UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento tecnológico e secagem de sistemas
lipídicos incorporando óleo essencial de *Lippia sidoides***

Iara Baldim

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento tecnológico e secagem de sistemas lipídicos incorporando óleo essencial de *Lippia sidoides*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Iara Baldim

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Pereira
Oliveira

Versão corrigida da dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 26/04/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Balim, Iara

Desenvolvimento tecnológico e secagem de sistemas lipídicos incorporando óleo essencial de *Lippia sidoides*.
Ribeirão Preto, 2017.

157 f. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Oliveira, Wanderley Pereira.

1. Alecrim pimenta. 2. Óleo essencial. 3. Timol. 4. Spray drying. 5. Formulações lipídicas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Iara Baldim

Título do trabalho: Desenvolvimento tecnológico e secagem de sistemas lipídicos incorporando óleo essencial de *Lippia sidoides*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Pereira Oliveira

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Trabalho realizado no Departamento de
Ciências Farmacêuticas da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, Laboratório de
Pesquisa e Desenvolvimento em Processos
Farmacêuticos (LAPROFAR)*

Apoio Financeiro
CAPES e FAPESP

Dedico este trabalho à minha família, principalmente aos meus pais, Ana Lucia e José Roberto, pelos grandes exemplos de determinação, coragem e amor que são para mim e por todo apoio durante esta etapa da minha vida.

À minha amada avó, Verinha, pela paciência e carinho com minhas intermináveis horas de estudo.

Ao meu amor, Tomaz, por sua companhia, por seu apoio e pelos deliciosos momentos juntos.

À minha querida Wendy, por seu amor incondicional e por sua companhia mais que especial, tornando cada dia de trabalho mais leve e agradável com sua presença.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Wanderley, por toda paciência e disposição para me orientar nesta trajetória e por compartilhar seus conhecimentos e experiências comigo. Seu profissionalismo e competência são um exemplo a ser seguido.

À Claudia, por todo apoio, pelas valiosas contribuições para o trabalho e por sua amizade e companheirismo.

Ao Marcelo, por todo apoio e dedicação na elaboração do trabalho e também por seu carinho e sua amizade de todos os dias.

À professora Dra. Marcia Regina von Zeska Kress e à Ludmilla Tonani pela colaboração e orientações durante os experimentos com fungos.

À toda equipe do Laboratório LAPROFAR.

À grande amiga e ex-aluna do LAPROFAR Camila, por me auxiliar e me apoiar no início da minha trajetória científica e acadêmica, e também por todo carinho e amizade, mesmo estando longe.

Aos meus amigos de faculdade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela oportunidade e pela estrutura, que permitiram a realização deste trabalho.

A todos que participaram de forma direta ou indireta no desenvolvimentos deste trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPESP (processos: 2014/15905-1 e 2011/10333-1), pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos!

***“O período de maior ganho em
conhecimento e experiência é o
período mais difícil da vida de
alguém”.***
(Dalai Lama)

RESUMO

BALDIM, I. **Desenvolvimento tecnológico e secagem de sistemas lipídicos incorporando óleo essencial de *Lippia sidoides***. 2017. 157 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Óleos essenciais (OEs) constituem misturas complexas de várias moléculas voláteis hidrofóbicas produzidas pelo metabolismo secundário de plantas. Eles são empregados em diversos setores industriais, como por exemplo, o farmacêutico, alimentício, cosmético, agricultura e pecuária, em virtude de suas comprovadas ações bactericida, virucida, fungicida, antiparasitária, inseticida, analgésica, sedativa, anti-inflamatória, espasmolítica e anestésica local. Também têm sido utilizados na proteção de alimentos (como antioxidantes e conservantes), e incorporados em embalagens ativas. Os OEs podem apresentar problemas de instabilidade quando expostos ao calor, umidade, oxigênio e luminosidade. A reduzida solubilidade em água e sua elevada volatilidade são outras limitações para seu uso. A microencapsulação e nanoencapsulação dos OEs são estratégias viáveis e eficientes à proteção e modulação da liberação dos compostos bioativos, promovendo o aumento da estabilidade físico-química, proteção contra fatores ambientais, redução da volatilidade, aumento da solubilidade, biodisponibilidade, atividade biológica, redução da toxicidade, entre outros. A encapsulação em carreadores lipídicos micro e nanoestruturados tem recebido significativa atenção nos setores farmacêutico e alimentício, em face de várias vantagens, como baixa toxicidade, facilidade de escalonamento, baixo custo de produção e capacidade de encapsular compostos hidrofílicos e lipofílicos. Este trabalho teve como objetivo estudar a formação e secagem de sistemas lipídicos micro e/ou nanoestruturados contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*, empregando diferentes processos tecnológicos e avaliar a influência destes nas propriedades apresentadas pelo produto líquido e seco obtido (propriedades físico-químicas, estabilidade, atividade antimicrobiana e retenção do timol, composto ativo majoritário no OE). Os resultados mostraram que a composição das formulações, as condições e o processo de secagem tiveram efeitos significativos nas propriedades físico-químicas e na estabilidade do produto, além de influenciarem também a retenção de timol. Este trabalho permitiu obter informações relevantes sobre os processos de secagem das formulações lipídicas por *spray drying* e liofilização e também sobre as características apresentadas pelos pós obtidos.

Palavras-chave: encapsulação, carreadores lipídicos, *spray drying*, liofilização, óleo essencial, *Lippia sidoides*, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

BALDIM, I. **Technological development and drying of lipid systems containing essential oil of *Lippia sidoides***. 2017. 157 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Essential oils (EOs) are complex mixtures of various volatile molecules (hydrophobic) produced by the plants secondary metabolism. Essential oils have high importance in various industrial sectors, such as pharmaceutical, food, cosmetic, health, agriculture and livestock; mainly due to its proved biological activity as bactericidal, virucidal, fungicidal, antiparasitic, insecticidal, analgesic, sedative, anti-inflammatory, spasmolytic and local anesthetic activities. Essential oils have also been used in food protection (as antioxidants and preservatives), and embedded in active food packaging. It is also characteristic of EOs present problems of instability when exposed to heat, moisture, oxygen and light. The reduced water solubility and high volatility are another limitation for the use of EOs. The micro and nanoencapsulation technologies of EOs arises as a viable and effective solution, increasing the product physicochemical stability, furnishing protection against environmental factors, reducing volatility, modulate the release, increasing bioavailability, reducing toxicity, among others. Encapsulation in lipid carriers has received significant attention in the pharmaceutical and food sectors, mainly due to the several attributed advantages such as low toxicity, capability to encapsulate hydrophilic and lipophilic compounds, low production costs and easy scale up. The objective of this work was to study the formation and drying of micro and/or nanostructured lipid systems loaded with essential oil of *Lippia sidoides* using different technological processes and to evaluate their influence on the properties presented by the liquid and dry product obtained (physicochemical properties, stability, antimicrobial activity and retention of thymol, major active compound in EO). The results showed that the composition of the formulations, the conditions and the drying process had significant effects on the physicochemical properties and the stability of the product, besides also influencing the retention of thymol. This work allowed to obtain relevant information on the drying processes of the lipid formulations by spray and freeze drying and also on the characteristics presented by the obtained powders.

Keywords: encapsulation, lipid carriers, spray drying, freeze drying, essential oil, *Lippia sidoides*, antimicrobial activity

Lista de figuras

Figura 1.	Estruturas moleculares dos principais compostos isolados de <i>Lippia sidoides</i> . (A) timol, (B) carvacrol.....	7
Figura 1.1.	Cromatograma do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	36
Figura 1.2.	Curva analítica do timol obtida por CG-MS	37
Figura 1.3.	Imagens das formulações líquidas obtidas por microscopia ótica (aumento de 500 vezes)	39
Figura 1.4.	Distribuição granulométrica acumulada das formulações líquidas	40
Figura 1.5.	Determinação do pH e condutividade elétrica das formulações líquidas (gráficos “a” e “b”) e seus respectivos brancos (gráficos “c” e “d”) em função do tempo decorrido do preparo.....	43
Figura 1.6.	Tamanho de partícula e índice de polidispersão (PI) das formulações líquidas (gráficos “a” e “b”) e seus respectivos brancos (gráficos “c” e “d”) em função do tempo decorrido de preparo	45
Figura 1.7.	Aspecto visual das formulações lipídicas líquidas contendo óleo essencial de <i>L. sidoides</i> e carreadores de secagem (Fibregum® B, Lacprodan® e Aerosil® 200)	47
Figura 1.8.	Condutividade elétrica e pH das formulações lipídicas líquidas contendo óleo essencial de <i>L. sidoides</i> e carreadores de secagem (Fibregum® B, Lacprodan® e Aerosil® 200).....	48
Figura 1.9.	Comportamento reológico das formulações lipídicas contendo adjuvante de secagem - símbolos fechados e abertos representam a tensão de cisalhamento aumentando e diminuindo a taxa de deformação, respectivamente	50
Figura 1.10.	Porcentagem de retenção de timol das formulações lipídicas com e sem carreadores de secagem	51
Figura 2.1.	Comparação entre os resultados experimentais do potencial zeta (Z) determinados para as formulações líquidas e produto seco redisperso em água.....	67
Figura 2.2.	Comparação entre os resultados experimentais do tamanho das gotículas no sistema disperso (dp) determinados para as formulações líquidas e produto seco redisperso em água	69
Figura 2.3.	Comparação entre os resultados experimentais do índice de polidispersão (PI) determinados para as formulações líquidas e produto seco redisperso em água	71
Figura 2.4.	Retenção do timol, composto majoritário no OE de <i>Lippia sidoides</i> , nas formulações lipídicas secas por <i>spray drying</i>	75
Figura 2.5.	Morfologia típica dos produtos obtidos por <i>spray drying</i> : F11c’ (A); F11c (B).....	76
Figura 3.1.	Retenção de timol nos sistemas lipídicos secos por <i>spray drying</i> (SD) e liofilizados (LF)	89

Figura 3.2.	Morfologias da formulação F9c seca por <i>spray drying</i> (A) e liofilizada (B).....	90
Figura 4.1.	Esquema do planejamento experimental Box-Behnken realizado	99
Figura 4.2.	Superfícies de resposta da densidade de compactação, d_c (A) e índice de Carr, I_c (B) em função da temperatura de secagem, Tg_c e da porcentagem de Compritol®888 ATO, F_c e fator de Hausner, H_R , em função da temperatura de secagem, Tg_c e da relação MD/GA, Ad_c , com as demais variáveis fixadas no valor médio	108
Figura 4.3.	Superfície de resposta da retenção de timol (A) em função da temperatura de secagem, Tg_c e da porcentagem de Compritol®888 ATO, F_c , com razão MD/GA fixada no valor médio; e diagrama de Pareto (B).....	112
Figura 4.4.	Superfície de resposta da retenção de timol (A) em função da concentração de Compritol®888 ATO, F_c , e da razão MD/GA, Ad_c ; e diagrama de Pareto (B)	118
Figura 4.5.	Diagrama de Pareto da retenção de timol em função da razão da em função da concentração de Compritol®888 ATO, F_c , da razão MD-GA/Formulação, Ad_c , e processo de produção, P_c (amostras líquidas ou liofilizadas)	119

Lista de tabelas

Tabela 1.1.	Composição das formulações lipídicas (% m/m)	29
Tabela 1.2.	Composição das formulações lipídicas contendo carreadores de secagem (% m/m)	31
Tabela 1.3.	Composição do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	35
Tabela 1.4.	Concentração e áreas médias dos picos de timol obtidos por CG-MS	36
Tabela 1.5.	Parâmetros da distribuição granulométrica das formulações líquidas	39
Tabela 1.6.	Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta das amostras líquidas	41
Tabela 1.7.	Resultados obtidos para o teste de centrifugação	44
Tabela 1.8.	Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta das amostras líquidas contendo adjuvantes de secagem (Fibregum [®] B, Lacprodan [®] e Aerosil [®] 200).....	47
Tabela 1.9.	Parâmetros reológicos ajustados das formulações com adjuvantes de secagem	49
Tabela 1.10.	MIC (mg/mL) e MFC (µg/mL) dos sistemas lipídicos, OE puro e do timol (composto majoritário).....	53
Tabela 2.1.	Constituintes das formulações lipídicas (% m/m)	61
Tabela 2.2.	Composição do OE de <i>Lippia sidoides</i> determinada por CG-MS.....	65
Tabela 2.3.	Umidade do produto, atividade de água e propriedades de fluidez dos produtos secos	72
Tabela 3.1.	Composição das formulações de base lipídica (% m/m).....	83
Tabela 3.2.	Propriedade de fluidez, umidade do produto (Xp), e atividade de água (a _w) dos produtos secos; diâmetro médio (dp), índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (Z) das amostras redispersas.....	87
Tabela 4.1.	Fatores e seus níveis para o planejamento Box-Behnken.....	99
Tabela 4.2.	Planejamento experimental Box-Behnken	99
Tabela 4.3.	Composição das formulações base (sem adjuvantes de secagem) (% m/m)	100
Tabela 4.4.	Composição das soluções de adjuvantes de secagem a serem incorporadas em cada formulação (% m/m).....	101
Tabela 4.5.	Composição das formulações lipídicas contendo carreadores de secagem (% m/m)	101
Tabela 4.6.	Planejamento experimental 3 ²	102
Tabela 4.7.	Resultados experimentais obtidos de acordo com as variáveis estudadas nas secagens por <i>spray drying</i>	105

Tabela 4.8.	Análise de regressão ajustada para as propriedades do produto seco em <i>spray dryer</i> , incluindo a interação entre as variáveis (variáveis codificadas).....	106
Tabela 4.9.	Resultados experimentais obtidos de acordo com as variáveis avaliadas na secagem por liofilização	113
Tabela 4.10.	Resultados experimentais obtidos para os fatores estudados nas formulações líquidas.....	114
Tabela 4.11.	Análise de regressão realizada para as propriedades do produto liofilizado em comparação com a formulação líquida, incluindo a interação entre as variáveis (variáveis codificadas)	115

Lista de abreviaturas e siglas

α	Nível de significância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
a_w	Atividade de água
ρ_b	Densidade aparente
$\rho_{t,1250}$	Densidade compactada
dp	Tamanho de partícula
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CV	Coeficiente de variação
D	Taxa de deformação
DP	Desvio padrão
EHL	Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico
EOs	Essential oils
FH	Fator de Hausner
G:P	Proporção entre os adjuvantes de secagem goma arábica:concentrado proteico do soro de leite
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detector de Arranjo de Diodos
H_R	Razão de Hausner
I_c	Índice de Carr
IK	Índice de Kovats
K	Índice de consistência
LF	Liofilização
m_0	Massa inicial
MD/GA	Razão maltodextrina/goma arábica
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
MIC	Concentração Inibitória Mínima
n	Índice de fluxo
NLC	Nanostructured Lipid Carriers (carreadores lipídicos nanoestruturados)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
O/A	Emulsão óleo em água
OEs	Óleos essenciais

p	Pressão de vapor da água no produto
p_o	Pressão de vapor da água pura
P_{atm}	Pressão de atomização
PI	Índice de polidispersão
q.s.p	Quantidade suficiente para
SLN	Solid Lipid Nanoparticles (nanopartículas lipídicas sólidas)
SD	<i>Spray Drying</i>
T_g	Temperatura gás de entrada
UR	Umidade relativa
UV-vis	Ultravioleta visível
v_0	Volume inicial
W_{atm}	Vazão do ar de atomização
W_g	Vazão do ar de secagem
W_{susp}	Vazão de alimentação da formulação líquida
X_p	Umidade do produto
Z	Potencial zeta
γ	Tensão de cisalhamento

Sumário

I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
II.1 Óleos essenciais	5
II.2 Alecrim-pimenta (<i>Lippia sidoides</i>).....	6
II.2.1 Óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> e seus compostos químicos isolados	6
II.2.2 Atividade antimicrobiana.....	7
II.3 Encapsulação em sistemas lipídicos como formas de liberação de óleos essenciais	9
II.3.1 Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC)	10
II.4 Secagem de formulações lipídicas contendo compostos voláteis.....	11
III. OBJETIVOS.....	14
III.1 Objetivo geral	15
III.2 Objetivos específicos.....	15
IV. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	16
V. CAPÍTULOS	19
CAPÍTULO 1 - Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade biológica de formulações lipídicas contendo óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	20
RESUMO	23
ABSTRACT	24
1.1 INTRODUÇÃO.....	24
1.2 OBJETIVOS.....	27
1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1.3.1 Material.....	27
1.3.2 Caracterização do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> e quantificação de timol no óleo essencial por CG-MS.....	28
1.3.3 Preparo de formulações lipídicas contendo óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	28
1.3.4 Análise das formulações líquidas	30
1.3.4.1 Estudo de estabilidade das formulações líquidas	30
1.3.5 Estudo da influência dos carreadores de secagem nas formulações líquidas.....	31
1.3.5.1 Análise das formulações líquidas com carreadores de secagem	32

1.3.5.2 Comportamento reológico das formulações líquidas	32
1.3.6 Quantificação de timol nas formulações lipídicas	32
1.3.7 Atividade antifúngica contra <i>Candida albicans</i>	33
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
1.4.1 Caracterização do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> e quantificação de timol	34
1.4.1.1 Curva analítica para a quantificação do timol no óleo essencial por cromatografia gasosa.....	36
1.4.2 Análise das formulações líquidas sem carreadores de secagem.....	37
1.4.2.1 Tamanho de partícula e distribuição granulométrica obtida por microscopia ótica e análise de imagens	38
1.4.2.2 Tamanho de partícula, PI e potencial Zeta	40
1.4.2.3 Estudo de estabilidade das formulações	42
1.4.3 Estudo da influência dos carreadores de secagem nas formulações líquidas.....	46
1.4.3.1 Análise das formulações líquidas com carreadores de secagem	46
1.4.3.2 Comportamento reológico das formulações líquidas contendo carreadores de secagem	48
1.4.4 Quantificação de timol nas formulações lipídicas	50
1.4.5 Atividade antifúngica das formulações lipídicas	51
1.5 CONCLUSÕES	53
CAPÍTULO 2 - Influência da composição e da secagem por <i>spray drying</i> nas propriedades físico-químicas de formulações de base lipídica incorporadas de OE de <i>Lippia sidoides</i>	54
RESUMO	56
ABSTRACT	57
2.1 INTRODUÇÃO.....	58
2.2 OBJETIVOS.....	59
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.3.1 Material	59
2.3.2 Caracterização dos compostos principais do OE de <i>Lippia sidoides</i> por CG-MS	60
2.3.3 Preparação das formulações de base lipídica	60
2.3.4 Secagem das formulações lipídicas.....	61
2.3.5 Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações líquidas e do produto seco redisperso em água	62
2.3.6 Propriedades de fluidez do produto seco.....	62

2.3.7 Umidade e atividade de água do produto seco	62
2.3.8 Retenção de timol nas formulações líquidas e produto seco.....	63
2.3.9 Morfologia das partículas.....	63
2.3.10 Desempenho da operação de secagem	63
2.3.11 Análise estatística	64
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
2.4.1 Composição do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> determinada por CG-MS	64
2.4.2 Desempenho do processo de secagem.....	64
2.4.3 Potencial zeta, tamanho de partículas dispersas, e índice de polidispersão das formulações líquidas e do produto seco redisperso em água	66
2.4.4 Umidade do produto, atividade de água e propriedades de fluidez.....	71
2.4.5 Retenção do composto majoritário timol nas formulações secas.....	73
2.4.6 Morfologia do produto seco	75
2.5 CONCLUSÕES	76
CAPÍTULO 3 - Secagem de formulações de base lipídica incorporadas de óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> pelos processos <i>spray drying</i> e liofilização	78
RESUMO	80
ABSTRACT	80
3.1 INTRODUÇÃO.....	81
3.2 OBJETIVOS.....	82
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	82
3.3.1 Material	82
3.3.2 Preparação dos sistemas lipídicos	83
3.3.3 Secagem	84
3.3.4 Propriedades de fluidez do produto seco.....	84
3.3.5 Umidade e atividade de água do produto seco	85
3.3.6 Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta do produto seco redisperso em água	85
3.3.7 Retenção de timol nos produtos secos.....	85
3.3.8 Morfologia das partículas.....	86
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
3.4.1 Propriedade físico-químicas do produto	86
3.4.2 Retenção de timol nas formulações líquidas e secas	89
3.4.3. Morfologia do produto seco	90
3.5 CONCLUSÕES	90

CAPÍTULO 4 - Estudo da influência de variáveis de processamento sobre as propriedades físico-químicas de composições lipídicas contendo óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> utilizando técnicas de planejamento experimental	92
RESUMO	95
ABSTRACT	96
4.1 INTRODUÇÃO.....	96
4.2 OBJETIVOS.....	97
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	98
4.3.1 Material	98
4.3.2 Planejamento experimental	98
4.3.3 Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações líquidas e dos produtos secos redispersos em água	103
4.3.4 Propriedades de fluidez do produto seco por <i>spray drying</i>	103
4.3.5 Umidade e atividade de água do produto seco	103
4.3.6 Retenção de timol nos produtos secos e nas formulações líquidas	104
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
4.4.1 Secagem por <i>spray drying</i>	104
4.4.1.1 Recuperação de produto e propriedades de fluidez dos pós secos em <i>spray dryer</i>	107
4.4.1.2 Tamanho de partícula (dp), índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (Z) das formulações secas em <i>spray dryer</i> e ressuspensas	108
4.4.1.3 Umidade (Xp) e atividade de água (Aw) das formulações secas em <i>spray dryer</i>	110
4.4.1.4 Retenção de timol nas formulações secas por <i>spray drying</i>	110
4.4.2 Secagens por liofilização.....	112
4.4.2.1 Tamanho de partícula (dp), índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (Z).....	116
4.4.2.2 Umidade (Xp) e atividade de água (Aw) das formulações liofilizadas	116
4.4.2.3 Porcentagem de retenção de timol.....	117
4.5 CONCLUSÕES	119
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
VII. CONCLUSÕES.....	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

Atualmente existem fortes incentivos à utilização de ativos naturais em vários setores industriais (ex. farmacêutico e alimentício), em virtude de evidências científicas comprovando potenciais efeitos benéficos à saúde. Em geral, a atividade biológica de produtos de origem vegetal, pode ser associada à presença de compostos bioativos, denominados fitoquímicos. Muitos destes compostos exibem significativas propriedades biológicas como, por exemplo, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, e antitumoral, com grande potencial de exploração nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, químicas, cosmecêuticas, e na agroindústria (FALLER; FIALHO, 2009; FANG; BHANDARI, 2010; HUANG; YU; RU, 2010; MANACH et al., 2004).

Nesse sentido, os óleos essenciais têm despertado grande interesse, particularmente devido a seu amplo espectro de atividades biológicas comprovadas, destacando-se antifúngica, antibacteriana, inseticida, antiviral, antioxidante, entre outras (SHERRY et al., 2013; TIAN et al., 2011). Óleos essenciais são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis produzidos pelo metabolismo secundário de plantas (ex. aromáticas e especiarias). Em geral, o composto em maior concentração no óleo essencial está relacionado à sua propriedade biológica (BILIA et al., 2014). Os principais componentes de óleos essenciais pertencem às classes dos monoterpenos, sesqui-terpenos e diterpenos (SHERRY et al., 2013), compostos em geral sensíveis ao oxigênio, luz, calor e umidade. Estas substâncias podem sofrer alterações irreversíveis quando em contatos com outros materiais ou agentes externos sem proteção adequada (MARTÍN et al., 2010). Óleos essenciais podem ser incorporados em uma vasta gama de preparações farmacêuticas e alimentícias, na forma de ingrediente ativo, como antioxidante, conservante, ou como flavorizante.

Apesar do grande potencial de aplicação tecnológica dos óleos essenciais, eles apresentam diversas limitações, como por exemplo, complexidade química, elevada volatilidade, susceptibilidade à degradação e propensão à oxidação, insolubilidade em sistemas aquosos e em geral baixa biodisponibilidade, que dificultam seu emprego direto em produtos mais elaborados (COIMBRA et al., 2011; SAVIUC et al., 2011).

A micro e a nanoencapsulação de ativos naturais é uma tecnologia emergente, que vem sendo utilizada atualmente visando solucionar diversos problemas relacionados com a estabilidade e biodisponibilidade de ativos naturais, incluindo

óleos essenciais. Esta técnica consiste na inclusão do agente ativo em um sistema carreador, que pode ser constituído de carboidratos, gomas, proteínas, lipídios ou outros materiais poliméricos naturais ou sintéticos. Esta tecnologia permite, por exemplo, alterar a solubilidade, proteger e modular a liberação e funcionalidade de ativos, além de superar problemas de instabilidade e incompatibilidades em formulações. A seleção dos materiais de parede e do processo de produção está diretamente relacionada com as propriedades desejadas do produto como, por exemplo, proteção, biodegradabilidade, liberação modificada, sustentada, bem como a aplicação final do produto (FANG; BHANDARI, 2010; LOPEZ-RUBIO; GAVARA; LAGARON, 2006).

A encapsulação em sistemas lipídicos tem recebido significativa atenção atualmente, principalmente nos setores farmacêutico e alimentício, devido às inúmeras vantagens apresentadas, como baixa toxicidade, facilidade e baixo custo de produção e capacidade de encapsular compostos hidrofílicos e lipofílicos. A desidratação desses sistemas lipídicos pode gerar dispersões secas, com elevada eficiência de encapsulação, solubilidade e maior estabilidade frente às formas líquidas (BOUREZG et al., 2012; CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014; JOSHI; MÜLLER, 2009). O potencial de aplicação do produto e a atividade biológica dependem das propriedades físicas e químicas do produto gerado.

Nesse estudo foi utilizado o óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta), planta aromática que tem demonstrado elevado potencial de aplicação nos setores farmacêutico, de alimentos, cosmeceutico entre outros, destacando-se a atividade antioxidante e antimicrobiana. Seu óleo essencial é rico em timol e em seu isômero carvacrol fazendo desta espécie aromática uma importante fonte de bioativos com ação antibacteriana, antifúngica e ação larvicida contra o vetor da dengue (mosquito *Aedes aegypti*), comprovadas cientificamente e que são de interesse para a saúde pública. Esta espécie se encontra relacionada na lista de plantas medicinais com potencial para gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde - RENISUS (BRASIL, 2009).

II. REVISÃO DA LITERATURA

II. REVISÃO DA LITERATURA

Apresenta-se a seguir uma revisão sobre a espécie *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta), planta aromática objeto de estudo deste trabalho; desenvolvimento de formulações lipídicas (composição, técnicas de preparo, estabilidade e caracterização) e encapsulação de compostos voláteis por *spray drying*.

II.1 Óleos essenciais

Óleos essenciais (OE) são líquidos voláteis, límpidos, solúveis em lipídios e solventes orgânicos, geralmente com densidade inferior à da água (BILIA et al., 2014). São metabólitos secundários com propriedades aromáticas extraídos de plantas aromáticas, sendo sintetizados em diferentes órgãos da planta, tais como flores (jasmim, rosa, violeta e lavanda), botões florais (cravo), folhas (eucalipto, sálvia), frutas (anis), galhos, casca (canela), sementes (cardamomo), madeira (sândalo), e raízes (gingibre). Eles podem ser extraídos das plantas por diferentes métodos de extração, como por exemplo a hidrodestilação, extração por solvente orgânico, extração com fluido supercrítico, extração assistida por micro-ondas, dentre outros. Devido à sua natureza hidrofóbica e a densidade muitas vezes menor do que da água, podem ser separadas da fase aquosa por decantação. Em geral, o teor de óleos essenciais nas plantas aromáticas é bastante reduzido (em torno de 1%), e varia conforme a espécie e o órgão da planta. Por esse motivo são substâncias raras e muito valorizadas comercialmente (EL ASBAHANI et al., 2015).

Pesquisadores do mundo todo estão tentando caracterizar uma série de propriedades biológicas dos OEs, que incluem atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antivirais, antimutagênicas, anticancerígenas, antioxidantes, imunomoduladoras e antiprotozoárias (BAKKALI et al., 2008; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Normalmente os OEs possuem cerca de 20 a 60 componentes, mas esse número pode chegar até mais de 100 substâncias isoladas, presentes em diferentes concentrações. Geralmente o componente majoritário é o principal responsável pelas propriedades biológicas dos óleos essenciais. Os componentes incluem diferentes grupos, provenientes de distintas origens biossintéticas. O principal grupo são os

terpenóides, fenilpropanóides e derivados de hidrocarbonetos alifáticos de cadeia curta (BILIA et al., 2014).

II.2 Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*)

As plantas medicinais e aromáticas são utilizadas desde o início da história da humanidade devido às suas inúmeras propriedades, que permitem uma vasta gama de aplicações nas áreas farmacêutica, cosmética, alimentícia e sanitária. Essas plantas são ricas em óleos essenciais, possuindo comprovada atividade antimicrobiana e antioxidante (ALMEIDA et al., 2010; BOTELHO et al., 2007; CARVALHO et al., 2013; FONTENELLE et al., 2007; MONTEIRO et al., 2007; VERAS et al., 2012).

Atualmente, a crescente busca por produtos com ativos naturais trouxe novos ares aos estudos das plantas com propriedades terapêuticas. Sendo uma das mais ricas do planeta, a biodiversidade brasileira oferece muitas plantas com propriedades medicinais, dentre elas o alecrim-pimenta, planta aromática de estudo nesse trabalho, com destacada atividade biológica.

Lippia sidoides, popularmente conhecido como alecrim-pimenta, é uma árvore de pequeno porte (2 a 3 m) pertencente à família Verbenaceae, típica da vegetação do semiárido nordeste. Possui um conjunto de folhas muito aromáticas e picantes e pequenas flores esbranquiçadas nos eixos das folhas (MOURAD et al., 2015), que em conjunto constituem as partes medicinais desta planta.

II.2.1 Óleo essencial de *Lippia sidoides* e seus compostos químicos isolados

O óleo essencial de *Lippia sidoides* possui elevado valor comercial, tendo o timol e o carvacrol como principais compostos bioativos (ALMEIDA et al., 2010). Vários outros compostos também estão presentes, como o etil-metil-carvacrol, β -cariofileno e p-cimeno, mas a composição dos óleos essenciais pode variar muito, dependendo da região geográfica, da variedade, da idade da planta, do método de secagem e de extração do óleo (FONTENELLE et al., 2007). Os isômeros timol e carvacrol são fenóis monoterpenóides biossintetizados em plantas a partir de γ -terpineno e p-cimeno (ANDRADE et al., 2014).

Concentrações de óleo essencial em torno de 4% podem ser encontradas nas folhas de *Lippia sidoides* (CELIO et al., 2008), sendo que aproximadamente 60% deste

é timol (FONTENELLE et al., 2007). A Figura 1 apresenta as estruturas moleculares dos principais compostos isolados do óleo essencial de *Lippia sidoides*.

Figura 1. Estruturas moleculares dos principais compostos isolados de *Lippia sidoides*. (A) timol, (B) carvacrol

L. sidoides é uma importante planta medicinal devido à sua ampla gama de aplicações biológicas descritas ao longo do tempo na medicina popular e também em vários trabalhos científicos publicados na literatura. Dentre suas atividades biológicas destacam-se: atividade inseticida, fungicida, bactericida, antileishmania, larvicida, acaricida e anti-inflamatória (BOTELHO et al., 2007; CARVALHO et al., 2003, 2013, CAVALCANTI et al., 2004, 2010; FARIAS-JUNIOR et al., 2012; LIMA et al., 2013; SANTOS et al., 2015; VERAS et al., 2012). A seguir serão apresentadas suas principais atividades biológicas relacionadas aos seus principais ativos.

II.2.2 Atividade antimicrobiana

Com a crescente incidência de infecções resistentes a antibióticos, está se tornando cada vez mais necessária a busca por novos agentes antimicrobianos. A utilização de óleos essenciais como agentes antimicrobianos oferece um baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana, devido à presença de diferentes compostos ativos presentes no óleo. A atividade antimicrobiana pode estar relacionada com diferentes mecanismos de ação desses compostos, dificultando a adaptação dos microrganismos. Assim, os óleos essenciais assumem um papel importante no combate ao desenvolvimento de resistência microbiana (COSTA et al., 2008; DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003; VERAS et al., 2012).

Veras e colaboradores (2014) estudaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia sidoides* em diferentes cepas de bactérias gram-positivas (tais

como *S. aureus* e *E. faecalis*) e gram-negativas (como *E. coli* e *P. Aeruginosa*) pelo método de microdiluição em BHI (brain heart infusion), calculando a concentração inibitória mínima (MIC). Os resultados demonstraram que as bactérias gram-negativas são mais resistentes à ação de produtos naturais, como óleos essenciais. Essa maior resistência está relacionada à forma de membrana presente nesses microrganismos, que forma um complexo envelope, protegendo-os da ação dos agentes antimicrobianos (HOLLEY; PATEL, 2005; OLADIMEJI; ORAFIDIYA; OKEKE, 2004).

Gochev e Girova (2009) analisaram o óleo essencial de *Thymus vulgaris* (contendo 43,4% de timol), comparando a atividade antimicrobiana do óleo essencial obtido das folhas dessa planta com uma composição pura de timol, contra *P. rettigeri*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* pelo método de microdiluição em caldo e difusão em disco. Os autores demonstraram que a atividade antimicrobiana é dependente da quantidade de timol encontrada no óleo: o óleo essencial estudado, contendo reduzida quantidade de timol (43,4%), apresentou menor atividade antimicrobiana quando comparado à composição pura. Esses resultados corroboram para escolha do óleo essencial de *Lippia sidoides* para esse estudo, por possuir quantidades significativas de timol em sua composição.

Devido ao grande número de compostos químicos, os óleos essenciais não possuem um alvo específico na célula. Seu mecanismo de ação envolve basicamente a interação da membrana com o óleo: as estruturas lipofílicas facilitam a penetração do óleo essencial através da membrana, desestabilizando o transporte de íons e solutos. Esse processo leva a uma série de alterações na célula: resulta na perda de íons e redução no potencial de membrana, com consequente colapso da bomba de prótons e depleção de ATP, levando à morte celular por apoptose e necrose (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994; TURINA et al., 2006; VERAS et al., 2013b; YOON et al., 2000).

A atividade antimicrobiana depende da estrutura química dos compostos ativos majoritários do óleo essencial (DORMAN; DEANS, 2000; INOUE; TAKIZAWA; YAMAGUCHI, 2001). Os compostos que possuem um grupamento fenólico ou alcoólico (como o timol e carvacrol) fazem mais duplas ligações, permitindo maior efeito inibitório do crescimento microbiano quando comparados a aldeídos e cetonas (DORMAN; DEANS, 2000; GRIFFIN et al., 1999). Outros estudos demonstraram que os isômeros constitucionais timol e carvacrol apresentam igual atividade contra

bactérias gram-positivas e gram-negativas, ou seja, a posição do grupo hidroxila dessas estruturas não interfere na atividade do composto (BOTELHO et al., 2007; GOACHEV; GIROVA, 2009).

A atividade antimicrobiana do óleo de *Lippia sidoides* também foi avaliada em diferentes fungos. Muitos autores têm relatado que os óleos essenciais são um dos grupos mais promissores de compostos naturais capazes de permitir o desenvolvimento de novos protótipos antifúngicos (CAVALEIRO; PINTO; GONÇALVES, 2006; FONTENELLE et al., 2007; HAMMER; CARSON; RILEY, 2002; HAMMER; CARSON, 2004; KOSALEC; PEPELJNJAK; KUSTRAK, 2005; MAGWA et al., 2006; MONDELLO; BERNARDIS, 2006; PYUN; SHIN, 2006; ÜNLÜ et al., 2002).

Estudos *in vitro* de Fontenelle e colaboradores (2007) demonstraram que concentrações inibitórias mínimas do óleo essencial de *Lippia sidoides* variando entre 620 e 2500 mg/L são eficazes contra diferentes cepas de *Candida spp.* Os autores também reportaram a eficiência desse óleo essencial contra *Malassezia pachydermatis*, fungo mais comum como agente causador de otite e dermatite em cães. Esse estudo demonstrou que a menor dose utilizada do óleo essencial (25 mg/mL) foi tão eficiente para inibir o crescimento do fungo quanto o controle positivo, Itraconazol, usado no teste de difusão em agar. Tais resultados reforçam seu potencial como antifúngico, podendo ser uma fonte promissora para uma nova droga.

II.3 Encapsulação em sistemas lipídicos como formas de liberação de óleos essenciais

Apesar da vasta gama de aplicações, os óleos essenciais apresentam como características limitantes a sensibilidade a fatores externos, como luz, oxigênio e calor, o que favorece sua degradação, dificultando seu uso em maior escala na indústria. Nesse sentido, a incorporação de OEs em sistemas de encapsulação surge como uma estratégia promissora para preservar esses compostos, sendo de potencial interesse para as indústrias farmacêuticas, alimentícia e cosmética (RODRÍGUEZ et al., 2016).

A microencapsulação é o processo pelo qual os ingredientes ativos (materiais de núcleo), como óleos essenciais e aromas são incorporados dentro de um material secundário (parede) (ARSHADY, 1993; DESAI; JIN PARK, 2005). O material de parede da microcápsula protege a substância do núcleo contra efeitos ambientais

(oxigênio, luz, umidade, etc.), dessa forma melhora sua estabilidade, condições para manipulação e aceitação global (GARG; WOOD; SINGH, 2006). Além disso, também prolonga a validade dos produtos, melhora a funcionalidade e expande a gama de aplicações dos ativos (KAUSHIK et al., 2015).

O tamanho das partículas formadas por meio do processo de encapsulação pode ser classificado como: macro ($>500\ \mu\text{m}$), micro ($1,0 - 5000\ \mu\text{m}$) e nano ($<1,0\ \mu\text{m}$) (KING, 1995). Tanto o tamanho quanto a forma das micropartículas dependem dos materiais e dos métodos utilizados para prepará-las. Diferentes tipos de micropartículas são produzidos a partir de uma vasta gama de materiais de parede (monômeros e/ou polímeros) e também por diferentes processos de microencapsulação, tais como: *spray-drying*, extrusão, liofilização, coacervação, co-cristalização, polimerização interfacial, aprisionamento em lipossomas, inclusão molecular, etc. (DESAI; JIN PARK, 2005; F. GIBBS, SELIM KERMASHA, INTEAZ AL, 1999; GHARSALLAOUI et al., 2007; GOUIN, 2004; KING, 1995; SHAHIDI; HAN, 1993).

II.3.1 Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC)

Conforme discutido anteriormente, existem diversos materiais, sistemas e métodos de encapsulação de OEs, dentre eles os sistemas lipídicos. Carreadores lipídicos incluem emulsões na escala micro e nanométrica e nanopartículas lipídicas, divididas, grosso modo, em lipossomas, micelas, niossomas, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC). A associação de óleos essenciais a nanopartículas lipídicas visa aumentar sua estabilidade e solubilidade em meio aquoso a fim de se manter, ou até mesmo aumentar, sua atividade biológica (BILIA et al., 2014).

A primeira geração de nanopartículas lipídicas, denominada nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), consiste na utilização de uma matriz composta por lipídio sólido tanto a temperatura ambiente quanto corporal. A grande vantagem em se utilizar partículas lipídicas como sistemas carreadores é o fato de a matriz ser composta por componentes fisiológicos, ou seja, excipientes com status geralmente reconhecido como seguro (GRAS) para administração oral e tópica, o que reduz o risco de toxicidade aguda e crônica. A segunda geração de nanopartículas, denominada carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) se diferencia da primeira pela

nanoestruturação da matriz lipídica, o que permite incorporar maior quantidade do ativo e evita sua expulsão da matriz lipídica durante o armazenamento, possibilitando maior flexibilidade na modulação da liberação do ativo. Esse processo (NLC) consiste na combinação de lipídios sólidos e líquidos, resultando em uma matriz lipídica menos organizada, com mais imperfeições, permitindo incorporar maior concentração de ativo (CORTÉS-ROJAS, 2015; SOUTO, 2005).

Os componentes da formulação (lipídios sólidos e líquidos, tensoativos e fase aquosa) devem ser selecionados a fim de se atingir a máxima eficiência de encapsulação, prevenir ou amenizar a degradação do princípio ativo e maximizar sua absorção (CORTÉS-ROJAS, 2015).

II.4 Secagem de formulações lipídicas contendo compostos voláteis

As formulações lipídicas consistem em sistemas eficientes de encapsulação de ativos, principalmente quando se deseja encapsular óleos essenciais. No entanto, o produto líquido obtido ainda apresenta certo grau de instabilidade, tanto físico-química quanto microbiológica, podendo desenvolver desde problemas como agregação de partículas e sedimentação, quanto contaminação por microrganismos, o que reduzirá o tempo de prateleira desse produto. Nesse aspecto, a secagem dessas formulações é um processo fundamental para conferir maior estabilidade e maior tempo de armazenamento do produto, o qual pode ser facilmente redisperso no momento do uso.

Embora muitas técnicas têm sido desenvolvidas para microencapsulação de ativos, *spray drying* é a tecnologia mais comum utilizada na indústria farmacêutica e de alimentos, por se tratar de um processo flexível, versátil, econômico, pode ser utilizado em larga escala, além de produzir um pó de boa qualidade (ARSHADY, 1993; ZIEGLER et al., 2007). Essa técnica tem sido amplamente utilizada na encapsulação de gorduras, óleos, essências e ingredientes lipossolúveis (KAUSHIK et al., 2015).

A secagem por *spray drying* apresenta o desafio de remover água por vaporização, restando o composto volátil, que apresenta uma volatilidade muito maior que a da água (SOOTTITANTAWAT et al., 2003). Através da adição de carreadores de secagem é possível encapsular compostos voláteis com sucesso, pois com a remoção da fase aquosa o carreador encapsula a fase lipídica, restando seus ativos voláteis (CORTÉS-ROJAS, 2015). Os principais fatores que influenciam na retenção

do composto volátil na secagem em *spray drying* são: o tipo do material de parede, as propriedades do material do núcleo (sua concentração e volatilidade), as características da formulação a ser atomizada (teor de sólidos total, viscosidade e tamanho das gotículas) e as condições do processo de *spray drying* (tipo de atomização, temperatura e vazão do ar de secagem e umidade relativa do ar) (FERNANDES et al., 2014; JAFARI et al., 2008).

O processo de secagem por *spray drying* consiste na mistura do material de parede com o material no qual o ativo se encontra, formando uma emulsão ou dispersão. Então, essa mistura é atomizada na câmara de secagem e, na presença do ar quente circulando pela câmara, o solvente é evaporado (RODRÍGUEZ et al., 2016). Esse processo forma uma crosta na superfície da partícula, que atua como uma membrana semipermeável, retendo os compostos voláteis e permitindo a evaporação da água (CORTÉS-ROJAS, 2015; REINECCIUS, 2004).

A liofilização também é um processos bastante utilizado para secar substâncias termossensíveis e permite a obtenção de produtos secos de alta qualidade (CALVO et al., 2011). Essa técnica de secagem consiste na remoção da água de um material congelado por sublimação ou dessorção, sob vácuo, convertendo-a da fase sólida para o estado de vapor, sem passar pela fase líquida (VARSHOSAZ; ESKANDARI; TABBAKHIAN, 2012). Produtos liofilizados são mais estáveis à oxidação quando comparados a produtos secos por *spray drying*. Isso ocorre porque a baixa temperatura requerida para o processo de secagem e a ausência de água na forma líquida retardam a deterioração da formulação. Em contrapartida, a liofilização demanda um consumo de energia cerca de 6 a 10 vezes maior que a secagem em *spray drying*, além de um tempo de processo também mais elevado (RODRÍGUEZ et al., 2016). Em termos econômicos, a liofilização é reconhecida como o processo mais caro de secagem de produtos, sendo cerca de 30 a 50 vezes mais caro que o *spray drying* (CALVO et al., 2011).

Independente do processo de secagem escolhido, a seleção do carreador de secagem a ser utilizado é uma etapa importante no processo, já que suas propriedades estão intimamente relacionadas à retenção do composto ativo. Um carreador de secagem ideal deve apresentar propriedades de emulsificação e formação de película, ser biodegradável, apresentar baixa viscosidade em elevado teor de sólidos e ser de baixo custo. No entanto, é improvável que um único agente encapsulante apresentará

todas essas propriedades. Dessa forma, utiliza-se frequentemente a mistura de dois ou mais compostos (SILVA et al., 2013). O uso de diferentes tipos de carreadores pode resultar em um pó com distintas propriedades físico-químicas, dependendo da estrutura e das características de cada carreador (MAHDAVI et al., 2016). Os tipos mais utilizados desses materiais de parede para encapsulação são os carboidratos (amidos modificados e hidrolisados), gomas e proteínas (CORTÉS-ROJAS, 2015).

Dentre os carboidratos, utiliza-se com bastante frequência a maltodextrina, obtida a partir da hidrólise ácida do amido de milho e apresentam elevada solubilidade em água e baixa viscosidade, mesmo em concentrações de sólidos elevadas (SILVA et al., 2013). Dependendo do grau de hidrólise, as maltodextrinas apresentam um valor em equivalente de dextrose (DE). Quanto maior o grau DE, mais ela se aproxima das propriedades da dextrose (maior higroscopicidade, solubilidade, doçura e menor viscosidade), enquanto que a diminuição a torna mais próxima das propriedades do amido (CORTÉS-ROJAS, 2015).

A goma arábica também é um carreador eficiente na encapsulação. Além da cadeia polissacarídica, a goma arábica possui uma fração proteica, que lhe atribui propriedades emulsificantes. Ela também é compatível com muitas gomas, amidos, carboidratos e proteínas (ALVES et al., 2014; SILVA et al., 2013).

As proteínas, tais como gelatina, caseína, proteínas de soja, do trigo e do soro de leite, também são frequentemente utilizadas como carreadores de secagem, principalmente na secagem por *spray drying*, já que permitem reduzir os problemas de adesão do pó ao ciclone, uma vez que modificam as propriedades de superfície das partículas atomizadas através da rápida capacidade de formação de filme (ADHIKARI et al., 2009; BHUSARI; MUZAFFAR; KUMAR, 2014).

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento e secagem de sistemas lipídicos micro e/ou nanoestruturados contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*, empregando diferentes processos tecnológicos e avaliando a influência destes nas propriedades apresentadas pelo produto obtido.

III.2 Objetivos específicos

- Elaborar estudos de pré-formulação, com a finalidade de selecionar o sistema lipídico a ser utilizado;
- Padronizar métodos para análise e detecção do ativo na matéria prima utilizada e nos produtos obtidos;
- Estudar a influência da composição das formulações (sistemas lipídicos e tensoativos) nas propriedades físico-químicas, estabilidade e atividade antifúngica dos produtos líquidos obtidos;
- Avaliar os processos de secagem por *spray drying* e liofilização;
- Determinar as propriedades físico-químicas dos produtos secos obtidos;
- Investigar a influência da composição das formulações (proporções de lipídios e adjuvantes de secagem) e das variáveis de processamento nas propriedades físico-químicas e na retenção de ativo nos produtos obtidos.

IV. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

IV. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A encapsulação de óleos essenciais é a melhor estratégia quando se deseja preservar e garantir a eficácia e estabilidade de seus compostos ativos. Dentre as várias formas de encapsulação disponíveis, os sistemas lipídicos são promissores, uma vez que, além de compatíveis com os óleos essenciais, também se valem do aspecto tecnológico, que permite modular a liberação dos ativos no organismo.

Dessa forma, realizou-se um estudo preliminar para a produção de diferentes formulações lipídicas contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* como princípio ativo e, posteriormente, um estudo de caracterização e estabilidade, pois a formulação líquida já consiste em um produto tecnológico com as mais diversas propriedades apresentadas por esse óleo essencial.

Sabendo-se que as formulações secas possuem maior estabilidade e tempo de prateleira e também com o objetivo de se estudar os processos de obtenção de micro e nanocápsulas, foi realizado um estudo de secagem dessas formulações, por duas técnicas diferentes: *spray drying* e liofilização, gerando um segundo produto tecnológico, dessa vez, sob a forma de pó. Esse produto pode ser facilmente redisperso em água, retornando à sua forma original, quando necessário.

Ao longo do desenvolvimento do trabalho, observou-se a necessidade de dividi-lo em 4 capítulos, desenvolvidos conjuntamente, para uma melhor organização e compreensão. Dessa forma, essa dissertação de mestrado foi estruturada da seguinte forma:

Capítulo 1 - Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade biológica de formulações lipídicas contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*: neste capítulo são apresentados os estudos de desenvolvimento, caracterização, estabilidade e atividade antifúngica contra *Candida albicans* de dispersões lipídicas contendo o óleo essencial de *Lippia sidoides*.

Capítulo 2 - Influência da composição e da secagem por *spray drying* nas propriedades físico-químicas de formulações de base lipídica incorporadas de OE de *Lippia sidoides*: este capítulo descreve como a composição das formulações lipídicas contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* e a secagem por *spray drying* influenciaram nas propriedades físico-químicas dos pós obtidos e na retenção de timol das formulações obtidas.

Capítulo 3 - Secagem de formulações de base lipídica incorporadas de óleo essencial de *Lippia sidoides* pelos processos *spray drying* e liofilização: este capítulo compara a secagem das formulações lipídicas contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* por duas técnicas diferentes: *spray drying* e liofilização, além de descrever as propriedades físico-químicas e as eficiências de retenção de timol dos pós obtidos por essas duas diferentes técnicas de secagem diferentes.

Capítulo 4 - Estudo da influência de variáveis de processamento sobre as propriedades físico-químicas de composições lipídicas contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* utilizando técnicas de planejamento experimental: este último capítulo traz o emprego de técnicas de planejamento estatístico de experimentos para avaliar a influência da composição das formulações e dos processos de secagem sobre as propriedades físico-químicas dos produtos formados.

V. CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade biológica de formulações lipídicas contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*

Lista de figuras

Figura 1.1. Cromatograma do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	36
Figura 1.2. Curva analítica do timol obtida por CG-MS	37
Figura 1.3. Imagens das formulações líquidas obtidas por microscopia ótica (aumento de 500 vezes)	39
Figura 1.4. Distribuição granulométrica acumulada das formulações líquidas.....	40
Figura 1.5. Determinação do pH e condutividade elétrica das formulações líquidas (gráficos “a” e “b”) e seus respectivos brancos (gráficos “c” e “d”) em função do tempo decorrido do preparo	43
Figura 1.6. Tamanho de partícula e índice de polidispersão (PI) das formulações líquidas (gráficos “a” e “b”) e seus respectivos brancos (gráficos “c” e “d”) em função do tempo decorrido de preparo	45
Figura 1.7. Aspecto visual das formulações lipídicas líquidas contendo óleo essencial de <i>L. sidoides</i> e carreadores de secagem (Fibregum [®] B, Lacprodan [®] e Aerosil [®] 200)	47
Figura 1.8. Condutividade elétrica e pH das formulações lipídicas líquidas contendo óleo essencial de <i>L. sidoides</i> e carreadores de secagem (Fibregum [®] B, Lacprodan [®] e Aerosil [®] 200).....	48
Figura 1.9. Comportamento reológico das formulações lipídicas contendo adjuvante de secagem - símbolos fechados e abertos representam a tensão de cisalhamento aumentando e diminuindo a taxa de deformação, respectivamente	50
Figura 1.10. Porcentagem de retenção de timol das formulações lipídicas com e sem carreadores de secagem	51

Lista de tabelas

Tabela 1.1. Composição das formulações lipídicas (% m/m).....	29
Tabela 1.2. Composição das formulações lipídicas contendo carreadores de secagem (% m/m)	31
Tabela 1.3. Composição do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	35
Tabela 1.4. Concentração e áreas médias dos picos de timol obtidos por CG-MS.....	36
Tabela 1.5. Parâmetros da distribuição granulométrica das formulações líquidas.....	39
Tabela 1.6. Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta das amostras líquidas	41
Tabela 1.7. Resultados obtidos para o teste de centrifugação.....	44
Tabela 1.8. Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta das amostras líquidas contendo adjuvantes de secagem (Fibregum [®] B , Lacprodan [®] e Aerosil [®] 200).....	47
Tabela 1.9. Parâmetros reológicos ajustados das formulações com adjuvantes de secagem.....	49
Tabela 1.10. MIC (mg/mL) e MFC (µg/mL) dos sistemas lipídicos, OE puro e do timol (composto majoritário)	53

Lista de equações

Equação 1.1.....	28
Equação 1.2.....	32
Equação 1.3.....	38

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ATCC	American Type Culture Collection
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CV	Coefficiente de variação
D	Taxa de deformação
DP	Desvio padrão
EHL	Equilíbrio hidrofílico lipofílico

EOs	Essential oils
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detector de Arranjo de Diodos
IK	Índice de Kovats
K	Índice de consistência
MIC	Concentração Inibitória Mínima
n	Índice de fluxo
O/A	Emulsão óleo em água
OE	Óleos essenciais
PI	Índice de polidispersão
q.s.p	Quantidade suficiente para
γ	Tensão de cisalhamento

RESUMO

Óleos essenciais (OEs) possuem significativa importância em diversos setores industriais, devido à sua ampla variedade de aplicação, como bactericida, virucida, fungicida, antiparasitário, inseticida, analgésico, anti-inflamatório, etc. No entanto, esses compostos bioativos são voláteis e geralmente sensíveis ao oxigênio, luz, calor e umidade. Tecnologias de micro e nanoencapsulação surgem como uma alternativa viável e efetiva, uma vez que podem proporcionar proteção contra problemas de instabilidade, alterar a solubilidade e também a liberação de substâncias bioativas do produto. No presente trabalho, óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) foi adicionado a formulações lipídicas pelo processo de emulsificação por inversão de fases. Gelucire® 50/13, ácido esteárico ou Compritol® 888 ATO (lipídios sólidos) e ácido oleico ou Labrasol® (lipídios líquidos) compuseram a fase oleosa e Poloxamer® 188 ou uma combinação de Tween® 80 e Span® 80 foram os tensoativos utilizados. Doze formulações foram preparadas e analisadas visualmente quanto à estabilidade. As formulações compostas por Gelucire® 50/13 se mostraram mais promissoras, sendo submetidas a testes de estabilidade. Distribuição granulométrica (partículas polidispersas), tamanho de partícula (214,4 a 423,2 nm), índice de polidispersão (em torno de 0,3) e potencial zeta (-40,6 a -23,0) foram os parâmetros utilizados para caracterização dessas formulações. Visando à subsequente secagem por *spray dryer*, foram acrescentados adjuvantes de secagem às formulações líquidas (goma arábica - Fibregum® B, concentrado proteico do soro do leite - Lacprodan® e dióxido de silício coloidal - Aerosil® 200) que,

posteriormente, foram avaliadas quanto ao comportamento reológico (pseudoplástico com presença de tixotropia). As formulações lipídicas, bem como o óleo essencial de *Lippia sidoides* e seu composto majoritário, timol, foram avaliados quanto à atividade fungicida contra *Candida albicans* e as formulações apresentaram potente atividade contra a levedura, assim como o óleo essencial.

ABSTRACT

Essential oils (EOs) have high importance in various industrial sectors, due to its wide range of application, such as bactericidal, virucidal, fungicidal, antiparasitic, insecticidal, analgesic, anti-inflammatory, and so on. However, these bioactive compounds are volatiles and generally sensitives to oxygen, light, heat and humidity. In this way, micro and nanoencapsulation technologies arises as a viable and effective solution, since it furnishes protection against instability problems, changes product solubility and release of the bioactive substances. In this work, essential oil of *Lippia sidoides* Cham. (pepper-rosemary) was loaded in lipid-based systems through emulsification by phase inversion. Gelucire® 50/13, stearic acid or Compritol® 888 ATO (solid lipids) and oleic acid or Labrasol® (liquid lipids) comprised the lipid phase, while Poloxamer® 188 or a combination of Tween® 80 and Span® 80 were the surfactants used. Twelve formulations were prepared and visually analyzed for stability. Formulations composed of Gelucire® 50/13 were visually more stable, subjected to stability tests. Granulometric distribution (polydispersity), particle size (214.4 to 423.2 nm), polydispersity index (around 0.3) and zeta potential (-40.6 to -23.0) were used for products characterization. Aiming the drying process by spray drying, drying carriers were added to the liquid formulations (Arabic gum - Fibregum® B, proteic concentrate of whey protein - Lacprodan® and colloidal silicon dioxide - Aerosil® 200), which were subsequently evaluated for rheological behavior (pseudoplastic with presence of thixotropy). The lipid compositions, as well as the essential oil of *Lippia sidoides* and its major compound, thymol, were evaluated for fungicidal activity against *Candida albicans* and the formulations presented potent activity against this yeast, as well as the essential oil.

1.1 INTRODUÇÃO

Atualmente existem fortes incentivos à utilização de ativos naturais em vários setores industriais (ex. farmacêutico e alimentício), em virtude de evidências científicas

comprovando potenciais efeitos benéficos à saúde. Historicamente, a maioria dos fármacos tem surgido de metabólitos secundários de produtos naturais ou seus derivados (CORTÉS-ROJAS, 2015; LI; VEDERAS, 2009). Em geral, a atividade biológica de produtos de origem vegetal, pode ser associada à presença de compostos bioativos, denominados fitoquímicos. Muitos destes compostos exibem significativas propriedades biológicas como, por exemplo, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, e antitumoral, com grande potencial de exploração nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, químicas, cosmecêuticas, e na agroindústria (FALLER; FIALHO, 2009; FANG; BHANDARI, 2010; HUANG; YU; RU, 2010; MANACH et al., 2004).

Nesse sentido, os óleos essenciais (OEs) têm despertado grande interesse, particularmente devido a seu amplo espectro de atividades biológicas comprovadas, destacando-se antifúngica, antibacteriana, inseticida, antiviral, antioxidante, entre outras (SHERRY et al., 2013; TIAN et al., 2011). Óleos essenciais são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis produzidos pelo metabolismo secundário de plantas (ex. plantas aromáticas e especiarias). Em geral, o composto em maior concentração no óleo essencial está relacionado à sua propriedade biológica (BILIA et al., 2014). OEs podem ser incorporados a uma vasta gama de preparações farmacêuticas e alimentícias, na forma de ingrediente ativo, como antioxidante, conservante, ou como flavorizante. Vários estudos têm demonstrado a eficácia dos OEs em baixas concentrações contra agentes bacterianos encontrados na indústria de alimentos (EL ASBAHANI et al., 2015; OUSSALAH et al., 2006, 2007). Os principais componentes de óleos essenciais pertencem às classes dos monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos (SHERRY et al., 2013), compostos em geral sensíveis ao oxigênio, luz, calor e umidade. Estas substâncias podem sofrer alterações irreversíveis quando em contato, sem proteção adequada, com outros materiais ou agentes externos (MARTÍN et al., 2010).

Apesar do grande potencial de aplicação tecnológica dos óleos essenciais, estes apresentam diversas limitações, como por exemplo, complexidade química, elevada volatilidade, susceptibilidade à degradação e propensão à oxidação, insolubilidade em sistemas aquosos e em geral baixa biodisponibilidade, que dificultam seu emprego direto em produtos mais elaborados (COIMBRA et al., 2011; SAVIUC et al., 2011).

A microencapsulação e a nanoencapsulação de ativos naturais é uma tecnologia que vem sendo amplamente utilizada visando solucionar diversos problemas relacionados com a estabilidade e biodisponibilidade de ativos naturais, incluindo óleos essenciais.

Esta técnica consiste na inclusão do agente ativo em um sistema carreador, que pode ser constituído de carboidratos, gomas, proteínas, lipídios ou outros materiais poliméricos naturais ou sintéticos. Esta tecnologia permite, por exemplo, transformar substâncias líquidas e voláteis em sólidos, alterar a solubilidade, proteger e modular a liberação e funcionalidade de ativos, além de superar problemas de instabilidade e incompatibilidades em formulações. A seleção dos materiais de parede e do processo de produção está diretamente relacionada com as propriedades desejadas do produto como, por exemplo, proteção, biodegradabilidade, liberação modificada, sustentada, bem como a aplicação final do produto (FANG; BHANDARI, 2010; LOPEZ-RUBIO; GAVARA; LAGARON, 2006).

A encapsulação em sistemas lipídicos tem recebido significativa atenção atualmente, principalmente nos setores farmacêutico e alimentício, devido às inúmeras vantagens apresentadas, como baixa toxicidade, facilidade de utilização, baixo custo de produção e capacidade de encapsular compostos hidrofílicos e lipofílicos. Esta técnica consiste na inclusão do agente ativo em um invólucro protetor utilizando diferentes tipos de materiais de parede. Os métodos de encapsulação podem ser divididos em processos físicos como *spray drying*, químicos como a polimerização interfacial ou físico-químicos como a coacervação (CORTÉS-ROJAS, 2015; FANG; BHANDARI, 2010). A desidratação desses sistemas lipídicos pode gerar dispersões secas, com elevadas eficiência de encapsulação e solubilidade e maior estabilidade frente às formas líquidas (BOUREZG et al., 2012; CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014; JOSHI; MÜLLER, 2009). O potencial de aplicação do produto e a atividade biológica dependem das propriedades físicas e químicas do produto gerado. Fatores como o tipo de lipídio, tensoativos, o processo de emulsificação, condições de secagem/resfriamento influenciam as características das partículas obtidas. Portanto, deve ser realizado um estudo detalhado de cada etapa do processo visando conhecer os mecanismos de formação das partículas e alcançar as características desejadas do produto (CORTÉS-ROJAS, 2015).

Neste trabalho foi empregado o óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham., popularmente conhecida como alecrim pimenta, planta aromática nativa da região do semiárido no nordeste brasileiro e amplamente empregada na medicina popular como antisséptico de uso local na pele e mucosas. É uma importante planta medicinal devido à sua ampla gama de aplicações biológicas descritas ao longo do tempo na medicina

popular e também em vários estudos científicos. Dentre suas atividades biológicas destacam-se: atividade inseticida, fungicida, bactericida, antileishmania, larvicida, acaricida e anti-inflamatória (BOTELHO et al., 2007; FERNANDES, 2008; CARVALHO et al., 2003, 2013, CAVALCANTI et al., 2004, 2010; FARIAS-JUNIOR et al., 2012; LIMA et al., 2013; SANTOS et al., 2015; VERAS et al., 2012). Seu óleo essencial é rico em timol e seu isômero carvacrol, compostos majoritários que estão relacionados à atividade biológica dessa planta. Devido às suas propriedades, a *Lippia sidoides* possui elevado potencial de aplicação nos mais diversos setores, como o farmacêutico, de alimentos, cosmeceutico entre outros. Além disso, é uma planta de interesse para a saúde pública. Esta espécie está relacionada na lista de plantas medicinais com potencial para gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde – RENISUS (BRASIL, 2009).

1.2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi desenvolver sistemas lipídicos micro e/ou nanoestruturados contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* e estudar a influência da composição desses sistemas nas propriedades físico-químicas, estabilidade, retenção de composto ativo e na atividade antifúngica contra *Candida albicans*.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Material

Óleo essencial de *Lippia sidoides* foi adquirido do grupo Pronat – Produtos Naturais LTDA (Horizonte – Ceará). Como reagentes, solventes e padrões analíticos foram utilizados: água purificada por osmose reversa; água ultrapura Mili-Q; álcool etílico absoluto (Labsynth, Brasil), acetonitrila e metanol, ambos adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co (São Luis, EUA); timol puro (Sigma-Aldrich, Brasil), com 99,5% de pureza. Como lipídios, tensoativos e carreadores de secagem foram utilizados: ácido esteárico (Via Farma, Brasil), Compritol® 888 ATO (behenato de glicerila, Brasquim, Brasil), ácido oleico (LabSynth, Brasil); Gelucire® 50/13 (estearoil macrogol-32 glicerídeo EP, EHL 11, Gattefossé, França), Labrasol® (caprilcaproil macrogol-8 glicerídeo EP, EHL 12, Gattefossé, França), Tween® 80 (Polisorbato 80, EHL 15, LabSynth, Brasil), Span® 80 (Sorbitan monoleato, EHL 4,3; Sigma-Aldrich, EUA), Poloxamer® 188 (Kolliphor P 188 Micro, EHL 29, BASF, Brazil); goma arábica

(Fibregum[®] B, Colloides Naturels, Brasil), Lacprodan[®] (concentrado proteico de soro de leite, Arla Foods Ingredients S.A., Argentina), Aerosil[®] 200 (dióxido de silício coloidal, Evonik Degussa, Hanau, Alemanha).

1.3.2 Caracterização do óleo essencial de *Lippia sidoides* e quantificação de timol no óleo essencial por CG-MS

Os constituintes principais do óleo essencial foram caracterizados em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (Shimadzu modelo GCMS QP-2010, Japão), utilizando coluna capilar EN5-MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), empregando hidrogênio como gás de arraste (fluxo de 1,0 mL/min), sendo a temperatura programada de 60°C a 240°C, a 3°C/min. A temperatura de injeção foi de 240°C, com fluxo de 1,30 mL/min de H₂; temperatura do detector de 260°C e razão split 1:50 (FERNANDES, 2008).

Os componentes do óleo essencial foram identificados por comparação entre os espectros de massa dos componentes apresentados pela biblioteca eletrônica (WILEY7.LIB), os índices de Kovats (IK) calculados em relação à série de alcanos (C9-C20) e publicados em literatura (ADAM, 2001).

1.3.3 Preparo de formulações lipídicas contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*

A quantidade de óleo essencial a ser utilizada nas formulações foi fixada em 50% sobre a quantidade de lipídio sólido. Algumas formulações utilizaram como tensoativo uma mistura de Tween[®] 80 (tensoativo hidrofílico, valor de EHL 15) e Span[®] 80 (tensoativo lipofílico, valor de EHL 4,3) na proporção de 1:1. De acordo com a Equação 1, o valor de EHL resultante foi de 9,6.

$$EHL_{\text{mistura}} = \frac{X EHL_A + (100 - X) EHL_B}{100} \quad (\text{Equação 1.1})$$

Onde:

X = porcentagem de tensoativo hidrofílico (50%);

EHL_A = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de A;

EHL_B = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de B;

As formulações obtidas estão apresentadas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Composição das formulações lipídicas (% m/m)

Função	Componentes	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Ativo	OE <i>Lippia sidoides</i>	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
	Ácido esteárico	6,0	6,0	6,0	6,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipídio sólido	Compritol® 888 ATO	-	-	-	-	6,0	6,0	6,0	6,0	-	-	-	-
	Gelucire® 50/13	-	-	-	-	-	-	-	-	6,0	6,0	6,0	6,0
Lipídio líquido	Ácido oleico	1,0	1,0	-	-	1,0	1,0	-	-	1,0	1,0	-	-
	Labrasol®	-	-	1,0	1,0	-	-	1,0	1,0	-	-	1,0	1,0
	Tween® 80	0,35	-	0,35	-	0,35	-	0,35	-	0,35	-	0,35	-
Tensoativo	Span® 80	0,35	-	0,35	-	0,35	-	0,35	-	0,35	-	0,35	-
	Poloxamer® 188	-	0,7	-	0,7	-	0,7	-	0,7	-	0,7	-	0,7

*água: q.s.p. 100 g

Os componentes das formulações, suas proporções e modo de preparo foram baseados tanto em estudos preliminares do nosso grupo de pesquisa quanto em Rosa (2011), com algumas alterações. O preparo das formulações consistiu em pesar os componentes de cada fase (aquosa, oleosa e, separadamente, o óleo essencial) em balança analítica (Mettler Toledo modelo AG204, Suíça) e submetê-los ao aquecimento na chapa de aquecimento (IKA-Werke modelo RT 15, Alemanha). Ao atingir temperatura de 10°C acima do ponto de fusão do lipídio sólido, verte-se o óleo essencial (vagarosamente) sobre a fase oleosa sob agitação magnética (IKA-Werke modelo RT 15, Alemanha) e, em seguida, a fase aquosa sobre a oleosa, vagarosamente e sob agitação. As formulações foram homogeneizadas em ultra-turrax (IKA modelo T18 basic, Wilmington, EUA) durante 2 minutos a 18.000 rpm e, em seguida, foram submetidas ao processador ultrassônico (SONICS Vibracell modelo CV334, Newtown, EUA) com a sonda Tapered (Cod. 630-0220-04) na amplitude de 70 % durante 2 minutos (ciclos de 30 segundos on/off). As formulações resultantes foram mantidas sob agitação e sem aquecimento para que se estabilizassem até atingir temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$).

1.3.4 Análise das formulações líquidas

Após o preparo, as formulações foram analisadas visualmente quanto ao aspecto macroscópico e estabilidade (separação de fases, precipitação) e aquelas selecionadas foram submetidas às seguintes análises:

- Distribuição granulométrica: 50 µL da formulação líquida foi transferida para lâmina de vidro, coberta com a lamínula e observadas em microscópio óptico (Olympus® modelo BX60MIV, Japão) conectado a uma câmera digital (SPOT Insight modelo 3.2.0, Diagnostic Instruments). Imagens foram obtidas com aumento de 500 vezes e submetidas à análise em um sistema de análise de imagens Image Pro-Plus®7.0. Para a contagem das partículas (glóbulos) foi selecionado o diâmetro médio de partícula. Esses valores foram usados para se determinar a frequência cumulativa como função do diâmetro médio das partículas.

- Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta: esses parâmetros foram medidos por espalhamento de luz dinâmico (*Dinamic Light Scattering*), utilizando o equipamento Zetasizer (modelo Nano ZS90, Malvern, Reino Unido), equipado com ângulo de espalhamento 90°. As medições foram feitas em triplicata a 25 °C, após a diluição de 1:200 (v/v) das amostras em água ultrapura Mili-Q. Os valores de potencial zeta foram calculados a partir da média de valores de mobilidade eletroforética utilizando a equação de Smoluchowski (CHANDRASEKHAR, 1943).

1.3.4.1 Estudo de estabilidade das formulações líquidas

As formulações foram preparadas e armazenadas à temperatura ambiente de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ em frascos herméticos transparentes. Foram analisadas no tempo zero ($T_0 = 24$ horas), 7 dias (T_7), 15 dias (T_{15}) e 30 dias (T_{30}). A estabilidade das formulações foi avaliada pela determinação da condutividade elétrica, do valor do pH, teste de centrifugação, tamanho de partícula e índice de polidispersão, de acordo com os seguintes procedimentos:

- A condutividade elétrica foi determinada em condutivímetro (modelo 856, Metrohm, Suíça), e as medidas foram realizadas em triplicata, em temperatura ambiente de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

- O pH foi determinado com o auxílio do peagômetro (modelo 827 pH Lab, usando eletrodo unitrode com PT100 Metrohm, Suíça). As leituras foram realizadas em triplicata em temperatura ambiente controlada de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

- O teste de centrifugação foi realizado segundo Moraes (2006) com algumas modificações e consistiu em centrifugar amostras de aproximadamente 1 mL de cada formulação em centrífuga Eppendorf (modelo 5430 R – Eppendorf, Alemanha) na temperatura controlada de 25 °C durante 15 minutos a 1000 rpm (106,2 RCF), 2500 rpm (663,8 RCF) e 3500 rpm (1301,0 RCF), sendo a estabilidade avaliada no início e final de cada etapa de centrifugação.

- Tamanho de partícula e índice de polidispersão: as formulações foram analisadas a cada 30 dias de intervalo (T₀; T₃₀ e T₆₀) e análise foi realizada conforme descrito no item 1.3.4.

1.3.5 Estudo da influência dos carreadores de secagem nas formulações líquidas

Para esse estudo foram selecionadas apenas as formulações que se apresentaram estáveis quanto ao aspecto visual, ou seja, visualmente não apresentaram separação de fases. O preparo das formulações seguiu o mesmo procedimento já descrito em 2.3. Ao final do preparo, foram adicionados os carreadores de secagem, já previamente hidratados e só então as formulações ficaram sob agitação magnética lenta para que se estabilizassem. As composições das formulações adicionadas de carreadores de secagem estão apresentadas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Composição das formulações lipídicas contendo carreadores de secagem (% m/m)

Função	Componentes	F9c	F10c	F11c	F12c
Ativo	OE <i>Lippia sidoides</i>	3,0	3,0	3,0	3,0
Lipídio sólido	Gelucire® 50/13	6,0	6,0	6,0	6,0
Lipídio líquido	Ácido oleico	1,0	1,0	-	-
	Labrasol®	-	-	1,0	1,0
	Tween® 80	0,35	-	0,35	-
Tensoativo	Span® 80	0,35	-	0,35	-
	Poloxamer® 188	-	0,7	-	0,7
	Fibregum® B	8,6	8,6	8,6	8,6
Carreador de secagem	Lacprodan®	1,1	1,1	1,1	1,1
	Aerosil® 200	1,1	1,1	1,1	1,1

*água: q.s.p. 100 g

1.3.5.1 Análise das formulações líquidas com carreadores de secagem

As formulações foram analisadas no tempo zero com relação aos seguintes parâmetros: tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, condutividade elétrica e pH. Todas as análises seguiram as metodologias apresentadas em 1.3.4.

1.3.5.2 Comportamento reológico das formulações líquidas

A caracterização reológica das formulações acrescidas dos carreadores de secagem foi realizada em um Reômetro Brookfield (Modelo LV-DV III, EUA), cilindros concêntricos operando o *software* Reocalc[®]. Para a realização das leituras selecionou-se um programa com incremento/redução de velocidade de 5 rpm, faixa de leitura de 5 a 100 (aumentando e reduzindo a rotação), rampa de 30 segundos e *spindle* SC4-18. Após o preparo das formulações, as amostras permaneceram em repouso por 24 horas a temperatura ambiente controlada ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) antes da realização das análises (em duplicata). Os resultados foram analisados com base nos valores dos índices de fluxo (n) e de consistência (K), determinados por meio do ajuste não linear dos dados experimentais de tensão de cisalhamento (γ), em função da taxa de deformação (D) pelo modelo reológico de Ostwald de Waele, de acordo com a Equação 1.2.

$$\gamma = K \times D^n \quad (\text{Equação 1.2})$$

1.3.6 Quantificação de timol nas formulações lipídicas

Com o objetivo de quantificar o timol (componente majoritário presente no óleo essencial) nas formulações lipídicas, utilizou-se inicialmente a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). As condições cromatográficas foram baseadas no método proposto por Benelli, Souza e Oliveira (2013) e Leal e colaboradores (2003), com algumas modificações.

As análises foram realizadas em cromatógrafo LC-20A Prominence Shimadzu com injetor automático, bomba LC-6A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e detector de arranjo de diodos (SPD-M20A), coluna C18 (Shimadzu Shim-Pack CLC(M) 4,6 mm x 25 cm, 5 μm), tempo de corrida de 20 minutos, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 μL , temperatura do forno de 30 $^{\circ}\text{C}$. A fase móvel foi composta por água (A) e acetonitrila (B) segundo o gradiente: 0–2 min, 10% B; 2–7 min, aumento linear de B para 78%; 7–17 min, 78% B; 17–20 min, aumento linear de B para 100%; 20–23 min, 100%

de B; 23–26 min, redução linear de B para 10%, 23–32 min, 10% de B. Os cromatogramas foram obtidos a 276 nm e o método foi validado de acordo com o guia para validação dos métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA (ANVISA, 2012). O preparo das amostras consistiu em diluí-las em acetonitrila (amostras sem carreador de secagem) e metanol (amostras com carreador de secagem), homogeneizar a mistura em banho de ultrassom e submeter as soluções à agitação magnética por 30 minutos. Após a extração as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 5000 g e o sobrenadante filtrado com auxílio de membranas filtrantes Millex 0,45 micras e submetidas a análise por HPLC.

1.3.7 Atividade antifúngica contra *Candida albicans*

A atividade antifúngica foi determinada frente à *Candida albicans* (ATCC 64548), como descrito no documento M27-A (NCCLS, 2002a) com pequenas modificações. Os ensaios foram realizados para as formulações de base lipídica sem os adjuvantes de secagem, OE de *Lippia sidoides* e para o timol (componente majoritário do OE).

O meio de cultivo utilizado foi o caldo RPMI-1640 GIBCO BRL® (Life Technologies, Grand Island, EUA), com glutamina, sem bicarbonato de sódio, suplementado com glicose e tamponado com MOPS a pH 7,0 (NCCLS, 2002a). A suspensão final do inóculo foi preparada com água deionizada esterilizada, equivalente a escala de 0,5 de McFarland, utilizando-se colônias de 24 horas. Em seguida foi ajustada por contagem de células em câmara de Neubauer, para a obtenção de um inóculo de concentração igual a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. A viabilidade e a pureza do inóculo foram controladas por cultivo de alíquotas de suspensão em placas de Agar Sabouraud dextrose, incubados a 37°C durante 48 horas.

As formulações foram diluídas em água Mili-Q autoclavada para que ficassem na concentração de 2,5 mg de óleo essencial por mL. O timol e o óleo essencial foram diluídos em solução aquosa de Poloxamer® 188 (7 mg/mL), sendo a concentração final de 2,4 mg/mL para o timol puro e 2,5 mg/mL para o óleo essencial. Alíquotas de 100 µL de cada amostra a ser analisada foram colocadas nos poços das placas de microdiluição. A suspensão inicial de microrganismo foi diluída 1:50 e posteriormente 1:20 em RPMI-1640, para obtenção de uma suspensão $1-5 \times 10^3$ UFC/mL. A seguir foram inoculados volumes de 100 µL desta suspensão nos poços da placa de microdiluição. Os poços da coluna 1 foram utilizados como controle do meio (controle negativo), sendo depositado

neste 200 µL de meio RPMI-1640. Os poços da coluna 12 foram utilizados como controle positivo, sendo depositado nestes 200 µL de inoculo. Também foi avaliada a sensibilidade da solução de Poloxamer® 188 frente à *Candida albicans*, uma vez que foi o meio utilizado para solubilizar timol e óleo essencial.

As microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. A leitura foi realizada visualmente, comparando-se o crescimento no poço controle positivo com os demais poços referentes às amostras analisadas. Considerou-se Concentração Inibitória Mínima (MIC) a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento da levedura. A concentração que apresentou 100% de inibição do crescimento quando comparado com o controle positivo foi avaliada quanto à capacidade de matar 100% dos microrganismos. Volumes de 10 µL da respectiva concentração (MIC) foram inoculados em placas de Agar Sabouraud dextrose e após a incubação a 37°C durante 48 horas foram observadas a presença ou ausência de crescimento, sendo assumida como Concentração Fungicida Mínima (CFM) a menor concentração capaz de matar 100% das leveduras (ensaios realizados, no mínimo, em duplicata).

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 Caracterização do óleo essencial de *Lippia sidoides* e quantificação de timol

A análise do óleo essencial realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS). Conforme esperado, observou-se a prevalência do timol, principal ativo ao qual estão relacionadas à maioria das atividades biológicas da *Lippia sidoides* (ALMEIDA et al., 2010). O predomínio do timol relativamente aos demais constituintes do óleo essencial fica evidente no cromatograma apresentado na Figura 1.1 A Tabela 1.3 mostra a composição total do óleo essencial analisado, em que se observa o timol como constituinte majoritário do óleo (68%), seguido do p-cimeno (9%), do trans-cariofileno (8%), do β-myrceno (3%) e do γ-terpineno (3%). Juntos esses cinco compostos totalizam 91% da composição do óleo essencial de *Lippia sidoides*.

Tabela 1.3. Composição do óleo essencial de *Lippia sidoides*

Componentes	Área (%)	Índice de Kovats
α -tujeno	0,95	928
α -pineno	0,56	937
2- β -pineno	0,16	980
β -myrceno	2,84	989
α -felandreno	0,07	1007
β -ocimeno	0,16	1011
α -terpineno	1,16	1018
para-cimeno	9,43	1025
Bornileno	0,64	1032
1,8-cineol	0,53	1033
β -cis-ocymeno	0,11	1037
β -trans-ocymeno	0,16	1048
γ -terpineno	2,71	1060
Acetato de linalool	0,35	1099
2-(chlorometil)oxano	0,15	1145
Umbelulona	0,26	1170
L-4-terpineol	0,68	1180
Timol metil éter	0,97	1231
Timol	68,22	1297
α -capaeno	0,34	1377
Cariofileno (trans)	7,72	1420
Aromadendreno	0,46	1440
α -cariofileno	0,34	1455
Ledeno	0,44	1493
δ -cadineno	0,10	1520
Óxido de cariofileno	0,43	1580

Componentes listados em ordem de eluição

Figura 1.1. Cromatograma do óleo essencial de *Lippia sidoides*

1.4.1.1 Curva analítica para a quantificação do timol no óleo essencial por cromatografia gasosa

A curva analítica para quantificação do timol foi construída utilizando-se concentrações de timol variando de 0,125 mg/mL a 2,0 mg/mL, tendo sido realizadas cinco repetições autênticas em cada nível. O método apresentou linearidade no intervalo de concentrações estudado, com valor de R^2 0,9933. Os resultados das áreas, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) se encontram descritos na Tabela 1.4 e a curva analítica está representada na Figura 1.2.

Tabela 1.4. Concentração e áreas médias dos picos de timol obtidos por CG-MS

Concentração (mg/mL)	A1	A2	A3	Média	DP	CV (%)
0,125	699535	698420	695137	697697	2286	0,33
0,25	1894051	1889311	1778560	1853974	65353	3,53
0,5	4434648	4437790	4588228	4486889	87776	1,96
1,0	10151588	10745352	10422670	10439870	297255	2,85
1,5	12775214	14850925	13542248	13722796	1049568	7,65
2,0	19290449	20907518	20881591	20359853	926221	4,55

Figura 1.2. Curva analítica do timol obtida por CG-MS

1.4.2 Análise das formulações líquidas sem carreadores de secagem

Após o preparo, as 12 formulações sem carreadores de secagem (Tabela 1.1) foram analisadas quanto ao aspecto visual, separação de fases e estabilidade aparente. As formulações com ácido esteárico (F1 a F4) apresentaram-se floculadas quando uma fase foi vertida na outra, pois as fases não se homogeneizaram de forma adequada. As formulações compostas por Compritol® 888 ATO (F5 a F8) também flocularam e apresentaram separação de fases, indicando como resultado uma formulação instável. Entretanto, as formulações obtidas com Gelucire® 50/13 (F9 a F12) se mantiveram estáveis durante e após o preparo, indicando que a presença de maiores concentrações de tensoativo fornece mais estabilidade para as formulações, uma vez que o Gelucire® 50/13 é uma base auto emulsionante, composta por misturas de mono-, di- e triglicerídeos e ésteres de ácidos graxos com polietilenoglicol (EL-BADRY; FETIH; FATHY, 2009; ELOY et al., 2012) e suas características tensoativas permitem a formação de formulações mais estáveis. Dessa forma, selecionou-se as formulações compostas por Gelucire® 50/13, para dar continuidade ao estudo com a adição de carreadores de secagem, sendo que estas, foram renomeadas para F9 (Gelucire® 50/13, ácido oleico, Tween® 80 e Span® 80), F10 (Gelucire® 50/13, ácido oleico e Poloxamer® 188), F11 (Gelucire® 50/13, Labrasol®, Tween® 80 e Span® 80) e F12 (Gelucire® 50/13, Labrasol® e Poloxamer® 188). As demais formulações (F1 a F8) foram descartadas do estudo.

1.4.2.1 Tamanho de partícula e distribuição granulométrica obtida por microscopia ótica e análise de imagens

O tamanho de partícula é um importante parâmetro a ser analisado, pois está diretamente relacionado à solubilidade e também à estabilidade do sistema. Com base nas imagens obtidas em microscópio óptico e com o auxílio do *software* analisador de imagens (Image Pro-Plus®, 7.0) foi possível determinar o diâmetro médio e a distribuição granulométrica das partículas dispersas nas formulações lipídicas líquidas. A Figura 1.3 apresenta as imagens obtidas de cada formulação líquida avaliada.

A distribuição dos tamanhos de partícula foi caracterizada por meio dos tamanhos correspondentes às porcentagens de 10%, 50% e 90% das partículas da distribuição acumulada, que permitiram a determinação do SPAN, de acordo com a Equação 1.3 (MARTÍN et al., 2010).

$$SPAN = \frac{d_{90}-d_{10}}{d_{50}} \quad (\text{Equação 1.3})$$

onde:

d_{90} = somatória dos diâmetros abaixo de 90% das partículas

d_{10} = somatória dos diâmetros abaixo de 10% das partículas

d_{50} = somatória dos diâmetros abaixo de 50% das partículas

Os valores de distribuição granulométrica estão representados na Tabela 1.5 e o aspecto visual por microscopia ótica das partículas está ilustrada na Figura 1.3.

Figura 1.3. Imagens das formulações líquidas obtidas por microscopia ótica (aumento de 500 vezes)

Tabela 1.5. Parâmetros da distribuição granulométrica das formulações líquidas

Formulação líquida	Distribuição de partículas (μm)			
	d ₁₀	d ₅₀	d ₉₀	SPAN (-)
F9	0,29	0,82	1,75	1,78
F10	0,15	0,61	1,37	2,00
F11	0,26	0,92	2,15	2,05
F12	0,18	0,79	2,00	2,30

Legenda: F9 (Gelucire[®] 50/13, ácido oleico, Tween[®] 80 e Span[®] 80), F10 (Gelucire[®] 50/13, ácido oleico e Poloxamer[®] 188), F11 (Gelucire[®] 50/13, Labrasol[®], Tween[®] 80 e Span[®] 80) e F12 (Gelucire[®] 50/13, Labrasol[®] e Poloxamer[®] 188)

Com base nos resultados apresentados na Tabela 1.5, pode-se observar que os valores de SPAN obtidos foram dependentes do sistema lipídico. Há uma pequena variação nas formulações compostas por Poloxamer[®] 188 como tensoativo (F10 e F12), as quais apresentaram valores ligeiramente maiores de SPAN, sendo mais polidispersas que as obtidas da mistura de Tween[®] 80 e Span[®] 80. Também foi possível observar que as formulações compostas por ácido oleico (F9 e F10) apresentaram partículas mais agregadas quando comparadas às formulações contendo Labrasol[®], o que confere um comportamento de distribuição granulométrica mais acumulado em torno de 1 μm .

Os gráficos de distribuição granulométrica mostram que as formulações são compostas por partículas polidispersas (Figura 1.4).

Figura 1.4. Distribuição granulométrica acumulada das formulações líquidas

1.4.2.2 Tamanho de partícula, PI e potencial Zeta

Os sistemas lipídicos também foram caracterizados pela determinação tamanho de partícula e índice de polidispersão (PI) pela técnica do espalhamento dinâmico da luz, e pelo potencial zeta. O potencial zeta caracteriza a carga de superfície das partículas e, dessa forma, fornece informações sobre as forças de repulsão entre as partículas lipídicas formadas. Para se obter sistemas estáveis, impedindo floculação e coalescência das gotículas, em geral se considera que o potencial zeta deve apresentar valores acima de 30 mV, em módulo (SHRESTHA; BALA; ARORA, 2014), o que favoreceria a repulsão das partículas entre si, contribuindo para aumentar a estabilidade do sistema. Os resultados da determinação do tamanho de partícula e potencial zeta das formulações estão apresentados na Tabela 1.6, que também inclui os valores dos índices de polidispersão (PI), os quais fornecem informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos de partícula.

Tabela 1.6. Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta das amostras líquidas

Formulação	Tamanho de partícula (nm)	PI (-)	Potencial Zeta (mV)
F9	214,4 ± 1,5	0,296 ± 0,021	-40,6 ± 0,7
Branco F9	78,5 ± 9,2	0,707 ± 0,125	-29,8 ± 2,1
F10	276,3 ± 4,5	0,375 ± 0,046	-39,2 ± 1,0
Branco F10	35,8 ± 1,4	0,422 ± 0,009	-14,9 ± 0,7
F11	423,2 ± 7,5	0,288 ± 0,025	-23,7 ± 0,7
Branco F11	22,9 ± 0,5	0,360 ± 0,004	-12,1 ± 0,9
F12	360,6 ± 2,0	0,258 ± 0,021	-23,0 ± 0,1
Branco F12	76,6 ± 2,3	0,645 ± 0,032	-18,2 ± 0,7

Todas as amostras apresentaram valores negativos de potencial zeta, sendo que para as amostras preparadas com ácido oleico (F9 e F10) os valores de potencial ficaram em torno de -40 mV, indicativo de maior estabilidade eletrostática do sistema quando comparadas às amostras preparadas com Labrasol® como lipídio líquido (F11 e F12), que apresentaram valores de potencial zeta em torno de -23 mV. O valor negativo do potencial zeta está relacionado com a presença de compostos dissociáveis nos óleos que compõem as formulações e com a adsorção de íons negativos na superfície das gotículas (BONILLA et al., 2012). O índice de polidispersão (PI) revela a qualidade da dispersão e varia a partir de valores inferiores a 0,1, para medições adequadas e de boa qualidade, até valores próximos de 1, para amostras de má qualidade que não apresentam tamanho coloidal ou apresentam polidispersividade muito elevada (ANTON et al., 2007). Todas as dispersões apresentaram valores de tamanhos de partículas na escala nanométrica e índices de polidispersão relativamente baixos, indicando a formação de nanoestruturas relativamente monodispersas. As amostras compostas por ácido oleico apresentaram menor tamanho de partícula que as compostas por Labrasol®. A diferença entre os valores determinados por microscopia ótica e pela técnica do espalhamento de luz dinâmico é esperado, uma vez que as diluições utilizadas e a definição de diâmetro utilizadas em ambas as técnicas são diferentes. A microscopia empregou o diâmetro médio visual, em número, e a técnica de espalhamento de luz dinâmico com ângulo de 90° mede a difusão das partículas que se movem sob movimento browniano e converte essa medida em tamanho e em distribuição de tamanhos utilizando a relação de Stokes-Einstein. Além disso, a resolução do método de microscopia nas condições empregadas é melhor para partícula de 1 µm.

Todas as formulações contendo óleo essencial apresentaram menor polidispersividade que seus respectivos brancos, indicando que o óleo essencial auxilia na emulsificação da formulação. Bonilla e colaboradores (2012) analisaram o efeito do óleo essencial de tomilho, também rico em timol (57,7%), em dispersões formadoras de película de quitosana e reportaram maior atividade surfactante dos compostos anfifílicos presentes no óleo essencial de tomilho, que possui composição próxima do OE utilizado nesse estudo. Nas formulações do presente estudo esse resultado também foi observado, concluindo-se que os compostos presentes no óleo essencial de *L. sidoides* auxiliaram na emulsificação da formulação, contribuindo, dessa forma, para diminuição da polidispersividade das partículas, formando partículas mais homogêneas, como pode ser observado na Tabela 1.6. A presença do OE também contribuiu para a formação de partículas mais estáveis, o que pode ser justificado pelos valores maiores (mais negativos, Tabela 1.6) de potencial zeta das formulações contendo óleo essencial em comparação com os brancos (formulações sem a adição do óleo essencial).

1.4.2.3 Estudo de estabilidade das formulações

Os resultados das determinações dos valores de pH e condutividade elétrica em função do tempo decorrido após o preparo das formulações (T=0, T=7 dias, T=15 dias e T=30 dias) podem ser observados na Figura 1.5. A Tabela 1.7 apresenta os resultados dos testes de centrifugação (também em função do tempo T=0, T=7 dias, T=15 dias e T=30 dias). De acordo com os resultados obtidos, pode-se perceber que os valores de pH se mantiveram praticamente estáveis durante o período de armazenagem, sem apresentar alterações relevantes, sendo os valores bastante próximos ao branco da formulação (sem o óleo essencial).

Com relação à condutividade elétrica, basicamente, tem-se que quando um estado estável apresenta valores elevados de condutividade, a água representa a fase contínua, enquanto que valores próximos a zero significam que a fase contínua é o óleo (ANTON et al., 2007). Em relação à condutividade elétrica, os valores variaram bastante (entre 25 e 125 $\mu\text{S}/\text{cm}$) com o passar do tempo após o preparo, o que pode ser notado principalmente com relação às formulações F9 e F10 (com ácido oleico na composição), cujos valores de condutividade elétrica aumentaram significativamente (cerca de 4 vezes mais) após 15 dias do preparo das dispersões, com elevado incremento após 30 dias (5 vezes mais), o que indica menor estabilidade dessas formulações em relação às

formulações F11 e F12, que continham Labrasol® na composição. A diferença de estabilidade entre as duas composições de lipídio (ácido oleico e Labrasol®) já era esperada, uma vez que as propriedades tensoativas do Labrasol® combinadas aos compostos do óleo essencial que auxiliam na emulsificação permitiram a formação de estruturas mais estáveis, evitando o aumento da condutividade elétrica, tal como foi observado para as formulações compostas por ácido oleico. Comparando-se as formulações líquidas contendo o óleo essencial com seus respectivos brancos, foi possível observar que apenas as formulações de ácido oleico (F9 e F10) contendo óleo essencial apresentaram aumento significativo da condutividade elétrica, instabilidade que possivelmente está relacionada com a interação do óleo essencial e o ácido oleico, já que esse aumento não foi observado nos respectivos brancos.

Figura 1.5. Determinação do pH e condutividade elétrica das formulações líquidas (gráficos “a” e “b”) e seus respectivos brancos (gráficos “c” e “d”) em função do tempo decorrido do preparo

- Ensaio de centrifugação

O teste de centrifugação indicou que as formulações começaram a apresentar alterações (separação de fases) a partir de 15 dias após o preparo. Os resultados apresentados na Tabela 1.7 mostram que a formulação que se manteve mais estável foi a

F11, enquanto que F9 e F10 apresentaram menor estabilidade também para o teste de centrifugação, resultado também já esperado devido à capacidade tensoativa do Labrasol® em comparação à do ácido oleico. Decorridos 30 dias do preparo, todas as formulações continuavam íntegras, ou seja, não apresentaram separação de fases antes da centrifugação.

Tabela 1.7. Resultados obtidos para o teste de centrifugação

Form.	Antes da Centrifugação				Após 15 minutos 1.000 rpm				Após 15 minutos 2.500 rpm				Após 15 minutos 3.500 rpm			
	0	7	15	30	0	7	15	30	0	7	15	30	0	7	15	30
F9	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++
F10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	++	++	++	++
F11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	++	-	++	++
F12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	++	++	++

(-) sem alteração, (+) alteração leve, (++) alteração acentuada; T=0 (24 horas após preparo), T=7 (7 dias após preparo), T=15 (15 dias após preparo) e T=30 (30 dias após preparo)

Os resultados de tamanho de partícula e índice de polidispersão durante o período de 60 dias estão apresentados na Figura 1.6. Os brancos das formulações foram analisados somente até o tempo de 30 dias após o preparo, uma vez que a falta do ativo favoreceu o crescimento de microrganismos nas dispersões lipídicas. Esse resultado é bastante promissor, e fornecem evidências do potencial do óleo essencial como um agente antimicrobiano em composições farmacêuticas, que é um dos objetivos desse trabalho.

Figura 1.6. Tamanho de partícula e índice de polidispersão (PI) das formulações líquidas (gráficos “a” e “b”) e seus respectivos brancos (gráficos “c” e “d”) em função do tempo decorrido de preparo

De acordo com a Figura 1.6 é possível observar que as formulações com óleo essencial apresentaram tamanhos de partícula consideravelmente superiores aos respectivos brancos. A formulação F11 foi a que apresentou maior tamanho de partícula, seguida por F12, ambas contendo Labrasol® na composição. A formulação F10 apresentou partículas relativamente pequenas, em torno de 200 nm, porém foi a que apresentou maior polidispersividade. Sabe-se que o tipo e a concentração de tensoativo utilizado em uma formulação tem uma correlação direta com o tamanho de partículas da emulsão formada (TAN et al., 2010), o que pode ser a razão do aumento do tamanho observado para as formulações contendo o óleo essencial, em relação aos respectivos brancos. A interação óleo essencial/sistema tensoativo também influenciou de forma significativa no tamanho de partícula das formulações: nas formulações sem o óleo essencial, F9 apresentou praticamente o dobro do tamanho e índice de polidispersão em relação à F10. Por outro lado, as formulações contendo o óleo apresentaram tamanhos semelhantes entre si e uma distribuição de partículas mais estreita, o que evidencia que o

óleo essencial interage com os componentes da formulação, favorecendo a homogeneização e a estabilidade do sistema.

1.4.3 Estudo da influência dos carreadores de secagem nas formulações líquidas

Essa etapa do desenvolvimento do trabalho teve como objetivo avaliar a influência da adição de carreadores de secagem nas propriedades físico-químicas das formulações líquidas, visando sua posterior secagem. As formulações lipídicas foram acrescidas de Fibregum[®] B (goma arábica), Lacprodan[®] WPC 80 (proteína hidrolisada de soro do leite concentrada) e Aerosil[®] 200 (dióxido de silício coloidal) como carreadores de secagem, na proporção de 11,8% do teor de sólidos total.

1.4.3.1 Análise das formulações líquidas com carreadores de secagem

A adição de carreadores de secagem, conforme esperado, forneceu partículas maiores, mais polidispersas e com menores valores de potencial zeta, conforme apresentado na Tabela 1.8. Com a adição dos carreadores, o teor de sólidos das formulações foi alterado (aumentou de 10,7% para 21,5%), assim como a composição das formulações, já que além dos lipídios, tensoativos e água, passou a apresentar carboidratos e proteínas, o que favoreceu tanto o aumento do tamanho quanto do índice de polidispersão das partículas. Classes diferentes de macromoléculas apresentam polaridades e características diferentes. Como esses componentes foram adicionados ao final do processo de produção das nanopartículas, muito provavelmente tendem a compor a fase externa da emulsão. A redução nos valores de potencial zeta indica que o sistema está mais instável quando comparado ao sistema anterior, sem os adjuvantes de secagem. Essa redução na estabilidade frente à adição dos carreadores de secagem é evidenciada na Figura 1.7, a qual permite observar que a superfície das formulações está mais transparente e base mais esbranquiçada.

Tabela 1.8. Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta das amostras líquidas contendo adjuvantes de secagem (Fibregum[®] B , Lacprodan[®] e Aerosil[®] 200)

Formulação	Tamanho de Partícula (nm)	PI (-)	Potencial Zeta (mV)
F9c	303,1 ± 8,7	0,513 ± 0,025	-31,1 ± 0,6
F10c	403,5 ± 19,7	0,729 ± 0,048	-31,6 ± 0,7
F11c	747,4 ± 15,3	0,518 ± 0,058	-16,4 ± 0,6
F12c	910,9 ± 22,7	0,616 ± 0,111	-16,8 ± 1,2

Figura 1.7. Aspecto visual das formulações lipídicas líquidas contendo óleo essencial de *L. sidoides* e carreadores de secagem (Fibregum[®] B, Lacprodan[®] e Aerosil[®] 200)

A Figura 1.8 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros pH e condutividade elétrica. Os dados obtidos mostram que a incorporação dos carreadores de secagem resultou em um aumento discreto nos valores de pH de 4,3, em média, para 5. Com relação à condutividade elétrica a variação foi bastante acentuada, já que os resultados experimentais foram cerca de 100 vezes superiores aos valores sem adição de carreadores. Esses valores maiores são esperados, uma vez que tanto o concentrado proteico do soro de leite (Lacprodan[®]) quanto a goma arábica (que possui uma porção proteica) apresentam carga quando em solução (NH_4^+ ; COO^-). Consequentemente, ocorre um aumento das interações água-proteína, aumentando a condutividade elétrica, visto que essas são interações eletrostáticas (KREŠIĆ et al., 2008). Observa-se também que o efeito causado pela adição de carreadores suplantou as diferenças observadas para as diferentes formulações, como mostrado na Figura 1.8.

Figura 1.8. Condutividade elétrica e pH das formulações lipídicas líquidas contendo óleo essencial de *L. sidoides* e carreadores de secagem (Fibregum® B, Lacprodan® e Aerosil® 200)

1.4.3.2 Comportamento reológico das formulações líquidas contendo carreadores de secagem

A reologia é um parâmetro importante para caracterizar as propriedades de escoamento das emulsões e prever seu comportamento durante a fabricação (TADROS, 2004), e possui relação direta com a estabilidade da emulsão. A caracterização reológica da formulação a ser alimentada para secagem em *spray drying* é importante, possuindo relação direta com as características das gotas atomizadas (TEWA-TAGNE; BRIANÇON; FESSI, 2007). Emulsões O/A tipicamente apresentam comportamento pseudoplástico com presença de tixotropia (MORAIS; OLIVEIRA; DA ROCHA-FILHO, 2014). O comportamento pseudoplástico é dependente da taxa de deformação, ou seja, a resistência que o material oferece ao escoamento diminui com o aumento da velocidade de deformação (MORAIS, 2006). A tixotropia é caracterizada pela alteração da viscosidade em função do tempo de deformação. Esse fenômeno é reversível, permitindo que a viscosidade inicial seja retomada algum tempo após cessar o cisalhamento, porém ela não é recuperada totalmente após o estado de repouso (ALMEIDA; BAHIA, 2003). O grau de tixotropia é avaliado pela área resultante entre a curva ascendente e descendente do reograma, denominada histerese (PIANOVSKI et al., 2008). O estudo do comportamento reológico mostrou que todas as formulações apresentaram comportamento pseudoplástico com pequeno grau de tixotropia, dependente da composição. Estes estão representados pelos reogramas da Figura 1.9 e pelos índices de fluxo, na Tabela 1.9. As linhas vermelhas plotadas nos gráficos da Figura 1.9, representam os valores estimados pelo modelo de Ostwald ajustado aos dados

experimentais, demonstrando uma ótima correlação. As formulações compostas por ácido oleico como lipídio líquido (F9c e F10c) apresentaram maior tixotropia que as demais formulações, uma vez que a área de histerese apresentada foi de 2 a 4 vezes maior. Além disso, também foi possível observar que a formulação F11c apresentou o comportamento pseudoplástico mais acentuado de todas as formulações analisadas, já que quanto menor o valor do índice de fluxo, mais rapidamente a viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação (GAO; TIEN; CHOI, 2003).

O índice de consistência corresponde ao valor da viscosidade aparente da formulação a uma taxa de deformação igual a 1. Dessa forma, quanto maior o valor do índice de consistência, mais espessa é a formulação, em condições de pequeno cisalhamento. Os resultados apresentados indicam que a formulação F11c foi a mais espessa dentre todas, o que condiz com observações visuais e tácteis.

Tabela 1.9. Parâmetros reológicos ajustados das formulações com adjuvantes de secagem

Formulação	Índice de consistência (dyn.s ⁿ /cm ²)		Índice de fluxo (n)		Área de histerese (d/cm ² .s)
	D ascendente	D descendente	D ascendente	D descendente	
F9c	0,36	0,09	0,87	1,17	242,9
F10c	0,52	0,05	0,81	1,28	434,4
F11c	0,55	0,35	0,81	0,90	151,2
F12c	0,59	0,42	0,80	0,86	106,0

Figura 1.9. Comportamento reológico das formulações lipídicas contendo adjuvante de secagem - símbolos fechados e abertos representam a tensão de cisalhamento aumentando e diminuindo a taxa de deformação, respectivamente

1.4.4 Quantificação de timol nas formulações lipídicas

Nessa etapa se avaliou os solventes acetonitrila e metanol para a extração do timol das dispersões lipídicas investigadas (Figura 1.10). A utilização de acetonitrila para o preparo das amostras forneceu bons resultados de retenção de timol para as formulações contendo ácido oleico na composição (F9c e F10c), evidenciando uma extração eficiente. O mesmo não foi observado para as formulações compostas por Labrasol® que apresentaram valores de retenção de timol abaixo de 60%. Essa diferença na porcentagem de retenção do timol não era esperada, já que o método utilizado no preparo das formulações foi o mesmo, assim não seriam esperadas perdas significativas do marcador. Dessa forma, houve a necessidade de alterar o solvente de preparo das amostras para a análise em HPLC. As formulações compostas por carreadores de secagem foram, então, extraídas com metanol em vez de acetonitrila durante o preparo das amostras. Os resultados apresentados nessa segunda análise mostraram que o metanol foi um solvente

mais eficiente para determinação da retenção de timol das formulações lipídicas em questão, já que conseguiu extrair o timol de forma semelhante, tanto para as formulações contendo Labrasol® quanto para as com ácido oleico, sendo selecionado para a continuidade do estudo.

Figura 1.10. Porcentagem de retenção de timol das formulações lipídicas com e sem carreadores de secagem

1.4.5 Atividade antifúngica das formulações lipídicas

A Tabela 1.10 apresenta os resultados experimentais da concentração mínima inibitória (MIC), da concentração mínima fungicida (MFC) e de suas respectivas médias geométricas (GM) das formulações lipídicas F9 a F12 juntamente com os respectivos valores para o óleo essencial de *Lippia sidoides* (OE), e do composto isolado timol, obtidos pelo método da microdiluição frente a levedura *Candida albicans*. Pode ser observado na Tabela 1.10 que o OE e o composto majoritário isolado (timol) apresentaram valores inferiores de MIC e MFC, comparados às formulações lipídicas avaliadas. Entretanto, se verifica que todas as formulações lipídicas também exibiram boa atividade frente à *Candida albicans*, evidenciando o potencial dos sistemas produzidos, que também são capazes de estabilizar e aumentar a dispersibilidade em água do OE, o que o torna adequado para ser utilizado como um ingrediente ativo em preparações antifúngicas farmacêuticas. A preparação F12, que contém o Labrasol® e o Poloxamer® 188, exibiram atividade antifúngica um pouco superior, como pode ser observado na Tabela 1.10. O tensoativo Poloxamer® 188, empregado para a dispersão do OE e do composto isolado timol não apresentaram atividade antifúngica frente à *C. albicans*, em toda a faixa de concentrações avaliadas.

Comparando-se os resultados obtidos com a sensibilidade apresentada pela *Candida albicans* frente ao fármaco padrão de tratamento fluconazol, amplamente utilizado para tratar candidíase sistêmica, os valores apresentados pelas amostras testadas (óleo essencial, timol e formulações lipídicas) ainda são atraentes para um ativo natural: MIC entre 156 a 312 µg/mL contra 2,5 a 7,5 µg/mL (AHMAD; KHAN; MANZOOR, 2013) para amostras avaliadas nesse trabalho e fluconazol respectivamente, ambos ensaios realizados para isolados de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol. No entanto, Ahmad e colaboradores (2013) demonstraram que a associação entre timol e fluconazol foi eficiente no tratamento contra candidíase. Além disso, os valores de MIC apresentados pelas formulações lipídicas (entre 156 a 312 µg/mL) foram bastante promissores quando comparados ao estudo realizado por Fontenelle e colaboradores (2007) (entre 620 a 2500 mg/L), que avaliou a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Lippia sidoides* contra *C. albicans*. Segundo Holetz e colaboradores (2002) extratos vegetais são considerados com atividade antimicrobiana quando apresentarem MIC abaixo de 1000 µg/mL.

A combinação sinérgica de fármacos tem sido uma estratégia válida e pragmática para procurar drogas com um novo modo de ação, já que a falta de novos antifúngicos e as limitadas opções terapêuticas disponíveis exigem estratégias para encontrar novos candidatos a antifúngicos (CUI et al., 2015). Para que ocorra uma ação antifúngica sinérgica, os dois fármacos utilizados devem ser capazes de atacar a célula fúngica em mais de dois alvos diferentes (AHMAD; KHAN; MANZOOR, 2013). Ainda são necessários mais estudos, com outras linhagens de fungos, além de desenvolvimento tecnológico suplementar de formulações lipídicas para acondicionar, estabilizar e modular a liberação do óleo essencial. Porém, os resultados preliminares obtidos no estudo são bastante promissores, evidenciando a relevância e importância do estudo.

Tabela 1.10. MIC (mg/mL) e MFC ($\mu\text{g/mL}$) dos sistemas lipídicos, OE puro e do timol (composto majoritário)

Amostras	MIC (GM) ($\mu\text{g/mL}$)	MIC (FAIXA) ($\mu\text{g/mL}$)	MFC (GM) ($\mu\text{g/mL}$)	MFC (FAIXA) ($\mu\text{g/mL}$)
OE	156	156	312	312
Timol	156	156	221	156 - 312
F9	312	312	442	312 - 625
F10	312	312	442	312 - 625
F11	221	156 - 312	525	312 - 625
F12	221	156 - 312	371	312 - 625
Poloxamer® 188	> 3500	> 3500	> 3500	> 3500

1.5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho demonstram a obtenção de sistemas emulsionados com partículas com diâmetro médio na escala nanométrica e índice de polidispersão na ordem de 0,30. Para o período avaliado de 30 dias as formulações contendo Labrasol® apresentaram maior estabilidade frente às compostas por ácido oleico.

As formulações apresentaram comportamento reológico do tipo pseudoplástico com presença de tixotropia, sendo apropriado para o processo de atomização na secagem em *spray drying*. Essa propriedade foi ligeiramente mais acentuada (2 a 4 vezes maior) nas formulações contendo ácido oleico na composição.

Os resultados também confirmam que o OE de *Lippia sidoides* apresenta uma potente atividade antifúngica frente à levedura *Candida albicans*. As formulações lipídicas também apresentaram potente atividade antifúngica contra a cepa de levedura testada (ATCC 64548). Esses resultados são promissores, e comprovam o potencial de se obter novas formulações com atividade antimicrobiana a partir de fontes naturais, capazes de preservar e modular a liberação dos compostos bioativos associados à sua atividade farmacológica.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

Influência da composição e da secagem por *spray drying* nas propriedades físico-químicas de formulações de base lipídica incorporadas de OE de *Lippia sidoides*

Lista de figuras

Figura 2.1. Comparação entre os resultados experimentais do potencial zeta (Z) determinados para as formulações líquidas e produto seco redisperso em água.....	67
Figura 2.2. Comparação entre os resultados experimentais do tamanho das gotículas no sistema disperso (dp) determinados para as formulações líquidas e produto seco redisperso em água	69
Figura 2.3. Comparação entre os resultados experimentais do índice de polidispersão (PI) determinados para as formulações líquidas e produto seco redisperso em água	71
Figura 2.4. Retenção do timol, composto majoritário no OE de <i>Lippia sidoides</i> , nas formulações lipídicas secas por <i>spray drying</i>	75
Figura 2.5. Morfologia típica dos produtos obtidos por <i>spray drying</i> : F11c' (A); F11c (B)	76

Lista de tabelas

Tabela 2.1. Constituintes das formulações lipídicas (% m/m)	61
Tabela 2.2. Composição do OE de <i>Lippia sidoides</i> determinada por CG-MS.....	65
Tabela 2.3. Umidade do produto, atividade de água e propriedades de fluidez dos produtos secos	72

Lista de equações

Equação 2.1.....	62
Equação 2.2.....	62
Equação 2.3.....	72

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ANOVA	Análise de variância
a_w	Atividade de água
ρ_b	Densidade aparente
$\rho_{t,1250}$	Densidade compactada
dp	Tamanho de partícula
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
EOs	Essential oils
G:P	Proporção entre os adjuvantes de secagem goma arábica:concentrado proteico do soro de leite
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detector de Arranjo de Diodos
H_R	Razão de Hausner
I_c	Índice de Carr
IK	Índice de Kovats
m_0	Massa inicial
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
OE	Óleos essenciais
p	Pressão de vapor da água no produto
PI	Índice de polidispersão
p_o	Pressão de vapor da água pura
q.s.p	Quantidade suficiente para
v_0	Volume inicial
X_p	Umidade do produto
Z	Potencial zeta

RESUMO

Óleos essenciais (OEs) são amplamente utilizados em diversos setores industriais; porém podem exibir diversos problemas de instabilidade quando expostos a fatores ambientais. Tecnologias de encapsulação despontam como soluções efetivas para melhorar as propriedades e estabilidade de OEs. Nas últimas décadas, a encapsulação em sistemas de base lipídica tem recebido grande atenção, devido a várias vantagens reconhecidas frente à sistemas de encapsulação convencionais. Neste trabalho, oito formulações lipídicas

contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* foram analisadas com relação à influência da composição e do processo de secagem em *spray drying* (SD) sobre as propriedades físico-químicas e eficiência de retenção de timol nos produtos formados. Os produtos obtidos da secagem por SD foram caracterizados pela determinação de propriedades de fluidez (Índice de Carr: 25,0% a 47,9%; razão de Hausner: 1,55 a 1,38), umidade (3,78% a 5,2%), atividade de água ($<0,5$), e morfologia das partículas secas. Os resultados experimentais de potencial zeta, tamanho das gotículas dispersas e índice de polidispersão, das amostras redispersas do produto seco situam-se na faixa de -25,9 a -30,9 mV, 525,3 a 1143 nm, e de 0,425 a 0,625, respectivamente, mostrando pequenas diferenças em relação aos valores determinados para as composições originais (-16,4 mV a -31,6 mV; 147 nm a 1531 nm; e 0,459 a 0,729). A retenção do composto majoritário timol no produto seco foi significativamente inferior aos valores determinados para as composições líquidas, e sofreram influência dos adjuvantes de secagem empregados.

ABSTRACT

Essential oils (EOs) are widely used in various industrial sectors; but can present several instability problems when exposed to environmental factors. Encapsulation technologies are effective solutions to improve EOs properties and stability. In the last decades, the encapsulation in lipid based systems has received significant attention, due to the several recognized advantages over conventional encapsulation systems. For this work, eight different lipid systems loaded with *Lippia sidoides* essential oil were analyzed in relation to the influence of composition and spray drying process on physicochemical properties and retention efficiency of the formed systems. The spray dried products were characterized by determination of flow properties (Carr Index: 25.0% to 47.93%, and Hausner ratio: 1.25 to 1.38), moisture (3.78% to 5.20%), water activity (<0.5), and powder morphology. Zeta potential, particles size, and polydispersity index, of the redispersed dried product falls between -25.9 mV and -30.9 mV, 525.3 nm to 1143 nm, and from 0.425 to 0.652, respectively, showing slight differences with the ones measured for liquid composition (-16.4 mV to -31.6 mV; 147 nm to 1531 nm; and 0.459 to 0.729). The retention of the major compound thymol in the dried products was significantly lower than the values determined for the liquid compositions, and were affected by the drying carrier systems.

2.1 INTRODUÇÃO

Óleos essenciais (OEs) apresentam grande importância em diversos setores industriais, como por exemplo o farmacêutico, alimentício, cosmético, sanitário, agricultura e pecuária; principalmente devido ao amplo espectro de atividades biológicas comprovadas, como por exemplo bactericida, fungicida, antiparasitária, inseticida, analgésica, sedativa, anti-inflamatória, entre outras (SHERRY et al. 2013; TIAN et al. 2011).

OEs são complexas misturas de vários compostos voláteis (hidrofóbicos), produzidos pelo metabolismo secundário das plantas. Dentre os principais constituintes de óleos essenciais destacam-se os terpenóides (mono, di e sesquiterpenos), e compostos oxigenados (ex. álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, éteres fenólicos, e outros), sendo as propriedades biológicas muitas vezes associadas aos compostos majoritários e ao sinergismo entre os constituintes do OE (BILIA et al., 2014).

Todavia, OEs apresentam significativos problemas de instabilidade, podendo sofrer alterações irreversíveis de suas propriedades físico-químicas devido à exposição ao calor, umidade, oxigênio e luminosidade. Sua baixa solubilidade em água é outra restrição para seu emprego em várias potenciais aplicações (ADAMIEC; KALEMBA, 2006; CHANG; MCLANDSBOROUGH; MCCLEMENTS, 2015).

A micro e a nanoencapsulação de OEs e de outros produtos derivados de plantas, surge como uma ferramenta promissora, permitindo modular a liberação de compostos bioativos e aumentar a estabilidade físico-química, fornecendo proteção contra fatores ambientais, redução da volatilidade, aumento da biodisponibilidade, entre outros.

A encapsulação em carreadores lipídicos tem recebido muita atenção nos setores farmacêuticos e alimentícios, principalmente devido às diversas vantagens atribuídas, como por exemplo baixa toxicidade, potencial de encapsular compostos hidrofílicos e lipofílicos, baixos custos de produção, e facilidade de ampliação de escala. Vários sistemas lipídicos podem ser desenvolvidos, como por exemplo emulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, e carreadores lipídicos nanoestruturados (BOUREZG et al., 2012).

A desidratação dessas composições podem gerar dispersões secas, com elevada eficiência de encapsulação, solubilidade e maior estabilidade frente às formas líquidas, podendo ser redispersas quando necessário (BOUREZG et al., 2012; CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014; JOSHI; MÜLLER, 2009). Diversos processos de secagem

podem ser utilizados, com destaque para o *spray drying* (ou secagem por atomização) e a liofilização (GALLARATE et al., 2009; HERNANDEZ SANCHEZ; CUVELIER; TURCHIULI, 2015).

Estudos da literatura tem demonstrado que o tipo de materiais usados, proporção de adjuvantes, condições de secagem e condições de armazenagem do produto exercem influência sobre a microestrutura do produto seco por *spray drying*, afetando a retenção do composto ativo encapsulado. A microestrutura do produto pode influir em sua funcionalidade, estabilidade, e propriedades de fluidez (CARNEIRO et al., 2013; JAFARI et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2004).

A *Lippia sidoides* é um arbusto aromático amplamente empregado na medicina tradicional do Brasil como antisséptico local. A atividade antimicrobiana desta espécie vegetal é associada à presença do timol, um dos componentes majoritários de seu óleo essencial (FERNANDES et al., 2008). Esta espécie também se encontra relacionada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - RENISUS (BRASIL, 2009).

2.2 OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo foi o estudo da influência dos constituintes da formulação de base lipídica empregada para a encapsulação de OE de *Lippia sidoides* e da secagem por *spray drying* na eficiência de retenção do composto majoritário, o timol, e nas propriedades físico-químicas das partículas formadas. Uma comparação entre as propriedades das formulações originais com os produtos secos redispersos em água também é apresentada.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Material

O óleo essencial de *Lippia sidoides* (PRONAT - Produtos Naturais do Nordeste LTDA, Horizonte – Ceará - Brazil). Os principais constituintes das formulações foram: Gelucire® 50/13 (Gattefossé, França), ácido oleico (LabSynth, Brasil), Labrasol® (Gattefossé, France), Span® 80 (Sigma-Aldrich, EUA), Tween® 80 (LabSynth, Brasil), Poloxamer® 188 (Kolliphor P 188 Micro – gentilmente doado pela BASF, Brasil). Misturas de proteína do soro do leite (Arla Foods Ingredientes S.A., Argentina), goma

arábica (NEXIRA, Brasil), e Aerosil[®] 200 (Evonik Degussa, Alemanha), foram utilizados como adjuvantes de secagem (e de encapsulação). Água ultrapura (Direct Q System, Millipore) foi empregada no preparo das formulações de encapsulação. Outros produtos químicos e reagentes utilizados foram de grau farmacêutico ou grau cromatográfico.

2.3.2 Caracterização dos compostos principais do OE de *Lippia sidoides* por CG-MS

Os principais constituintes do OE de *Lippia sidoides* foram caracterizados por cromatografia gasosa acoplada ao um espectrômetro de massa (GC-MS modelo GCMS QP-2010, Shimadzu, Japão), usando a coluna capilar EN5-MS (30 m x 0.25 mm x 0.25µm). H₂ foi utilizado com gás de arraste, com temperatura programada de 60°C a 240 °C com rampa de 3 °C/min.

As demais condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injetor de 240 °C; vazão de H₂ de 1,30 mL/min; temperatura do detector de 260 °C, a razão de split de 1:50. Os principais constituintes do OE foram identificados pela comparação de seu espectro de massa com os espectros publicados na biblioteca eletrônica da Wiley (WILEY7.LIB), e dos índices de Kovats (IK) relativos a uma série de alcanos (C9-C20) com os valores reportados em Adam (2001).

2.3.3 Preparação das formulações de base lipídica

Oito diferentes formulações lipídicas foram preparadas de acordo com a Tabela 2.1. O Gelucire[®] 50/13 associado com o ácido oleico ou com o Labrasol[®] formaram a fase lipídica, e o Poloxamer[®] 188, ou a combinação do Tween[®] 80:Span[®] 80 na razão 1:1 foram adicionados na fase aquosa. Misturas de proteína do soro do leite (P) e goma arábica (G) foram utilizadas como adjuvantes de secagem. Pequena proporção de dióxido de silício coloidal (Aerosil[®] 200), foi adicionado somente nas formulações possuindo maior razão G:P, visando melhorar o desempenho da secagem.

As formulações foram preparadas pela técnica de inversão de fases a quente. O lipídio Gelucire[®] 50/13 foi aquecido a 10 °C acima de seu ponto de fusão, e misturado com os lipídios líquidos ácido oleico ou Labrasol[®]. Os agentes tensoativos (Tween[®] 80:Span[®] 80 ou Poloxamer[®] 188) foram dissolvidos em água e aquecidos à mesma temperatura da fase lipídica. O óleo essencial e a fase aquosa foram lentamente adicionados à fase lipídica, sendo mantidos sobre agitação magnética, e então homogeneizados em UltraTurrax (IKA modelo T18 basic, Wilmington, EUA) a 18.000

rpm for 2 min. A emulsão O/A resultante foi então submetida à homogeneização por ultrassom a 20 kHz de frequência, intensidade de 70% durante 2 minutos, com a sonda de 13 mm (SONICS VCX-750, Newtown, EUA). Os carreadores de secagem (encapsulação), previamente hidratados foram adicionados somente após o preparo das formulações. A concentração de sólidos final das formulações (incluído os lipídios, tensoativos, OE e adjuvantes de secagem) foi de 16,7% (formulações c'), e 21,4% m/m (formulações c).

Tabela 2.1. Constituintes das formulações lipídicas (% m/m)

Função	Componente	Formulação							
		F9c'	F10c'	F11c'	F12c'	F9c	F10c	F11c	F12c
Ativo	OE <i>Lippia sidoides</i>	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Lipídio anfifílico	Gelucire® 50/13	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Lipídio líquido	Ácido oleico	1,0	1,0	-	-	1,0	1,0	-	-
Tensoativo	Labrasol®	-	-	1,0	1,0	-	-	1,0	1,0
	Tween® 80	0,35	-	0,35	-	0,35	-	0,35	-
	Span® 80	0,35	-	0,35	-	0,35	-	0,35	-
	Poloxamer® 188	-	0,7	-	0,7	-	0,7	-	0,7
Adjuvante	Fibregum® B	3,0	3,0	3,0	3,0	8,6	8,6	8,6	8,6
de	Lacprodan®	3,0	3,0	3,0	3,0	1,1	1,1	1,1	1,1
secagem	Aerosil® 200	-	-	-	-	1,1	1,1	1,1	1,1

*água: q.s.p. 100 g

2.3.4 Secagem das formulações lipídicas

As formulações lipídicas incorporadas de OE foram submetidas à secagem em um *spray dryer* modelo SD-05 da Lab-Plant (Lab-Plant Ltd, Huddersfield, Reino Unido), empregando as seguintes condições operacionais: vazão de alimentação da composição lipídica de 4 g/mL, temperatura de entrada do gás de secagem de 100 °C para as formulações c', e de 90 °C para a formulações c, vazão do ar de secagem de 60 m³/h, diâmetro de orifício do bico atomizador de 1 mm, pressão e vazão do ar de atomização de 3 bar e 17 L/min, respectivamente.

2.3.5 Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações líquidas e do produto seco redisperso em água

O tamanho de partículas, índice de polidispersão e o potencial zeta das formulações líquidas e dos correspondentes produtos secos redispersos foram determinadas em um equipamento Malvern Zetasizer Nanoseries ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido), pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (*dp* e *PI*) e da mobilidade eletroforética (*Z*). Amostras dos produtos secos redispersas em água Mili-Q, à mesma concentração original e mantidas sob agitação por 30 minutos e diluídas 1:200 (v/v), antes das determinações (medidas realizadas em triplicata).

2.3.6 Propriedades de fluidez do produto seco

A razão de Hausner (H_R) e o índice de Carr (I_C) foram utilizadas como propriedades de fluidez. Esses parâmetros são determinados segundo as Equações 2.1 e 2.2, descritas a seguir:

$$H_R = \frac{\rho_{t,1250}}{\rho_b} \quad (\text{Equação 2.1})$$

$$I_C = \frac{\rho_{t,1250} - \rho_b}{\rho_{t,1250}} \times 100 \quad (\text{Equação 2.2})$$

onde ρ_b é a densidade aparente ou “bulk” ($\rho_b = m_0/v_0$), $\rho_{t,1250}$ é a densidade compactada, determinada usando o volume ocupado por uma amostra de pó em uma proveta após 1250 quedas a partir de uma distância de 14,0 mm. O equipamento Caleva® (Tapped Density Tester, TDT, Frankfurt, Alemanha) foi empregada para a determinação das densidades aparente e compactada, de acordo com o método descrito na farmacopeia americana (USP 29-NF 24, 2006).

2.3.7 Umidade e atividade de água do produto seco

O conteúdo de umidade dos produtos secos foi determinado pelo método de titulação por Karl Fischer, empregando-se um equipamento Karl Fischer 870 Titrino Plus (Methrom, Suíça), previamente calibrado com água. Análises de atividade de água foram realizadas no medidor de atividade de água Aqua Lab 4TEV (Decagon Devices, Pullman, EUA), utilizando o eletrodo capacitivo. Os resultados foram expressos como média e desvio (medidas realizadas em triplicata).

2.3.8 Retenção de timol nas formulações líquidas e produto seco

A caracterização do óleo essencial de *Lippia sidoides* por CG-MS confirmou o timol como composto majoritário. Portanto, o timol foi selecionado como marcador químico a ser quantificado para monitorar o desenvolvimento do processo. A quantificação deste composto foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD). As condições cromatográficas foram baseadas no método proposto por Benelli, Souza e Oliveira (2013) e Leal e colaboradores (2003), com algumas modificações. As análises foram realizadas em cromatógrafo LC-20A Prominence Shimadzu com injetor automático, bomba LC-6A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e detector de arranjo de diodos (SPD-M20A), coluna C18 (Shimadzu Shim-Pack CLC(M) 4,6 mm x 25 cm, 5 µm), tempo de corrida de 20 minutos, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL, temperatura do forno de 30 °C. A fase móvel foi composta por água (A) e acetonitrila (B) segundo o gradiente: 0–2 min, 10% B; 2–7 min, aumento linear de B para 78%; 7–17 min, 78% B; 17–20 min, aumento linear de B para 100%; 20–23 min, 100% de B; 23–26 min, redução linear de B para 10%, 23–32 min, 10% de B. O cromatograma foi analisado a 276 nm.

O método de preparo das amostras consistiu na diluição de uma quantidade pré-determinada em metanol, sendo homogeneizadas em ultrassom e mantidas sobre agitação magnética por 30 minutos de forma a extrair o timol. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 5000 g, sendo o sobrenadante analisado por HPLC, após filtração em filtro Millipore 0.45 µm.

2.3.9 Morfologia das partículas

Fotomicrografias dos produtos secos foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (MEV-FEG). Amostras dos produtos secos são dispostas sobre suporte com fita adesiva de carbono (dupla face), revestidas com uma fina película de platina em um sputter coater, e analisadas em um MEV-FEG Inspect F-50 (FEI, Holanda) a 5 kV, em diferentes magnificações.

2.3.10 Desempenho da operação de secagem

O desempenho do *spray dryer* durante a secagem das formulações lipídicas incorporadas de OE de *Lippia sidoides* foi avaliado pela recuperação de produto,

determinada como a razão percentual entre a quantidade de material seco coletado pela quantidade total de sólidos alimentada (lipídios, tensoativos, OE e adjuvantes de secagem).

2.3.11 Análise estatística

Os resultados de várias respostas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para se determinar a existência de diferença significativa entre as médias (nível de significância de 5%).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Composição do óleo essencial de *Lippia sidoides* determinada por CG-MS

Os resultados obtidos por CG-MS permitiram a detecção de 27 compostos do OE de *Lippia sidoides*, sendo que 26 foram identificados com sucesso, como apresentado na Tabela 2.2. Esses 26 constituintes correspondem, a 99,94% da composição do óleo essencial. O timol, composto bioativo geralmente associado a várias das atividades biológicas atribuídas à *Lippia sidoides*, foi confirmado como o composto mais abundante no OE, respondendo por 68,2% do OE (ALMEIDA et al., 2010; FERNANDES et al., 2008). O p-cimeno (9,43%), o trans-Cariofileno (7,72%), o β -mirceno (2,84%), e o γ -terpineno (2,71%) são outros constituintes principais do OE. Juntos esses 5 compostos totalizam 90,92% da composição do OE da *Lippia sidoides*.

2.4.2 Desempenho do processo de secagem

A recuperação do produto foi a resposta empregada como medida do desempenho da operação de secagem. As perdas durante o processo são caracterizadas pela elutriação e adesão do material à câmara de secagem e ao ciclone. O valor médio de recuperação do produto determinado para a secagem das formulações com menor teor de adjuvante de secagem (menor razão G:P, Código c') foi de $44,7 \pm 2,0\%$. Para as formulações contendo maior quantidade de adjuvante de secagem (maior razão G:P; código c), essa resposta atingiu o valor de $50,9 \pm 3,4\%$. Elevada adesão do material atomizado ao ciclone foi observada em praticamente todas as operações de secagem. As formulações c', secas inicialmente a 100 °C exibiram grande adesão do material na câmara de secagem. Por esta razão, se optou por reduzir a temperatura de secagem em 10 °C para as secagens das formulações F9c a F12c, e uma pequena quantidade de dióxido de silício coloidal (1%)

foi acrescentada aos adjuvantes de secagem. Uma pequena elevação na recuperação do produto foi observada, porém os problemas de adesão e baixa recuperação do material persistiram.

Tabela 2.2. Composição do OE de *Lippia sidoides* determinada por CG-MS

Constituentes	Área (%)	Índice de Kovats
α - Tujeno	0,95	928
α -pineno	0,56	937
2- β -pineno	0,16	980
β -mirceno	2,84	989
α - Felandreno	0,07	1007
β -ocimeno	0,16	1011
α -terpineno	1,16	1018
para-cimeno	9,43	1025
Bornilen	0,64	1032
1,8-cineol	0,53	1033
β -cis-ocimeno	0,11	1037
β -trans-ocimeno	0,16	1048
γ -terpineno	2,71	1060
Acetato de linalil	0,35	1099
2-(Clorometil)tetrahidropirano	0,15	1145
<i>Umbelulona</i>	0,26	1170
L-4-terpineol	0,68	1180
<i>Timol metil eter</i>	0,97	1231
Timol	68,22	1297
α -Copaeno	0,34	1377
trans-Cariofileno	7,72	1420
Aromadendreno	0,46	1440
α - Cariofileno	0,34	1455
Ledeno	0,44	1493
δ -cadineno	0,10	1520
Óxido de cariopileno	0,43	1580

Composto listados na ordem de eluição

De acordo com Cortés-Rojas et al. (2014), a adesividade de pós em equipamentos de secagem é uma das maiores causas de perdas de produto, especialmente quando são processados materiais que possuem baixos valores de temperatura de transição vítrea, como é o caso de formulações de base lipídica. A análise dos resultados não evidenciou

diferenças relevantes na recuperação de produto devido a alteração dos lipídios líquidos e/ou tensoativos nas formulações.

2.4.3 Potencial zeta, tamanho de partículas dispersas, e índice de polidispersão das formulações líquidas e do produto seco redisperso em água

O potencial zeta (Z), o tamanho das gotículas dispersas (dp) e o índice de polidispersão (PI) são parâmetros muito usados para a caracterização de sistemas dispersos, incluindo emulsões, nanopartículas lipídica sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados (FANGUEIRO et al., 2014; MAHFOUDHI; KSOURI; HAMDI, 2016). O potencial zeta permite a caracterização de cargas na superfície das partículas, e assim fornece informações sobre forças repulsivas entre as gotículas dispersas (SHRESTHA; BALA; ARORA, 2014). É uma propriedade que permite inferir sobre a estabilidade física de emulsões e outros tipos de dispersões coloidais (KAUR et al., 2015). Em geral, valores de $|Z|$ maiores que 20 mV promovem a repulsão entre as partículas dispersas e preveem boa estabilidade física (DAS; NG; TAN, 2012). A Figura 2.1 apresenta os resultados experimentais de Z para as formulações de base lipídica avaliadas, antes e após a secagem (amostras redispersas à mesma concentração original). Os valores de potencial zeta das amostras redispersas estão, respectivamente, na faixa de -25,9 mV a -30,9 mV; exibindo pequenas diferenças em relação às formulações líquidas (-16,4 mV a -31,6 mV). Análise de variância seguida pelo teste de Tukey foi realizada para se avaliar a influência de algumas variáveis de composição e da secagem sobre Z .

Figura 2.1. Comparação entre os resultados experimentais do potencial zeta (Z) determinados para as formulações líquidas e produto seco redisperso em água. Letras/números iguais indicam diferença significativa (teste de Tukey, $p \leq 0,05$)

Os resultados apresentados na Figura 2.1 indicam que a alteração do sistema tensoativo de Tween[®] 80:Span[®] 80 (equilíbrio hidrofílico-lipofílico de 9,7; presentes nas formulações F9 e F11) para o Poloxamer[®] 188 (equilíbrio hidrofílico-lipofílico $\approx 29,0$; presente nas formulações F10 e F12), não evidenciou exercer influência significativa sobre Z, tanto para as formulações líquidas quanto para as amostras secas redispersas, independentemente de suas distintas propriedades. Muito provavelmente, este resultado se deve à pequena quantidade empregada de tensoativos para a composição das formulações. Quando comparada a dos demais componentes das formulações (lipídios e adjuvantes de secagem), a concentração de tensoativos empregada é bastante reduzida, portanto a mudança no sistema tensoativo não resulta em influência significativa sobre os valores de Z.

Por outro lado, o tipo de lipídio líquido adicionado influenciou significativamente no potencial zeta das formulações líquidas. Composições contendo o Labrasol[®] (F11 e F12) exibiram menores valores de Z (em módulo), independente dos adjuvantes de secagem.

Para as amostras secas redispersas, a redução nos valores de |Z| somente foi observada para as composições contendo maior proporção do adjuvante de secagem

(maior razão G:P, formulações F11c e F12c). Entretanto, as comparações entre os resultados obtidos para as amostras secas redispersas são um pouco mais complicadas, visto que outros fatores como, por exemplo, o grau de redispersão e a o teor de OE retido no produto exercem influência sobre os valores de Z. Comparado com o sistema branco (veja capítulo 1), a adição de OE promove um significativo aumento de $|Z|$. Portanto, os distintos teores de OE retidos nos produtos secos podem influir nos valores experimentais do potencial zeta.

Em relação à influência dos adjuvantes de secagem (formulações c' e c), pode-se observar a existência de significativas diferenças entre os valores de Z obtidos para as formulações c' e c. Para as formulações líquidas contendo ácido oleico (formulações F9 e F10), um pequeno incremento em $|Z|$ pode ser observado com o aumento da razão G:P do sistema adjuvante de secagem (e consequentemente do teor de sólidos – formulações c). Para as formulações contendo Labrasol® o comportamento oposto foi observado.

Para as amostras do produto seco redisperso, a maioria das formulações não demonstrou influência significativa dos adjuvantes de secagem sobre os valores de Z. Novamente, vale a pena salientar que para os pós secos, a análise é um pouco mais complexa, devido às diferenças entre o teor de OE retido no produto, e a operação de redispersão do produto, que podem exercer influência sobre os valores determinados.

Comparando-se os valores de Z entre as formulações originais e as secas (produto redisperso) foi possível observar que não houve diferença significativa para as composições formuladas com ácido oleico, independente dos demais componentes da formulação. Porém, diferenças marcantes devido ao processo secagem são evidentes para as composições contendo o Labrasol® (F11 e F12), cujos produtos secos e redispersos apresentaram valores consideravelmente maiores de Z.

Em síntese, considerando as análises de potencial zeta, pode-se supor que as formulações contendo ácido oleico como lipídio líquido (F9 e F10) tendem a possuir maior estabilidade comparada às obtidas com Labrasol®. Todavia, de um ponto de vista tecnológico, todos os sistemas podem ser considerados estáveis, já que apresentaram elevado grau de estabilidade para os ensaios realizados com as formulações lipídicas originais (sem a presença de adjuvantes de secagem), como pôde ser observado no capítulo 1.

A Figura 2.2 apresenta os resultados experimentais do tamanho médio das gotículas dispersas determinados para as formulações líquidas e produtos secos redispersos à mesma concentração inicial. Pode-se observar na Figura 2.2 que o tamanho médio das gotículas dispersas sofre influência da composição das formulações lipídicas. As formulações contendo Labrasol® (F11 e F12) exibem maiores tamanhos médios de gotículas dispersas comparativamente às compostas por ácido oleico, independente do adjuvante de secagem ($p \leq 0,05$), tanto para as formulações líquidas quanto para o produto seco redisperso.

Figura 2.2. Comparação entre os resultados experimentais do tamanho das gotículas no sistema disperso (dp) determinados para as formulações líquidas e produto seco redisperso em água. Letras/números iguais indicam diferença significativa (teste de Tukey, $p \leq 0,05$)

O tamanho médio das amostras secas redispersas estão na faixa de 525,3 nm a 1143 nm; e de 147 nm a 1531 nm para as formulações líquidas originais. Análise de variância seguida pelo teste de Tukey foi realizada para se avaliar a influência de variáveis da composição das formulações e da secagem destas sobre o tamanho das gotículas no sistema disperso (dp).

A alteração do sistema tensoativo adicionado às formulações (Tween® 80:Span® 80 para F9 e F11 ou Poloxamer® 188 para F10 e F12), apresentou influência significativa no tamanho de partículas apenas para as formulações contendo Labrasol® e obtidas com os adjuvantes de secagem com menor razão G:P (formulações líquidas F11c' e F12c'). Como pode ser observado na Figura 2.2 as formulações contendo Tween® 80:Span® 80 apresentaram maior tamanho de partícula quando comparadas às contendo Poloxamer® 188.

Para as formulações líquidas, o aumento na razão G:P (maior concentração de sólidos) tende a aumentar o tamanho médio das gotículas dispersas, porém esse efeito não foi exibido para os produtos secos redispersos. De uma forma geral, as formulações líquidas tendem a exibir tamanhos médios das gotículas dispersas ligeiramente inferiores aos apresentados para o produto seco redisperso. Este comportamento pode ser verificado para a maioria dos resultados experimentais apresentados na Figura 2.2, com exceção apenas da formulação F11c', cujo tamanho apresentado pela formulação líquida foi muito superior ao do produto seco redisperso, portanto um comportamento não esperado.

A Figura 2.3 apresenta a comparação entre os resultados experimentais do índice de polidispersão (PI) determinados para as formulações líquidas e produto seco redisperso. O índice de polidispersão indica a variação na distribuição do tamanho de partícula de uma amostra e varia de 0 a 1 (DAS; NG; TAN, 2012). De acordo com Maitani et al. (2001) índices de polidispersão maiores que 0,3 exibem um pronunciado grau de heterogeneidade no tamanho das gotículas dispersas. Neste trabalho, os valores experimentais de PI se mantiveram em torno de 0,5, indicativo de uma distribuição de tamanhos levemente heterogênea. Os resultados apresentados na Figura 2.3 indicam que as variáveis de formulação e o processo de secagem não exerceram influência significativa no PI. A exceção a esse comportamento foi apresentada entre as formulações líquidas F10c' e F10c, nas quais foi observado um aumento no PI com o aumento da razão G:P (maior teor de sólidos) dos adjuvantes de secagem.

Figura 2.3. Comparação entre os resultados experimentais do índice de polidispersão (PI) determinados para as formulações líquidas e produto seco redisperso em água. Letras/números iguais indicam diferença significativa (Tukey test, $p \leq 0,05$)

2.4.4 Umidade do produto, atividade de água e propriedades de fluidez

A Tabela 2.3 apresenta os resultados experimentais da umidade do produto (X_p), atividade de água (a_w), densidades aparente (ρ_b) e compactada ($\rho_{t,1250}$), razão de Hausner (H_R), e índice de Carr (I_c), das formulações lipídicas secas por *spray drying*.

Tabela 2.3. Umidade do produto, atividade de água e propriedades de fluidez dos produtos secos

Formulação	Xp (%)	A _w (-)	ρ _b (g/cm ³)	ρ _{t,1250} (g/cm ³)	H _r (-)	I _c (-)
F9c'	3,78 ± 0,05	-	0,13	0,17	1,32	32,00
F10c'	4,05 ± 0,03	-	0,13	0,17	1,31	30,77
F11c'	4,21 ± 0,08	-	0,13	0,18	1,35	34,62
F12c'	4,42 ± 0,07	-	0,15	0,19	1,27	26,67
F9c	4,45 ± 0,27	0,366 ± 0,011	0,17	0,22	1,33	33,33
F10c	5,20 ± 0,08	0,421 ± 0,002	0,15	0,21	1,38	37,93
F11c	4,40 ± 0,27	0,353 ± 0,011	0,17	0,23	1,34	33,93
F12c	4,73 ± 0,02	0,353 ± 0,008	0,19	0,24	1,25	25,00

O teor de umidade e a atividade de água são parâmetros relacionados às propriedades da composição alimentada e condições de secagem utilizadas (CORTÉS-ROJAS, 2015). A umidade do produto reflete a quantidade total de água presente no produto seco (FAZAELI et al., 2012). Apesar da análise estatística dos resultados indicar a existência de alguma influência significativa devido à alteração de alguns constituintes da formulação, por exemplo, tipo de tensoativo, lipídios líquidos, e mistura de adjuvantes de secagem, essas diferenças observadas não são relevantes do ponto de vista tecnológico. Os resultados experimentais de umidade do produto variaram de 3,78% a 5,20%, que são considerados adequados para a garantia da qualidade do produto.

A atividade de água (a_w) é um parâmetro considerado mais relevante que Xp, em termos de qualidade do produto. A atividade de água tem relação direta com a quantidade de água livre presente no produto seco, que consequentemente está disponível para promover o crescimento de microrganismos e para outras reações de degradação. Geralmente produtos com $a_w < 0,60$ são considerados como microbiologicamente estáveis (QUEK; CHOK; SWEDLUND, 2007). A atividade de água formalmente é definida pela Equação 2.3:

$$a_w = p/p_0 \quad (\text{Equação 2.3})$$

em que p é a pressão do vapor de água no produto, e p_0 é a pressão do vapor de água pura à mesma temperatura, porém existem outras definições alternativas.

Os valores de a_w determinados para os produtos secos com o código c exibiram bons resultados para atividade de água, com valores abaixo de 0,5, portanto dentro da faixa considerada segura do ponto de vista microbiológico; porém não foi possível determinar os valores de a_w para os produtos obtidos com a menor razão G:P (c').

Os valores de H_R e I_C foram determinados a partir dos valores experimentais das densidades “bulk” (ρ_b) e compactadas ($\rho_{t,1250}$), determinadas para as formulações lipídicas secas. Os parâmetros H_R e I_C são geralmente empregados como medidas indiretas para a caracterização da fluidez de sistemas particulados. Se baseiam na fricção e acomodação das partículas, sofrendo influência por exemplo do tamanho e distribuição granulométrica das partículas, e propriedades superficiais, como rugosidade, porosidade e geometria das partículas. Valores baixos de H_R e I_C indicam baixa coesividade e, portanto, boa fluidez (CORTÉS-ROJAS et al. 2014). Materiais pulverulentos que apresentam pequena fricção entre partículas adjacentes apresentam H_R por volta de 1,2. Valores de H_R superiores a 1,6 em geral são observados para partículas coesivas e de dimensão reduzida, apresentando escoamento restrito (AULTON, 2002). Materiais com $I_C < 10\%$ são considerados de excelente fluidez, de 11 a 15% boa fluidez, de 16 a 20% razoável, 21 a 25% aceitável, 25 a 31% ruim, 32 a 37% muito ruim, e $>38\%$ fluidez extremamente ruim (USP 29-NF 24, 2006).

Observa-se na Tabela 2.3 que as amostras das formulações lipídicas secas exibiram valores de I_C correspondentes a uma fluidez ruim e muito ruim, o que é comum para produtos secos por *spray drying* devido aos reduzidos diâmetros de partículas encontrados. As amostras contendo Labrasol® e Poloxamer® 188 (F12c' e F12c) apresentaram os menores valores de I_C , sendo classificadas como de escoamento ruim e aceitável, respectivamente.

2.4.5 Retenção do composto majoritário timol nas formulações secas

A retenção de voláteis durante a secagem por *spray drying* é dependente de fatores associados às propriedades físico-químicas dos compostos voláteis, dos constituintes das formulações de encapsulação, dos adjuvantes (ou carreadores) de secagem (materiais de parede), e das condições de secagem (REINECCIUS 2004; MADENE et al. 2006; FERNANDES et al. 2008). Em geral, elevados teores de sólidos nas composições de encapsulação possuem efeito positivo sobre a retenção dos voláteis durante a secagem (FERNANDES et al. 2008; TEIXEIRA et al. 2004). Uma explicação aceitável para esse

comportamento é que em baixas concentrações, compostos altamente voláteis tendem a evaporar de soluções aquosas mais rapidamente que a água. Entretanto, quando a concentração da suspensão é suficientemente elevada, o reverso é geralmente verdadeiro, ocorrendo uma evaporação preferencial da água (WALTON; MUMFORD, 1999).

Esse comportamento pode ser observado nos resultados experimentais para retenção de timol (Figura 2.4). As amostras contendo maior razão G:P (maior concentração de sólidos, com código c) exibiram um aumento considerável na retenção de timol, comparadas com as formulações c'. Esse comportamento pode ser justificado pela difusividade dos compostos através da membrana de encapsulação, que deve ser menor à elevada concentração de sólidos (EL-SAYED et al. 1990; CORTÉS-ROJAS et al. 2014). Entretanto, perdas significativas do ativo empregado como marcador do processo foram observadas para todas as condições de secagem. Por outro lado, as formulações lipídicas originais exibiram elevados valores de retenção do timol, exibindo valores até superiores a 82,0% (dados não apresentados). Uma possível explicação para as elevadas perdas durante a secagem, muito provavelmente, tem relação com o reduzido tamanho das gotículas dispersas nas formulações lipídicas (faixa nanométrica) e também no momento da atomização, o que pode elevar significativamente a área de transferência de calor e de massa em contato com o gás de secagem, favorecendo a evaporação dos compostos voláteis. A temperatura de secagem utilizada também deve ter contribuído para a perda de voláteis, considerando a baixa temperatura de transição vítrea das formulações, o que favorece aderência do produto às paredes do secador e do ciclone. Uma vez que a matriz de encapsulação atinge a transição vítrea, as taxas de degradação e difusão do óleo essencial através da matriz da partícula aumentam drasticamente (LI; ROOS; MIAO, 2016; RISCH; REINECCIUS, 1995; WHORTON, 1995). Assim, o emprego de condições de secagem mais amenas, ou um processo de secagem mais brando, como por exemplo a liofilização, certamente acarretará uma elevação na retenção de voláteis no produto seco, sendo este o objetivo de estudo do próximo capítulo (Capítulo 3).

Figura 2.4. Retenção do timol, composto majoritário no OE de *Lippia sidoides*, nas formulações lipídicas secas por *spray drying*

2.4.6 Morfologia do produto seco

A morfologia de produtos obtidos por *spray drying* sofre influência de diversos fatores, como por exemplo a cinética de secagem e os constituintes da formulação alimentada (CORTÉS-ROJAS et al., 2014). As características físico-químicas do material são determinantes para o seu comportamento durante a secagem e para a morfologia do produto formado (WALTON; MUMFORD, 1999). A Figura 2.5 apresenta resultados típicos de morfologia das partículas obtidas nessa etapa do trabalho, respectivamente para as formulações F11c' (A); F11c (B). Pode ser observado na Figura 2.5 uma predominância de partículas arredondadas, côncavas com superfícies porosas, comumente observadas para produtos secos por *spray drying* na presença de carboidratos (TONON; GROSSO; HUBINGER, 2011). Essas morfologias apresentam similaridade com resultados reportados por vários autores para a encapsulação de compostos voláteis por *spray drying* (PARAMITA et al. 2010; CORTÉS-ROJAS et al. 2014). Em geral, todas as partículas apresentam uma morfologia bastante similar (dados não apresentados), com a presença de partículas de tamanhos heterogêneos (independentemente da composição da formulação alimentada).

Figura 2.5. Morfologia típica dos produtos obtidos por *spray drying*: F11c' (A); F11c (B)

2.5 CONCLUSÕES

Os resultados reportados nesse capítulo mostraram que a encapsulação de OE de *Lippia sidoides* em formulações de base lipídica é uma tecnologia bastante viável, porém necessita de ajustes nas variáveis de formulação e de processo para se alcançar um produto final dentro das especificações desejáveis, principalmente com relação à retenção de timol. A secagem destas formulações por *spray drying* (por exemplo) mostra ser promissora, apesar das dificuldades inerentes devido à ocorrência de elevada aderência do produto nas paredes do equipamento de secagem, causadas pelo baixo ponto de fusão dos componentes lipídicos (cerca de 50 °C para o Gelucire 50/13) e baixa temperatura de transição vítrea da formulação encapsulante. Esses problemas acarretaram uma elevada perda de compostos voláteis, monitorada através da quantificação do composto majoritário do OE (timol) ao longo do processo, excedendo 80% em alguns experimentos. As formulações secas codificadas por c, nas quais adicionou-se adjuvante de secagem com maior razão G:P (e teor de sólidos), mostraram considerável incremento na retenção do timol comparativamente às formulações com menor razão G:P (c').

As diferenças entre as propriedades físico-químicas das formulações originais e amostras redispersas do produto seco não foram relevantes. O potencial zeta e o tamanho das partículas dispersas nas formulações líquidas e das amostras secas redispersas

sofreram influência dos constituintes das formulações e dos adjuvantes de secagem, e estão na faixa de -16,4 mV a -31,6 mV e 147 nm a 1531 nm; e de -25,9 mV a -30,9 mV, 525,3 nm a 1143 nm, respectivamente.

As formulações secas obtidas são prontamente redispersíveis em água, retornando às propriedades originais quando necessário, o que é uma vantagem significativa. Entretanto, ainda se faz necessário aprimorar o processo de produção, de forma a reduzir as perdas de voláteis durante a secagem.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3

Secagem de formulações de base lipídica incorporadas de óleo essencial de *Lippia sidoides* pelos processos *spray drying* e liofilização

Lista de figuras

Figura 3.1. Retenção de timol nos sistemas lipídicos secos por <i>spray drying</i> (SD) e liofilizados (LF)	89
Figura 3.2. Morfologias da formulação F9c seca por <i>spray drying</i> (A) e liofilizada (B).....	90

Lista de tabelas

Tabela 3.1. Composição das formulações de base lipídica (% m/m)	83
Tabela 3.2. Propriedade de fluidez, umidade do produto (Xp), e atividade de água (a_w) dos produtos secos; diâmetro médio (dp), índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (Z) das amostras redispersas	87

Lista de equações

Equação 3.1.....	84
Equação 3.2.....	84

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

a_w	Atividade de água
ρ_b	Densidade aparente
$\rho_{t,1250}$	Densidade compactada
dp	Tamanho de partícula
EOs	Essential oils
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detector de Arranjo de Diodos
H_R	Razão de Hausner
I_c	Índice de Carr (I_c)
LF	Liofilização

m_0	Massa inicial
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
OEs	Óleos essenciais
PI	Índice de polidispersão
q.s.p	Quantidade suficiente para
SD	<i>Spray drying</i>
v_0	Volume inicial
Xp	Umidade do produto
Z	Potencial zeta

RESUMO

Apresenta-se neste capítulo um estudo comparativo da secagem de formulações lipídicas incorporadas de óleo essencial de *Lippia sidoides* por duas diferentes tecnologias, o processo *spray drying* e a liofilização. Avaliou-se a influência da composição de encapsulação (adição de lipídio líquido: ácido oleico ou Labrasol[®], e dos tensoativos: Tween[®] 80:Span[®] 80 1:1, ou Poloxamer[®] 188) e do processo de secagem. Os produtos obtidos foram caracterizados pela determinação das propriedades físico-químicas (umidade do produto, atividade de água, propriedades de fluidez, potencial Zeta, tamanho de partículas e polidispersividade do produto seco redisperso à mesma concentração inicial) e retenção do composto ativo majoritário (timol). Os adjuvantes de secagem, goma arábica, proteína do soro de leite e dióxido de silício coloidal foram adicionados em proporções pré-definidas à formulação de encapsulação, de forma a aprimorar o desempenho da secagem e propriedades do produto. Nas condições investigadas, os resultados evidenciaram uma superioridade da secagem por liofilização, que gerou um produto com elevada retenção de OE, menor umidade e atividade de água. O produto obtido por *spray drying* apresentou elevada perda de voláteis, superior a 70%, evidenciando necessidade de melhoramento do processo.

ABSTRACT

This chapter presents a comparative study about drying of lipid based formulations incorporated by essential oil of *Lippia sidoides*, by two different technologies: spray drying and freeze-drying processes. The influence of the encapsulation composition (addition of liquid lipid: oleic acid or Labrasol[®], and the surfactants: Tween[®] 80: Span[®]

80 1: 1, or Poloxamer[®] 188) and the drying process was evaluated. The products obtained were characterized by the physicochemical properties (product moisture, water activity, flow properties and Zeta potential, particle size and polydispersity index of the redispersed dry product at the same initial concentration) and retention of the major active compound (thymol). The drying carriers gum arabic, whey protein and colloidal silicon dioxide were added to the encapsulation formulations in pre-defined proportions, to improve drying performance and product properties. Under the conditions investigated, the results showed a superiority of freeze drying process, which generated a product with high EO retention, lower humidity and water activity. The product formed by spray drying presented high loss of volatiles, higher than 70%, evidencing the need for process optimization.

3.1 INTRODUÇÃO

Óleos essenciais (OEs) são compostos voláteis, hidrofóbicos, produzidos pelo metabolismo secundário de plantas. Devido à sua composição química complexa, muitas vezes composta por mais de 100 compostos terpênicos diferentes, os OEs têm um amplo espectro de atividade biológica e antimicrobiana (antibacterianos, antifúngicos, antivirais, controle de pragas, repelentes de insetos) (EL ASBAHANI et al., 2015), além de propriedades medicinais, como analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos, anestésicos locais e antioxidantes (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010; BAKKALI et al., 2008; BILIA et al., 2014; BUCHBAUER et al., 1993). Devido a essa vasta gama de propriedades, OEs apresentam grande importância em diversos setores industriais, como por exemplo o farmacêutico, alimentício, cosmético, sanitário, agricultura e pecuária.

Além dos compostos terpênicos (mono, di e sesquiterpenos), OEs são constituídos também de compostos oxigenados (ex. álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, éteres fenólicos, e outros) (LOZA-TAVERA, 1999; MATOS; OLIVEIRA, 1998). Esses constituintes, em geral, são sensíveis ao oxigênio, luz, calor e umidade, tornando os óleos essenciais compostos frágeis e voláteis, facilmente degradáveis caso não estejam protegidos dos fatores externos (EL ASBAHANI et al., 2015). Sua baixa solubilidade em água é outra restrição para seu emprego em várias potenciais aplicações (BILIA et al., 2014; COIMBRA et al., 2011; DORMAN; DEANS, 2000). A encapsulação de óleos essenciais em

carreadores lipídicos surge como uma solução efetiva para melhorar as propriedades e garantir maior estabilidade aos OEs.

A desidratação dessas composições podem gerar dispersões secas, com elevada eficiência de encapsulação, solubilidade e maior estabilidade frente às formas líquidas, podendo ser redispersas quando necessário (BOUREZG et al., 2012; CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014; JOSHI; MÜLLER, 2009). Diversos processos de secagem podem ser utilizados, com destaque para o *spray drying* (ou secagem por atomização) e a liofilização (GALLARATE et al., 2009; HERNANDEZ SANCHEZ; CUVELIER; TURCHIULI, 2015).

Dentre as plantas aromáticas com grande potencial para geração de produtos tecnológicos destaca-se a *Lippia sidoides*, popularmente conhecida como “alecrim-pimenta”, nativa da região semiárida do nordeste brasileiro. É amplamente empregada na medicina popular como antisséptico local de pele e mucosas. Seu óleo essencial possui comprovadas propriedades fungicida, bactericida, larvicida, acaricida, anti-inflamatória, dentre outras (CAVALCANTI et al., 2010; NUNES et al., 2005; PINTO et al., 2016; VERAS et al., 2013b). Seu efeito terapêutico é atribuído principalmente à presença de seu composto majoritário, timol (MATOS; OLIVEIRA, 1998; VERAS et al., 2012, 2014).

3.2 OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo é o estudo comparativo da secagem de formulações de base lipídicas com adição do óleo essencial de *Lippia sidoides* pelos processos *spray drying* e liofilização, bem como avaliar as propriedades físico-químicas e eficiência de retenção do composto ativo majoritário (timol) nos produtos gerados.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Material

Óleo essencial de *Lippia sidoides* (PRONAT – Produtos Naturais LTDA, Brasil), Gelucire® 50/13 (Gattefossé, França), ácido oleico (LabSynth, Brasil), Labrasol® (Gattefossé, France), Span® 80 (Sigma-Aldrich, USA), Tween® 80 (LabSynth, Brasil), Poloxamer® 188 (Kolliphor P 188 Micro - BASF, Brasil), proteína do soro do leite (Arla

Foods Ingredientes S.A., Argentina), goma arábica (NEXIRA, Brasil), Aerosil® 200 (Evonik Degussa, Alemanha), metanol e timol (Sigma-Aldrich, USA), água milli-Q®.

3.3.2 Preparação dos sistemas lipídicos

Avaliou-se a influência de constituintes da composição de encapsulação (adição de lipídio líquido: ácido oleico ou Labrasol®, e dos tensoativos: Tween® 80:Span® 80 1:1, ou Poloxamer® 188). Os adjuvantes de secagem goma arábica (Fibregum® B), proteína do soro de leite (Lacprodan®) e dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200) foram adicionados à composição de encapsulação, de forma a aprimorar o desempenho da secagem e propriedades do produto, em proporções pré-definidas. Foram preparadas 04 diferentes formulações, sendo a composição apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição das formulações de base lipídica (% m/m)

Função	Componente	Formulação			
		F9c	F10c	F11c	F12c
Ativo	OE <i>Lippia sidoides</i>	3,0	3,0	3,0	3,0
Lipídio anfifílico	Gelucire® 50/13	6,0	6,0	6,0	6,0
Lipídio líquido	Ácido oleico	1,0	1,0	-	-
Lipídio líquido	Labrasol®	-	-	1,0	1,0
Tensoativo	Tween® 80	0,35	-	0,35	-
	Span® 80	0,35	-	0,35	-
	Poloxamer® 188	-	0,7	-	0,7
	Fibregum® B	8,6	8,6	8,6	8,6
Adjuvante de secagem	Lacprodan®	1,1	1,1	1,1	1,1
	Aerosil® 200	1,1	1,1	1,1	1,1

*água: q.s.p. 100 g

As formulações foram preparadas pela técnica de inversão de fases a quente. O lipídio Gelucire® 50/13 foi aquecido a 10 °C acima de seu ponto de fusão, e misturado com os lipídios líquidos ácido oleico ou Labrasol®. Os agentes tensoativos (Tween® 80:Span® 80 ou Poloxamer® 188) foram dissolvidos em água e aquecidos à mesma temperatura da fase lipídica. O óleo essencial e a fase aquosa foram lentamente adicionados à fase lipídica, mantidos sob agitação magnética, e então homogeneizados

em UltraTurrax T18, a 18.000 rpm for 2 min. A emulsão O/A resultante foi então submetida à homogeneização por ultrassom a 20 kHz de frequência, intensidade de 70% durante 2 minutos (SONICS VCX-750, sonda de 13 mm). Os adjuvantes de secagem foram incorporados lentamente às formulações líquidas, sob agitação e, posteriormente foram submetidos ao processo de secagem.

3.3.3 Secagem

A secagem dos sistemas lipídicos foi realizada pelos processos *spray drying* e liofilização.

A secagem por *spray drying* foi realizado em um *spray dryer* SD-05 (Lab-Plant Ltd, Huddersfield, UK – diâmetro do atomizador de 1 mm), operando à uma vazão de alimentação da formulação lipídica de 4 g/min, pressão e vazão do ar de atomização de 3 bar e 17 L/min, respectivamente, vazão do ar de secagem de 60 m³/h e temperatura de secagem de 90°C.

O processo de liofilização foi realizado em um liofilizador modelo SNL108B, da Thermo Fisher Scientific contendo uma unidade liofilizadora Micromodulyo 1,5 L (305x330x432 mm), um condensador em aço inoxidável um compressor de 1/4 hp e potência de 0,30 kw, uma bomba de ultra-vácuo LyoPump VLP195FD, frascos para liofilização e válvulas independentes. As amostras foram congeladas a -20 °C por 12 horas em tubos falcon de 50 mL, e posteriormente a -80 °C por mais 4 horas, sendo então liofilizadas por 48 horas.

3.3.4 Propriedades de fluidez do produto seco

A razão de Hausner (H_R) e o índice de Carr's (I_C) foram utilizados como propriedades de fluidez. Esses parâmetros são determinados segundo as Equações 3.1 e 3.2, descritas a seguir:

$$H_R = \frac{\rho_{t,1250}}{\rho_b} \quad (\text{Equação 3.1})$$

$$I_C = \frac{\rho_{t,1250} - \rho_b}{\rho_{t,1250}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.2})$$

em que ρ_b é a densidade aparente ou “bulk” ($\rho_b = m_0/V_0$), $\rho_{t,1250}$ é a densidade compactada, determinada usando o volume ocupado por uma amostra de pó em uma

proveta após 1250 quedas a partir de uma distância de 14.0 mm. O equipamento Caleva[®] (*Tapped Density Tester*, TDT - Frankfurt, Alemanha) foi empregado para a determinação das densidades aparente e compactada, de acordo com o método descrito na farmacopeia americana (USP 29-NF 24, 2006).

3.3.5 Umidade e atividade de água do produto seco

O conteúdo de umidade dos produtos secos foi determinado pelo método de titulação por Karl Fischer, empregando-se um equipamento Karl Fischer 870 Titrino Plus (Methrom, Suíça), previamente calibrado com água. Análises de atividade de água foram realizadas no medidor de atividade de água Aqua Lab 4TEV (Decagon Devices, Pullman – USA), utilizando o eletrodo capacitivo. Os resultados foram expressos como média e desvio (medidas realizadas em triplicata).

3.3.6 Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta do produto seco redisperso em água

O tamanho de partículas, índice de polidispersão e o potencial zeta foram determinadas em um equipamento Malvern Zetasizer Nanoseries ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido), pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (dp e PI) e da mobilidade eletroforética (Z). Amostras dos produtos secos foram redispersas em água milli-Q, à mesma concentração original, e mantidas sob agitação por 30 minutos e diluídas 1:200 (v/v), antes das determinações (medidas realizadas em triplicata).

3.3.7 Retenção de timol nos produtos secos

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) foi utilizada para monitorar o timol (composto majoritário no óleo essencial de *Lippia sidoides*) nos produtos obtidos por *spray drying* e por liofilização. As condições cromatográficas foram baseadas no método proposto por Benelli, Souza e Oliveira (2013) e Leal e colaboradores (2003), com algumas modificações. As análises foram realizadas em cromatógrafo LC-20A Prominence Shimadzu com injetor automático, bomba LC-6A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e detector de arranjo de diodos (SPD-M20A), coluna C18 (Shimadzu Shim-Pack CLC(M) 4,6 mm x 25 cm, 5 µm), tempo de corrida de 20 minutos, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL, temperatura do forno de 30 °C. A fase móvel foi composta por água (A) e acetonitrila (B)

segundo o gradiente: 0–2 min, 10% B; 2–7 min, aumento linear de B para 78%; 7–17 min, 78% B; 17–20 min, aumento linear de B para 100%; 20–23 min, 100% de B; 23–26 min, redução linear de B para 10%, 23–32 min, 10% de B. O cromatograma foi analisado a 276 nm.

Amostras do produto seco foram misturadas com metanol, homogeneizadas em ultrassom e mantidas sobre agitação magnética por 30 minutos de forma a extrair o timol. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 5000 g, sendo o sobrenadante analisado por HPLC, após filtração em filtro Millipore 0.45 µm.

3.3.8 Morfologia das partículas

Fotomicrografias dos produtos secos foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (MEV-FEG). Amostras dos produtos secos são dispostas sobre suporte com fita adesiva de carbono (dupla face), revestidas com uma fina película de platina em um sputter coater, e analisadas em um MEV-FEG Inspect F-50 (FEI, Holanda) a 5 kV, em diferentes magnificações.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Propriedade físico-químicas do produto

A Tabela 3.2 apresenta os resultados experimentais da razão de Hausner (H_R), índice de Carr's (I_c), umidade do produto (X_p), e atividade de água (a_w) dos produtos obtidos pela secagem em *spray drying* (SD) e por liofilização (LF), e também o diâmetro médio (d_p), o índice de polidispersão (PI) e o potencial zeta (Z), das amostras secas redispersas em água mill-Q à mesma concentração original.

Tabela 3.2. Propriedade de fluidez, umidade do produto (X_p), e atividade de água (a_w) dos produtos secos; diâmetro médio (dp), índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (Z) das amostras redispersas

Amostras	H_R (-)	I_c (-)	X_p (%)	a_w (-)	dp (nm)	PI (-)	Z (mV)
F9c-SD	1,33	33,3	4,45 ± 0,27	0,366 ± 0,011	525,3 ± 19,5	0,636 ± 0,118	-30,8 ± 0,8
F10c-SD	1,38	37,9	5,20 ± 0,08	0,421 ± 0,002	582,1 ± 34,5	0,589 ± 0,058	-30,9 ± 0,8
F11c-SD	1,34	33,9	4,40 ± 0,27	0,353 ± 0,011	954,6 ± 9,8	0,626 ± 0,092	-25,9 ± 0,9
F12c-SD	1,25	25,0	4,73 ± 0,02	0,353 ± 0,008	1143,0 ± 18,4	0,652 ± 0,088	-26,5 ± 1,7
F9c-LF	1,40	40,0	1,20 ± 0,02	0,041 ± 0,004	493,0 ± 32,1	0,522 ± 0,073	-34,4 ± 0,9
F10c-LF	1,31	31,2	1,25 ± 0,06	0,053 ± 0,002	522,7 ± 27,5	0,559 ± 0,130	-33,7 ± 1,7
F11c-LF	1,38	37,9	1,17 ± 0,20	0,070 ± 0,000	480,4 ± 27,9	0,598 ± 0,083	-26,3 ± 0,7
F12c-LF	1,38	37,9	1,38 ± 0,11	0,052 ± 0,016	606,3 ± 14,6	0,552 ± 0,102	-26,3 ± 0,6

Os valores de H_R e I_C são comumente associados ao comportamento de fluidez de sistemas particulados, baseados na fricção e acomodação das partículas, e sofrem influência de diversos fatores, como por exemplo as propriedades superficiais, tamanho médio e distribuição granulométrica das partículas (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014). Valores baixos indicam baixa coesividade e, portanto, fluxo melhor. Valores abaixo de 16 para o índice de Carr e abaixo de 1,2 para fator de Hausner são considerados pós de bom fluxo (AULTON, 2002). Os resultados experimentais de H_R e I_C apresentados na Tabela 3.2 evidenciam que, independente do processo de secagem, os produtos secos apresentaram baixa fluidez.

Por outro lado, pode se observar na Tabela 3.2 que o processo de secagem exerceu influência sobre os resultados experimentais de X_p e a_w , sendo mais elevados para os produtos gerados por *spray drying*.

Amostras dos produtos obtidos por ambos os processos, quando redispersas em água à mesma concentração original, exibem partículas com tamanho médio na escala nanométrica e índice de polidispersão em torno de 0,60, evidência de uma distribuição de tamanhos um pouco heterogênea. Estes resultados são próximos dos valores determinados para a formulação líquida original (dados não apresentados), indicando uma elevada capacidade de redispersão do produto seco. A composição da formulação lipídica exerceu influência sobre o tamanho de partícula do produto redisperso. Maiores tamanhos médios de partículas foram observados para a formulação F12c, precedida pela F11c, ambas contendo o Labrasol® como lipídio líquido; principalmente para o produto seco por *spray drying*.

O potencial eletro cinético, também denominado de potencial zeta (Z), é um parâmetro geralmente associado com a estabilidade física de sistemas coloidais, como por exemplo emulsões e outras dispersões lipídicas. Um aumento no valor absoluto do potencial zeta está correlacionado com menor tendência à floculação. Geralmente valores elevados de potencial zeta ($|Z| > 30$) podem estabilizar emulsões prevenindo coalescência das partículas e aumentando a repulsão eletrostática entre a superfície delas (ZANATTA et al., 2010). Valores de $|Z| \geq 20$ foram obtidos para as amostras redispersas dos produtos SD (*spray drying*) e LF (liofilizado). A constituição da formulação lipídica exerceu significativo efeito em Z ; enquanto que a influência do processo de secagem foi negligível, muito provavelmente devido a diferenças na quantidade de óleo essencial retido.

As formulações contendo ácido oleico como lipídio líquido apresentaram valores mais elevados de $|Z|$, comparado com os contendo Labrasol[®], o que pode ser evidência de uma maior estabilidade física do sistema redisperso.

3.4.2 Retenção de timol nas formulações secas

A Figura 3.1 apresenta os resultados experimentais da retenção do composto majoritário timol nos sistemas lipídicos SD e LF e demonstra haver um impacto significativo do processo de secagem nessa resposta. A retenção de compostos voláteis durante a secagem depende de diversas variáveis, como por exemplo as propriedades físico-químicas da formulação original e das partículas secas, processo e condições de secagem, volatilidade do composto, entre outros. A liofilização ocorre a temperaturas baixas, o que muito certamente reduziu a volatilização do óleo essencial durante o processo de secagem, o qual deve se difundir através de uma barreira de lipídio congelado. Apesar do processo de liofilização apresentar um tempo de processo mais longo, consumir maior quantidade de energia e apresentar maior custo, a qualidade do produto obtido pode justificar sua utilização, principalmente em produtos farmacêuticos. Para uma secagem por *spray drying* mais eficiente, com maior retenção de óleo essencial, ainda são necessárias melhorias na formulação líquida (alteração nos lipídios, sistema tensoativo e carreadores de secagem utilizados) para que o óleo essencial permaneça retido na partícula, reduzindo sua volatilização durante o processo de secagem no *spray dryer*.

Figura 3.1. Retenção de timol nos sistemas lipídicos secos por spray drying (SD) e liofilizados (LF)

3.4.3. Morfologia do produto seco

As fotomicrografias obtidas por MEV-FEG (Figura 3.2), mostram que a morfologia das partículas dos produtos secos sofre influência do processo de secagem, como esperado. Partículas arredondadas, côncavas com superfícies rugosas foram geradas pelo processo SD (Figura 3.2.A); enquanto que os produtos obtidos por liofilização (LF) exibem superfície plana com forma de flocos e lascas (Figura 3.2.B). Essas diferenças são esperadas devido aos distintos mecanismos de secagem envolvidos nos processos. A secagem em *spray dryer* tem início pela atomização da formulação, a superfície das gotículas atomizadas começa a secar e formar uma película que, com a evaporação da umidade em seu interior, podem romper, murchar e inflar novamente, até que toda a umidade seja evaporada (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014; EL-SAYED; WALLACK; KING, 1990; WALTON; MUMFORD, 1999), esse processo resulta na morfologia arredondada, rugosa e côncava das partículas. Já a secagem por liofilização não ocorre a atomização, a perda de água se dá por sublimação, o material liofilizado apresenta-se como blocos compactos, o que condiz com a forma assumida pelo material desidratado (flocos e lascas irregulares).

Figura 3.2. Morfologias da formulação F9c seca por *spray drying* (A) e liofilizada (B)

3.5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados expostos nesse capítulo, pode-se concluir que produtos com alto grau de redispersão foram gerados pelos processos SD e LF, exibindo dp, PI e Z próximos dos valores determinados para a formulação original. O produto seco gerado pelo processo de liofilização apresentou maior retenção de timol ($\geq 80\%$), em relação ao processo SD ($\cong 21\%$).

24%); exibindo também menor umidade e atividade de água. Os processos de secagem exercem grande influência na morfologia dos produtos secos.

CAPÍTULO 4

CAPÍTULO 4

Estudo da influência de variáveis de processamento sobre as propriedades físico-químicas de composições lipídicas contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* utilizando técnicas de planejamento experimental

Lista de figuras

Figura 4.1. Esquema do planejamento experimental Box-Behnken realizado.....	99
Figura 4.2. Superfícies de resposta da densidade de compactação, d_c (A) e índice de Carr, I_c (B) em função da temperatura de secagem, $T_{g,c}$ e da porcentagem de Compritol®888 ATO, F_c e fator de Hausner, H_R , em função da temperatura de secagem, $T_{g,c}$ e da relação MD/GA, Ad_c , com as demais variáveis fixadas no valor médio	108
Figura 4.3. Superfície de resposta da retenção de timol (A) em função da temperatura de secagem, $T_{g,c}$ e da porcentagem de Compritol®888 ATO, F_c , com razão MD/GA fixada no valor médio; e diagrama de Pareto (B).....	112
Figura 4.4. Superfície de resposta da retenção de timol (A) em função da concentração de Compritol®888 ATO, F_c , e da razão MD/GA, Ad_c ; e diagrama de Pareto (B).....	118
Figura 4.5. Diagrama de Pareto da retenção de timol em função da razão da em função da concentração de Compritol®888 ATO, F_c , da razão MD-GA/Formulação, Ad_c , e processo de produção, P_c (amostras líquidas ou liofilizadas).....	119

Lista de tabelas

Tabela 4.1. Fatores e seus níveis para o planejamento Box-Behnken.....	99
Tabela 4.2. Planejamento experimental Box-Behnken	99
Tabela 4.3. Composição das formulações base (sem adjuvantes de secagem) (% m/m)	100
Tabela 4.4. Composição das soluções de adjuvantes de secagem a serem incorporadas em cada formulação (% m/m).....	101

Tabela 4.5. Composição das formulações lipídicas contendo carreadores de secagem (% m/m)	101
Tabela 4.6. Planejamento experimental 3 ²	102
Tabela 4.7. Resultados experimentais obtidos de acordo com as variáveis estudadas nas secagens por <i>spray drying</i>	105
Tabela 4.8. Análise de regressão ajustada para as propriedades do produto seco em <i>spray dryer</i> , incluindo a interação entre as variáveis (variáveis codificadas)	106
Tabela 4.9. Resultados experimentais obtidos de acordo com as variáveis avaliadas na secagem por liofilização	113
Tabela 4.10. Resultados experimentais obtidos para os fatores estudados nas formulações líquidas.....	114
Tabela 4.11. Análise de regressão realizada para as propriedades do produto liofilizado em comparação com a formulação líquida, incluindo a interação entre as variáveis (variáveis codificadas)	115

Lista de equações

Equação 4.1	102
Equação 4.2	103
Equação 4.3	103

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

α	Nível de significância
a_w	Atividade de água
ρ_b	Densidade aparente
$\rho_{t,1250}$	Densidade compactada
d_p	Tamanho de partícula
EOs	Essential oils
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detector de Arranjo de Diodos
H_R	Razão de Hausner
I_c	Índice de Carr (I_c)
m_0	Massa inicial
MD/GA	Razão maltodextrina/goma arábica
O/A	Emulsão óleo em água

OEs	Óleos essenciais
P_{atm}	Pressão de atomização
PI	Índice de polidispersão
q.s.p	Quantidade suficiente para
T_g	Temperatura gás de entrada
v_0	Volume inicial
W_{atm}	Vazão do ar de atomização
W_g	Vazão do ar de secagem
W_{susp}	Vazão de alimentação da formulação líquida
X_p	Umidade do produto
Z	Potencial zeta

RESUMO

Essa etapa do trabalho consistiu na elaboração de formulações lipídicas contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* como fonte de ativos para se estudar a influência das variáveis de composição das formulações e do processo de secagem das dispersões lipídicas sobre as propriedades físicas e químicas dos produtos gerados. Avaliou-se a influência das concentrações de lipídios (diferentes proporções de Compritol®888 ATO) e de adjuvantes de secagem (diferentes proporções da razão maltodextrina/goma arábica) sobre as propriedades dos produtos secos por *spray drying* (com variação na temperatura de secagem visando analisar também sua influência sobre o produto), liofilizados e também na formulação líquida original. As formulações líquidas e secas foram caracterizados através da determinação da porcentagem de retenção de timol, composto ativo majoritário no óleo essencial de *Lippia sidoides*, tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta (para todas as amostras); umidade e atividade de água para todos os produtos secos e determinação de propriedades de fluxo e recuperação de pó (somente os produtos secos por *spray drying*). As secagens por *spray drying* e liofilização foram realizadas de acordo com um planejamento experimental de três fatores e três níveis tipo Box-Behnken e outro planejamento fatorial 3^2 , respectivamente, para o estudo da influência das variáveis de processamento sobre as propriedades físico-químicas dos produtos formados. Os pós liofilizados apresentaram maior retenção de timol e valores de umidade e atividade de água menores, indicando um processo mais adequado para secagem de formulações lipídicas, que apresentam baixos valores de temperatura de transição vítrea.

ABSTRACT

This stage of the work consisted in manufacturing lipid formulations containing essential oil of *Lippia sidoides* as active source to study the influence of the composition variables of the formulations and the drying process of the lipid dispersions on the physical and chemical properties presented by the final products. The study evaluated the influence of lipid concentrations (different ratios of Compritol®888 ATO) and drying carriers (different proportions of the maltodextrin / gum arabic ratio) on the properties of the dried powders by spray drying (varying inlet temperature, aiming to analyze its influence on the final product), freeze drying and on the original liquid formulation. The products obtained were analyzed regarding physicochemical properties (particle size, polydispersity index and zeta potential for all samples, moisture content and water activity for all powders and flow properties for spray dried powders), as well as powder recovery (spray dried powders only) and to the percentage retention of thymol, the major active compound in the essential oil of *Lippia sidoides*. Spray drying and freeze drying were performed according to an experimental design of three factors and three levels of Box-Behnken and another factorial design 3^2 , respectively, to study the influence of processing variables on the physicochemical properties of the obtained products.. Freeze-dried powders presented higher thymol retention and lower moisture and water activity values, indicating a very adequate process for dehydration of lipid formulations, which present low values of glass transition temperature.

4.1 INTRODUÇÃO

Lippia sidoides, popularmente conhecida como “alecrim-pimenta”, é um arbusto nativo da região nordeste do Brasil. Seu óleo essencial (OE) é rico em timol (50-70%), composto fenólico com comprovada atividade antifúngica e antibacteriana. Seu óleo essencial também apresenta atividade inseticida, acaricida, antileishmania, larvicida, anti-inflamatória, dentre outras (CARVALHO et al., 2003, 2013; CAVALCANTI et al., 2010; FARIAS-JUNIOR et al., 2012; LIMA et al., 2013; OLIVEIRA; PAULA; PAULA, 2014; SANTOS et al., 2015; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012; VERAS et al., 2013a).

Devido a essa vasta gama de efeitos biológicos, os OEs têm atraído fortes interesses por parte das indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia, química e agroindústria. No entanto, OEs são misturas de substâncias lipofílicas e voláteis, susceptíveis à degradação por fatores físicos (luz, temperatura, pH, etc.) e químicos (ar, umidade, etc.) (BASER; BUCHBAUER, 2015; PINTO et al., 2016). Tais características são limitantes e muitas vezes comprometem seu

uso na indústria. Como alternativa para solucionar essa limitação surge a micro e nanoencapsulação de óleos essenciais, estratégias que visam preservar e proteger suas propriedades funcionais, além de permitir uma liberação controlada do ativo em um dado sistema físico ou biológico (OLIVEIRA; PAULA; PAULA, 2014). Esse processo consiste na incorporação de uma substância, como material do núcleo, recoberto por uma membrana (GHAYEMPOUR; MONTAZER, 2016). Existem vários sistemas de encapsulação de ativos, tais como nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), microemulsões e lipossomas. A escolha do sistema depende das propriedades físico-químicas do material a ser encapsulado (WEISS et al., 2009). Fatores como o tipo de lipídio, o tensoativo, o processo de emulsificação e condições de secagem/resfriamento podem influenciar nas propriedades das partículas formadas (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014). Por essa razão é importante examinar cada etapa do processo de produção, a fim de se obter partículas com as propriedades físico-químicas desejáveis e com elevada eficiência de retenção do composto ativo.

O presente estudo consistiu em se utilizar técnicas de planejamento experimental, com o objetivo de influência de variáveis de processamento sobre as propriedades físico-químicas de formulações lipídicas contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*. As formulações foram acrescidas de diferentes proporções e composições de adjuvantes de secagem, sendo empregadas duas diferentes técnicas de secagem: *spray drying* e liofilização. Dois diferentes planejamentos experimentais foram empregados, dependendo do processo adotado: O planejamento experimental de três fatores e três níveis tipo Box-Behnken foi empregado na análise do produto obtido por *spray drying*, enquanto que um planejamento 3^2 foi utilizado para o estudo das formulações líquidas e do produto seco por liofilização.

4.2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da composição das formulações (tipos e concentrações de lipídios e adjuvantes de secagem) e de processos de secagem sobre as propriedades físico-químicas dos produtos obtidos, empregando técnicas de planejamento estatístico de experimentos.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Material

Óleo essencial de *Lippia sidoides* (PRONAT – Produtos Naturais LTDA, Brasil), Gelucire® 50/13 (Gattefossé, França), Compritol® 888 ATO (behenato de glicerila, Brasquim, Brasil), ácido oleico (LabSynth, Brasil), Poloxamer® 188 (Kolliphor P 188 Micro - BASF, Brasil), maltodextrina, goma arábica (Colloides Naturels, Brasil), Aerosil® 200 (Evonik Degussa, Alemanha), metanol HPLC e acetonitrila HPLC (ambos adquiridos de Sigma-Aldrich, EUA), água ultrapura Milli-Q (Millipore, EUA).

4.3.2 Planejamento experimental

Técnicas de planejamento estatístico de experimento foram utilizadas para se avaliar a influência das variáveis de processamento sobre as propriedades físico-químicas dos produtos formados.

Um planejamento experimental de três fatores e três níveis tipo Box-Behnken (BOX; BEHNKEN, 1960; BOX; HUNTER; HUNTER, 1978) foi empregado para se investigar a influência de variáveis de composição e de processo durante a secagem de formulações lipídicas por *spray drying*. Este modelo de planejamento foi escolhido pois permite a construção de um modelo polinomial de segunda ordem para otimizar um processo com um menor número de experimentos. Este modelo inclui pelo menos um nível intermediário (0), estabelecido para cada combinação de fatores. O modelo apresenta a seguinte forma:

$$Y_i = a_0 + a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_3 + a_4 X_1 X_2 + a_5 X_2 X_3 + a_6 X_1 X_3 + a_7 (X_1)^2 + a_8 (X_2)^2 + a_9 (X_3)^2 + E$$

em que $a_0 - a_9$ são os coeficientes de regressão, X_1-X_3 denota os fatores, Y é a resposta medida associada com as combinações dos fatores e E representa o erro experimental. No estudo, os fatores foram codificados em três níveis: baixo (-1,0), intermediário (0,0) e alto (1,0). A Tabela 4.1 resume os fatores e seus respectivos níveis e a Tabela 4.2 esquematiza o desenvolvimento experimental Box-Behnken. Os fatores em estudo incluem:

- Porcentagem de Compritol® 888 ATO (F), que consistiu na quantidade de Compritol® 888 ATO em relação ao total de lipídios sólidos da formulação. Os valores estudados foram: 0%, 40% e 80% (isso permitiu, em tese, avaliar diferentes sistemas lipídicos, em virtude do caráter hidrofóbico/hidrofílico dos lipídios usados).

- Razão MD-GA/Formulação (Ad), que consistiu na relação entre as quantidades (em massa) de maltodextrina mais goma arábica e o total de constituintes sólidos da formulação. As razões utilizadas foram: 0,90; 1,80 e 2,70.
- Temperatura de secagem (Tg), que representou a temperatura do gás de entrada na secagem por *spray drying*. As temperaturas utilizadas foram: 90°C, 120°C e 150°C.

Tabela 4.1. Fatores e seus níveis para o planejamento Box-Behnken

Fatores	Níveis		
	-1,0	0,0	1,0
Porcentagem de Compritol® 888 ATO (%)	0	40	80
Razão maltodextrina-goma arábica/formulação	0,90	1,80	2,70
Temperatura de secagem (°C)	90	120	150

Tabela 4.2. Planejamento experimental Box-Behnken

Experimento nº	Lipídio	Razão	Temperatura de
	sólido	Adjuvantes/formulação	secagem
1	-1	-1	0
3	-1	1	0
5	-1	0	-1
7	-1	0	1
2	1	-1	0
4	1	1	0
6	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
13	0	0	0
14	0	0	0
11	0	-1	1
12	0	1	1
15	0	0	0
16	0	0	0

Figura 4.1. Esquema do planejamento experimental Box-Behnken realizado

A composição das formulações foi escolhida com base nos melhores resultados obtidos em estudos prévios, apresentados nos capítulos 1 a 3. De acordo com os resultados apresentados, foi selecionado o ácido oleico como lipídio líquido e o Poloxamer[®] 188 como tensoativo. Primeiramente foram preparadas as formulações base com diferentes proporções de Compritol[®] 888 ATO (0%, 40% e 80%), conforme esquematizado na Tabela 4.3. O modo de preparo das formulações consistiu em pesar os componentes de cada fase (aquosa, oleosa e, separadamente, o óleo essencial) em balança analítica (Mettler Toledo modelo AG204, Suíça) e submetê-los ao aquecimento na chapa de aquecimento (IKA-Werke modelo RT 15, Alemanha). Quando as misturas atingirem a temperatura de 10°C acima do ponto de fusão do lipídio sólido (Compritol[®] 888 ATO ou Gelucire[®] 50/13 no caso da formulação sem Compritol) verteu-se o óleo essencial (vagarosamente) sobre a fase oleosa sob agitação magnética (IKA-Werke modelo RT 15, Alemanha) e, em seguida, a fase aquosa sobre a oleosa, vagarosamente, ainda sob agitação. As formulações foram homogeneizadas em ultra-turrax (IKA modelo T18 basic, Wilmington, EUA) durante 2 minutos a 18.000 rpm e, em seguida, foram submetidas ao processador ultrassônico (SONICS Vibracell modelo CV334, Newtown, EUA) com a sonda Standard Horn 1" 630-0209 na amplitude de 45% durante 15 minutos (3 ciclos de 5 minutos on, 2 minutos off). Após o preparo das formulações base foi adicionada a solução de adjuvantes de secagem, esquematizada na Tabela 4.4. Para cada nível de formulação base foram adicionados os 3 níveis de adjuvantes de secagem (com razão MD-GA/Formulação de 0,90; 1,80 e 2,70), compondo um total de 9 formulações. A relação dos componentes e suas quantidades está apresentada na Tabela 4.5.

Tabela 4.3. Composição das formulações base (sem adjuvantes de secagem) (% m/m)

Componente	Formulação -1,0	Formulação 0,0	Formulação 1,0
Poloxamer [®] 188	1,3	1,3	1,3
Água	80,8	80,8	80,8
Óleo Essencial <i>Lippia sidoides</i>	5,4	5,4	5,4
Compritol [®] 888 ATO	0,0	4,3	8,6
Gelucire 50/13	10,8	6,5	2,2
Ácido Oleico	1,8	1,8	1,8

Tabela 4.4. Composição das soluções de adjuvantes de secagem a serem incorporadas em cada formulação (% m/m)

Componente	Adjuvante -1,0	Adjuvante 0,0	Adjuvante 1,0
Formulação base	55,7	37,8	28,6
Dióxido de silício coloidal	1,1	1,1	1,1
Maltodextrina	7,7	10,5	11,9
Goma arábica	1,9	2,6	3,0
Água	33,6	48,1	55,5

Tabela 4.5. Composição das formulações lipídicas contendo carreadores de secagem (% m/m)

Função	Componentes	FA	FB	FC	FD	FE	FF	FG	FH	FI
Ativo	OE <i>Lippia</i> <i>sidoides</i>	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4
Lipídio sólido	Gelucire® 50/13 (anfifílico)	10,8	10,8	10,8	6,5	6,5	6,5	2,2	2,2	2,2
Lipídio sólido	Compritol® 888 ATO	0,0	0,0	0,0	4,3	4,3	4,3	8,6	8,6	8,6
Lipídio líquido	Ácido oleico	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Tensoativo	Poloxamer® 188	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Carreador de secagem	Dióxido de silício coloidal	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
Carreador de secagem	Maltodextrina	7,7	10,5	11,9	7,7	10,5	11,9	7,7	10,5	11,9
Carreador de secagem	Goma arábica	1,9	2,6	3,0	1,9	2,6	3,0	1,9	2,6	3,0

*água: q.s.p. 100 g

Após o preparo as formulações foram secas no *spray dryer*. Utilizou-se um *spray dryer* escala laboratorial (modelo SD-05, Lab-Plant, Reino Unido), que possui uma câmara de secagem de 215 mm de diâmetro e 500 mm de altura. As dispersões lipídicas foram alimentadas a uma vazão (W_{susp}) de 4 g/min com bico atomizador com diâmetro de 1,0 mm e as variáveis operacionais foram fixadas em: vazão do ar de secagem (W_g): 60 m³/h, pressão do ar de atomização (P_{atm}): 3 kgf/cm² e vazão do ar de atomização (W_{atm}): 17 lpm. A temperatura de entrada do ar de secagem (T_g), foi fixada de acordo com o planejamento experimental, nos valores de 90°C, 120°C e 150°C. A temperatura do gás de saída foi monitorada em intervalos

regulares, de forma a se obter o instante em que o processo entra em regime permanente, iniciando-se a alimentação da formulação de secagem e a coleta do produto seco. Monitoraram-se a temperatura e umidade do ar ambiente e a temperatura do ar de saída de forma a verificar o desempenho do secador.

A recuperação do produto (R) foi calculada por balanço de massas através da relação percentual entre a massa de pó total coletada e a massa total de sólidos (incluindo o óleo essencial) alimentada no *spray dryer* (CORTÉS-ROJAS; OLIVEIRA, 2012), de acordo com Equação 4.1.

$$R = \frac{M_c \times (1 - X_p)}{W_s \times C_s \times \theta} \times 100 \quad (\text{Equação 4.1})$$

Em que: M_c : massa coletada (g); X_p : umidade (g); W_s : vazão de alimentação (g/min); C_s : teor de sólidos da composição de secagem (g/g); θ : tempo de processo (min).

Paralelamente à secagem em *spray dryer* foi feita também a secagem das formulações em liofilizador. Como para esse processo a variável temperatura é constante e fixa para todos os experimentos, os experimentos foram organizados de acordo com um planejamento experimental fatorial 3^2 , sendo as variáveis: porcentagem de Compritol® 888 ATO na formulação e razão MD-GA/Formulação, ambas já descritas anteriormente para o planejamento Box-Behnken, resultando em 9 experimentos (Tabela 4.6). O planejamento também foi realizado para as formulações líquidas, permitindo a comparação dos resultados obtidos. A Tabela 4.6 apresenta as variáveis codificadas do planejamento experimental 3^2 utilizado.

Tabela 4.6. Planejamento experimental 3^2

Exp. n/Formulação	Lipídio sólido	Razão adjuvantes/formulação
1/FA	-1	-1
2/FB	-1	0
3/FC	-1	1
4/FD	0	-1
5/FE	0	0
6/FF	0	1
7/FG	1	-1
8/FH	1	0
9/FI	1	1

4.3.3 Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações líquidas e dos produtos secos redispersos em água

O tamanho de partículas, índice de polidispersão e o potencial zeta foram determinados em um equipamento Malvern Zetasizer Nanoseries ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido), utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (dp e PI) e da mobilidade eletroforética (Z). Amostras dos produtos secos foram redispersas em água Milli-Q, à mesma concentração original, mantidas sob agitação por 30 minutos e diluídas 1:200 (v/v), antes das determinações. As formulações líquidas também foram diluídas 1:200 (v/v) e todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.3.4 Propriedades de fluidez do produto seco por *spray drying*

A razão de Hausner (H_R) e o índice de Carr (I_C) dos produtos secos por *spray drying* foram utilizadas como propriedades de fluidez. Esses parâmetros são determinados segundo as Equações 4.2 e 4.3, descritas a seguir:

$$H_R = \frac{\rho_{t,1250}}{\rho_b} \quad (\text{Equação 4.2})$$

$$I_C = \frac{\rho_{t,1250} - \rho_b}{\rho_{t,1250}} \times 100 \quad (\text{Equação 4.3})$$

onde ρ_b é a densidade aparente ou “bulk” ($\rho_b = m_0/V_0$), $\rho_{t,1250}$ é a densidade compactada (dc), determinada usando o volume ocupado por uma amostra de pó em uma proveta após 1250 quedas a partir de uma distância de 14.0 mm. O equipamento Caleva® (Tapped Density Tester, TDT - Frankfurt, Alemanha) foi empregado para a determinação das densidades aparente e compactada, de acordo com o método descrito na farmacopeia americana (USP 29-NF 24, 2006).

4.3.5 Umidade e atividade de água do produto seco

O conteúdo de umidade dos produtos secos foi determinado pelo método de titulação por Karl Fischer, empregando-se um equipamento Karl Fischer 870 Titrino Plus (Methrom, Suíça), previamente calibrado com água.

Análises de atividade de água foram realizadas no medidor de atividade de água Aqua Lab 4TEV (Decagon Devices, EUA), utilizando o eletrodo capacitivo. Os resultados foram expressos como média e desvio e as medidas realizadas em triplicata.

4.3.6 Retenção de timol nos produtos secos e nas formulações líquidas

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) foi utilizada para monitorar o timol (composto majoritário no óleo essencial de *Lippia sidoides*) nas formulações líquidas e nos produtos obtidos por *spray drying* e por liofilização. As condições cromatográficas foram baseadas no método proposto por Benelli, Souza e Oliveira (2013) e Leal e colaboradores (2003), com algumas modificações. As análises foram realizadas em cromatógrafo LC-20A Prominence Shimadzu com injetor automático, bomba LC-6A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e detector de arranjo de diodos (SPD-M20A), coluna C18 (Shimadzu Shim-Pack CLC(M) 4,6 mm x 25 cm, 5 μ m), tempo de corrida de 20 minutos, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 μ L, temperatura do forno de 30 °C. A fase móvel foi composta por água (A) e acetonitrila (B) segundo o gradiente: 0–2 min, 10% B; 2–7 min, aumento linear de B para 78%; 7–17 min, 78% B; 17–20 min, aumento linear de B para 100%; 20–23 min, 100% de B; 23–26 min, redução linear de B para 10%, 23–32 min, 10% de B. O cromatograma foi analisado a 276 nm.

Amostras do produto seco e da formulação líquida foram misturadas com metanol, homogeneizadas em ultrassom e mantidas sobre agitação magnética por 30 minutos de forma a extrair o timol. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 5000 x g, sendo o sobrenadante analisado por HPLC, após filtração em filtro Millipore 0,45 μ m.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Secagem por *spray drying*

Os dados experimentais obtidos para as secagens por *spray drying* foram submetidos à análise de regressão, a fim de se determinar a influência dos fatores investigados (porcentagem de Compritol® 888 ATO, razão MD-GA/Formulação e temperatura de secagem). A Tabela 4.7 exibe os resultados obtidos experimentalmente para as 16 secagens por *spray drying* e a Tabelas 4.8 apresenta os coeficientes de regressão linear e quadrática, de interações lineares entre as variáveis estudadas e o coeficiente de determinação R^2 , ajustados aos resultados experimentais apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Resultados experimentais obtidos de acordo com as variáveis estudadas nas secagens por *spray drying*

Fatores estudados		Respostas obtidas											
Nº	Compritrol® 888 ATO (%)	Ad (-)	Tg (°C)	dc (g/mL)	Ic (-)	H _R (-)	dp (nm)	PI (-)	Z (mV)	a _w (-)	Xp (%)	Rec. pó (%)	Ret. timol (%)
1	0	0,9	120,0	0,248	34,2	1,34	522,2±31,8	0,632±0,095	-26,5±1,2	0,373±0,004	3,77±0,07	54,4	16±0,5
2	0	2,7	120,0	0,309	41,5	1,42	433,1±19,1	0,685±0,063	-29,4±0,1	0,301±0,010	4,48±0,01	56,5	21±0,4
3	0	1,8	90,0	0,276	43,8	1,44	488,2±6,4	0,634±0,143	-27,2±0,7	0,458±0,002	5,52±0,08	47,8	34±0,7
4	0	1,8	150,0	0,292	42,4	1,42	504,6±19,0	0,748±0,065	-26,7±0,4	0,310±0,016	3,57±0,44	55,0	5±0,0
5	80	0,9	120,0	0,308	40,0	1,40	1798,3±60,9	0,469±0,079	-30,9±0,7	0,311±0,006	3,25±0,04	49,9	14±0,1
6	80	2,7	120,0	0,381	50,0	1,50	1594,3±105,2	0,683±0,099	-29,2±1,1	0,398±0,003	4,91±0,29	48,2	14±0,5
7	80	1,8	90,0	0,371	50,0	1,50	1637,8±72,0	0,541±0,093	-33,6±1,0	0,328±0,008	4,25±0,15	48,3	44±1,8
8	80	1,8	150,0	0,346	41,5	1,42	1689,3±106,6	0,532±0,053	-29,3±0,3	0,307±0,003	3,32±0,09	47,0	7±0,0
9	40	0,9	90,0	0,306	32,9	1,33	1071,5±46,2	0,651±0,099	-26,2±0,4	0,393±0,004	4,36±0,64	62,4	47±0,7
10	40	2,7	90,0	0,368	46,8	1,47	929,8±22,0	0,807±0,050	-17,2±0,7	0,421±0,042	6,53±0,00	54,4	40±0,4
11	40	1,8	120,0	0,312	36,2	1,36	1258,0±50,7	0,653±0,112	-26,1±0,9	0,318±0,002	5,01±0,13	54,1	23±0,2
12	40	1,8	120,0	0,312	35,3	1,35	1827,7±74,5	0,488±0,053	-26,3±0,7	0,430±0,008	6,12±0,02	63,8	18±0,3
13	40	0,9	150,0	0,292	33,8	1,34	1395,3±81,6	0,570±0,035	-28,9±0,2	0,445±0,002	4,44±0,07	55,6	6±0,2
14	40	2,7	150,0	0,340	38,2	1,38	1242,3±59,6	0,655±0,059	-27,8±0,4	0,366±0,010	5,20±0,06	45,2	8±0,1
15	40	1,8	120,0	0,297	34,3	1,34	1353,8±43,7	0,384±0,028	-17,8±0,5	0,357±0,013	5,10±0,02	49,2	17±0,3
16	40	1,8	120,0	0,302	32,9	1,33	1679,0±37,0	0,450±0,096	-28,7±0,7	0,253±0,007	3,98±0,08	55,5	18±0,5

Tabela 4.8. Análise de regressão ajustada para as propriedades do produto seco em *spray dryer*, incluindo a interação entre as variáveis (variáveis codificadas)

Parâmetros	Coeficientes de regressão para as respostas experimentais									Retenção timol (%)
	dc (g/ml)	Ic (-)	H _R (-)	dp (nm)	PI (-)	Z (mV)	a _w (-)	Xp (%)	Recuperação pó (%)	
Média/intercepto	0,3058*	34,6672*	1,3467*	1529,6042*	0,4933*	-24,7250*	0,3397*	5,0488*	55,6550*	19,2578*
F _{C(L)}	0,0351*	2,4474**	0,0245**	596,4229*	-0,0593	-1,6458	-0,0124	-0,2025	-2,5425	0,3916
F _{C(Q)}	0,0002	6,6423*	0,0664*	-261,1813	0,0336	-4,2375	-0,0248	-0,9588	-4,1725	-2,9906
Ad _{C(L)}	0,0304*	4,4526*	0,0445*	-73,4813	0,0634	1,1000	-0,0045	0,6625	-2,2500	-0,0541
Ad _{C(Q)}	0,0055	0,1367	0,0014	-181,4729	0,0903	-0,0292	0,0307	0,0112	0,7375	-0,1011
Tg _{C(L)}	-0,0065***	-2,1700**	-0,0217**	88,0125	-0,0159	-1,0625	-0,0215	-0,5150	-1,2675	-17,3089*
Tg _{C(Q)}	0,0152**	3,1186**	0,0312**	-188,4438	0,0870	-0,2542	0,0358	0,0712	-2,0025	6,1370**
F _{C(L)} x Ad _{C(L)}	0,0032	0,6770	0,0068	-28,7250	0,0403	1,1417	0,0399	0,2363	-0,9400	-1,2157
F _{C(L)} x Tg _{C(L)}	-0,0100***	-1,7839***	-0,0178***	8,7625	-0,0308	0,9667	0,0318	0,2538	-2,1250	-2,0938
Ad _{C(L)} x Tg _{C(L)}	-0,0033	-2,3763**	-0,0238**	-2,8125	-0,0178	-1,9750	-0,0267	-0,3538	-0,5950	2,3160
R ²	0,9786	0,9673	0,9673	0,9315	0,7153	0,5159	0,5543	0,7846	0,4974	0,9648

C, variáveis codificadas; L, efeito linear; Q, efeito quadrático ou de curvatura. Termos significativos a: * $\alpha \leq 0,01$; ** $\alpha \leq 0,05$; *** $\alpha \leq 0,10$

4.4.1.1 Recuperação de produto e propriedades de fluidez dos pós secos em *spray dryer*

Como pode ser observado na Tabela 4.8 nenhuma variável exerceu influência significativa sobre a recuperação de produto na secagem por *spray drying*, nem mesmo a um nível de significância de 90%. Os valores de recuperação de pó variaram entre 45,2% e 63,8% (Tabela 4.7). O teste de falta de ajuste também não apresentou significância estatística a 90% (dado não apresentado). Durante as secagens, todas as formulações apresentaram problemas de adesão, muito provavelmente relacionados à baixa temperatura de transição vítrea da resultante da formulação. A adição de adjuvantes de secagem visa elevar a temperatura de transição vítrea do material a ser seco, reduzindo sua tendência à aglomeração durante a secagem e armazenamento do produto (FREIRE; SILVEIRA, 2009). No entanto, as temperaturas empregadas para a secagem foram consideradas elevadas para esse tipo de produto, causando a adesão do pó nas paredes do ciclone.

Com relação às propriedades de fluidez exibidas pelos pós secos por *spray drying* os três fatores estudados (composição das formulações, concentração de adjuvantes de secagem e temperatura de secagem) exerceram influência altamente significativa sobre a densidade de compactação dos pós, o índice de Carr e o fator de Hausner, a um nível de significância superior a 95%, chegando a 99%, como pode ser observado na Tabela 4.7. O modelo estatístico ajustado para esses dados experimentais (incluindo todos os coeficientes) apresentou valores de R^2 superiores a 0,967, sem falta de ajuste, podendo ser empregado para a estimativa dos resultados experimentais.

Índice de Carr e fator de Hausner são baseados na fricção e acomodação das partículas, sendo afetados por fatores como tamanho de partícula e propriedades de superfície. Geralmente os valores de índice de Carr e fator de Hausner são associados com as características de fluidez de materiais particulados. Valores baixos indicam baixa coesividade e, portanto, boa fluidez. Assim, valores abaixo de 16 para índice de Carr e abaixo de 1,2 para fator de Hausner são apresentados por produtos com boa fluidez, enquanto que valores de índice de Carr de 22 a 35% caracterizam fluidez fraca ou pobre, de 35 a 38% fluidez muito fraca e acima de 40%, extremamente fraca (AULTON, 2002, 2005; CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014). Os resultados obtidos para I_C e H_R apresentados na Tabela 4.7 indicam que os produtos formados não apresentam boas propriedades de fluxo, com fluidez caracterizadas como fraca, muito fraca e extremamente fraca. As formulações com maior porcentagem de Compritol®888

ATO e maior razão MD/GA apresentaram os maiores valores de densidade de compactação, índice de Carr e fator de Hausner e, portanto, as piores propriedades de fluidez. A Figura 4.2 esquematiza as superfícies de resposta para as propriedades de fluidez dos pós obtidos.

Figura 4.2. Superfícies de resposta da densidade de compactação, d_c (A) e índice de Carr, I_c (B) em função da temperatura de secagem, $T_{g,C}$ e da porcentagem de Compritol®888 ATO, $F_{c,C}$ e fator de Hausner, H_r (C), em função da temperatura de secagem, $T_{g,C}$ e da relação MD/GA, $Ad_{C,C}$, com as demais variáveis fixadas no valor médio

4.4.1.2 Tamanho de partícula (d_p), índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (Z) das formulações secas em *spray dryer* e ressuspensas

Na Tabela 4.7, pode ser observado que o tamanho de partícula sofreu influência da composição da formulação, a um nível de significância superior a 95%, atingindo 99%. A Tabela 4.7 mostra que os valores de tamanho de partícula variaram entre 433,1nm e 1827,7nm.

Verifica-se que o tamanho de partícula tende a aumentar de forma inversa à proporção de Gelucire® 50/13 presente na composição. O Gelucire® 50/13 é uma base auto emulsionante

com elevado poder tensoativo, que reduz a tensão superficial e favorece a emulsificação, consequentemente reduzindo o tamanho de partícula dos sistemas dispersos (SINHA et al., 2010).

O índice de polidispersão indica a amplitude de distribuição do tamanho de partícula, que varia de 0 a 1. Teoricamente, populações monodispersas apresentam $PI = 0$. No entanto, $PI < 0,2$ é considerada como distribuição de tamanho estreita (DAS; NG; TAN, 2012). Observa-se pelas Tabelas 4.6 e 4.7 que o índice de polidispersão não sofreu influência de nenhuma das variáveis estudadas, nem a um nível de significância de 90%, e os valores de PI dos pós ressuspensores tiveram amplitude de variação entre 0,384 e 0,807, indicando polidispersão das partículas.

O potencial zeta (Z) indica a carga global que uma partícula adquire em um meio específico. A estabilidade de uma dispersão pode ser prevista a partir do valor de Z, que se refere ao grau de repulsão entre partículas próximas e carregadas de forma semelhante na dispersão. Elevado módulo de Z indica partículas altamente carregadas, impedindo a agregação delas devido à repulsão elétrica, estabilizando a dispersão; enquanto que para valores baixos de Z, a atração excede a repulsão e a dispersão flocula (DAS; CHAUDHURY, 2011). Assim como para PI, os valores obtidos para o potencial zeta também não sofreram influências significativas da composição lipídica da formulação, proporção de adjuvantes de secagem e nem da temperatura de secagem ($\alpha \leq 0,10$). Os valores obtidos para Z foram todos negativos e variaram de -17,2mV a -33,6mV. Valores negativos de Z derivados de tensoativos não iônicos (Poloxamer® 188) são atribuíveis à polarização do tensoativo, seguida pela adsorção de moléculas de água polarizadas na superfície da partícula, oferecendo um potencial zeta de magnitude relativamente mais baixa, quando comparado aos tensoativos iônicos (HAN et al., 2008; TAN et al., 2010). Do ponto de vista da estabilidade, valores acima de ± 30 são desejáveis para uma boa estabilidade física (DAS; CHAUDHURY, 2011; FREITAS; MÜLLER, 1998). Os valores obtidos nesse trabalho caracterizam as amostras como possuindo estabilidade moderada em relação ao potencial zeta.

4.4.1.3 Umidade (X_p) e atividade de água (A_w) das formulações secas em *spray dryer*

A umidade do produto representa a composição total da água em um sistema; enquanto que a atividade de água está associada com a água livre, que está disponível para reações de degradação (químicas e/ou bioquímicas). A alta atividade da água indica maior disponibilidade de água livre para reações de degradação, o que reflete em um menor tempo de prateleira (FAZAELI et al., 2012; QUEK; CHOK; SWEDLUND, 2007). De uma forma geral, se assume que valores abaixo de 0,5 são requeridos a fim de se evitar possível crescimento microbiano (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2012). Os valores de atividade de água apresentados pelos pós secos em *spray dryer* foram entre 0,253 e 0,458, portanto abaixo do valor limite de 0,5. Com relação à umidade, os valores obtidos (3,25% a 6,53%) estão no limite dos valores mínimos de umidade geralmente preconizados para pós secos com aplicação na indústria de alimentos, entre 3 a 4% (IXTAINA et al., 2015) e para extratos secos de plantas medicinais ($\leq 5\%$) (USP 30-NF 25, 2007).

Observa-se na Tabela 4.7, que nenhuma variável estudada exerceu influência sobre a atividade de água ou umidade do produto obtido, nem mesmo a um nível de significância de 90%. Já para $\alpha \leq 0,15$ (dados não apresentados) observou-se influência do valor quadrático da composição das formulações (porcentagens de Compritol®888 ATO utilizadas) e também do valor linear da concentração de adjuvantes empregadas (razão MD/GA) sobre os valores obtidos para umidade. O teste de falta de ajuste para essas determinações também não apresentou significância estatística a 90%, indicando adequação do modelo estatístico para a análise.

4.4.1.4 Retenção de timol nas formulações secas por *spray drying*

Como pode ser observado na Tabela 4.7, os valores de retenção de timol obtidos foram baixos, variando de 5% a 47%. A temperatura de entrada do gás de secagem apresentou influência considerável nessa resposta: elevada temperatura de secagem (150°C) resultou em retenções muito baixas de timol. Observa-se na Tabela 4.7 que os efeitos linear e quadrático da temperatura de secagem exerceram influência significativa na retenção de timol das formulações secas, a um nível de significância superior a 95%, chegando a 99% para o efeito linear. O modelo estatístico utilizado para o ajuste dos dados apresentou R^2 de 0,9648 e falta de ajuste não significativa, podendo ser utilizado para fins de predição e otimização.

A perda de compostos voláteis durante o processo de encapsulação por *spray drying* é inevitável, e o objetivo é reduzir esse valor ao mínimo possível. Essas perdas ocorrem em três estágios distintos: (1) durante a atomização, uma vez que existe uma grande área de superfície,

turbulência e escoamento / mistura dentro das camadas da emulsão atomizada; (2) após a formação de gotículas, quando há perda rápida de água a partir da gotícula e a sua superfície ainda não formou uma membrana seletiva estável. Dessa forma, os voláteis difundem-se com a água para a superfície das gotículas, particularmente aqueles com volatilidades relativas mais elevadas, e são perdidos para o ar de secagem; (3) a perda final é quando a água na gotícula excede o seu ponto de ebulição e as bolhas formadas dentro da gotícula explodem para a superfície, levando uma parcela dos compostos voláteis (HECHT; KING, 2000a, 2000b; JAFARI et al., 2008; KING, 1995).

Apesar da composição das formulações não ter apresentado influência significativa na retenção de timol, todas as formulações exibem concentrações consideráveis de Gelucire® 50/13 na composição, um membro de uma classe diferente de carreadores tensoativos, descrito como promotor de permeação, característica atribuída à sua natureza tensoativa e lipídica. Esse tipo de tensoativo lipídico é capaz de interagir com a membrana celular (através da polaridade) alterando suas propriedades físicas, tornando-a mais permeável (ELOY et al., 2012). A interação do Gelucire® 50/13 com o óleo essencial das formulações tornará os ativos mais polares, aumentando assim a solubilidade dos compostos encapsulados em meio aquoso. Esse processo resultará no aumento da capacidade de difusão desses compostos através da matriz durante a secagem por *spray drying* e, conseqüentemente, maiores perdas durante a formação das cápsulas (GHARSALLAOUI et al., 2007). Além disso, essa interação também pode facilitar a associação molecular dos compostos voláteis com o material de parede, interferindo na formação do filme interfacial na interface O/A, que estabiliza a emulsão, podendo, indiretamente, afetar a retenção (JAFARI et al., 2008). A Figura 4.3 ilustra a superfície de resposta para a retenção de timol e o diagrama de Pareto, nos quais podem ser identificadas a influência da temperatura de secagem sobre a retenção de timol.

Figura 4.3. Superfície de resposta da retenção de timol (A) em função da temperatura de secagem, T_{gc} e da porcentagem de Compritol®888 ATO, F_c , com razão MD/GA fixada no valor médio; e diagrama de Pareto (B)

4.4.2 Secagens por liofilização

Os dados experimentais obtidos para as formulações líquidas originais e produtos secos por liofilização, também foram submetidos à análise de regressão, a fim de se determinar a influência dos fatores pesquisados (porcentagem de Compritol®888 ATO e razão MD-GA/Formulação). As Tabelas 4.9 e 4.10 exibem os resultados obtidos experimentalmente para as liofilizações e para as formulações líquidas originais, respectivamente. De forma a permitir a análise conjunta dos dados experimentais apresentados nas Tabelas 4.9 e 4.10, podemos definir uma nova variável (categórica), denominada de processo, sendo assumido o valor -1 para as formulações líquidas e +1 para as amostras secas, resultando em um planejamento 2×3^2 (apenas para as respostas determinadas para ambos os casos). As respostas existentes apenas para o produto liofilizado são realizadas de acordo com o planejamento 3^2 original.

A Tabela 4.11 apresenta os coeficientes de regressão linear e quadrático, as interações lineares entre as variáveis estudadas e o coeficiente de determinação R^2 resultantes da análise estatística dos resultados. A discussão desses resultados é apresentada nas seções seguintes.

Tabela 4.9. Resultados experimentais obtidos de acordo com as variáveis avaliadas na secagem por liofilização

Fatores estudados			Respostas obtidas					
Nº	Compritol® 888 ATO (%)	MD-GA / Formulação (-)	dp (nm)	PI (-)	Z (mV)	aw (-)	Xp (%)	Retenção timol (%)
1	0	0,9	638,4±30,4	0,660±0,019	-35,3±1,3	0,083±0,007	1,92±0,01	100±2,5
2	0	1,8	709,1±55,5	0,671±0,133	-35,9±1,0	0,073±0,005	2,39±0,46	97±1,0
3	0	2,7	660,7±57,9	0,725±0,046	-32,9±0,8	0,077±0,004	4,50±0,45	90±0,8
4	80	0,9	1662,0±83,7	0,531±0,090	-36,2±0,9	0,065±0,005	2,00±0,02	92±0,2
5	80	1,8	1743,3±68,1	0,515±0,152	-33,5±0,5	0,104±0,026	1,78±0,42	89±1,9
6	80	2,7	1764,0±112,4	0,524±0,049	-36,1±1,2	0,104±0,028	0,93±0,33	74±1,4
7	40	0,9	827,8±57,4	0,931±0,056	-28,9±0,7	0,213±0,007	2,70±0,10	94±1,1
8	40	1,8	952,0±26,3	0,803±0,126	-27,9±0,1	0,082±0,005	2,30±0,18	90±0,5
9	40	2,7	922,6±38,5	0,762±0,097	-29,7±1,0	0,084±0,004	2,31±0,13	86±0,3

Tabela 4.10. Resultados experimentais obtidos para os fatores estudados nas formulações líquidas

Fatores estudados			Respostas obtidas			
Nº	Compritol® 888 ATO (%)	MD/GA (-)	dp (nm)	PI (-)	Z (mV)	Retenção timol (%)
1	0	0,9	267,9±3,1	0,444±0,040	-27,3±1,4	100±1,2
2	0	1,8	316,4±13,4	0,486±0,101	-27,7±1,0	97±0,5
3	0	2,7	340,0±31,5	0,505±0,020	-28,4±1,3	89±1,6
4	80	0,9	2366,0±198,7	0,089±0,064	-34,5±0,9	90±2,1
5	80	1,8	2623,3±136,8	0,270±0,071	-32,0±0,6	100±1,4
6	80	2,7	2941,3±61,0	0,367±0,068	-31,9±1,3	78±6,1
7	40	0,9	404,0±8,3	0,484±0,022	-31,9±1,4	96±5,5
8	40	1,8	418,6±11,7	0,475±0,038	-32,2±0,8	91±0,6
9	40	2,7	430,5±18,2	0,503±0,034	-32,1±0,8	96±1,8

Tabela 4.11. Análise de regressão realizada para as propriedades do produto liofilizado em comparação com a formulação líquida, incluindo a interação entre as variáveis (variáveis codificadas)

Coeficientes de regressão para as respostas experimentais						
Parâmetros	dp (nm)	PI (-)	Z (mV)	a _w (-)	X _p (%)	Retenção timol (%)
Média/intercepto	675,9005*	0,6549*	-30,0667*	0,1144***	2,2794**	100,8002*
Proc _(L)	-12,6727	0,1388*	-1,0259	-	-	-7,5442*
F _{,C(L)}	847,2861*	-0,0997*	-1,3861	0,0066	-0,6833***	-4,3144**
F _{,C(Q)}	676,7931*	-0,1772*	-2,2083	-0,0423	-0,1867	-0,6355
Adc _(L)	74,4069	0,0206	0,2528	-0,0161	0,1858	-5,1690**
Adc _(Q)	-25,0111	0,0070	-0,5750	0,0184	0,2358	-3,9561
Proc _(L) x F _{,C(L)}	-320,4083*	0,0186	1,0917	-	-	-0,8273
Proc _(L) x Adc _(L)	-37,8986	-0,0392***	0,0306	-	-	-0,8800
F _{,C(L)} x Adc _(L)	72,854	0,0182	0,1792	0,0112	-0,9113**	-1,2081
R ²	0,9487	0,9337	0,5049	0,4061	0,8820	0,8511

C, variáveis codificadas; L, efeito linear; Q, efeito quadrático ou de curvatura. Termos significativos a: * $\alpha \leq 0,01$; ** $\alpha \leq 0,05$; *** $\alpha \leq 0,10$

4.4.2.1 Tamanho de partícula (dp), índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (Z)

Com base na Tabela 4.11 foi possível observar que houve influência altamente significativa ($\alpha \leq 0,01$) da composição das formulações (porcentagens de Compritol®888 ATO utilizadas) sobre o tamanho de partícula apresentado pelas dispersões (638,4 nm a 1764,0 nm para as formulações liofilizadas e 267,9 nm a 2941,3 nm para as formulações líquidas). A interação dos efeitos lineares do processo de obtenção (formulação líquida ou liofilizada) e da composição das formulações também exerceu influência altamente significativa no tamanho das partículas ($\alpha \leq 0,01$).

A composição das formulações, assim como o processo envolvido na obtenção das partículas também influenciaram significativamente o índice de polidispersão (PI) das amostras, ambos com nível de significância de 99%. Além disso, a interação entre os efeitos lineares processo e concentração de adjuvantes de secagem (razão MD-GA/formulação) também exerceu influência sobre PI ($\alpha \leq 0,10$). Os valores apresentados para PI ficaram entre 0,515 e 0,931 para as formulações liofilizadas e entre 0,089 e 0,505 para as líquidas.

Os resultados descritos acima já eram esperados, uma vez que uma maior quantidade do lipídio sólido Compritol®888 ATO nas formulações reduz a propriedade tensoativa proveniente do Gelucire® 50/13, formando composições menos emulsificadas, tendendo a apresentar partículas maiores e mais polidispersas.

Com relação ao potencial zeta, observou-se que nenhuma variável estudada exerceu influência significativa, nem mesmo a um nível de significância de 90%. Os valores obtidos para esse parâmetro (-27,9mV a -36,2mV para as formulações liofilizadas e -27,3 mV a -34,5 mV para as líquidas) caracterizam a estabilidade das amostras como moderada.

4.4.2.2 Umidade (Xp) e atividade de água (Aw) das formulações liofilizadas

A umidade apresentada pelos pós liofilizados (0,93% a 4,50%) sofreu influência significativa ($\alpha \leq 0,10$) da composição das formulações e também da interação entre os efeitos lineares da composição e dos adjuvantes de secagem ($\alpha \leq 0,05$). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de o Compritol®888 ATO aumentar o caráter lipofílico das formulações, tendendo a acumular menos umidade. Comportamento contrário é esperado com o aumento na concentração de adjuvantes de secagem, que favorecem o acúmulo de umidade por se tratarem de compostos hidrofílicos com maior higroscopicidade (quando comparado aos lipídios). Por

outro lado, a atividade de água não sofreu influência significativa de nenhuma das variáveis estudadas e seus valores ficaram entre 0,065 e 0,213, como é possível observar na Tabela 4.11.

Os valores de umidade e atividade de água apresentados pelos pós liofilizados foram bem baixos, evidenciando pós com alta estabilidade frente a reações bioquímicas e proliferação de microrganismos. Esses valores menores do que os apresentados pelo pó seco em *spray dryer* são atribuídos aos diferentes mecanismos de secagem envolvidos em ambos os processos.

4.4.2.3 Porcentagem de retenção de timol

A retenção de timol, composto ativo majoritário no óleo essencial de *Lippia sidoides*, sofreu influência altamente significativa de todas as variáveis estudadas no planejamento, a um nível de significância superior a 95%, chegando a 99%, sem efeitos de curvatura ou de interação, segundo a Tabela 4.11.

As Tabelas 4.9 e 4.10 apresentam os valores de retenção de timol para as amostras liofilizadas e líquidas, respectivamente. Conforme esperado, as formulações liofilizadas apresentaram uma retenção um pouco menor do que as líquidas, confirmando que o processo de secagem, por menos agressivo que seja, ainda resulta em pequenas perdas de voláteis. A análise estatística demonstrou que quanto maior a quantidade do lipídio sólido Compritol®888 ATO (consequentemente menor a quantidade de Gelucire® 50/13), menor foi a porcentagem de retenção de timol da formulação. Esse comportamento foi observado tanto para as formulações líquidas quanto para as secas e pode ser explicado pela forma de preparo das formulações, uma vez que o Compritol®888 ATO possui elevado ponto de fusão (em torno de 70 °C) e a temperatura exigida para o preparo é de 10 °C acima do ponto de fusão do lipídio sólido. Essa elevada temperatura de trabalho (80 °C) favorece a perda do ativo por volatilização e degradação. No entanto, como no processo de liofilização as perdas de voláteis são bastante reduzidas, maiores quantidades de Gelucire® 50/13 favorecem a retenção de timol quando se compara ao processo de secagem por *spray drying*.

Com relação aos adjuvantes de secagem, observou-se que o aumento da razão MD/GA nas formulações contribuiu para reduzir a retenção de timol. Essa redução não foi muito acentuada, no entanto pode-se ressaltar que não há necessidade de se utilizar excessivas concentrações de adjuvantes de secagem para o processo de liofilização, já que este consiste em um processo brando que ocorre em baixas temperaturas e em ambiente restrito de oxigênio, ao contrário da secagem por *spray drying*, que necessita de maiores concentrações desses

adjuvantes, para conferir proteção contra as perdas de voláteis, causadas pelo grande área de exposição das formulações com ar aquecido.

Pode-se observar que os valores de retenção de timol obtidos para as formulações liofilizadas são bastante elevados (74% a 100%) e até mesmo comparáveis aos valores obtidos para as formulações líquidas (78% a 100%), demonstrando que esta é uma excelente técnica de secagem, bastante eficiente, principalmente para a secagem de materiais com elevada volatilidade e baixos valores de temperatura de transição vítrea, como é o caso das formulações lipídicas incorporadas de óleo essencial.

A Figura 4.4 mostra a superfície de resposta da retenção de timol em função da razão da concentração de Compritol®888 ATO, $F_{C,C}$, e da razão MD-GA/Formulação. Pode-se observar a influência dos efeitos lineares do processo, razão MD-GA/Formulação e concentração do lipídio sólido Compritol®888 ATO.

A Figura 4.5 apresenta o diagrama de Pareto da retenção de timol em função da razão da em função da concentração de Compritol®888 ATO, $F_{C,C}$, da razão MD-GA/Formulação e processo de produção (amostras líquidas ou liofilizadas), que demonstra a influência significativa do processo de produção (variável categórica), da composição e concentração de adjuvantes na formulação lipídica.

Figura 4.4. Superfície de resposta da retenção de timol em função da concentração de Compritol®888 ATO, $F_{C,C}$, e da razão MD-GA/Formulação, $Ad_{C,C}$, para os produtos obtidos pelo processo de liofilização

Figura 4.5. Diagrama de Pareto da retenção de timol em função da razão da em função da concentração de Compritol®888 ATO, $F_{c,L}$, da razão MD-GA/Formulação, $Ad_{c,L}$, e processo de produção, $P_{c,L}$ (amostras líquidas ou liofilizadas)

4.5 CONCLUSÕES

Os resultados reportados nesse estudo mostraram que a retenção de timol nas formulações lipídicas e, conseqüentemente a atividade biológica desses sistemas acrescidos do óleo essencial de *Lippia sidoides* como fonte de ativos, podem ser modificadas através da correta seleção da composição da formulação a ser seca, do processo e condições de secagem, e também pela quantidade de carreadores de secagem adicionados.

A porcentagem de retenção de timol variou conforme o processo de secagem utilizado, sendo muito maior para as formulações liofilizadas (74% a 100%) do que para as secas em *spray dryer* (5% a 47%). Os valores de retenção apresentados pelos pós liofilizados foram muito semelhantes às suas respectivas formulações líquidas, indicando baixíssimas perdas durante o processo de liofilização e uma retenção elevada de ativo, apesar que outros compostos minoritários possam ter sido perdidos.

Os produtos secos por *spray drying* apresentaram propriedades de fluidez fraca, muito fraca e extremamente fraca, não apresentando boas propriedades de compressão, sendo um resultado característico para pós secos em *spray dryer*. As partículas apresentaram tamanhos entre 433,1nm e 1827,7nm, polidispersas e com relativa estabilidade referente ao potencial zeta, cujos valores ficaram na faixa entre -17,2mV e -33,6mV. As formulações com maiores teores de Compritol®888 ATO apresentaram as piores propriedades de fluidez e maiores tamanhos de partícula (amostras redispersas), no entanto formaram partículas com maior valor de potencial

zeta, indicando maior estabilidade. Os pós apresentaram ainda valores adequados de atividade de água (abaixo de 0,5), e umidade de 3,25% a 6,53%, característica influenciada pela a umidade relativa do ar de secagem.

Os pós liofilizados apresentaram tamanhos de partícula entre 638,4 nm a 1764,0 nm, enquanto as formulações líquidas apresentaram maior amplitude de tamanho, variando de 267,9 nm a 2941,3 nm. As formulações liofilizadas apresentaram maior polidispersão do que as líquidas; e a quantidade do lipídio sólido Compritol®888 ATO na formulação forneceu partículas maiores (para ambos os processos de obtenção das partículas) e mais polidispersas (para os pós liofilizados). As amostras apresentaram ainda valores de potencial zeta em torno de -30 mV, sendo a estabilidade definida como moderada. As formulações liofilizadas apresentaram valores reduzidos de umidade (0,93% a 4,50%) e atividade de água (0,065 a 0,213), sendo que as formulações com menor quantidade de adjuvantes de secagem e maior percentagem de Compritol®888 ATO apresentaram os menores valores de umidade.

A análise permitiu concluir que o processo de liofilização forneceu um produto com maior retenção do ativo, menor atividade de água e umidade, evidenciando um produto com alta estabilidade frente a reações de degradação químicas e/ou bioquímicas. Maiores concentrações do lipídio sólido Compritol®888 ATO forneceram partículas maiores, mais polidispersas, porém com menor atividade de água. À primeira vista o processo de liofilização proporciona maiores vantagens frente ao processo *spray drying* para a desidratação de formulações lipídicas incorporadas de óleo essencial, gerando um: produto com mais teor de ativos. No entanto, trata-se de um processo cujo custo energético é elevado e o tempo de obtenção do produto seco é maior. Como foi descrito no estudo, os demais fatores envolvidos no processo também influenciaram nas características do produto final. Portanto, outros estudos nessa área poderão levar à determinação de formulações e condições de secagem por *spray drying* que permitam a obtenção de um produto final com boa retenção de ativos a um custo de produção reduzido.

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A micro/nanoencapsulação é uma tecnologia de grande interesse para a indústria, já que permite incorporar e aumentar a solubilidade e estabilidade, proteger e modular a liberação de uma vasta gama de ativos com propriedades diferentes. Esse processo de inclusão do ativo em um invólucro protetor pode ocorrer de diversas formas diferentes. Este trabalho abordou como objeto de estudo sistemas lipídicos, na forma líquida original e submetidos a secagem pelos processos *spray drying* e por liofilização.

Inúmeros fatores estão envolvidos na obtenção de um sistema encapsulante capaz de reter quantidades elevadas de ativo de forma a garantir sua proteção, estabilidade e, ainda, modular sua liberação. A escolha dos componentes a serem utilizados, bem como suas proporções nas formulações e também as técnicas envolvidas na obtenção desses sistemas são etapas cruciais no desenvolvimento das micro/nanopartículas lipídicas. Dessa forma, o estudo detalhado de cada etapa do processo de produção, assim como a caracterização do produto final são muito importantes para o conhecimento e entendimento do processo produtivo como um todo.

As análises apresentadas no Capítulo 1 permitiram avaliar a influência de diferentes constituintes dos sistemas (lipídios e tensoativos), avaliando sua influência nas propriedades físico-químicas, retenção do composto majoritário, timol, e na atividade antifúngica contra *Candida albicans* das formulações líquidas obtidas. Esse estudo foi promissor e contribuiu para novas perspectivas tecnológicas na área, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos para o mercado. A utilização de ativos naturais ou até mesmo a associação desses ativos com moléculas antifúngicas já existentes no mercado é uma estratégia promissora no combate à resistência desses microrganismos aos medicamentos atualmente disponíveis.

Os estudos de secagem realizados nos capítulos posteriores também permitiram obter uma visão completa de todo o processo, das dificuldades inerentes para a secagem desses sistemas, e das variáveis envolvidas. Observou-se que a composição das formulações, bem como seu teor de sólidos, e a temperatura de secagem no *spray dryer* influenciaram significativamente a retenção do composto ativo, timol. Esse parâmetro também sofreu grande influência do processo de secagem. Verificou-se que a liofilização permite obter partículas com retenção de timol bastante superior às secas em *spray dryer*. No entanto, essas duas técnicas de secagem diferem acentuadamente no que diz respeito ao gasto energético,

o qual é muito maior no processo de liofilização. Dessa forma, o presente trabalho apresenta grandes contribuições nessa área de investigação, mostrando várias dificuldades e problemas inerentes à secagem destes tipos de formulações e propõe condições que permitam alterar esses problemas, visando solucioná-los.

VII. CONCLUSÕES

VII. CONCLUSÕES

A caracterização dos sistemas lipídicos descrita no Capítulo 1 evidenciou a obtenção de partículas na escala nanométrica de tamanho e com baixo índice de polidispersão. Observou-se ainda que alterações na composição das formulações lipídicas influem significativamente em suas propriedades físico-químicas e estabilidade. A avaliação da atividade antifúngica das formulações lipídicas obtidas, bem como do óleo essencial de *Lippia sidoides*, demonstraram boa atividade contra a levedura *Candida albicans*.

Os resultados apresentados no Capítulo 2 confirmaram a influência da composição e concentração de adjuvantes de secagem na retenção do timol e desempenho do sistema. As formulações secas nas quais adicionou-se adjuvante de secagem com maior razão G:P (e teor de sólidos), mostraram considerável incremento na retenção do timol comparativamente às formulações com menor razão G:P. Os pós obtidos são prontamente redispersíveis em água, retornando às propriedades originais do produto, o que o torna vantajoso do ponto de vista tecnológico. Entretanto, observou-se uma elevada perda de ativo e vários problemas no desempenho do secador, provavelmente associados à reduzida temperatura de transição vítrea das composições. Os resultados permitiram concluir que vários fatores estão envolvidos na retenção de ativos, como as variáveis operacionais do secador *spray dryer* e a própria composição da formulação.

Um estudo comparativo da influência do processo de secagem sobre as propriedades físico-químicas do produto formado foi apresentado no capítulo 3. Os resultados obtidos demonstraram que os produtos obtidos pelos processos *spray drying* e liofilização apresentaram alto grau de redispersão em água, gerando formulações com propriedades similares às originais. Também foi observado que o processo de secagem exerce grande influência na morfologia do pó. Os produtos liofilizados apresentaram maior retenção de timol e menores valores de atividade de água e umidade do que os produtos secos por *spray drying*.

No Capítulo 4 foi possível concluir que as propriedades físico-químicas de sistemas lipídicos tanto na forma líquida quanto desidratada podem ser modificadas por meio da alteração da composição da formulação (sistema lipídico e tensoativos), o processo e condições de secagem e também a proporção e tipos de carreadores de secagem empregados. Novamente, a retenção de timol foi maior nos produtos liofilizados. Todavia, apesar da maior retenção, o tempo e a energia consumidos durante esse processo de secagem representam um gasto considerável na produção dessas partículas, tornando necessários estudos adicionais visando

aumentar a eficiência do processo de secagem de sistemas lipídicos pelo processo *spray drying*, como por exemplo: redução da temperatura de secagem, remoção da umidade do gás e/ou uso de diferentes gases de secagem, como o nitrogênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. **Allured: Carol Stream, IL**, 2001.
- ADAMIEC, J.; KALEMBA, D. Analysis of microencapsulation ability of essential oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 24, n. 9, p. 1127–1132, set. 2006.
- ADHIKARI, B. et al. Effect of addition of proteins on the production of amorphous sucrose powder through spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 94, n. 2, p. 144–153, set. 2009.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: An updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407–426, 2010.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1–2, p. 80–86, 2013.
- ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, n. 3, p. 96–100, 2003.
- ALMEIDA, M. C. S. DE et al. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1877–1881, 2010.
- ALVES, S. F. et al. Microencapsulation of essential oil from fruits of *Pterodon emarginatus* using gum arabic and maltodextrin as wall materials: composition and stability. **Drying Technology**, v. 32, n. 1, p. 96–105, 2 jan. 2014.
- ANDRADE, V. A. et al. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 1153–1161, dez. 2014.
- ANTON, N. et al. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, n. 1–2, p. 44–52, 2007.
- ANVISA. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre "os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos". Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária Disponível em: <portal.anvisa.gov.br/documents>. Acesso em 29 de março de 2017.
- ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**, 1993.
- AULTON, M. E. **Pharmaceutics: The science of dosage form design**. London: Churchill Livingstone, 2002.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2nd. ed. Porto Alegre: Churchill Livingstone, 2005.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BASER, K.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. 2nd. ed. New York: CRC Press, 2015.

BENELLI, L.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Quality changes during spouted bed drying of pepper-rosmarin extract. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 91, n. 11, p. 1837–1846, 2013.

BHUSARI, S. N.; MUZAFFAR, K.; KUMAR, P. Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. **Powder Technology**, v. 266, p. 354–364, 2014.

BILIA, A. R. et al. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2014, p. 1–14, 2014.

BONILLA, J. et al. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 9–16, 2012.

BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 349–356, 2007.

BOUREZG, Z. et al. Redispersible lipid nanoparticles of Spironolactone obtained by three drying methods. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 413, p. 191–199, 2012.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455–475, 1960.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: John Wiley, 1978.

_____. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS Espécies vegetais 1**, 2009. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>>. Acesso em 29 de março de 2017.

BUCHBAUER, G. et al. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 6, p. 660–664, 1993.

CALVO, P. et al. Effects of microcapsule constitution on the quality of microencapsulated walnut oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 10, p. 1273–1280, 2011.

CARNEIRO, H. C. F. et al. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 443–451, abr. 2013.

CARVALHO, A. F. U. et al. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569–571, 2003.

CARVALHO, R. R. DA C. E et al. In vitro activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 241–244, 2013.

CAVALCANTI, E. S. et al. Larvicidal activity of essential oils from brazilian plants against

Aedes aegypti L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 541–544, 2004.

CAVALCANTI, S. C. H. et al. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 829–832, 2010.

CAVALEIRO, C.; PINTO, E.; GONÇALVES, M. Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. **Journal of Applied**, 2006.

CELIO, F. et al. Teor de óleo essencial e seus constituintes em alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) de três regiões geográficas distintas. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 1462–1465, 2008.

CHANDRASEKHAR, S. Stochastic problems in physics and astronomy. **Reviews of Modern Physics**, v. 15, n. 1, p. 1–89, 1943.

CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). **Food Chemistry**, v. 172, p. 298–304, 2015.

COIMBRA, M. et al. Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 2, p. 433–442, 2011.

CORTÉS-ROJAS, D. F. **Encapsulação de compostos bioativos de *Syzygium aromaticum* em carreadores lipídicos sólidos. 2015. 157 f.** Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; OLIVEIRA, W. P. Physicochemical properties of phytopharmaceutical preparations as affected by drying methods and carriers. **Drying Technology**, v. 30, n. 9, p. 921–934, 2012.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers. **Journal of Food Engineering**, v. 127, p. 34–42, 2014.

COSTA, V. C. O. et al. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 245–248, 2008.

CUI, J. et al. Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 362–371, 2015.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, n. 1, p. 39–44, 2003.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 62–76, 2011.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 139–151, 2012.

DESAI, K. G. H.; JIN PARK, H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361–1394, 2005.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308–316, 2000.

EL-BADRY, M.; FETIH, G.; FATHY, M. Improvement of solubility and dissolution rate of indomethacin by solid dispersions in Gelucire 50/13 and PEG4000. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 17, n. 3, p. 217–225, 2009.

EL-SAYED, T. M.; WALLACK, D. A.; KING, C. J. Changes in particle morphology during drying of drops of carbohydrate solutions and food liquids . 1 . Effects of composition and drying conditions. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 29, n. 1971, p. 2346–2354, 1990.

EL ASBAHANI, A. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.

ELOY, J. DE O. et al. Solid dispersion of ursolic acid in Gelucire 50/13: a strategy to enhance drug release and trypanocidal activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 4, p. 1436–1445, 2012.

F. GIBBS, SELIM KERMASHA, INTEAZ AL, B. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 213–224, 1999.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 211–218, 2009.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010.

FANGUEIRO, J. F. et al. Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: Development, characterization and cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1–2, p. 64–73, 2014.

FARIAS-JUNIOR, P. A. et al. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 399–402, 2012.

FAZAEI, M. et al. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 667–675, 2012.

FERNANDES, L. P. **Desenvolvimento tecnológico de produtos particulados obtidos a partir de *Lippia sidoides* pela técnica de *spray drying* e avaliação das propriedades antifúngicas**. 2008. 138p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

FERNANDES, L. P. et al. Volatile retention and antifungal properties of spray-dried microparticles of *Lippia sidoides* essential oil. **Drying Technology**, v. 26, n. 12, p. 1534–1542, 2008.

FERNANDES, R. V. DE B. et al. Effect of solids content and oil load on the microencapsulation process of rosemary essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 173–181, 2014.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934–940, 2007.

FREIRE, J. T.; SILVEIRA, A. M. Secagem de produtos farmacêuticos. In: OLIVEIRA, W. P.; FREITAS, L. A. P.; FREIRE, J. T. (Eds.). **Fenômenos de Transporte em Sistemas Particulados: Fundamentos e Aplicações**. São Carlos: Ed. Suprema, 2009. p. 307–343.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, n. 2, p. 221–229, 1998.

GALLARATE, M. et al. Formulation of dry emulsion for topical applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 823–833, 2009.

GAO, T.; TIEN, J.; CHOI, Y. Sunscreen formulas with multilayer lamella structure. **Cosmetics and toiletries**, v. 118, n. 10, p. 41–52, 2003.

GARG, M.; WOOD, L.; SINGH, H. Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. R66–R71, 2006.

GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007.

GHAYEMPOUR, S.; MONTAZER, M. Micro/nanoencapsulation of essential oils and fragrances: Focus on perfumed, antimicrobial, mosquito-repellent and medical textiles. **Journal of Microencapsulation**, v. 0, n. 0, p. 1–14, 2016.

GOCHEV, V. K.; GIROVA, T. D. Antimicrobial activity of various essential oils against spoilage and pathogenic microorganisms isolated from meat products. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, n. sup1, p. 900–904, 2009.

GOUIN, S. Microencapsulation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 7–8, p. 330–347, 2004.

GRIFFIN, S. G. et al. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, n. 5, p. 322–332, 1999.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 195–9, 2002.

HAMMER, K.; CARSON, C. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial**, 2004.

HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1–3, p. 210–216, 2008.

HECHT, J. P.; KING, C. J. Spray drying: influence of developing drop morphology on drying rates and retention of volatile substances. 2. Modeling. **Industrial & Engineering Chemistry**

Research, v. 39, n. 6, p. 1766–1774, 2000a.

HECHT, J. P.; KING, C. J. Spray drying: influence of developing drop morphology on drying rates and retention of volatile substances. 1. Single-drop experiments. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, n. 6, p. 1756–1765, 2000b.

HERNANDEZ SANCHEZ, M. DEL R.; CUVELIER, M.-E.; TURCHIULI, C. Design of liquid emulsions to structure spray dried particles. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 99–105, 2015.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273–292, 2005.

HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. R50–R57, 2010.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 565–573, 2001.

IXTAINA, V. Y. et al. Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying. **Powder Technology**, v. 271, p. 26–34, 2015.

JAFARI, S. M. et al. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816–835, 2008.

JOSHI, M. D.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 161–172, 2009.

KAUR, S. et al. Nanostructure Lipid Carrier (NLC): the new generation of lipid nanoparticles. **Asian Pac J Health Sci**, v. 2, p. 76–93, 2015.

KAUSHIK, P. et al. Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 868–881, 2015.

KING, A. H. Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing on hydrocolloids. In: **Abstracts of papers of the American Chemical Society**. Washington: American Chemical Society. v. 206, p. 79–AGFD, 1995.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; KUSTRAK, D. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., *Apiaceae*). **Acta Pharmaceutica**, 2005.

KREŠIĆ, G. et al. Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. **Journal of Food Engineering**, v. 87, n. 1, p. 64–73, 2008.

LEAL, L. K. A. M. et al. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Revista**

Brasileira de Farmacognosia, v. 13, p. 9–11, 2003.

LI, J. W.-H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161–165, 2009.

LI, R.; ROOS, Y. H.; MIAO, S. Flavor release from spray-dried amorphous matrix: Effect of lactose content and water plasticization. **Food Research International**, v. 86, p. 147–155, 2016.

LIMA, J. K. A. et al. Biototoxicity of some plant essential oils against the termite *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 246–251, 2013.

LOPEZ-RUBIO, A.; GAVARA, R.; LAGARON, J. M. Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 10, p. 567–575, 2006.

LOZA-TAVERA, H. Monoterpenes in Essential Oils. In: SHAHIDI, F. et al. (Eds.). **Chemicals via Higher Plant Bioengineering**. Boston, MA: Springer US. p. 49–62, 1999.

MADENE, A. et al. Flavour encapsulation and controlled release - a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 1–21, 2006.

MAGWA, M. L. et al. Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 85–89, 2006.

MAHDAVI, S. A. et al. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum arabic and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 379–385, 2016.

MAHFOUDHI, N.; KSOURI, R.; HAMDI, S. Nanoemulsions as potential delivery systems for bioactive compounds in food systems: preparation, characterization and application in food industry. In: ALEXANDRU MIHAI GRUMEZESCU (Ed.). **Emulsions - Nanotechnology in the Agri-Food Industry**. Academic Press. p. 365–403, 2016.

MAITANI, Y. et al. Modified ethanol injection method for liposomes containing β -sitosterol β -D-glucoside. **Journal of liposome research**, v. 1, n. 11, p. 115–125, 2001.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MARTÍN, Á. et al. Micronization of polyethylene glycol by PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions)-drying of aqueous solutions. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 49, n. 12, p. 1259–1266, 2010.

MATOS, F. J. A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham.- farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 70, n. 3–4, p. 84–87, 1998.

MONDELLO, F.; BERNARDIS, F. DE. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and-resistant human. **BMC infectious**, 2006.

MONTEIRO, M. V. B. et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**,

v. 111, n. 2, p. 378–382, 2007.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 158f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MORAIS, G. G.; OLIVEIRA, W. P.; DA ROCHA-FILHO, P. A. Influence of mixing speed in liquid crystal formation and rheology of O/W emulsions containing vegetable oils. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 35, n. 11, p. 1551–1556, 2014.

MOURAD, K. A. et al. Culture of medicinal plants in the city of fortaleza as a proposal for the sustainable development of the municipality. **International Journal of Life Science and Engineering**, v. 1, n. 4, p. 177–182, 2015.

MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles for improved formulation of cosmetic and pharmaceutical actives. n. 1, p. 1–69, 2007.

NUNES, R. S. et al. Characterization of the *Lippia sidoides* in vegetable raw material for pharmaceutical products. **Sci. Plena**, v. 1, p. 182–184, 2005.

OLADIMEJI, F.; ORAFIDIYA, L.; OKEKE, I. Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oil of Moldenke. **International Journal of Aromatherapy**, v. 14, n. 4, p. 162–168, 2004.

OLIVEIRA, E. F. DE; PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M. DE. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 146–151, 2014.

OLIVEIRA, W. P. DE; FREITAS, L. A. P. DE; FREIRE, J. T. Drying of Pharmaceutical Products. In: FREIRE, J. T.; SILVEIRA, A. M. DA; FERREIRA, M. DO C. (Eds.). **Transport Phenomena in Particulate Systems**. São Carlos: Benthan Science. p. 148–171, 2012.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v. 73, n. 2, p. 236–244, 2006.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414–420, 2007.

PARAMITA, V. et al. Effect of additives on the morphology of spray-dried powder. **Drying Technology**, v. 28, n. 3, p. 323–329, 2010.

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, N. DE O. F. et al. Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 279–288, 2016.

PYUN, M.; SHIN, S. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. **Phytomedicine**, 2006.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 46, n. 5, p. 386–392, 2007.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

REINECCIUS, G. A. The spray drying of food flavors. **Drying Technology**, v. 22, n. 6, p. 1289–1324, 2004.

RISCH, S. J.; REINECCIUS, G. A. **Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**. Washington, DC: American Chemical Society. v. 590, 1995.

RODRÍGUEZ, J. et al. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p. 41–59, 2016.

ROSA, N. A. B. **Development of nanoparticles loaded with bioactive compounds for application as nutraceuticals**. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia do Porto, Universidade do Porto, Porto, 2011.

SANTOS, C. P. DOS et al. Chemical diversity and influence of plant age on the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. germplasm. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 416–421, 2015.

SAVIUC, C. et al. Hybrid nanosystem for stabilizing essential oils in biomedical applications. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 6, n. 4, p. 1657–1666, 2011.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501–547, 1993.

SHERRY, M. et al. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. **Journal of Liposome Research**, v. 23, n. 4, p. 268–275, 2013.

SHRESTHA, H.; BALA, R.; ARORA, S. Lipid-based drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutics**, v. 2014, p. 10, 2014.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022–8028, 1994.

SILVA, P. I. et al. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 538–544, 2013.

SINHA, V. R. et al. Solid Lipid Nanoparticles (SLN'S) – trends and implications in drug targeting. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 212–238, 2010.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136–141, 2012.

SOOTTITANTAWAT, A. et al. Microencapsulation by spray drying : influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. **Food Engineering and Physical Properties**, v. 68, n. 7, p. 2256–2262, 2003.

SOUTO, E. M. B. **SLN and NLC for topical delivery of antifungals**. 259 f. Tese (Doutorado), Freien Universitat Berlin, Berlin, 2005.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 227–258, 2004.

TAN, S. W. et al. Surfactant effects on the physical characteristics of Amphotericin B-containing nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 372, n. 1–3, p. 73–79, 2010.

TEIXEIRA, M. I. et al. Characterization of short chain fatty acid microcapsules produced by spray drying. **Materials Science and Engineering: C**, v. 24, n. 5, p. 653–658, 2004.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterisation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 2, p. 124–135, 2007.

TIAN, J. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 2–3, p. 464–470, 2011.

TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F.; HUBINGER, M. D. Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 282–289, 2011.

TURINA, A. DE. V. et al. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 101–113, 2006.

ÜNLÜ, M. et al. Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 1–2, p. 117–121, 2002.

USP 29-NF 24. Bulk density and tapped density of powders. In: **United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 29-NF 24)**. Rockville, MD: USP, 2006. p. 2704.

USP 30-NF 25. United States Pharmacopeia and National Formulary. In: **United States Pharmacopeial Convention**. 30th. ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

VARSHOSAZ, J.; ESKANDARI, S.; TABBAKHIAN, M. Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1157–1163, 2012.

VERAS, H. N. H. et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 508–512, 2012.

VERAS, H. N. H. et al. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* cham: Possible mechanism of action. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 2, p. 179–185, 2013a.

VERAS, H. N. H. et al. Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, 2013b.

VERAS, H. N. H. et al. Antimicrobial Effect of *Lippia sidoides* and Thymol on *Enterococcus*

faecalis Biofilm of the Bacterium Isolated from Root Canals. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–5, 2014.

WALTON, D. E.; MUMFORD, C. J. The morphology of spray-dried particles - the effect of process variables upon the morphology os spray-dried particles. **IChemE**, v. 77, p. 442–460, 1999.

WEISS, J. et al. Nanostructured encapsulation systems. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G. et al. (Eds.). **Global Issues in Food Science and Technology**. 1st. ed. Elsevier, 2009. p. 425–479.

WHORTON, C. Factors Influencing Volatile Release from Encapsulation Matrices. In: **Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**. St. Paul, MN, 1995. p. 134–142.

YOON, H. S. et al. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, n. 1, p. 151–156, 2000.

ZANATTA, C. F. et al. Rheological behavior, zeta potential, and accelerated stability tests of Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) emulsions containing lyotropic liquid crystals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 1, p. 93–101, 2010.

ZIEGLER, M. et al. Manufacturing Processes: Physical Processes. In: **Flavourings**. Weinheim, 2007. p. 15–119.