-se a solução A;
- Da solução A foi realizada uma nova diluição onde foram pipetadas 1 μL da solução de nanopartículas em 99 μL de água destilada, obtendo-se a solução B.

As suspensões das amostras líquidas foram gotejadas em placas de sílica e deixadas secar ao ambiente. Posteriormente foram recobertas com 10 nm de ouro em um metalizador Coating System BALTEC MED 020. As micrografias foram obtidas em um equipamento LEO (modelo 440) com detector OXFORD (modelo 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV, corrente de 2,82 A e com uma sonda de 200 pA. A partir das imagens geradas foi possível estudar características como forma, número de partículas e distribuição de tamanho.

Para a análise quantitativa e processamento das imagens utiliza-se o *software* livre *Image J* (National Institute of Health, NIH, Estados Unidos) e com o auxílio do programa OriginLab 9.1 foi possível fazer o gráfico de frequência (n) de ocorrência de nanopartículas em função do diâmetro médio. Através do ajuste gaussiano, determinou-se o tamanho médio e o índice de polidispersão, em complemento aos resultados do DLS.

5 Resultados e Discussão

5.1 Estudo de estabilidade das nanopartículas poliméricas

A caracterização dos nanossistemas quanto a sua estabilidade em meio aquoso e sua formação é importante para se obter novos sistemas ainda mais eficazes.

A associação do sal bicarbonato de sódio com o detergente SDS foi escolhida para evitar a agregação das nanopartículas poliméricas e desta forma aumentar a estabilidade do sistema associando a baixa variação de pH com o tempo. A estabilidade quanto a variação de pH das soluções de nanopartículas foi avaliada sem e com a presença do bicarbonato de sódio na solução aquosa, onde a variação de pH no segundo teste permaneceu mais estável durante o tempo. Este teste foi avaliado por cerca de 30 dias, aferidos a cada cinco dias contados a partir do primeiro dia de síntese, mantendo-se no pH 8 com variação pH 7,8. As soluções com somente o tensoativo SDS variavam entre pH 8 e pH 6,5 com o decorrer dos mesmo 30 dias. Para esta avaliação as soluções foram armazenadas sob as mesmas condições: em vidro fechado, sem umidade e luz excessiva e sem a adição de qualquer ácido ou base aos sistemas. Macroscopicamente, neste mesmo período, não se observou aglomerados em nenhuma das soluções. O teste também foi realizado nas soluções de nanopartículas com e sem o ativo lipofílico.

Posteriormente a escolha da síntese com a associação do bicarbonato de sódio com o SDS as avaliações quanto a estabilidade foram iniciadas. Após a síntese e a posterior evaporação do solvente orgânico (acetona) as soluções de nanopartículas sem e com ativo apresentaram aspecto macroscópico translúcido e branco, embora, a solução com ativo tenha sido obtida mais turva que o sistema anterior. Essa mudança aparente, pode indicar, mudanças físico-químicas dos sistemas, que serão estudadas adiante. Os pHs iniciais foram de 8 e 9, respectivamente para as soluções sem e com ativo. A figura 19 compara os aspectos macroscópicos das soluções de nanopartícula com ativo e sem ativo decorridos alguns dias de síntese.

Figura 19 - (A) Nanopartícula com ativo e (B) Nanopartícula sem ativo. Ambas sem diluição.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a emulsificação da solução aquosa com a solução de polímero não se observou excesso de óleo essencial (sobrenadante) ou da matriz. A solução com ativo não apresentava o aroma forte e característico do óleo livre, mas suave.

A coalescência ou maturação para os dois sistemas referente a possível desestabilidade não foram observados nas horas iniciais. Em geral durante o tempo de armazenagem as suspensões coloidais apresentam agregações de nanopartículas no meio, resultando na formação de precipitados. (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)

A estabilidade coloidal é influenciada por mecanismo de hidrólise das matrizes, composição (matrizes, solventes, ativos), morfologia (cristalino, amorfo), dimensões da nanopartícula, forma, temperatura de transição vítrea, massa molecular e distribuição de massas moleculares do polímero, pH e repulsão eletrostática. (ANDERSON; SHIVE, 2012)

5.1.1 Determinação da massa molar da matriz de PLA por GPC

O PLA é um polímero sintético muito utilizado como matriz para o nanoencapsulamento de ativos. (SEVERINO *et al.*, 2011)

A figura 20 representa os cromatogramas das medidas realizadas para o PLA, obtidos

no intervalo da área de permeação seletiva (área de exclusão por tamanho) e a curva de calibração (ajustada ao polinômio de terceiro grau) para os padrões de poliestireno (PS).

Figura 20 - Cromatogramas PLA sobrepostos à curva de calibração de poliestireno monodisperso em THF à 35°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com base na curva de calibração e estabelecendo a relação entre o tempo de retenção (ou volume) de eluição e a massa molar, determinados no cromatograma, calculou-se a massa molar ponderada $\overline{M}_w$ e numérica média $\overline{M}_n$, e a polidispersão D , onde são indicadas na figura 21. (PALACIO; OROZCO; LÓPEZ, 2011).

Figura 21 - Distribuição da massa molar do PLA e sua respectiva polidispersão.
Fonte: Elaborada pela autora.

O erro da medida entre a duplicata foi de 0,13% para a $\overline{M}_n$ e 5 % para $\overline{M}_w$ e são relacionados a precisão do cromatógrafo.

Na tabela 3 os valores médios experimentais ($\overline{M}_n$ e $\overline{M}_w$) e valores teóricos mínimos e máximos reportados da literatura e determinados com a mesma técnica experimental são também comparados.

Tabela 3 - Massas molares experimental e teóricas máximas e mínimas para o PLA.

	Experimental ¹ (g.mol ⁻¹)	Teórico ² (g.mol ⁻¹)	Teórico ² (g.mol ⁻¹)
$\overline{M}_n$	76150	7600	77000
$\overline{M}_w$	134650	9300	150000

Fonte: (1) Elaborada pela autora; (2) Adaptado de PALACIO; OROZCO; LÓPEZ, 2011.

Os valores calculados podem indicar um alto-grau de polimerização (número de unidades repetitivas). Os resultados obtidos estão entre os valores máximos e mínimos reportados da literatura (PALACIO; OROZCO; LÓPEZ, 2011)

A massa molar é um indicativo de maior a resistência mecânica do material (por exemplo, à tração), válido até algumas variações no tamanho da cadeia polimérica, implicando também em mudanças significativas para a cristalinidade e no tempo de degradação do polímero. (AKCELRUD, 2007)

Para as nanopartículas poliméricas a liberação de ativo seguido da hidrólise do polímero é consequência do mecanismo de difusão, sendo portanto, ideal para moléculas

relativamente pequenas. Para polímeros com massa molar elevada, tornam o mecanismo de difusão mais lento. Nestes casos, para haver liberação dos ativos é necessário que a matriz sofra algum tipo de erosão ou outra ação.(SEVERINO et al., 2011)

Segundo (WICHERT; ROHDEWALD, 1990) a degradação de sistemas de micropartículas de PLA é relatado como dependente da massa molar do polímero e varia de semanas a meses de estabilidade.

Assim, os resultados experimentais podem sugerir, que a matriz de PLA escolhida pode aumentar o tempo de estabilidade do nanomaterial tornando a liberação do ativo mais lenta.

5.1.2 Caracterização do óleo essencial *Schinus molle* L.

A encapsulação do óleo essencial em matrizes poliméricas visa melhorar sua biodisponibilidade, tornando este solúvel em solventes presentes em bases cosméticas como a água. Para tanto o ativo foi caracterizado primordialmente quanto a suas características físico-químicas sendo estas descritas a seguir.

O óleo essencial extraído apresentou aspecto amarelo claro, com alguns reflexos verdes e aroma forte. O pH no valor de $(3,10 \pm 0,03)$ do hidrolato foi determinado após a extração em triplicata utilizando-se um pHmetro digital, à temperatura de 25°C. Por estar contido na fase superior do hidrolato, observou-se que o óleo essencial apresentava densidade menor que a água, sendo determinada como $(0,77 \pm 0,02) \text{ g.mL}^{-1}$. O rendimento da extração de óleo em relação a massa de semente *in natura* foi de apenas $(0,462 \pm 0,003)\%$. Em outros trabalhos descritos, embora determinados com outros métodos de extração, para a espécie *Schinus* obteve-se a densidade de $(0,91 \pm 0,02) \text{ g.mL}^{-1}$ e rendimento de $(7 \pm 2)\%$. (COLE, 2008; SILVA, et al., 2010).

Observa-se que, embora as sementes tenham sido maceradas junto com seu epicarpo (parte externa vermelha) e considerando que o processo mecânico rompa as paredes celulares facilitando, o processo de extração do óleo (DOURADO, 2012) o rendimento pode ter sido influenciado pelo tempo de extração. A diferença de densidade, rendimento e qualidade, também, podem ser consequência das diferenças de composição identificados do óleo.

Na análise por CG-MS dos componentes do óleo essencial de *Schinus molle* L. procurou-se identificar os picos correspondentes aos tempos de retenção relacionados aos terpenos, compostos de interesse para aplicação cosmética, existentes na amostra. Assim, na separação foram identificados 50 compostos, figura 22, sendo constituídos por 33,48% de terpenos.

Figura 22 - Cromatograma do óleo essencial de *Schinus molle* L. (pimenta rosa).
Fonte: Elaborada pela autora.

A massa molar média foi determinada como 157,36 g^{*}.

O ciclo butano,1,2-bis(1-methyle) (C₆H₈) foi o composto majoritário identificado (12,32%).

Os componentes terpenos majoritários identificados, com picos agudos bem definidos, foram o 3-Careno (11,93%), seguido de α -Phelandreno (7,67%) e α -Pineno(6,96%), as fórmulas estruturais, respectivas, são indicadas na figura 23. Os demais picos devem corresponder à outros compostos existentes na amostra. A tabela 4 indica os terpenos identificados.

* Com base na média ponderada das massas molares dos compostos. As massas molares foram encontradas no PUBCHEM (2015).

Figura 23 - Fórmulas estruturais para os compostos majoritários do óleo essencial.
Fonte: Adaptada de PUBCHEM, 2015.

Tabela 4 - Compostos majoritários do óleo essencial de *Schinus molle* L. (pimenta rosa).

Pico	Tempo de Retenção (minutos)	Área (%)	Nome	Classe
1	6,747	6,96	α-Pineno	Monoterpeno
5	8,343	2,07	β-Mirceno	Monoterpeno
6	8,730	7,67	α-Phelandreno	Monoterpeno
7	8,914	11,93	3-Careno	Monoterpeno
11	13,419	0,32	p-Menta- 1,5-dien-8-ol	Monoterpeno oxigenado
21	17,572	0,91	Timol	Monoterpeno oxigenado
25	20,817	2,09	Cariophyleno	Sequisterpeno
27	22,662	0,27	Trans- α-Bergamoteno	Sequisterpeno
33	25,042	1,26	Cariophyleno oxide	Sequisterpeno oxigenado

Fonte: Elaborada pela autora.

O tempo de extração, também, favorece uma provável oxidação do produto e leva ao decréscimo na quantidade de monoterpenos (mais voláteis) e no acréscimo na quantidade de sequisterpenos (menos voláteis) podendo levar a tempos de retenção sobrepostos. (OLIVEIRA et al., 2014)

No trabalho de (MARTINS et al., 2014) os compostos identificados α-Phelandreno, α-Pineno e o β-mirceno, são compostos que apresentam baixa toxicidade, atividade antioxidante e antimicrobiana, sendo este último eficaz para bactérias Gram positivas e Gram negativas patogênicas.

Na tabela 5 (a tabela não indica os resultados completos), compara-se o perfil fitoquímico do óleo essencial obtido neste trabalho com a literatura. As referências (1), (2) e (3) são espécies oriundas do Brasil, enquanto a referência (4) é referente a Tunísia.

Tabela 5 - Comparação da composição do óleo essencial de *Shinus molle* L. (pimenta rosa) obtidos neste trabalho e reportados da literatura.

Referência ¹	Área (%)	Referência ²	Área (%)	Referência ³	Área (%)	Referência ⁴	Área (%)
α -Pino	6,96	α -Pino	5,06	α -Pino	32,89	α -Pino	4,94
β -Mirreno	2,07	β -Pino	1,60	β -Pino	14,37	β -Mirreno	5,04
α -Phelandreno	7,67	Mirreno	1,67	Mirreno	0,34	Biciclogermacreno	6,42
3-careno	11,93	Biciclogermacreno	8,38	Biciclogermacreno	3,54	δ -Cadineno	1,64
p-menta-1,5-dien-ol	0,32	γ -Cadineno	5,79	α -Cadinol	3,27	o-Cymene	2,92
Timol	0,91	Sabinol	37,52	Sabineno	1,84	α -Phelandreno	46,64
Cariophyleno	2,09	Limoneno	7,21	limoneno	0,77	β -Phelandreno	28,53
Trans- α -bergamoteno	0,27	-	-	-	-	-	-
Cariophyleno oxide	1,26	-	-	-	-	-	-

Fonte: Adaptado de (1) Elaborada pela autora; (2) Adaptado de BARROSO; VARGAS, 2010; (3) SANTOS et al., 2007; (4) ENNIGROU et al., 2011.

Embora óleo extraído tenha muitos compostos correspondentes com os estudos reportados, as variações quantitativas e qualitativas das espécies químicas identificadas neste trabalho em relação a literatura (BARROSO; VARGAS, 2010; SANTOS et al., 2007; ENNIGROU et al., 2011) são relacionadas às características genéticas dependentes de qual órgão da planta foi extraído o produto, além de fatores abióticos dependentes da região, clima, época de colheita, solo, exposição ao Sol, irrigação, espécie e tempo de extração (que varia entre 1 hora a 7 horas). (OLIVEIRA et al., 2014) No geral, o ativo lipofílico em estudo apresenta compostos de comprovada atividade antioxidante e antimicrobiana interessantes para futuras aplicações cosméticas.

5.1.3 Eficiência de encapsulação

A curva TG do sistema de nanopartícula com ativo e do óleo essencial livre foram estudadas para a determinação da temperatura T_{onset} .

Com estas análises as temperaturas iniciais de degradação foram determinadas como 91,61°C e 81,40°C respectivamente para as amostras de óleo essencial e nanopartícula

polimérica. A figura 24 indica estes resultados:

Figura 24 - Curvas TGA e DTG (primeira derivada) para as amostras de : (A) óleo essencial (ativo) e (B) nanopartícula polimérica com ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 25 indica as análises de DSC para as amostras o óleo essencial e para as soluções de nanopartículas com ativo.

Figura 25 - Comparação das análises de DSC (A) óleo essencial (ativo) e (B) nanopartícula polimérica com ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela 6 indica as análises de DSC para as amostras de PLA, óleo essencial e para as soluções de nanopartículas sem e com ativo.

Tabela 6 - Análise DSC para óleo essencial e soluções de nanopartículas com ativos.

Amostra	Evento	Intervalo de Temperatura (°C)	
		T_{onset}	ΔH (J.g ⁻¹)
Óleo Essencial	Oxidação	50,62	13,61
	Volatilização	87,60	2,75
NP com ativo	Vaporização	28,78	25,03
	Vaporização/Decomposição	74,10	1,03

Fonte: Elaborada pela autora.

Para o ativo, há dois picos endotérmicos largos, não muito definidos, que indicam as temperaturas de volatilização de parte dos componentes em 50,62°C e 87,60°C. O perfil do DSC para o óleo essencial é influenciado pela mistura de compostos. Estes compostos possuem características físico-química diferentes, como como massas moleculares, temperatura de

ebulição/volatização, que possivelmente interagem entre si (TAN; MAN, 2002)

As nanopartículas com ativo apresentaram um evento endotérmico, relacionado a energia de evaporação da amostra. A variação de entalpia é definida de acordo com a quantidade dos reagentes e produtos das soluções. Em função disso, a entalpia liberada é maior para o sistema com ativo do que apenas para o ativo.

A partir da equação (13), teor de essência encapsulada no sistema foi determinada como 83%. O alto teor de encapsulamento foi eficaz e pode estar associado a pouca quantidade de massa do óleo livre incorporada no sistema. Este valor não é um valor quantitativo, visto que a água pode influenciar nos resultados. No trabalho de (LÓPEZ *et al.*, 2014) o teor de encapsulamento para micropartículas de todextrin e goma arábica para a encapsulação do mesmo ativo foi de 90%.

5.1.4 Diâmetro hidrodinâmico e Índice de Polidispersão (PDI)

As soluções de nanopartículas tiveram seu diâmetro hidrodinâmico determinado após a síntese. Uma amostra sem ativo e outra com ativo foram escolhidas para o estudo de estabilidade quanto ao tamanho, PDI, potencial Zeta e pH em função do tempo (aproximadamente 100 dias). A figura 26 indica a intensidade em função do tamanho (diâmetro) das nanopartículas sem ativo e indicam os dias de síntese analisados.

Figura 26 - Porcentagem de nanopartículas sem ativo em função do diâmetro: (A) 1 dia, (B) 2 dias, (C) 100 dias e (D) 115 dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

A

figura 27 indica a intensidade em função do tamanho (diâmetro) das nanopartículas com ativo e indicam os dias de síntese analisados.

Figura 27 - Porcentagem de nanopartículas com ativo lipofílico em função do diâmetro: (A) 1 dia, (B) 2 dias, (C) 100 dias e (D) 110 dias após a síntese.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 28 indica os diâmetros médios e o PDI em função do tempo para a solução de nanopartículas sem e com a adição de ativo. Os erros foram determinados apartir do desvio padrão realizados com a média ponderada de três medidas. As condições de armazenagem permaneceram as mesmas ao longo do estudo.

(A)

(B)

Figura 28 - Variação do tamanho (nm) e do PDI em função do tempo (dias): (A) nanopartícula sem ativo e (B) nanopartícula com ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar da distribuição larga do tamanho das nanopartículas, para ambas as sínteses a polidispersão do sistema apresentou-se ainda na faixa monodal e estreita de diâmetros com valores de aproximadamente 0,160 e 0,250. A baixa variação do PDI e do tamanho, indicam a obtenção de sistemas relativamente homogêneos, sem agregação e menos suscetíveis a perda de estabilidade. (MALVERN .. 2004; SOUZA, et al., 2012; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)

Sendo o volume da esfera dado pela equação 14, determina-se a variação do volume ΔV desta esfera dada pela diferença do volume da nanopartícula com óleo essencial V_2 e da nanopartícula sem óleo essencial V_1 , representado pela equação 15.

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3 \quad (14)$$

$$\Delta V = V_2 - V_1 \quad (15)$$

A tabela 7 indica os resultados obtidos, onde $\Delta V = (2,41 \times 10^{-15}) \text{ cm}^3$.

Tabela 7 - Variação de volume de nanopartículas sem e com ativo.

	Nanopartícula sem ativo	Nanopartícula com ativo
Raio (cm)	$7,7 \times 10^{-6}$	$1,01 \times 10^{-5}$
Volume (cm³)	$1,92 \times 10^{-15}$	$4,32 \times 10^{-15}$

Fonte: Elaborada pela autora.

Em comparação aos diâmetros hidrodinâmicos obtidos sem e com a presença do ativo, o aumento no tamanho correspondeu a uma variação de 28%. É provável que o aumento do raio hidrodinâmico entre os dois sistemas seja influenciado apenas pela presença do óleo essencial, visto que a diferença encontrada desaparece ao longo do tempo, retornando ao valor do volume observado para a nanopartícula sem ativo. Isto pode ocorrer devido a liberação do ativo incorporado durante o tempo. O óleo essencial não influenciou na estabilidade da nanoemulsão, fato este mostrado pelo PDI.

5.1.5 Potencial Zeta e variação de pH

A figura 29 indica a variação do potencial Zeta e do pH em função do tempo (dias). Os erros foram determinados apartir do desvio padrão realizados com a média ponderada de três medidas. Os valores iniciais do pH para o início das sínteses foram de $(9,30 \pm 0,02)$ e $(8,15 \pm 0,02)$, respectivamente, para as soluções de nanopartículas sem ativo e com ativo.

Figura 29 - Variação do potencial Zeta (mV) e pH em função do tempo (dias): (A) nanopartícula sem ativo e (B) nanopartícula com ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Algumas nanopartículas quando em solução aquosa adquirem carga elétrica em sua superfície, dado pela dissociação de grupos ionizáveis, por exemplo, os grupos terminais carboxílicos presentes na matriz de PLA diminui em módulo, então, o potencial Zeta. O potencial negativo é dado em função de uma possível desprotonação do polímero em água. A figura 29 (B) também pode indicar uma possível reação química entre os componentes do sistema. (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Os valores do potencial Zeta para ambas as soluções indicam uma boa estabilidade pois, todos são maiores, em módulo, que -30 mV. Neste caso, as forças repulsivas tendem a evitar possíveis agregações do sistema em função das colisões com outras nanopartículas, nunca atingindo o ponto isoelétrico, isto é, quando o potencial é Zeta zero. (MALVERN ... 2004)

A solução aquosa de SDS e do agente tamponante bicarbonato de sódio com pH em solução aquosa podem contribuir para a estabilidade coloidal devido a um efeito eletrostático eficaz e que impede a agregação das nanopartículas, que aumenta a força iônica como resultado da liberação dos íons à solução, que podem se adsorver às nanopartículas e que por sua vez

passam a formar uma camada de cargas elétricas oriundas da dissociação dos grupos OH^- e HCO_3^- e os íons Na^+ e dodecil sulfato $^-$. (SCHAFFAZICK et al., 2003). Ambas as soluções foram obtidas em pH básico. A solução aquosa de SDS e bicarbonato de sódio teve pH inicial de $(7,83 \pm 0,03)$.

Ao decorrer de aproximadamente 100 dias, o pH básico das soluções sem ativo diminuiu chegando ao pH 7 e diminuiu em módulo o potencial Zeta das nanopartículas. A variação de pH junto ao potencial Zeta pode indicar aumento da estabilidade.

Para o sistema com ativo, não se observou variação significativa do pH e visualmente o sistema não apresentou formação de aglomerado ou mesmo aumento da turbidez, onde, portanto é um indício de que o óleo essencial não alterou estas características. No trabalho de (MELO et al., 2010) nanopartículas de PLA para o encapsulamento de benzocaína, tiveram pequena variação de pH no período de 60 dias, com média de pH de 3,74 à 4,38 também apresentando uma boa estabilidade coloidal e indicando que o fármaco não influenciava em mudanças físicas e químicas significativas para o sistema. Apesar de mudanças no pH, visualmente os sistemas não apresentava-se com aspecto aglomerado ou mais turbido do que inicialmente.

Ao final de aproximadamente 200 dias de síntese, a solução apresentou duas fases, com um aglomerado branco precipitado ao fundo (efeito provável da agregação do produto). A aparência homogênea voltava novamente por pouco tempo quando a amostra sofria agitação manual. Deste modo, apesar das análises apresentarem estabilidade coloidal, o início da degradação pôde começar a ser observado.

5.1.5.1 Titulação potenciométrica do sistema de nanopartículas poliméricas

Para avaliar a estabilidade e a microestrutura das nanopartículas em meios ácidos e básicos, titulou-se as soluções do pH 12 até o pH 2.

Primeiramente, os sistemas foram avaliados macroscopicamente, após as titulações, onde não se observou aglomeração no primeiro momento. Para a solução sem ativo no pH 2, decorrido algumas horas, esta passou a apresentar alguns aglomerados que foram associados ao polímero da matriz, embora não se tenha realizado estudos complementares. Para a solução com ativo no pH 2, também foram observados aglomerados e a percepção da fragrância do óleo

de maneira mais forte por algum tempo. Estes resultados são esperados, visto que, em soluções coloidais a alta concentração de sal tendem a desestabilizar. O tamanho e potencial Zeta foram determinados junto as variações de pHs de acordo com a figura 30.

(A)

(B)

Figura 30 – Relação entre tamanho, PDI e potencial Zeta para titulação potenciométrica pH 12 ao pH 2: (A) sem ativo e (B) com ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 30 indica ainda que o PLA é um polímero sensível ao pH. Para ambos os sistemas, os pontos nas curvas em que indicam um maior tamanho das nanopartículas são interpretados como a concentração de íons H^+ presentes no meio ácido. Caso estes íons fiquem adsorvidos à parede da matriz polimérica, influenciam no tamanho e, também, na estabilidade coloidal e modificando o potencial Zeta da solução.

Antes da titulação e após cada titulação o tamanho médio, PDI e potencial Zeta foram determinados, novamente de acordo com a tabela 8.

Tabela 8 - Relação entre tamanho, PDI[†] e potencial Zeta antes e após a titulação potenciométrica para as soluções de nanopartículas sem e com ativo.

Amostra	Solução de nanopartículas sem ativo			Amostra	Solução de nanopartículas com ativo		
	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)		Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Antes de titular: pH 9	(136±60)	0,212	(-59±9)	Antes de titular: pH 8	(189±55)	0,144	(-55±9)
pH 2	(92±53)	0,144	(-42±7)	pH 2	(182±47)	0,162	(-47±7)
pH 12	(126±68)	0,184	(-50±7)	pH 12	(228±61)	0,216	(-48±9)

Fonte: Elaborada pela autora.

Para os nanossistemas analisados o potencial Zeta permaneceu negativo, aumentando

[†] Erro não determinado pelo equipamento.

quando o meio é mais básico, assim como, o tamanho. Para o pH mais ácido o tamanho diminuiu. Estes resultados, determina que em nenhum dos intervalos de pH deixou a repulsão eletrostática não compensar a força de Van der Waals, não aglomerando o sistema ao decorrer das análises (CHARRON *et al.*, 2012)

Assim, os nanossistemas são aparentemente mais estáveis quando em meios mais básicos e a possível desestabilização ao longo do tempo pode se dar quando o sistema estiver em meio mais ácidos.

5.1.6 Estudo de liberação do ativo

A temperatura de transição vítrea do PLA foi determinada por DSC. A análise para o TGA e o DSC da amostra de PLA são indicadas na figura:

Figura 31 - Análise térmica para o PLA: (A) TGA e DTG e (B) DSC.

Fonte: Elaborada pela autora.

A curva TGA do polímero, não mostra variação de massa até 308,12°C. A degradação ocorre em um único evento térmico com perda de massa de 98,12% no intervalo entre 319,64 °C e 353,96 °C. Acima deste intervalo a decomposição é rápida mantendo a perda de massa constante até 699°C, com resíduo de 0,958 %. Este resíduo indica que a massa polimérica não é pura.

Na análise de DSC, observa-se que há um desvio na linha de base que foi atribuído a transição vítrea T_g , com início em 61,12°C, enquanto a temperatura de fusão (T_m) foi atribuída a temperatura 158,6°C. Dependente do tipo do PLA (racêmico ou não), os valores reportados para a T_g estão entre 60 e 67°C, e de T_m entre 173 a 180 °C. (ARMENTANO et al., 2010).

Para o estudo de liberação do ativo, a amostra de nanopartícula com ativo foi submetida a aquecimento constante de 60°C sendo esta temperatura abaixo da T_g do polímero e para garantir que a perda de massa seja referente ao óleo essencial. A figura 32 mostra a variação da perda de massa em horas.

Figura 32 - Avaliação da liberação do ativo em função do tempo em horas.

Fonte: Elaborada pela autora

A massa inicial varia mais rapidamente porque é onde a concentração de ativo é maior. Na avaliação da figura 32 a massa começa a ficar constante em aproximadamente 4 horas. A liberação contínua em ambos os casos, pode ser associada também a alta massa molecular do polímero alta determinada inicialmente, pois, para acontecer a difusão do ativo para o meio, algum processo de erosão, neste estudo ocasionado pela temperatura, deve acontecer. (SEVERINO et al., 2011)

Com estes dados comprova-se que a solução de nanopartículas poliméricas com ativo é um sistema para liberação controlada simples e de fácil obtenção.

5.2 Estudo de formação

5.2.1 Percentual de cristalinidade e do perfil de difração das nanopartículas poliméricas por XRD

Após o estudo de estabilidade e de liberação do ativo, os sistemas foram avaliados quanto a sua formação estrutural. A cristalinidade dos sistemas foram comparados com a da matriz polimérica.

As amostras de PLA, SDS e bicarbonato de sódio foram estudadas para se conhecer o padrão de difração e serem usados para a interpretação dos difratogramas das nanopartículas. O PLA foi solubilizado em acetona enquanto o SDS e bicarbonato de sódio foram solubilizados, separadamente em água.

Neste estudo, as nanopartículas não são analisadas em solução mas, secas e depositadas em placas de vidro para que possam se cristalizar. Este processo implica em respostas de mudanças físico-químicas, como por exemplo a cristalinidade (SHARMA; BISEN; SHUKLA, 2012) Então amostras foram recristalizadas, para serem analisadas sob as mesmas condições que as nanopartículas poliméricas.

As amostras de nanopartículas poliméricas sem e com ativo, foram analisadas para os pHs 2, 9 e 12 e pHs 2, 8 e 12, respectivamente. A figura 33 compara os padrões de difração com as partes cristalinas e amorfas das nanopartículas em relação a matriz polimérica analisadas sob as mesmas condições.

Figura 33 - Perfil cristalográficos para as nanopartículas poliméricas e para o PLA:
(A) sem ativo (pH 2, pH 9, pH 12) e (B) com ativo (pH 2, pH 8, pH 12).
Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 34 (A) e figura 34 (B) indicam a linha de base como a área do halo amorfo e a área total semicristalina dos difratogramas do PLA em grão e para o PLA seco na placa de vidro.

Figura 34 - Determinação do percentual de cristalinidade do PLA: (A) polímero em pó; (B) polímero solubilizado em acetona e seco em vidro (placa).
Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando as duas amostras, as larguras diferentes dos picos de difração implicam em tamanho de cristalitos diferentes, o que pode indicar que as moléculas do PLA tenham sofrido algum tipo de orientação influenciando o deslocamento e a assimetria de pico.

Para o PLA em grão a cristalinidade foi determinada como $(36 \pm 5)\%$ e $2\theta = 17^\circ$ para a amostra seca na placa foi de $(49 \pm 5)\%$ e $2\theta = 49^\circ$, porém a diferença encontra-se dentro do erro. Resultado semelhante para a cristalinidade é reportado por (GROSSMAN; NWABUNMA, 2010) usando por DSC. A semicristalinidade, também observada nos difratogramas, pode ser associada pela alta massa molecular média determinada pela técnica GPC, o que leva à formação de menos ligações intermoleculares ao longo das cadeias poliméricas.

A figura 35 indica difratogramas para análises das nanopartículas de PLA sem ativo.

Figura 35 - Difratoqramas para análise do percentual de cristalinidade com a decomposição da área cristalina e total (A) nanopartícula pH 2; (B) nanopartícula pH 9 e (C) nanopartícula pH 12 sem ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 30 indica os difratogramas para as nanopartículas com ativo.

Figura 36 - Difratomogramas para análise do percentual de cristalinidade com a decomposição da área cristalina e total (A) nanopartícula pH 2; (B) nanopartícula pH 8 e (C) nanopartícula pH 12 com ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os perfis de difração das nanopartículas sem e com ativo foram próximos, sugerindo-se que a presença do óleo essencial não implicou em mudanças estruturais. No entanto, como há um processo de secagem das placas a hipótese do óleo ter sido evaporado não pode ser descartada totalmente. A cristalinidade para as nanopartículas sem ativo respectivamente para o pH 2, pH 9 e pH 12 foram $(51 \pm 5)\%$ e $2\theta = 25,9^\circ$; $(51 \pm 5)\%$ e $2\theta = 24,8^\circ$; $(51 \pm 5)\%$ e $2\theta = 25,0^\circ$. Para as nanopartículas com ativo a cristalinidade respectivamente para o pH 2, pH 9 e pH 12 foram $(54 \pm 5)\%$ e $2\theta = 25,19^\circ$; $(52 \pm 5)\%$ e $2\theta = 24,07^\circ$; $(64 \pm 5)\%$ e $2\theta = 21,57^\circ$. O grau de cristalinidade para as nanopartículas não variaram em relação ao PLA (placa) com exceção da nanopartícula com ativo no pH 12 que tem seu percentual maior em relação às demais análises. Observa-se que as áreas amorfas das nanopartículas poliméricas com e sem ativo e são correspondes aproximadamente em $2\theta = 25^\circ$, coincidentes com o polímero e do bicarbonato de sódio. A figura 37 indica o perfil de difração para o SDS e o bicarbonato de sódio inicialmente em pó como recebido e posteriormente solubilizados em água e secos em placa de vidro.

Figura 37 - Difração de raios X: (A) SDS (pó e placa); (B) Bicarbonato de sódio (pó e placa).

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a amostra de SDS em pó os picos mais largos de difração não aparecem quando comparados ao SDS na placa. Enquanto para o bicarbonato de sódio é evidente que amostra deixa seu perfil cristalino e tornar-se amorfa.

Nas análises das nanopartículas, os picos cristalinos em $2\theta = 5^\circ$ e $2\theta = 7^\circ$ são referidos ao SDS, identificando-se um excesso deste componente em solução. Deste modo, as caracterizações estruturais implicam na presença em excesso de SDS em solução e semicristalinidade em função da matriz polimérica.

Os resultados obtidos na obtidos investigação da formação e estabilidade dos nanossistemas para as análises de DRX e DLS, em função do pH, estão resumidamente apresentados na tabela 14.

Tabela 9 - Resultados resumidos obtidos com as técnicas de XRD e DLS em função do pH.

Amostras	XRD		DLS	
	Cristalinidade (± 5) (%)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Nanopartículas sem ativo				
pH 2	51	(92 $\pm$ 53)	0,144	(-42 $\pm$ 7)
pH 9	52	(136 $\pm$ 60)	0,212	(-59 $\pm$ 9)
pH 12	50	(126 $\pm$ 68)	0,184	(-50 $\pm$ 7)
Nanopartículas com ativo				
pH 2	54	(182 $\pm$ 47)	0,162	(-47 $\pm$ 7)
pH 8	52	(189 $\pm$ 55)	0,144	(-55 $\pm$ 9)
pH 12	64	(228 $\pm$ 61)	0,216	(-48 $\pm$ 9)

Fonte: Elaborada pela autora.

A velocidade de degradação do PLA é diretamente influenciado por sua cristalinidade, sendo maior para polímeros com maior proporção de ácido láctico e menor cristalinidade e para polímeros com menores massas moleculares (SEVERINO et al., 2011) Por tanto, com estas análises, apesar da alta massa molar, mostra-se que a cristalinidade do PLA teve grande importância na estabilidade dos nanossistemas.

5.2.2 Caracterização qualitativa da composição estrutural por FTIR

O espectro para a nanopartícula com ativo foi sobreposto aos espectros da nanopartícula sem ativo, PLA, óleo essencial, SDS e bicarbonato de sódio para a comparação quantitativa, indicadas na figura 38 a seguir.

Figura 38 - Comparação do espectro da nanopartícula polimérica com ativo com os espectros: (A) nanopartícula sem ativo; (B) PLA; (C) óleo essencial; (D) SDS e (E) bicarbonato de sódio.

Fonte: Elaborada pela autora.

O PLA, figura 39, apresentou cinco regiões principais:

Figura 39 - Análise por FTIR para o PLA.
Fonte: Elaborada pela autora.

As regiões indicadas no espectro da figura 39 e descritas na tabela 10 são também citadas por (CHIENG et al., 2014; CHIENG, B. et al., 2013) corroborando com a análise. A quantidade dos grupos funcionais terminais, ligações éster, grupos de ácidos carboxílicos e álcool levam ao alargamento ou estriamento da cadeia polimérica podem influenciar nos resultados, assim como fatores instrumentais.(PALACIO; OROZCO; LÓPEZ, 2011) A figura 40 indica o estudo do óleo essencial.

Tabela 10 - Análise de FTIR para PLA.

Intensidade do pico	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Modo de Vibração
Médio (agudo)	3651	OH	Estriamento livre
Fraco	2999-2946	CH	Estriamento simétrico
Forte	1758	C=O	Estiramento
Fraco	1458-1368	CH (CH ₃)	Dobramento
Fraco	1087	C-O	Estiramento

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 40 - Análise por FTIR para o óleo essencial de pimenta rosa.
Fonte: Elaborada pela autora.

Como se trata de uma mistura, não é possível identificar todos os componentes do óleo essencial, mas sim os grupos funcionais presentes nesta mistura, especialmente dos componentes majoritários. (LAMPMAN et al., 2010) A análise é indicada na tabela 11.

Tabela 11 - Análise de FTIR para óleo essencial de *Schinus molle* L. (pimenta rosa)

Intensidade do pico	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Modo de Vibração	Correspondência
Médio (largo)	3420	OH	Estiramento/Ligação de hidrogênio	Não se atribui
Fraco	3080	CH (anel aromático)	Estiramento	Majoritários
Forte (agudo)	2960	CH	Estiramento	Majoritários
Forte (agudo)	2927	CH	Estiramento	Majoritários
Médio	2872	CH	Estiramento	Majoritários
Fraco (agudo)	1645	C=C	Estiramento	Majoritários
Médio	1448	CH (CH ₃)	Dobramento fora do plano	Majoritários/outros elementos
Fraco	1018	C-O	Estiramento	Não se atribui
Médio (agudo)	889	CH (aromático)	Dobramento fora do plano	Majoritários

Fonte: Elaborada pela autora.

O sinal fraco referente ao estiramento C=C são presentes nos três componentes majoritários, representados estruturalmente na figura 23. A banda tripleto (2960 cm⁻¹, 2927 cm⁻¹ e 2872 cm⁻¹) representa deformações axiais para =CH, que podem representar alcenos

aromáticos. Para as ligações CH estas podem ser atribuídas aos compostos majoritários e também a outros elementos. Em geral compostos Monoterpenos apresentam absorbância em quatro regiões principais: em 3.000 cm^{-1} ; de 2.800 cm^{-1} à 1.650 cm^{-1} ; 1000 cm^{-1} e 950 cm^{-1} ; e entre 900 cm^{-1} e 850 cm^{-1} (PORTELLA et al., 2014), estando os resultados experimentais de acordo com a literatura.

A composição estrutural das nanopartículas poliméricas estão indicadas na figura 41.

Figura 41 - Análise por FTIR para a nanopartícula polimérica em solução aquosa comparação (A) sem ativo e (B) com ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise dos espectros para a nanopartícula sem ativo, figura 41 (A), é indicada na tabela 12.

Tabela 12 - Análise de FTIR para a solução de nanopartícula sem óleo essencial.

Intensidade do pico	Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Modo de Vibração	Correspondência
Forte (largo)	3400	OH	Estiramento/Ligação de hidrogênio	SDS/Bicarbonato de sódio/água
Fraco (largo)	2150	$\text{C}\equiv\text{C}$	Estiramento	Não se atribui
Médio (agudo)	1647	$\text{C}=\text{O}$	Estiramento	PLA/bicarbonato de sódio
Fraco (agudo)	1372	$\text{S}=\text{O}$	Estiramento	SDS
Fraco (agudo)	1238	$\text{H}-\text{C}-\text{O}$	Estiramento	PLA
Médio (largo)	705	CH (associado à CH_2)	Estiramento (<i>rocking</i>)	SDS

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise dos espectros para a nanopartícula com ativo, figura 41 (B), é indicada na tabela 13.

Tabela 13 - Análise de FTIR para a solução de nanopartícula com óleo essencial.

Intensidade do pico	Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Modo de Vibração	Correspondência
Forte (largo)	3420	OH	Estiramento/Ligação de hidrogênio	SDS/Bicarbonato de sódio/água
Fraco (largo)	2537 e 2362	OH	Estiramento	PLA/Bicarbonato de sódio
Médio (agudo)	1647	C=O	Estiramento	PLA/bicarbonato de sódio
Fraco (largo)	1180	C-O	Estiramento	PLA/bicarbonato de sódio
Médio (largo)	698	CH (associado à CH_2)	Estiramento (<i>rocking</i>)	SDS

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que para as duas análises realizadas, os espectros possuem três regiões que se sobrepõe uma com as outras:

- em aproximadamente 3400 cm^{-1} , a banda larga OH, refere-se a presença de água embora esteja presente, também, nas amostras de PLA e bicarbonato de sódio. A ligação de estiramento H-C-O foi atribuída ao PLA, devido a presença da banda larga OH;
- o grupamento C=O, na região de 1647 cm^{-1} , de pico estreito e altamente absorvente pode indicar o deslocamento da absorção da carbonila do bicarbonato, também presente no espectro do bicarbonato de sódio e do PLA e
- em 700 cm^{-1} , o grupo CH, pode indicar o movimento dos grupos CH_2 , denominada de banda de cadeia longa, determinada pela presença do SDS na formação das nanopartículas.

Para a solução com ativo não foi identificada a banda do sulfato, provavelmente sobreposta às bandas referentes a hidroxila. A banda de estiramento C-O, foi relacionada ao PLA e o bicarbonato de sódio. Ainda, em relação ao PLA nota-se que a banda referente ao ácido carboxílico deslocou para direita tornando-se menor do que em relação ao polímero, mostrando uma possível interação dos componentes da solução.

A principal diferença entre os dois sistemas de nanopartículas esta na região de 1180 cm^{-1} , com a ligação C-O atribuída a grupamentos ésteres. Embora seja um grupamento não associado aos compostos majoritários do óleo essencial ela é, neste caso, atribuída a possível interação entre o óleo essencial e o PLA. Esta mudança, pode indicar que o óleo essencial esta

adsorvido às nanopartículas poliméricas.

De acordo com as análises destes resultados, supõe-se que as nanopartículas poliméricas sofreram interações entre os componentes, como ligações químicas, o que justifica que os espectros das nanopartículas poliméricas não sejam correspondentes à superposição dos espectros do PLA, SDS, bicarbonato de sódio e o óleo essencial. Este resultado também foi observado com as análises de DLS.

5.2.3 Avaliação morfológica das nanopartículas poliméricas por SEM

A figura 42 mostra as imagens obtidas por SEM para as nanopartículas sem ativo e a figura 43 mostra as imagens para as nanopartículas com ativo.

(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

(F)

Figura 42 - Imagens das nanopartículas poliméricas sem ativo por SEM em diferentes concentrações: (A) e (B) pH 2 (C) e (D) pH 8; (E) e (F) pH 12.

Fonte: Elaborada pela autora.

(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

(F)

Figura 43 - Imagens das nanopartículas poliméricas com ativo por SEM em diferentes concentrações: (A) e (B) pH 2; (C) e (D) pH 8; (E) e (F) pH 12.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se na figura 42 (C) e (D), que as nanopartículas apresentam formas regulares

uniformemente esféricas sem ranhuras ou escamas. É possível, observar que há diferenças da dispersividade, embora haja regiões amostrais com aproximadamente o mesmo tamanho.

As regiões não esféricas da figura 42 (A), (C) e (E) são em função da preparação das amostras, e se devem provavelmente a algum tipo de excesso de SDS e o bicarbonato de sódio, além de ser característico do próprio polímero. A mesma observação ocorre para a figura 43 (com exceção da figura 43 (D)) onde estas regiões também são aparentes.

Para as nanopartículas com e sem ativo na faixa de pH 2 e pH 12 observa-se esferas menores, mais polidispersas e regiões com aparente excesso de SDS, esta hipótese é sustentada também pelo perfil de análise de XRD que apresentou picos característicos de difração destes componentes.

São vários os trabalhos encontrados na literatura que condizem com resultados semelhantes para imagens de nanopartículas poliméricas entre eles cita-se nanopartículas de PLA para encapsulação de fármacos como o *docetaxel* (MUSUMECI *et al.*, 2006) e *cefotina* (LOADED; NANOPARTICLES, 2010).

Neste estudo, não foi identificado diferenças morfológicas devido a presença do ativo na solução. Também a exemplo do XRD, o óleo por ser volátil pode ter sido volatilizado durante o preparo das amostras para análise.

A distribuição de tamanho e o índice de polidispersão foram determinados para as nanopartículas com pH 9 para nanopartícula sem ativo e pH 8 com ativo. As amostras com os pHs entre 2 e 12 apresentaram-se muito aglomeradas ou em pouco número o que dificultou a contagem estatística realizada pelo programa *ImageJ*.

O PDI foi determinado segundo a equação 16:

$$PDI = \left(\frac{\sigma}{x_c} \right)^2 \quad (16)$$

Onde, σ é a largura da distribuição Gaussiana e x_c é o ponto médio da distribuição Gaussiana (valor numérico do tamanho médio do diâmetro das nanopartículas). Segundo a função Gaussiana, σ representa 68% dos valores dos dados e portanto é dado como um intervalo de segurança. (VUOLO, 1996)

As análises estatísticas para as nanopartículas sem ativo foram realizadas com figura 42 (D), por apresentar maior números de nanopartículas e menos aglomerados. Para as nanopartículas com ativo, a figura 43 (D) foi, também, escolhida por apresentar maior números de nanopartículas e menos partículas aglomeradas, a análise estatística trabalhou apenas com

as nanopartículas visíveis em escala de 200 nm.

Com a distribuição de tamanho médio em função da frequência, o histograma ajustado a curva Gaussiana, analisou-se 145 nanopartículas para o sistema sem ativo e 67 nanopartículas para o sistema com ativo. A figura 44 indica distribuição do diâmetro médio das nanopartículas sem e com ativo, respectivamente, através do ajuste Gaussiano.

Figura 44 - Análise de distribuição do diâmetro médio das nanopartículas calculadas através do ajuste gaussiano.

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela 14 indica os tamanhos e o PDI determinados por SEM em comparação com a técnica de DLS.

Tabela 14 - Análise de distribuição do diâmetro médio (nm) das nanopartículas sem e com ativo obtidas através das técnicas SEM e DLS[‡]

Técnica	Nanopartícula sem ativo		Nanopartícula com ativo	
	Diâmetro médio (nm)	PDI (u.a.)	Diâmetro médio (nm)	PDI (u.a.)
SEM	237±55	0,23±0,05	245±94	0,148±0,006
DLS	154±73	0,226	202±83	0,166

Fonte: Elaborada pela autora.

Diferente do DLS que permite que a análise seja estudada em seu próprio meio dando como resposta o diâmetro hidrodinâmico, o SEM permite o estudo das imagens das partículas isoladas do seu meio, assim as diferenças entre os tamanhos calculados por SEM e DLS são esperados. (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Sendo assim, de acordo com a tabela 14 os diâmetros médios por SEM deram próximos para a variação das nanopartículas sem e com ativo, o que se explica também pelo baixo número de partículas observadas na figura 43 (D) obtendo-se a uma

[‡] Erro do PDI não determinado pelo equipamento para o DLS. As amostras analisadas não foram as mesmas para

base estatística pouco eficaz. Enquanto ao PDI para ambos os sistemas deram próximos ao valor estudado por DLS. Segundo os gráficos da figura 44 é possível observar que a distribuição de partículas apresentou o PDI na faixa extrema para ser considerado um sistema monodisperso.

Através da técnica de emulsificação seguida de evaporação de solvente foi possível produzir nanopartículas poliméricas com aparência esférica, com estabilidade e com eficácia em liberação do ativo lipofílico.

5.2.4 Modelo teórico para formação das nanopartículas poliméricas com e sem ativo

O estudo de formação teórico das nanopartículas poliméricas sem e com ativo foi concluída com os resultados conjuntos obtidos com a caracterização estrutural do sistema.

O polímero é solubilizado em um solvente miscível em água, a acetona em agitação magnética e constante, formando a fase orgânica. Esta agitação e o aquecimento baixo (em torno de 40°C) facilita a solubilização do polímero e por tanto facilitando a formação das partículas poliméricas sólidas.

A solução aquosa é formada pelo tensoativo (SDS) e o agente tamponante (bicarbonato de sódio) em temperatura 15°C, para que haja menor formação de espuma na solução durante a agitação magnética.

Na fase aquosa o sal, bicarbonato de sódio, sofre dissociação em água e fica em solução, aumentando a concentração de Na^+ e por consequência aumentando a repulsão eletrostática do sistema. A base OH^- , também fica em solução o que faz com esta tampone o meio:

Em presença de água, o SDS ioniza-se em ânion lauril sulfato:

No caso do tensoativo a formação micelar é espontânea, pois, tende a diminuir a área de contato entre as cadeias carbônicas e a água. Sabe-se que as micelas mantêm os grupos hidrofílicos próximos, de modo a gerar uma repulsão eletrostática que se opõe ao processo micelização, diminuindo o potencial elétrico e assim provocando a repulsão da parte hidrofílica.

(RIZZATTI; ZANETTE; MELLO, 2009) São estas micelas, que irão solubilizar o polímero.

A solução aquosa é vertida na solução orgânica, ambas sob agitação magnética constante, formando a nanoemulsão onde temos acetona (apolar) solubilizada na água (polar). Para nanopartículas de PLA com a incorporação do ativo lipofílico, o ativo é incorporado a solução aquosa e posteriormente esta a solução orgânica e o processo de formação é semelhante. Só haverá a formação de nanopartículas, em ambos os casos, acima da Concentração de Agregação Crítica (CAC) do polímero, que deve ser menor que o CMC do surfactante. (KHAN et al., 2008)

O polímero é hidrofóbico e por tanto, procurará um ambiente sem a presença de água para permanecer estável e assim, ele tenderá a formar partículas sólidas (nanopartículas). O polímero tende a atrair moléculas de tensoativos para determinadas posições da sua matriz. A parte apolar do polímero irá se juntar com o ambiente apolar, formado pela união das cadeias de hidrocarboneto do SDS.

O SDS irá formar espontaneamente uma série de agregados micelares em torno do polímero, visto que o ambiente micelar é favorável para a estabilidade do SDS e a presença do polímero também facilita esta interação, neste caso ocasionando uma interação física entre os componentes. Assim, é o caráter hidrofóbico do polímero e do agente tensoativo que é responsável pela interação para a formação das nanopartículas, ocorrendo um processo semelhante ao de micelização.

Para as nanopartículas com ativo, a solução aquosa com óleo é incorporada à solução orgânica, onde o polímero irá, também, procurar o ambiente micelar para formação de nanopartículas. O óleo essencial ao ser incorporado na solução aquosa é emulsificado, devido agitação, formando uma solução contínua de baixa estabilidade. Nesta agitação forma-se gotículas de óleo envoltas no ambiente micelar formado pelo SDS. O óleo essencial pode estar adsorvido ou no núcleo da esfera obtida. As nanopartículas poliméricas são estabilizadas por micelas de SDS.

Após, a formação da nanoemulsão, o solvente orgânico é evaporado fazendo com que as partículas que ainda não foram formadas e ainda estão dispersas na acetona se difundam para a solução aquosa. Devido ao volume da solução das nanopartículas, é comum manter a solução a agitação constante para acelerar o processo de evaporação da acetona. No final da solução tem-se uma emulsão óleo-água.

O processo proposto para a formação das nanopartículas estão dispostos na figura 45.

Figura 45 - Processo de: (1) solubilização do PLA em acetona; (2) formação das nanopartículas poliméricas sem ativo; e (3) formação das nanopartículas poliméricas com ativo em solução aquosa. As informações da figura são descritas no texto.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se as seguintes etapas:

- **Solução do PLA (2):**

(A) PLA (antes de ser solubilizado o polímero apresenta-se em forma de grão sólidos e irregulares figura 18);

(B) A partir da solubilização em acetona com agitação e com aquecimento de

40°C figura 45 2(B) . Neste processo, as cadeias poliméricas são relaxadas, o que facilita a incorporação no ambiente micelar formado pelo SDS. As soluções aquosas figura 45 1(A) e figura 45 3(B) são vertidas nesta solução.

- **Formação para as nanopartículas sem ativo lipofílico (1) e (com ativo (3)):**

- (A) Solução de SDS e bicarbonato de sódio (*e ativo*) em solução aquosa;
- (B) Formação de micelas de SDS e íons Na^+ em solução (*com a incorporação do ativo lipofílico no interior do ambiente micelar*);
- (C) Incorporação do PLA solubilizado em acetona na solução aquosa contendo SDS. O polímero por difusão vai para o ambiente micelar (*junto ao ativo*)
- (D) Massas de PLA continuam a ser incorporadas pela micela de SDS até formar uma matriz sólida (*junto a massa de ativo incorporada*);
- (E) Formação final da nanopartícula polimérica sem ativo, a partir de uma matriz sólida de PLA. (*O ativo pode estar disposto como mostrado na figura 6. Podendo as nanopartículas serem formadas como nanocápsulas ou nanoesferas, com o ativo absorvido no núcleo, adsorvido à parede polimérica, retido na matriz polimérica ou adsorvido na matriz polimérica*).

6 Conclusões

O uso de polímeros biodegradáveis, como o políácido láctico, na produção de nanopartículas é uma aplicação muito importante para o desenvolvimento da nanotecnologia de liberação controlada de ativos. Neste trabalho, foi desenvolvido um novo sistema de nanopartícula para liberação controlada do óleo essencial *Schinus molle* L. de simples e de fácil reprodução. O óleo essencial em estudo apresentou entre seus componentes compostos monoterpenos de atividade antioxidante e antimicrobiana comprovadas pela literatura adequada, sendo um bom potencial para futuros estudos em aplicação cosmética. A eficiência de encapsulação foi definida em função da entalpia do ativo e calculada como 83%, apresentando um bom teor de encapsulamento. Foi investigada a variação de estabilidade para sistemas sem e com o ativo. Após a formação das nanopartículas, a alta densidade das cargas negativas do polímero, atraem as cargas positivas da solução, provindas da ionização do SDS e da ionização em água, resultando na estabilização eletrostática do sistema. A partir das análises de estabilidade a solução aquosa das nanopartículas apresentaram-se estáveis ao longo do tempo onde, apesar da variação de pH os parâmetros de tamanho, PDI e potencial Zeta permaneceram com poucas variações até aproximadamente 100 dias. Através destas análises concluiu-se que o aumento no tamanho para o segundo sistema foi relacionado ao óleo essencial incorporado. Além da variação com o tempo, foi possível titular as soluções de nanopartículas com NaOH e HCl para o estudo nos pH 2 e pH 12. Supõe-se que para o pH 12 o sistema seja mais estável por causa do aumento do potencial Zeta nestas soluções. O estudo de liberação através da técnica de gravimetria, à temperatura de 60°C, mostrou que durante quatro horas houve liberação do ativo para o meio.

A estabilidade dos sistemas de nanopartícula também foi associada a porcentagem de cristalinidade e a alta massa molar do PLA. Através das análises de XRD, obteve-se que os perfis de difração para as nanopartículas são semicristalinos assim como a matriz polimérica. Além disso, observou-se que embora o óleo não influa nos perfis de difração das nanopartículas, ele afeta a cristalinidade no pH 12. Outro resultado importante é a indicação do excesso do tensoativo SDS na solução, também associadas nas imagens obtidas por SEM. O SEM mostrou que as nanopartículas são de aparência esférica, com matriz contínua de PLA, com tamanho e polidispersão próximas ao calculado com o DLS. A análise de microscopia revelou ainda que a presença do ativo não implicou em diferenças morfológicas entre as nanopartículas sem e com

ativo. A interação química entre os componentes do sistema foi comprovada pelas análises de FTIR, pois, a banda C-O apresentou alterações. Através do conjunto das análises foi possível propor um esquema simples para a formação dos sistemas de nanopartículas de PLA.

Portanto, o sistema se apresentou estável e com capacidade de liberação controlada. A investigação quanto a estabilidade e formação das nanopartículas sugerem que o estudo de características físico-químicas são importantes para se desenvolver nanossistemas estáveis e de fácil reprodução.

7 Perspectivas futuras

Sugere-se:

- a) para aperfeiçoar o rendimento da extração do óleo essencial, que se repita o mesmo procedimento em diferentes tempos;
- b) estudar as características de toxicidade do óleo essencial e do sistemas de nanopartículas com ativo para segurança de uso e manipulação;
- c) realizar os testes de liberação em função da temperatura da pele humana (lugar de aplicação) e em função do pH do meio de futura aplicação do sistema e
- f) liofilizar as soluções de nanopartículas de modo a estudar o aumento da estabilidade e aplicabilidade final do sistema.

Referências

AKCELRUD, L. **Fundamentos da ciência dos polímeros**. São Paulo: Manole, 2007.

ARMENTANO, I. et al. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 11, p. 2126–2146, 2010.

ARMENTANO, I. et al. Multifunctional nanostructured pla materials for packaging and tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10-11, p. 1720–1747, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670013000518>>. Acesso em: 1 jun. 2014.

ASSIS, L. M. et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99–109, 2012.

ATKINS, P. W.; PAULA, J. **Físico-química**. Rio de Janeiro: Livros técnicos e Científicos, 2008.

BANNACH, G. et al. Efeitos da história térmica nas propriedades de um polímeros pet: um experimento para ensino de análise térmica. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1825–1829, 2011.

BAO, Y. et al. Microencapsulation of fatty acid as phase change material for latent heat storage. **Journal of Energy Engineering © ASCE**, v. 137, n. 4, p. 214–219, 2011.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, v. 15, n. 1, p. 13–21, 2005

BARBOSA-CANOVAS, G. V. et al. **Global issues in food science and technology**. Amsterdam: Academic Press, 2009.

BARROSO, M. S. T.; VARGAS, R. M. F.; CASSEL, E. **Uso de um modelo de dessorção para simular a extração do óleo essencial de schinus molle l. por arraste a vapor: experimentos e modelagem**. 2010. p. 614–616. Disponível em: <http://www.pucrs.br/edipucrs/Vmostra/V_MOSTRA_PDF/Engenharia_e_Tecnologia_de_Materiais/83261-MAUREAN_SALLY_TAVARES_BARROSO.pdf>. Acesso em: 12 maio 2015.

BENNISTON, A. C.; MACKIE, P. R. Functional nanostructures incorporating responsive modules. In: Nalwa, H. S. (Ed.) **Nanostructured materials and nanotechnology**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 693–748.

BERNAL, Cláudia et al. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 849–855, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000500023&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 24/04/2014

BHATTACHARJEE, S.; ELIMELECH, M.; BORKOVEC, M. Dlvio interaction between colloidal particles: beyond derjaguin's approximation. **Croatica Chemica Acta**, v. 71, n. 4, p. 883–903, 1998.

BRAS, C. et al. Evaluation of the acute dermal exposure of the ethanolic and hexanic extracts from leaves of schinus molle var. areira l. in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1450–6, 2011.

BRUN, N. et al. Hybrid foams, colloids and beyond: from design to applications. **Chemical Society reviews**, v. 40, n. 2, p. 771–788, 2011.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

CALLISTER, W. D. **Materials science and engineering: an introduction**. 7th ed. New York: John Wiley & Sons, 2007.

CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: Artliber, 2002.

CHARRON, G. et al. On the use of ph titration to quantitatively characterize colloidal nanoparticles. **Langmuir**, v. 28, n. 43, p. 15141–15149, 2012.

CHIENG, B. et al. Epoxidized vegetable oils plasticized poly(lactic acid) biocomposites: mechanical, thermal and morphology properties. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16024–16038, 2014.

CHIENG, B. et al. Poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) polymer nanocomposites: effects of graphene nanoplatelets. **Polymers**, v. 6, n. 1, p. 93–104, 2013. doi:10.3390/polym6010093.

CHIQUEITO, A. J. Pontos quânticos: átomos artificiais e transistores atômicos. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 23, n. 2, p. 159–167, 2001.

COLE, E. R. **Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*schinus terebinthifolius raddi*) e sua eficácia no combate ao dengue**. 2008. 82 p. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) - Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.

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

COSTA, L. **Encapsulação de nanoparticulas de fosfato de alumínio pela técnica de polimerização em miniemulsão**. 2010. 140 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CULLITY, B. D. **Elements of x-ray diffraction**. Reading, Mass: Addison-Wesley Publishing Company, 1956.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.

DAUDT, R. M. et al. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 28–31, 2005.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DOURADO, M. T. **Óleos essenciais e oleoresina da pimenta rosa (*schinus terebinthifolius raddi*): propriedades químicas e biológicas**. 2012. 121 p. Tese (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

DURÁN, N. et al. Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 151–158, 2010.

ENNIGROU, A. et al. Leaf volatile oil constituents of schinus terebinthifolius and schinus molle from tunisia. p. 90–92, 2011. Disponível em: < <http://llu.fb.llu.lv/conference/foodbalt/2011/FOODBALT-Proceedings-2011-90-92.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2015.

EVORA, M. C. et al. Comparação de técnicas ftr de transmissão, reflexão e fotoacústica na análise de poliamida-6, reciclada e irradiada. **Polímeros**, v. 12, n. 1, p. 60–68, 2002.

FEYNMAN, R. P. **Plenty of room at the bottom**. 1959. Disponível em: < http://www.pa.msu.edu/~yang/RFeynman_plentySpace.pdf >. Acesso em: 12 maio 2015.

FLORENZANO, F. H. Perspectivas atuais para a obtenção controlada de polímeros e sua caracterização. **Polímeros**, v. 18, n. 2, p. 100–105, 2008.

FORMARIZ, T. H. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301–313, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v41n3/a03v41n3>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811–816, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000400031&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 4 nov. 2014.

Garikapati Kiran Babu et al. **Simple portable mini distillation apparatus for the production of essential oils and hydrosols**. US Patent 20050082157 A1, 23 Mar. 2001, 21 Apr. 2005.

GOMES, V. et al. Variation in the essential oils composition in Brazilian populations of Schinus molle L. (Anacardiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 222–227, 2013 DOI:10.1016/j.bse.2013.01.003

GROSSMAN, R. F.; NWABUNMA, D. **Poly (lactic acid)- synthesis, structures, properties, processing, and applications**. New York: Wiley ed. 2010.

HOIDY, W. H. et al. Preparation and characterization of polylactic acid/polycaprolactone clay nanocomposites. **Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 2, p. 97–106, 2010.

HORIBA Scientific. **A guidebook to particle size analysis**. 2012. Disponível em: < https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/PSA/PSA_Guidebook.pdf>. Acesso em: 12 maio 2015.

JAFELICCI JUNIOR, M.; VARANDA, L. C. O mundo dos colóides. **Química Nova na Escola**, v. 9, p. 9–13, 1999. Disponível em: <<http://www.joinville.udesc.br/portal/professores/carlad/materiais/Coloides.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2015.

JAHNO, V. D. **Síntese e caracterização do poli (l-ácido láctico) para uso como biomaterial**. 2005. 94 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

KHAN, M. Y. et al. Interaction between aqueous solutions of polymer and surfactant and its effect on physicochemical properties. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 3, n. 5, p. 579–585, 2008.

KHANKRUA, R. et al. Thermal and mechanical properties of biodegradable polyester/silica nanocomposites. **Energy Procedia**, 2013. v. 34, n. 3, p. 705–713. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2013.06.803>>\n<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876610213010461>>.

KIM, E. J.; SHAH, D. O. Effect of surfactants on the cloud point of amphiphilic drug solutions. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v. 227, n. 1-3, p. 105–111, 2003.

KOURNIATIS, L. R. et al. Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 295–300, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000200013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 24 out. 2014.

KUMARI, A.; YADAV, S. C. S. K. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces B, biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782542>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

LAMPMAN, G. M. et al. **Introdução a espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

LASPRILLA, A. J. R. et al. Synthesis and characterization of poly (lactic acid) for use in biomedical field. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 985–990, 2010. Disponível em: <<http://www.aidic.it/icheap10/webpapers/310Lasprilla.pdf>>. Acesso em: 4 nov. 2014.

LEIMANN, F. V. **Microencapsulação de óleo essencial de capim limão utilizando o processo de coacervação simples**. 2008. 115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

LÓPEZ, A. et al. Insecticidal activity of microencapsulated schinus molle essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 209–216, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669013007280>>. Acesso em: 7 nov. 2014.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

MACHADO, S. R. P.; EVANGELISTA, R. C. Development and characterization of cefoxitin Loaded D,L-PLA nanoparticles. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 193–202, 2010.

MAHMOUDI, M. et al. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 9, p. 5610–5637, 2011. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cr100440g>>. Acesso em: 21 out. 2014.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; EVANGELISTA, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded plga nanoparticles. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 523–530, 2006.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. **A basic guide to particle characterization**. Inform White Paper. Disponível em: <<http://www.atascientific.com.au/publications/wp-content/uploads/2012/07/MRK1806-01-basic-guide-to-particle-characterisation.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2015.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Zeta potential**: an introduction in 30 minutes. Disponível em: <<http://www3.nd.edu/~rroeder/ame60647/slides/zeta.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2015.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Zetasizer nano series user manual**. MAN0317. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Zetasizer+Nano+Series+User+Manual#0>>. Acesso em: 14 nov. 2014.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87–93, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000100015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 30 out. 2014.

MARTINS, M. D. R. et al. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of schinus molle l. essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 485–492, 2014.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2012/sm/c2sm06903b>>. Acesso em: 14 out. 2014.

MELO, N. F. S. et al. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (l-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 65–69, 2010.

MOHANRAJ, V.; CHEN, Y. Nanoparticles. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 561–573, 2007. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/14634>>. Acesso em: 4 nov. 2014.

MOREIRA, J. C. et al. Determinação das constantes k e alfa da equação de mark-houwink de poli(p-acetóxiestireno). **Polímeros**; v. 14, n. 2, p. 80–82, 2004.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese, caracterização e degradação “in vitro” do poli (l-ácido láctico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 1, p. 26–32, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/po/v16n1/v16n1a08.pdf>>. Acesso em: 4 nov. 2014.

MUSUMECI, T. et al. Pla/plga nanoparticles for sustained release of docetaxel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, n. 1–2, p. 172–179, 2006.

NANOSCIENCE and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. 2004. Disponível em: <<http://www.raeng.org.uk/publications/reports/nanoscience-and-nanotechnologies-opportunities>>. Acesso em: 12 maio 2015.

NAPPER, D. H. Steric stabilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 58, n. 2, p. 390–407, 1977. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021979777901503>>. Acesso em: 29 out. 2014.

OLIVEIRA, A. G. et al. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131–138, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n1/18821.pdf>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

OLIVEIRA, L. F. G. et al. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (schinus terebinthifolius raddi) sobre colletotrichum gloeosporioides. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2013. v. 15, n. 1, p. 150–157, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v15n1/a21v15n1.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2015.

OLIVEIRA, L. F. M. et al. Present status of traffic accidents in the age of speed: an overview. Distillation time and volatile profile of the essential oil of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius*) in Sergipe, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 243–249, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722014000200012>>. Acesso em: 20/01/2015

OROZCO, V. H. et al. Biodegradable self-reporting nanocomposite films of poly(lactic acid) nanoparticles engineered by layer-by-layer assembly. **Polymer**, v. 51, n. 18, p. 4127–4139, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386110005793>>. Acesso em: 24 fev. 2015.

PALACIO, J.; OROZCO, V. H.; LÓPEZ, B. L. Effect of the molecular weight on the physicochemical properties of poly(lactic acid) nanoparticles and on the amount of ovalbumin adsorption. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 12, p. 2304–2311, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532011001200010&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 maio 2015.

PECORA, R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2, p. 123–131, 2000. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1010067107182>>. Acesso em: 13 nov. 2014.

PERES, L. B. **Obtenção de nanopartículas de plla e nanopartículas blenda plla/pmma e plla/ps para incorporação de um análogo da isoniazida**. 2012. 139 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

PIANOVSKI, A. R. et al. Uso do óleo de pequi (*caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas : desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 249–259, 2008.

PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation i. methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17292111>>. Acesso em: 11 jul. 2014.

PLENTY of room revisited. **Nature nanotechnology**, v. 4, n. 12, p. 781, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/nnano/journal/v4/n12/pdf/nnano.2009.356.pdf>>. Acesso em 12 maio 2015.

PORTELLA, A. C. F. et al. Physical and chemical characterization of essential oil of siparuna guianensis aublet. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 1–6, 2014. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20140136>>. Acesso em: 12 maio 2015.

PRISTA, L.; ALVES, A.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3. ed. Lisboa : Fundacao Calouste Gulbenkian, 1990.

PUBCHEM: the PubChem Project. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 19 maio 2015.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670011000232>>. Acesso em: 2 maio 2014.

REIS, M. O. **Desenvolvimento e caracterização de nanocompósitos produzidos a partir de miniemulsão acrílica aquosa contendo nanopartículas de prata**. 2011. 100 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. R.; MELLO, L. C. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de química. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 518–521, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000200041&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 29 out. 2014.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54–57, 2008. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252008000200024&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 4 nov. 2014.

SANTOS, A. C. A. et al. Caracterização química de populações de schinus molle L. do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 1014–1016, 2007. Supl. 2

SANTOS, A. C. A. et al. Efeito fungicida dos óleos essenciais de schinus molle l. e schinus terebinthifolius raddi, anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 154–159, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000200003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 3 nov. 2014.

SANTOS, E. P.; BARBOZA, J. C. S. Avaliação do uso de amidos aniônicos hidrolisados como estabilizantes em nanocápsulas poliméricas para formulações tópicas. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 23, n. 5, p. 624–629, 2013. Disponível em: <<http://www.revistapolimeros.org.br/doi/10.4322/polimeros.2013.001>>. Acesso em: 2 nov. 2014.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000500017&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 14 out. 2014.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442–449, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722009000400013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 7 nov. 2014.

SCHINUS MOLLE. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Schinus_molle>. Acesso em: 19 maio 2015.

SCHINUS. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Schinus>>. Acesso em: 19 maio 2015.

SEVERINO, P. et al. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. **Polímeros**, v. 21, p. 361–368, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/po/v21n5/AOP_0860.pdf>. Acesso em: 4 nov. 2014.

SHARMA, R.; BISEN, D.; SHUKLA, U. X-ray diffraction: a powerful method of characterizing nanomaterials. **Science and Technology**, v. 4, n. 8, p. 77–79, 2012. Disponível em: <<http://recent-science.com/index.php/rrst/article/viewArticle/14887>>. Acesso em: 17 nov. 2014.

SHI, J. **Steric stabilization**. 2002. Disponível em: <http://muri.lci.kent.edu/References/NIM_Papers/stabilization_of_NP_suspensions/2002_Shi_steric_stabilization.pdf>. Acesso em: 12 maio 2015.

SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais. In: **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**, p. 38–43, 1993. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio16/16_oleos.pdf>. Acesso em 25 abr.

2015.

SILVA JUNIOR, E. et al. Formação de nanoemulsões do tipo óleo em água contendo óleo de semente de romã. **Disciplinarum Scientia**. série: ciências naturais e tecnológicas, v. 14, n. 1, p. 115–122, 2013.

SILVA, A. G. et al. The essential oil of brazilian pepper, *schinus terebinthifolia* raddi in larval control of *stegomyia aegypti* (linnaeus, 1762). **Parasites & vectors**, v. 3, p. 79, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2936394&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v43n3/a04v43n3.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2015.

SILVA, J. M.; LIMA, J. A. S. Quatro abordagens para o movimento browniano. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v.29, n. 1, p. 25-35, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbef/v29n1/a07v29n1.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2014.

SILVA, M. S. et al. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1868–1873, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000900009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 14 nov. 2014.

SIMOES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SLIWKA, W. Microencapsulation. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 14, n. 8, p. 539-550, 1975. doi: 10.1002/anie.197505391.

SMITH, W. F.; HASHEMI, J. **Fundamentos de engenharia e ciência dos materiais**. Rio de Janeiro: McGraw Hill Brasil, 2013.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n.1-2, p. 1-20, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365900003394>>. Acesso em: 12 maio 2015.

SOUSA, H.; RANGEL, C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860–1870, 2009.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros: parte I. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 96–100, 2012b.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros: parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101–106, 2012a.

SOUZA, P. M. S. et al. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 132–137, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000100024&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 10 dez. 2014.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, p. 12–20, 2009. Disponível em: <<http://periodicos.univille.br/index.php/RSA/article/viewArticle/86>>. Acesso em: 6 nov. 2014.

SURI, S. et al. **Microparticles and nanoparticles**. 3rd ed. New York: Elsevier, 2013.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000186860300157X>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

TADROS, T. F. **Emulsion formation and stability**. Weinheim: Wiley-VCH, 2013.

TAN, C. P.; MAN, Y. C. Y. B. Comparative differential scanning calorimetric analysis of vegetable oils: I. effects of heating rate variation. **Phytochemical Analysis : PCA**, v. 13, n. 3, p. 129-141, 2002.

TOTTI, L. C.; MEDEIROS, A. C. S. **Maturação e época de colheita de sementes de aroeira-vermelha**. 2006. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2010/41230/1/com-tec164.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2015.

TOUMEY, C. **Reading feynman into nanotechnology : a text for a new science**. Techné, v. 12, n. 3, p. 133-168, 2008.

VUOLO, J. H. **Fundamentos da teoria de erros**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 1996.

WANG, Y.; XIA, Y. Bottom-up and top-down approaches to the synthesis of monodispersed spherical colloids of low melting-point metals. **Nano Letters**, v. 4, n. 10, p. 2047-2050, 2004. doi:10.1016/0168-3659(90)90167-R.

WASANASUK, K. et al. Crystal structure analysis of poly (l -lactic acid) r form on the basis of the 2-dimensional wide-angle synchrotron x-ray and neutron diffraction measurements. **Macromolecules**, v. 44, p. 6441-6452, 2011.

WICHERT, B.; ROHDEWALD, P. A new method for the preparation of drug containing polylactic acid microparticles without using organic solvents. **Journal of Controlled Release**, v. 14, n. 3, p. 269-283, 1990.

ZANETTI-RAMOS, B. G. O desenvolvimento da nanotecnologia : cenário mundial e nacional de investimentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 2, p. 95-101, 2015.

ZARBIN, A. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n6/a16v30n6.pdf>>. Acesso em: 4 nov. 2014.