



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

**Nanoencapsulamento de Óleo Essencial de  
*Rosemarinus Officinalis* com PEG  
Estudo do efeito das massas molares de PEG**

**Sofia Pinho Laranjeira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Biotechnologia**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professora Doutora Amélia Rute Lima Dias dos Santos

**Covilhã, outubro de 2016**



# Agradecimentos

Quero agradecer às várias pessoas que, direta ou indiretamente, permitiram viver os melhores cinco anos da vida de um estudante.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e acreditaram na minha capacidade de querer mais e melhor para a nossa família. Aos meus avós e bisavó Joaquina que me têm constantemente no pensamento e me apoiam sempre com sábias e carinhosas palavras de encorajamento, principalmente, quando tudo parecia perdido para mim. Aos meus restantes familiares, tios/tias, padrinhos, primos(as), que mesmo sem o dizer, sei que têm orgulho e que confiam em mim como exemplo para os mais novos.

Um especial agradecimento ao senhor Fernando Fragoso, da SASUBI, que para além de um excelente profissional e treinador foi como um pai, um amigo e um psicólogo nos momentos mais solitários da Covilhã. A ele e a toda a equipa de Hóquei em Patins da UBI, um agradecimento por me ajudarem a crescer e amadurecer como pessoa e colega.

Aos meus amigos mais chegados, o Nuno Pereira, a Clara Godinho, a Cláudia Nóbrega, o Pedro Silva, o pessoal do ISVOUGA e à minha família académica “A Irmandade” um grande bem aja pelos bons momentos de descontração, amizade, união, amor, carinho, apoio e diversão. Foram um dos meus grandes pilares tanto na Covilhã como fora dela e serão com certeza os amigos da faculdade que ficaram para sempre comigo.

Agradeço também, à minha orientadora, a Professora Doutora Amélia Rute Santos por me ter acolhido sempre com a maior simpatia e por mover mundos e fundos para eu poder crescer como investigadora e profissional, e à Doutora Paula Gomes, do Centro de Ótica, da UBI, pela disponibilidade e colaboração neste projeto.



# Resumo

Os Óleos Essenciais (OE) são uma mistura de compostos hidrofóbicos voláteis que se degradam facilmente, porém apresentam propriedades e aplicações bastante úteis ao Homem desde o início das civilizações. O nanoencapsulamento destas substâncias tem vindo a ganhar um elevado interesse, essencialmente pelos benefícios que apresenta face aos microssistemas e proteção contra as condições ambientais, mas também pela variedade de materiais que se podem utilizar como agentes de encapsulamento. As estratégias atuais de nanoencapsulamento tendem cada vez mais para uma Química Verde e sustentável, de modo a deixar uma pegada ecológica mais pequena.

O presente trabalho pretende realizar o encapsulamento de óleos essenciais em nanocápsulas de Poli(Etileno Glicol) (PEG), pelo método de emulsão de óleo em água (O/A), e estudar a influência da massa molecular do PEG utilizado (do monómero até PEG 35 000) na formação das nanocápsulas. As amostras obtidas foram caracterizadas por Microscopia Eletrónica. A resistência das nanoemulsões de nanocápsulas (NC) à turbulência e à temperatura foi estudada por centrifugação e por aumento de temperatura gradual a pressão reduzida.

Observou-se que PEG com massa molar de 1 500 até 6 000 g/mol origina sistemas de emulsões de NC espessas e estáveis, com elevada resistência à turbulência e à temperatura. O Etilenoglicol, ou seja, o monómero (MEG), nas condições estudadas parece polimerizar em torno de gotículas de OE, formando nanocápsulas, mas em baixa concentração. O PEG 300, líquido à temperatura ambiente, forma nanocápsulas também em baixa quantidade, apenas observáveis por microscopia de transmissão.

O PEG com massas iguais ou superiores a 12 000 g/mol formam sistemas de microemulsões estáveis, mas não formam nanocápsulas. Concluiu-se ainda que a adição de etanol, apesar de aumentar a concentração de nanocápsulas diminui a espessura das cápsulas, deixando-as frágeis e pouco resistentes.

## Palavras-chave

Óleo Essencial, Poli(EtilenoGlicol) (PEG), Nanoencapsulamento, Nanoemulsão.



# Abstract

Essential Oils (EO) are a mixture of volatile hydrophobic compounds that degrade easily, but have properties and applications very useful to man since the beginning of human civilizations. The nanoencapsulation of these substances has gained a relevant interest, essentially for the benefits it provides face to microsystems and protection against environmental conditions, but also by the variety of materials that can be used as encapsulating agents. Current strategies of nanoencapsulation tend increasingly for Green Chemistry and sustainable methods, for a smaller ecological footprint.

This work pretends to perform the encapsulation of essential oils in nanocapsules of Poly (Ethylene Glycol) (PEG), by the method of Oil in Water emulsion (O/W), and study the influence of molecular weight of PEG (monomer to PEG 35 000) on the formation of nanocapsules. The samples were characterized by Electronic Microscopy techniques. Nanoemulsions and nanocapsules stability was studied by centrifugation (resistance to turbulence) and by gradual increase of temperature in a low pressure system.

It was observed that PEG with molar weight from 1500 to 6 000 g/mol affords emulsions of uniform nanocapsules, thick and stable systems with high resistance to turbulence and temperature. The monomer (MEG) polymerizes around the OE droplets forming NC in a not significant amount. PEG 300, liquid at room temperature, also forms NC in small amounts.

PEG with molar weights equal to or greater than 12 000 g / mol form stable microemulsions systems with no formation of NC. It was also concluded that the addition of ethanol, despite increasing the encapsulation efficiency, decreases the thickness of the capsules, making them fragile and much less resistant.

## Keywords

Essential Oil, Poli(ethylene Glycol) (PEG), Nanoencapsulation, nanoemulsion



# Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1.    Propriedades dos OE	1
1.1.1.  Agentes antioxidantes	1
1.1.2.  Agentes antimicrobianos	2
1.1.3.  Sabores e odores - <i>flavors</i>	2
1.2.    Aplicações	3
1.2.1.  Indústria Agrícola	3
1.2.2.  Indústria Alimentar	4
1.2.3.  Indústria Cosmética	5
1.2.4.  Indústria Farmacêutica e Medicina	5
1.2.5.  Indústria Têxtil	6
1.3.    Limitações	6
1.4.    Tecnologias de Encapsulamento	7
1.4.1.  Nanoencapsulamento	7
1.4.2.  Nanoemulsões	8
1.4.3.  Sonificação	10
1.4.4.  Outras Tecnologias de encapsulamento	11
1.5.    Materiais de encapsulamento	11
1.5.1.  Polímeros como material de encapsulamento	12
1.5.2.  PEG como material de encapsulamento de óleos essenciais	12
1.6.    Surfactantes	13
1.7.    Estudo de Nanopartículas	14
1.8.    Objetivo	15
Capítulo 2 - Estado da Arte	16
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	20
3.2.    Métodos experimentais	20

3.2.1.	Encapsulamento por <i>Melting-Dispersion</i>	20
3.2.2.	Encapsulamento do OE em PEG em fase aquosa	21
3.2.3.	Encapsulamento do OE em PEG em água e etanol (variação do método anterior)	21
3.2.4.	Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)	22
3.2.5.	Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM)	22
3.2.6.	Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)	22
3.2.7.	Cromatografia Gasosa (GC)/Cromatografia Gasosa-Espetrometria de Massa (GC-MS)	23
Capítulo 4 - Discussão de Resultados		24
4.1.	Análise de GC-MS	24
4.2.	Métodos de encapsulamento	26
4.3.	Análise de Microscopia Eletrónica de Varrimento (TEM)	27
4.3.1.	Amostras preparadas com PEG 1500, PEG 3000, PEG 4000 e PEG 6000	27
4.3.2.	Amostras preparadas com MEG	28
4.3.3.	Amostras preparadas com PEG 12 000, PEG 20 000 e PEG 35 000	29
4.4.	Análise de Transmission Electronic Microscopy (TEM)	30
4.4.1.	Amostras preparadas com MEG	30
4.4.2.	Amostras preparadas com PEG 300	31
4.4.3.	Amostras preparadas com PEG 1 500	31
4.4.4.	Amostras preparadas com PEG 4 000	32
4.5.	Estudo da Calorimetria Diferencial (DSC)	33
4.6.	Estabilidade das emulsões das NC-PEG	33
4.7.	Estudo de outras variáveis	35
4.7.1.	Diminuição da viscosidade do meio com etanol	35
4.7.2.	Estudo de pH	38
4.7.3.	Sonificação - Estudo do tempo e temperatura de processo	38

Capítulo 5 - Conclusão	41
Capitulo 6 - Perspetivas futuras	42
Capitulo 7 - Bibliografia	43



## Lista de Ilustrações

Ilustração 1 - Estrutura esquemática de nanocápsulas e nanoesferas .....	8
Ilustração 2 - Exemplos de nanoemulsão .....	9
Ilustração 3 - Fenómenos que afetam a estabilidade das nanoemulsões.	10
Ilustração 4 - Esquema do processo de sonificação.....	10
Ilustração 5 - Polimerização do Etileno Glicol.....	12
Ilustração 6 - Encapsulamento com PEG como co-polímero. ....	13
Ilustração 7 - Tamanho do surfactante nos sistemas coloidais. ....	14
Ilustração 8 - Composição do OE de Alecrim por GC-MS .....	24



# Lista de Imagens

Imagem 1. Imagens SEM de PEG com OE por <i>Melting-Dispersion</i> .....	26
Imagem 2. Imagens SEM das soluções ácidas de PEG com OE: PEG 1 500 a PEG 6 000 .....	28
Imagem 3. Imagem SEM da solução ácida de MEG com OE .....	29
Imagem 4. Imagens SEM das soluções ácidas de PEG de alta massa molar com OE .....	29
Imagem 5. Imagem TEM Emulsão de OE com MEG .....	30
Imagem 6. Imagem TEM Emulsão de solução ácida de PEG 300 .....	31
Imagem 7. Imagem TEM Emulsão de PEG 1 500 com OE .....	32
Imagem 8. Imagem TEM Emulsão de solução ácida de PEG 4 000 .....	32
Imagem 9. Amostras com emulsões de NC-PEG com OE .....	34
Imagem 10. Amostra de PEG 4000 com OE centrifugada.....	34
Imagem 11. Imagem SEM de Emulsão de NC-PEG 1500 com Etanol. ....	36
Imagem 12. Imagens SEM de Emulsão de NC-PEG 3000 com Etanol .....	36
Imagem 13. Imagem SEM de Emulsão de NC-PEG 4000 com Etanol .....	37
Imagem 14. Imagem SEM da emulsão de NC-PEG 6 000 com etanol.....	37
Imagem 15. Imagem SEM de emulsão múltipla de PEG 4 000 .....	38
Imagem 16. Imagens TEM de uma emulsão múltipla e de NC-PEG .....	40



# Lista de Esquemas

Esquema 1 - Método de <i>Melting-Dispersion</i> .....	21
Esquema 2 - Método O/A para o encapsulamento do OE em PEG .....	21
Esquema 3 - Método O/A para o encapsulamento de OE em PEG com a adição de Etanol .....	22
Esquema 4 - Condições de sonificação e resultados obtidos .....	39



## Lista de Acrónimos

A/O	Água em Óleo
CD	Calorimetria Diferencial
CG	<i>Gas Calorimetry</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EO	<i>Essential Oils</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC-MS	<i>Gas Calorimetry-Mass Spectrometry</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
MEG	Mono(Etileno Glicol)
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MW	<i>Molecular Weight</i>
NC-PEG	Nanocápsulas de Poli(Etileno Glicol)
O/A	Óleo em Água
O/A/O	Óleo em Água em Óleo
OE	Óleo Essencial
OEA	Óleo Essencial de Alho
OEO	Óleo Essencial de Oregão
OEZ	Óleo Essencial de <i>Zataria multifuncional</i>
O/W	Oil-in-Water
PEG	Poli(Etileno Glicol)
PEO	Poli(Etileno Óxido)
PLA	Poli(Lactic Ácid)
PLGA	Poli(Lactid-co-Glicolic Ácid)
POE	Poli(Óxido Etileno)
SEM	Scanning Electronic Microscopic
TEM	Transmission Electronic Microscopic
TPP	Tri(Poli Phosphate)



# Capítulo 1 - Introdução

Os OE são uma mistura complexa de vários compostos, líquida, oleosa e aromática, pouco solúvel em fase aquosa, obtida a partir dos órgãos de plantas de diversas espécies [1, 2, 3]. São constituídos por uma mistura de compostos hidrofóbicos que são metabolitos secundários das plantas, como terpenos, terpenóides, flavonóides, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, éteres e os diversos derivados minoritários [2, 4, 5]. A composição dos OE pode variar de acordo com a espécie de planta, dos órgãos de que são extraídos, da zona demográfica e da época sazonal, resultando em diferentes perfis organoléticos e olfativos e num largo leque de atividades biológicas [1, 2, 5].

## 1.1. Propriedades dos OE

Os OE têm propriedades antimicrobianas, antivirais, antifúngicas e inseticidas, antioxidantes, e na libertação de sabor e odores, etc., que se supõe poder estarem relacionadas com as suas funções na planta [2, 7]. As diferentes propriedades devem-se aos diferentes compostos químicos que constituem os OE, que podem ser misturados com outros OE ou agentes de proteção e ter efeitos sinérgicos sobre os contaminantes [2]. Com este leque de características, o Homem pode aplicar os OE em diversas indústrias para seu benefício e melhorar a qualidade de vida.

### 1.1.1. Agentes antioxidantes

Como agentes antioxidantes, os OE, oferecem proteção contra os efeitos nocivos dos radicais livres e outras espécies reativas de oxigénio, devido à presença maioritária de flavonóides e fenóis [4, 7]. Esta característica leva a vantagens ecológicas, económicas e de saúde da população geral. Exemplos disso são a melhoria na conservação de alimentos, a aplicação em cremes ou loções de cuidado de pele, entre outros.

Vários estudos demonstram que a maioria dos antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos podem deteriorar a saúde humana e que os OE têm a mesma capacidade antioxidante sem prejudicar ou alterar negativamente a saúde pública [4].

### 1.1.2. Agentes antimicrobianos

O rápido desenvolvimento da resistência por parte dos microrganismos aos antibióticos é um grave problema de saúde pública, tal como intoxicações e infeções alimentares, e tem levado o consumidor a procurar produtos de origem natural ou biológica, livres de químicos sintéticos [1, 4].

Os componentes dos OE têm propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais, devido principalmente à presença de terpenos, álcoois, cetonas, fenóis, ácidos, aldeídos e ésteres, podendo ser considerados antimicrobianos naturais, atuando em sinergia sobre todo o tipo de microrganismos. Como são hidrofóbicos, conseguem afetar a membrana celular bacteriana destruindo-a por disrupção membranar, tendo maior eficácia sobre bactérias Gram-negativas do que sobre as Gram-positivas, devido à composição das membranas celulares destas [1, 4, 5, 7]. A utilização de OE como agentes antimicrobianos naturais é uma alternativa cada vez mais procurada pelo consumidor final por ser uma alternativa verde, saudável e biodegradável em relação aos produtos com matérias primas sintéticas.

Contudo, algumas desvantagens como a alta volatilidade dos óleos, o seu caráter hidrofóbico e odores desagradáveis a altas concentrações, devem ser tomadas em consideração durante a sua formulação [7].

### 1.1.3. Sabores e odores - *flavors*

Os OE conseguem libertar odores e provocar sabores intensos, devido à presença de cadeias curtas hidrocarbonadas com oxigénio, azoto e enxofre nas suas ramificações. Como *flavors*, os óleos essenciais podem proporcionar aroma e sabor agradáveis aos alimentos, bem como a fragâncias, a produtos de *self care*, e a tecidos ou tintas. Na sua forma pura os óleos essenciais podem ter odores desagradáveis, sendo necessário algum tratamento prévio ou diluição destes em outras substâncias biocompatíveis [7].

## 1.2. Aplicações

O Homem utiliza os óleos essenciais desde o início das civilizações. Há mais de 2 000 anos, Grécia, Roma antiga, Egito, Índia, Pérsia e Arábia, os óleos essenciais eram usados em formulações para perfumes, alteração de sabores e conservantes naturais. A partir do século XVI são difundidos pela Europa em farmácias, mas só a partir do século XIX e XX começam a ser estudados como uma alternativa médica [2, 3, 8].

Atualmente, os OE são também utilizados em inúmeras indústrias, mostrando-se promissores em vastas áreas do cotidiano e dão uma melhor imagem aos produtos por serem químicos naturais com benefícios para o homem sem prejuízos para o ambiente [8, 9]. As propriedades dos OE fazem com que sejam valorizados e que tenham aplicações industriais interessantes, aumentando o rendimento e valor dos produtos finais. Por exemplo, na aplicação na agricultura e criação de animais, como fungicida ou antibiótico, na alimentação, como conservantes, na farmacêutica, como tratamento tópico, ou na cosmética, para criação de produtos livres de químicos nocivos.

Os óleos essenciais têm de ser considerados GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e aprovados pela FDA (*Food and Drugs Administration*) ou outro órgão regulador para poderem ser utilizados em produtos de consumo humano [2, 4, 7].

### 1.2.1. Indústria Agrícola

A agricultura é afetada por inúmeras pragas provocadas por diversos microrganismos, levando a perdas económicas elevadas. Uma das atividades exibida pelos óleos essenciais é a capacidade de matar organismos vivos, como fungos e insetos, que provocam pragas nas plantas. Os fungos e as suas micotoxinas, por exemplo, são os principais agentes causadores de doenças em culturas agrícolas e por isso há a necessidade de recorrer a fungicidas. Os fungicidas sintéticos demonstram sucesso eficaz no controlo dos fungos patogénicos, mas têm consequências negativas sobre o ambiente, saúde pública e ao nível económico, além de que cada vez mais constituintes estão a ser banidos. Os fungicidas naturais, por sua vez, são a alternativa mais ecológica e saudável por serem de origem natural, biodegradáveis, seguros e as fontes de matéria prima têm preparação a baixo custo e mantêm os alimentos frescos e com elevada qualidade, sem efeitos secundários nos humanos

[10, 11, 12]. Estudos demonstram ainda que os OE podem ser colocados diretamente no solo para reduzir o crescimento de bactérias e contaminações em produtos orgânicos frescos, como em vegetais [1].

Como inseticida, alguns dos constituintes dos EO conseguem interferir numa zona do sistema nervoso dos insetos, que não está presente em mamíferos e peixes, levando à morte daqueles. Assim, os óleos essenciais parecem ser uma alternativa não tóxica no combate de pragas, pois são claramente menos perigosos para o Homem e para o ambiente, contudo o seu perfil sensível limita o uso destes compostos [8, 10].

### **1.2.2. Indústria Alimentar**

Na indústria alimentar os óleos essenciais podem acrescentar vantagens e valor aos produtos finais de modo a que sejam mais seguros e aceites pelos consumidores. Os diferentes rácios dos compostos nos OE podem contribuir para a criação de alimentos funcionais e para a melhoria da qualidade nutricional, com benefício para a saúde pública. Podem funcionar como antioxidantes ou conservantes, inibidores de patogénicos alimentares, modificadores de prazos de validade, promotores de textura, agentes organoléticos e redutores de toxicidade, e ainda proporcionar a libertação controlada das especiarias [1, 4, 7].

Como aditivos alimentares, alguns OE podem proteger os alimentos contra a oxidação dos nutrientes e contra agentes patogénicos, mantendo os produtos sensorialmente aceitáveis e aumentando a segurança alimentar. Os aditivos alimentares à base de OE apresentam o mesmo efeito que os conservantes sintéticos, mas sem consequências nefastas para a saúde pública, podendo ser utilizado diretamente no produto e em baixas ou altas temperaturas [1, 4, 7]. No caso da carne e do peixe a adição de óleos essenciais serve, essencialmente, para preservar os seus perfis físico-químicos, microbianos e sensoriais da degradação *Post Mortem* [4].

Alguns exemplos de produtos de conservação alimentar são o “Protecta one” e o “Protecta two”, que são dois aditivos alimentares à base de extratos vegetais considerados como GRAS nos EUA [2].

Outras aplicações, em produtos alimentares são a utilização dos óleos essenciais em sinergia com embalagens de atmosfera modificada, o uso como produtos de limpeza e de desinfeção de alimentos, como conservantes de sabores, atuando no perfil

organolético dos alimentos [4, 7]. O “DMC Base Natural” é um conservante produzido pela empresa DMCA, em Espanha, que compreende 50% de óleo essencial de alecrim, salva e citrinos e 50% de glicerol [2].

Nesta indústria, os OE devem sofrer um tratamento prévio à sua aplicação final, porque podem apresentar toxicidade na sua forma pura, bem como alterações sensoriais significativas aos alimentos e apresentar uma perda precoce de funções a altas temperaturas. Outra limitação importante é o facto de os OE terem baixa solubilidade em fases aquosas, o que pode levar a separação de fases ou precipitação [7].

### **1.2.3. Indústria Cosmética**

Os OE podem ser incorporados em cremes, loções, gotas ou soluções para tratamento e prevenção de doenças ou uso em cosméticos. As principais aplicações dos óleos essenciais em cosmética são em produtos de limpeza, como pastas de dentes, géis de banho e perfumes, devido às suas capacidades como conservantes, branqueadores, odorais e antimicrobianas [8].

A substituição dos conservantes artificiais por conservantes de origem natural, como os OE, tem aumentado, pois os consumidores têm maior formação e informação sobre os efeitos nefastos que os químicos artificiais podem provocar a curto e longo prazo no nosso organismo. Este aspeto é importante nesta indústria, pois um produto mais natural e livre de químicos sintéticos tem uma imagem de marca mais aceite no mercado [8].

Contudo, é importante interiorizar que tudo tem um limite máximo seguro e as autoridades de saúde pública têm o dever de alertar para esses limites regulamentando valores de equilíbrio entre o risco e o benefício [8].

### **1.2.4. Indústria Farmacêutica e Medicina**

Os OE possuem na sua composição química compostos com alto valor nas áreas da saúde, como um efeito curativo físico e psicológico enorme e possibilidade de serem formulados para inalação ou para aplicação tópica. No geral, as moléculas do OE são

absorvidas pela pele ou através dos pulmões e interagem com o sistema nervoso ou linfático provocando uma sensação de cura, estimulação, relaxamento e frescura [8].

Na indústria da saúde os constituintes dos OE podem, ainda, ser extensivamente úteis para prevenir e curar doenças humanas e na formulação de vacinas [8]. Contudo, a administração oral de doses elevadas pode levar ao retardamento do crescimento e efeitos adversos nos pulmões e rins, sendo o encapsulamento uma estratégia para atenuar estes efeitos [4]. É importante alertar para estes riscos, uma vez que os óleos essenciais podem comercializar-se puros, sem indicação de como utilizar.

Um grande número de estudos tem sido conduzido no sentido de estudar as propriedades dos OE em terapias com aroma e com massagens, como modificador natural de penetração na pele e para a libertação controlada de fármacos em alvos específicos do organismo [8].

#### **1.2.5. Indústria Têxtil**

Ao serem funcionalizados em têxteis, os OE, podem atuar como fragâncias, agentes de proteção microbiana e como agentes refrescantes. A aplicação de têxteis modificados pode ter variados contextos desde o uso diário, em hospitais, lares, fábricas e escolas.

Atualmente existem diferentes tipos de tecnologia que melhora a utilização e funcionalidade dos tecidos, como os têxteis cosméticos. Os têxteis cosméticos são aqueles que em contacto com a pele humana transferem substâncias ativas com propósitos cosméticos, de forma controlada. Este tipo de têxtil pode conter compostos ativos a partir de OE encapsulados e adsorvidos nos tecidos. Esta adsorção favorece a peça com libertação controlada dos compostos e a sua otimização aumenta a sua resistência de libertação ao longo de ciclos de lavagem [13-16].

### **1.3. Limitações**

A composição química e perfil hidrofóbico fazem dos OE substâncias voláteis, muito pouco solúveis em meios aquosos e suscetíveis à degradação pela ação do oxigénio, luz, temperatura e humidade [2,6, 9, 17-19]. Estas características limitam o rendimento e eficácia das possíveis aplicações os OE, além de que a composição

pode-se alterar durante o armazenamento com o tipo de embalagem e o local onde o óleo é mantido. Assim, os OE devem ser mantidos em embalagens hermeticamente fechadas e protegidas da luz, em ambientes refrigerados [2].

Alguns óleos essenciais também apresentam características prejudiciais ao Homem nas suas formas puras, como fototoxicidade e potencial alergénico, devido às alterações dos compostos no armazenamento [2, 18]. Estas características anulam-se quando o óleo está presente numa percentagem máxima de segurança provada e regulamentada e a sua quantidade em formulações não ultrapassa esse limite. Por exemplo, o óleo da árvore do chá apenas é seguro em formulações com, no máximo, 1% de óleo [9].

Para ultrapassar estas limitações, as equipas de investigação têm-se concentrado no encapsulamento dos OE, levando também a uma melhoria no manuseamento dos destes óleos [6, 3].

## **1.4. Tecnologias de Encapsulamento**

O encapsulamento é um processo pelo qual substâncias como compostos bioativos sólidos, líquidos ou gasosos, são acondicionadas dentro de um material de revestimento de modo a formar um ambiente fechado capaz de controlar interações entre as condições internas e externas [7, 17, 20, 21]. O encapsulamento pode ser aplicado para diminuir as limitações dos óleos essenciais, como instabilidade física, termodinâmica, bioatividade, volatilização e degradação oxidativa, ou para melhorar as propriedades, nas diversas indústrias onde se podem aplicar [6, 10, 17, 19-22].

### **1.4.1. Nanoencapsulamento**

O nanoencapsulamento é o processo de encapsulamento realizado à escala nanométrica, que envolve incorporação, absorção ou dispersão de compostos dentro de vesículas, formando nanopartículas [3, 9, 19, 20, 22]. Esta técnica tem funcionalidades superiores aos microssistemas, como o aumento da área de superfície, da solubilidade e da biodisponibilidade, promoção de libertação mais controlada de substâncias ativas, proteção da substância do ambiente externo ou melhoramento do seu manuseamento [9, 10, 6, 19, 20, 23].

Os sistemas nanoestruturados formados são classificados de acordo com o método aplicado sendo as nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões as mais simples (Ilustração 1), entre outras mais complexas [21, 22, 24]. As nanocápsulas (com um diâmetro até 1000 nm) são sistemas vesiculares que apresentam um invólucro ao redor de um núcleo, e as nanoesferas, formam um sistema de matriz no qual o composto está disperso uniformemente [9, 19, 22].

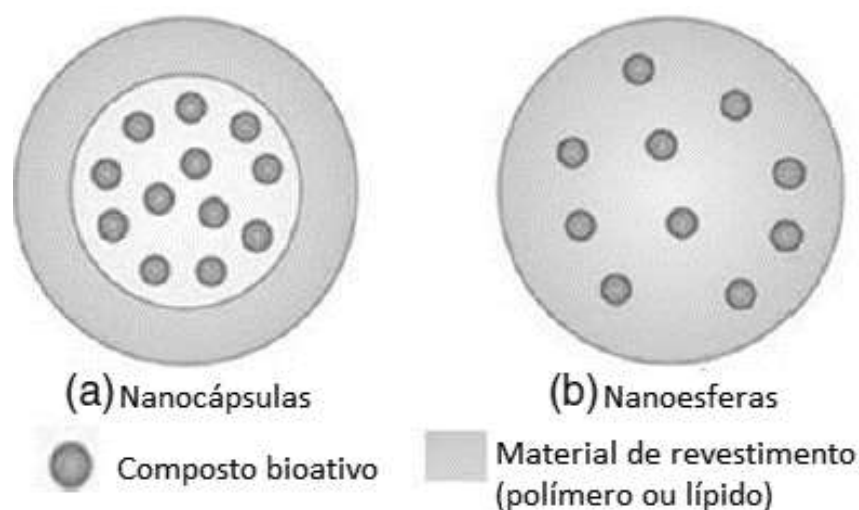


Ilustração 1 - Estrutura esquemática de (a) nanocápsulas e (b) nanoesferas. Adaptação do esquema apresentado por P. N. Ezhilarasi et al (2013) [20]

As técnicas de nanoencapsulamento podem ser mais ou menos complexas, de acordo com os materiais e com a aplicação final do produto. De acordo com a literatura existem técnicas de encapsulamento com ou sem solventes orgânicos, por métodos físicos ou químicos, com abordagem de “top-down” ou de “botton-up”. Atualmente tem havido uma tentativa do uso da Química Verde na produção de nanopartículas, pois são métodos mais ecológicos, económicos, sustentáveis e benéficos para a saúde pública e para os ecossistemas, sendo a emulsificação uma das técnicas mais comuns, eficazes e simples [3, 20, 25].

#### 1.4.2. Nanoemulsões

As nanoemulsões são nanossistemas de dispersões coloidais em que duas soluções imiscíveis estão dispersas uma na outra (ilustração 2). São opticamente translúcidas, estáveis cineticamente e a longo prazo e podem estar no estado líquido ou sólido, na forma de pó [18, 19, 26, 20, 22, 23]. As nanoemulsões têm concentrações muito baixas de surfactante (3-10%), libertam fragâncias sem necessidade de uso de álcool

e apresentam caráter estético e sensação agradável. A sua grande área de superfície e baixa tensão superficial resulta numa deposição uniforme e numa libertação de agentes bioativos com um maior poder de penetração na pele [20, 22, 23, 26].

Exemplo de emulsões são as emulsões de óleo-em-água (O/A) (ilustração 2-B) que consistem na homogeneização de uma mistura de óleo, água e um ou mais emulsionantes com um dispositivo mecânico, como um sonificador. Estas emulsões resultam num sistema de pequenas gotículas de óleo dispersas na fase aquosa em que a interface fica estabilizada por emulsionantes, e têm vantagens económicas e simplicidade de preparação [19, 21, 27].

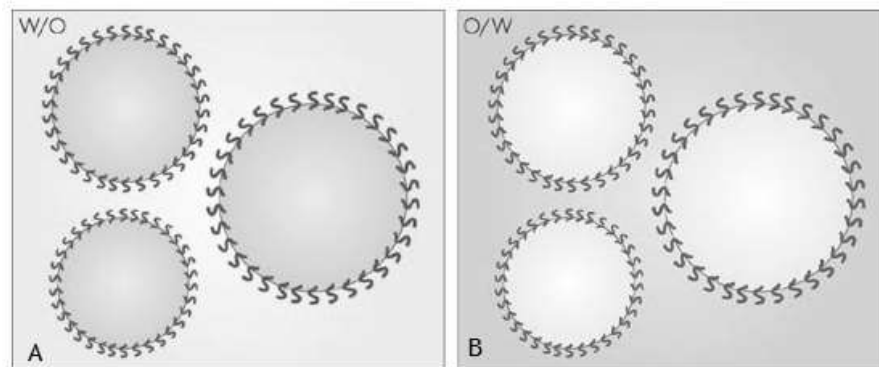


Ilustração 2 - Exemplos de nanoemulsão de (a) Água em Óleo (A/O) e de (b) óleo em água (O/A) com as gotas estabilizadas por moléculas de surfactante. Fonte: Nature Reviews Microbiology DOI: 10.1038/nrmicro1681

As nanoemulsões podem ser produzidas por emulsificação de baixa ou alta de energia. A produção por alta energia é a mais atrativa por permitir o scale up, disponibilidade de equipamento, por ser livre em solventes orgânicos e por produzir gotas de tamanhos menores [18, 20, 23]. Este método consiste no uso de agitação magnética de alta velocidade, homogeneizadores de alta pressão, ultrasonicadores ou microfluidizadores [20]. No caso de emulsificação com ultrassons, o aumento do consumo de energia contribui para reduzir o tamanho da gotícula, com recoalescência mínima de novas gotas [19, 20].

Uma das desvantagens das nanoemulsões é a sua instabilidade. Apesar de as nanoemulsões apresentarem maior estabilidade cinética em relação às microemulsões, as primeiras apresentam uma elevada instabilidade termodinâmica devido à maior área de interface [31]. A estabilidade cinética tem a ver com as interações dinâmicas entre as nanogotas, que permanecem num estado de contínuo de movimento, levando a colisões que destabilizam a nanoemulsão (ilustração 3).

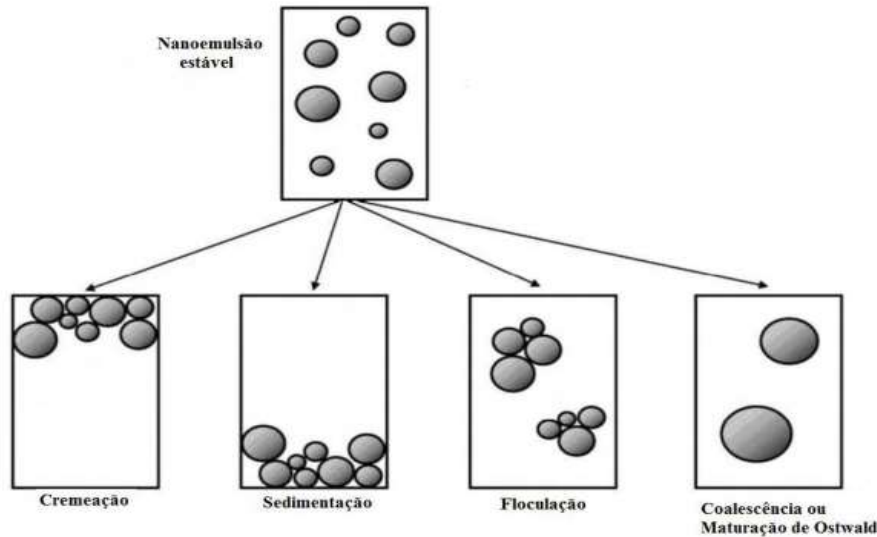


Ilustração 3 - Fenômenos que afetam a estabilidade das nanoemulsões.

(Fonte: adaptação feita por T. R. Borrin (2015) ao esquema apresentado por McClements, D. J., Weiss, J. Lipid Emulsions, Bailey's Industrial Oil and fat Products, 3<sup>th</sup> ed. John Wiley & Sons, 2005)

### 1.4.3. Sonificação

A sonificação é um dos passos mais importantes na formação de nanossistemas. Esta técnica baseia-se na aplicação de ultra-sons para realizar uma homogeneização fina da emulsão e permitir a diminuição do tamanho das gotas de óleo, organização do material de revestimento e estabilização do sistema por emulsificação. A sonificação é realizada por estágios em que inicialmente se tem uma mistura de óleo, um meio aquoso e um ou mais emulsificantes, forma-se uma emulsão múltipla de óleo em água em óleo (O/A/O), porque a concentração da fase aquosa é superior à do óleo, passando por uma inversão de fases resultando em uma emulsão de O/A, em que as gotículas são heterogêneas e grandes, e ao fim de algum tempo forma-se uma distribuição homogênea e estabilizada das gotas reduzidas na emulsão (ilustração 4) [23, 31]. Caso a fase aquosa contenha um material de revestimento, supõe-se que este vai organizar-se em redor das nanogotas de óleo, com posterior ligação do emulsificante.

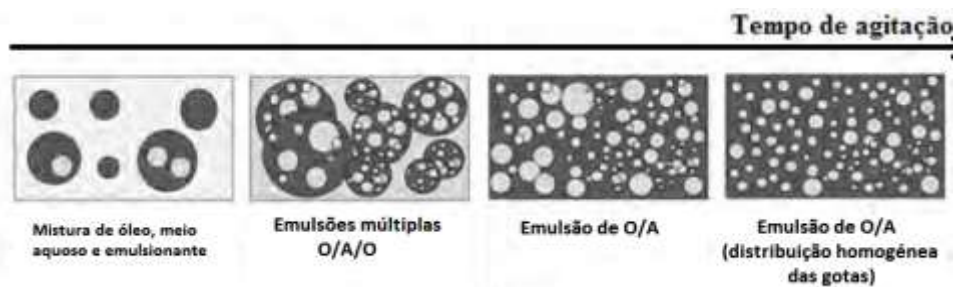


Ilustração 4 - Esquema do processo de sonificação de acordo com o tempo de agitação. Adaptação do esquema adaptado por T. Borrin (2015) [31] e por Komaiko et al 2016 [23]

#### 1.4.4. Outras Tecnologias de encapsulamento

Além das nanoemulsões existem outros métodos de encapsulamento de OE. Os mais comuns são a nanoprecipitação, a complexação de inclusão e a emulsificação- evaporação do solvente.

A nanoprecipitação envolve a precipitação do polímero a partir de uma solução orgânica e a difusão do solvente orgânico no meio aquoso, formando nanopartículas. Podem ser usados polímeros biodegradáveis, sendo o PEG e o Poli(Ácido Láctico-co-Glicólico) (*Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)*- PLGA) os mais comuns [20].

A complexação de inclusão consiste na inserção do agente a encapsular num material de revestimento (substratos moleculares que contêm cavidades que vão ser ocupadas pelo óleo) estabilizada por pontes de hidrogénio e ligações de Van Der Waals [19, 20, 21].

A técnica de emulsificação- evaporação de solvente envolve a emulsificação de um polímero numa solução aquosa e a evaporação do solvente deste, induzindo a precipitação do polímero em nanoesferas. Os compostos bioativos ficam dispersos numa rede de matriz polimérica [20].

#### 1.5. Materiais de encapsulamento

Os materiais de encapsulamento podem ter as mais variadas origens, sendo os mais comuns as dextrinas, o agar, polissacarídeos, alginatos, colagénio e polímeros naturais e/ou biodegradáveis [3, 20]. Estes materiais podem ser usados individualmente ou em combinação, e produzem uma camada fina de material à volta das substâncias alvo por diferentes mecanismos, formando nanocápsulas ou nanoesferas. Além de formar uma barreira de proteção contra as condições de ambiente externo, estes materiais também podem ser consumidos (são GRAS), apresentam biodegradabilidade, baixo custo, biodisponibilidade e por vezes têm origens naturais [6, 7, 17, 19]. O seu sucesso depende das interações com o conteúdo e dos processos de encapsulamento [7]. Os mecanismos de libertação dos compostos bioativos variam consoante a natureza do agente encapsulador e podem ser

estimulados com a temperatura, pH, solubilidade, biodegradabilidade, difusão, ruptura mecânica ou permeabilidade seletiva, etc. [19, 20].

### 1.5.1. Polímeros como material de encapsulamento

O encapsulamento à base de polímeros biodegradáveis e/ou naturais é frequentemente aplicado em diferentes áreas, e por existirem variadas matrizes poliméricas, é possível modificar superfícies, obter elevada eficiência de encapsulamento, elevada razão entre área/volume, facilidade de fazer *scale-up* e degradação controlada, apresentando um grande potencial em sistemas de liberação de fármacos [14, 17].

### 1.5.2. PEG como material de encapsulamento de óleos essenciais

O polietileno glicol (PEG) é um polímero sintético composto por poliéteres com unidades repetidas de etileno glicol (ilustração 5).

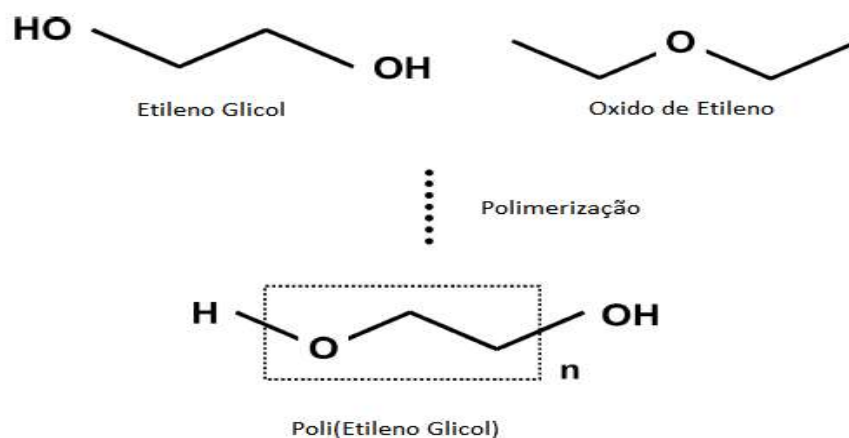


Ilustração 5 - Polimerização do Etileno Glicol e respectivas estruturas.  
Adaptação do esquema apresentado por Hyun-Jun Jang et al (2015) [28]

Em técnicas de encapsulamento, o PEG é comumente utilizado como co-polímero, um agente auxiliar de emulsões e de dispersões sólidas, em que a substância encapsulada fica dispersa numa matriz sólida interna, de outros materiais de encapsulamento, como por exemplo PLGA, Poli(ácido láctico) (Poli(Lactic ácido)-PLA), quitosano ou glicerina (ilustração 6) [29]. Este tipo de encapsulamento, denominado de 2ª geração tem também objetivo de evitar a captura hepática, pelas células de

Krupffer, de agentes bioativos nanoparticulados quando administradas no organismo animal. Os polímeros hidrofóbicos, como o PEG, não são reconhecidos nem capturados o que faz com que o material encapsulado tenha maior tempo médio de vida [32]. Este polímero apresenta elevado potencial para ser utilizado como matriz principal ou a solo de nanopartículas, podendo atuar como os materiais já utilizados para proteger e melhorar as propriedades dos óleos essenciais.

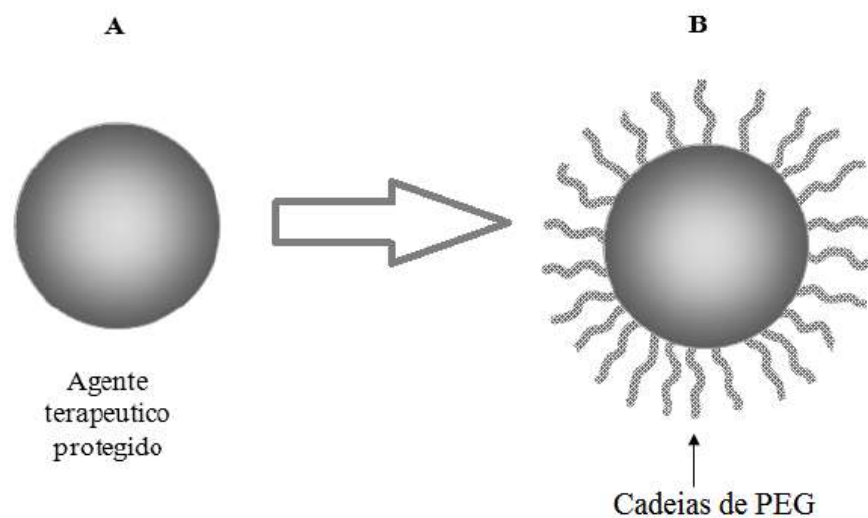


Ilustração 6 -Imagem explicativa de encapsulamento com PEG como co-polímero.  
Adaptado do artigo de revisão C. Gómez-Gaete (2004) [32]

É comumente aplicado em cosmética, farmacêutica, têxtil, tintas, entre outras indústrias e pode ter a denominação de Poli(Etileno Óxido) (PEO) ou Poli(Óxido Etileno) (POE), contudo não existe estudo que apliquem o PEG como material de revestimento individual [28, 29]. O PEG é aprovado pela FDA para uso em produtos de consumo humano e é considerado um composto GRAS, ou seja, é atóxico, biocompatível e não-imunogénico [24, 28].

## 1.6. Surfactantes

Os agentes tensoativos, surfactantes ou emulsificadores são substâncias que, em baixas concentrações, alteram a energia livre interfacial e a tensão interfacial de uma emulsão, deixando-a estabilizada. Os surfactantes têm natureza anfipática, possuindo regiões polares (hidrofílicas) e não-polares (hidrofóbicas) na mesma molécula [7, 23, 29]. Em geral, formam uma camada protetora em torno de gotículas

ou cápsulas e ajudam a prevenir a sua agregação durante e após a formação da emulsão [23]. Estudos realizados provam que quanto mais pequena for a molécula de surfactantes maior é a sua eficácia, devido ao aumento de organização à volta das cápsulas (ilustração 6) [23]. Exemplos destas substâncias é a lecitina, glicerol monopalminato, glicerol monoestearato e polisorbinatos [7].

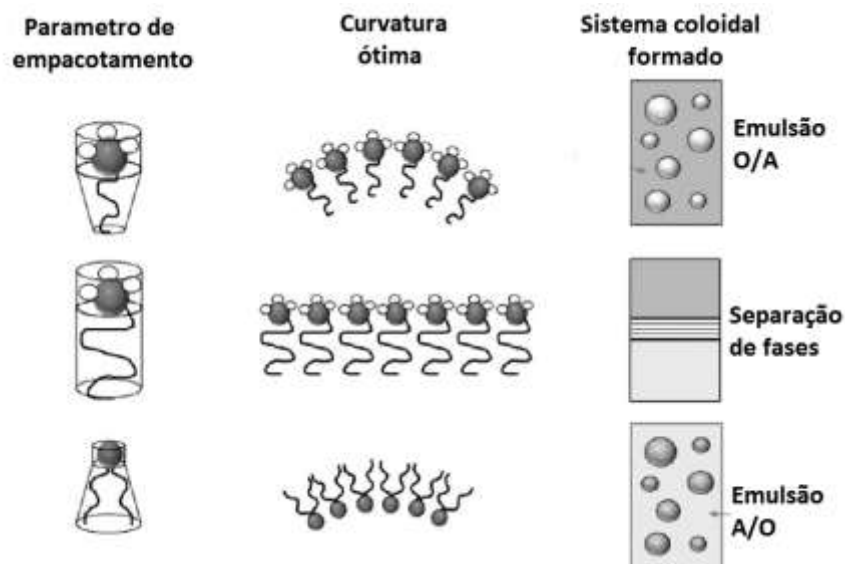


Ilustração 7 - Esquema explicativo da influência do tamanho do surfactante na formação de diferentes sistemas coloidais. Adaptação do esquema apresentado por komaiko et al 2016 [23]

Os polissorbatos são uma classe de surfactantes utilizados em alguns produtos farmacêuticos, em preparação de alimentos e em cosméticos, para solubilizar os óleos essenciais em produtos à base de água. Os polissorbatos são líquidos oleosos derivados de sorbatos PEGilizados esterificados com ácidos gordos. Alguns nomes de marcas comuns para polissorbatos incluem Scattics, Alkest, Canarcel e Tween [30].

## 1.7. Estudo de Nanopartículas

A caracterização de nanopartículas é um passo importante para o estudo das várias características físico-químicas, biológicas e morfológicas do material encapsulado e do material encapsulador.

A caracterização da morfologia, como tamanho, forma, dispersão e uniformidade de tamanho, pode ser estudada por Microscopia Eletrónica de Transmissão ou de Varrimento, por Microscopia de Força Atómica e por Difração a laser (*Dynamic Light*

*Scattering* - DLS). Estas técnicas permitem obter imagens de alta resolução da superfície das nanocápsulas, observar a sua presença num meio aquoso líquido e ainda obter o diâmetro médio das partículas [20, 32].

A Termogravimetria Diferencial e outras técnicas calorimétricas permitem concluir se o OE está encapsulado, a sua resistência ao calor, a percentagem de encapsulamento e o estado físico das cápsulas formadas e ainda se existe interação OE/Polímero. São técnicas que utilizam o calor e a variação da massa das amostras com a temperatura para obter conclusões sobre as características acima mencionadas [20]. Além das técnicas apresentadas ainda há o estudo do potencial zeta, que permite determinar a carga superficial das nanopartículas e a estabilidade das emulsões.

## **1.8. Objetivo**

O objetivo do presente trabalho foi estudar o nanoencapsulamento de óleos essenciais em cápsulas de PEG. Foram realizados estudos por dois métodos diferentes descritos na literatura [17, 35]. No método de “*melting dispersion*”, baseado na mistura direta do OE no polímero a temperaturas superiores à transição vítrea, não se obtiveram resultados positivos. O segundo método estudado, baseado na emulsão de óleo em água (O/A), demonstrou viabilidade para algumas massas molares do PEG. Assim, estudaram-se algumas variáveis, como a influência do tamanho molecular do polímero, a adição de etanol para diminuição da viscosidade do meio, e as condições de sonificação. Também se pretendeu estudar a capacidade de polimerização do monómero, o MEG, de forma a encapsular os OE. A caracterização foi realizada por microscopia eletrónica (MEV e MET) e calorimetria diferencial (CD) e os estudos de estabilidade por centrifugação e aumento gradual de temperatura a pressão reduzida.

## Capítulo 2 - Estado da Arte

Desde o final da década de 90 que o encapsulamento de composto ativos é estudado. Diversas técnicas foram desenvolvidas e otimizadas de modo a que, inicialmente, houvesse alto rendimento do encapsulamento, posteriormente, capacidade de encapsular os mais variados compostos (óleos e proteínas principalmente) e aplicação nas variadas indústrias. Atualmente, o foco está no encapsulamento com o mínimo de impacto no meio ambiente e redução no consumo de energia, como no uso da Química Verde e de materiais de encapsulamento naturais. O encapsulamento passou por várias etapas, mas a principal foi a redução do tamanho das partículas da micro para a nano escala, o que fez com que se abrisse um leque de aplicações úteis ao Homem.

Um dos primeiros trabalhos publicados sobre síntese de nanocápsulas foi de Calvo e seus colaboradores, em 1997 [33]. O grupo de investigação tentou criar um novo tipo de sistema de distribuição de proteínas hidrofílicas através de nanopartículas em suspensão e avaliar a eficácia de aprisionamento e libertação controlada das proteínas encapsuladas. O grupo utilizou quitosano, como polímero, óxido de polietileno - óxido de propileno (PEO-PPO), como co-polímero, e tripolifosfato de sódio (TPP), como surfactante, para formar uma suspensão de nanopartículas, pelo método de gelificação iónica. Eles provaram que as nanopartículas formadas têm grande capacidade de empacotamento (>80% da proteína total adicionada) e que o sistema fornece uma libertação contínua de proteína por um período de tempo extenso (>1 semana), podendo o processo ser promissor na produção de novos veículos de transporte para administração de fármacos.

Quase uma década depois, em 2005, Turchiuli e seus colaboradores realizaram um estudo sobre a viabilidade do encapsulamento de um óleo vegetal por um método de três etapas que consiste em emulsificação, *spray drying* e aglomeração em cama fluída [34]. O grupo usou uma mistura de resina de acácia e maltodextrina como material de encapsulamento e óleo vegetal, como modelo para outros ingredientes lípidos. O pó obtido foi caracterizado em termos de conteúdo, proteção do óleo contra a oxidação e as propriedades de manuseamento das cápsulas (fluidez, flexibilidade e molhabilidade). Eles concluíram que o pó obtido tinha alta capacidade para carregar o óleo e protegê-lo da oxidação e que a última etapa do processo faz

com que a molhabilidade aumente, embora a fluidez e resistência mecânica não tenham sofrido melhoramentos significativos.

Em 2009, o grupo de investigação de Feng-Lian Yang [17] caracterizou nanopartículas de óleo essencial de alho (*Allium sativum*) preparadas com Poli(etileno Glicol) (PEG) pelo método de *Melting-Dispersion*, desenvolvido em 2008 por outro autor. O método baseia-se na elevação da temperatura até derretimento do PEG, com posterior adição do óleo e agitação manual com vareta de vidro. Após o abaixamento da temperatura, e consequente solidificação, a mistura é triturada até à obtenção de um pó fino. Além da caracterização das partículas formadas, grupo analisou a composição do óleo utilizado, antes e após o encapsulamento, por cromatografia gasosa - espectrometria de massa, e avaliou a capacidade inseticida das nanopartículas contra o *Tribolium castaneum* (Besouro Castanho). A análise da composição do óleo mostrou não haver alteração significativa após encapsulamento, durante 5 meses de armazenamento. Os testes *in vitro* mostraram que o óleo essencial de alho encapsulado é mais eficaz como insecticida do que o óleo livre. Os autores obtiveram uma eficácia de acondicionamento de 80% com um rácio de 10% de óleo para PEG, concluindo assim que este é um possível método para a preparação de nanocápsulas de Óleo Essencial em PEG.

No mesmo ano, o grupo de investigadores de An reportou um novo método de preparação de nanopartículas poliméricas monodispersas e de tamanho controlado, usando lipossomas como molde [24]. Eles sabiam que o diacrilato de poli(etileno glicol) pode sofrer reações de fotopolimerização, então realizaram um método de encapsulamento que se baseou-se em três etapas principais: encapsulamento de hidrogel de PEG formando componentes dentro das cavidades dos lipossomas, separação das cápsulas por tamanhos ( $1.32 \pm 0.16 \mu\text{m}$  (12%),  $450 \pm 62 \text{ nm}$  (14%), and  $94 \pm 12 \text{ nm}$  (13%)) por nanofiltração e fotopolimerização do conteúdo dentro dos lipossomas por exposição a luz UV. Além disto, foi possível alterar a superfície das nanopartículas através de vários grupos funcionais. Os autores concluíram que esta técnica seria apropriada para a produção em massa de nanopartículas poliméricas.

Já em 2011, Flores e os seus colaboradores avaliaram a viabilidade da preparação de nanocápsulas e nanoemulsões usando óleo de arvore-de-chá (*Melaleuca alternifolia*) para protege-lo contra a volatilização, por emulsificação instantânea e deposição interfacial de polímero formado [9]. Na fase orgânica utilizaram o óleo essencial, sorbitano monooleato, como surfactante, poly( $\epsilon$ -caprotactona), como agente

encapsulante, e acetona (na fase aquosa foi utilizado o polisorbato 80, como surfactante). Depois da extração do solvente num evaporador rotativo, obtiveram nanocápsulas (160-220nm) com boas características físico-químicas relativamente à nanoestrutura formada e estabilidade significativa. Concluíram assim que o óleo essencial fica protegido contra a volatilização quando encapsulado num polímero, aumentando a estabilidade de armazenamento e atenuando os odores.

Passado dois anos, Hosseini encapsulou óleo essencial de orégãos (*Origanum vulgare*) (OEO) em nanopartículas de quitosano por um método de dois passos que engloba a preparação de uma emulsão de óleo em água e posterior gelificação iónica com TPP [35]. Esta técnica foi previamente desenvolvida por Yoksan, em 2010, e reproduzido em 2011, pelo mesmo, em colaboração com Keawchaon, em que encapsulou palmitato ascórbico em cápsulas de quitosano. O grupo de Hosseini confirmou o encapsulamento e caracterizou as cápsulas por técnicas de espectrofotometria, calorimetria e microscopia. Outros aspetos estudados foi o tamanho médio das partículas, capacidade de carregamento de óleo, eficiência de encapsulamento e o perfil de libertação do OEO. A equipa investigadora observou que as partículas formadas tinham forma esférica e distribuição regular com tamanhos compreendidos entre 40-80nm e os testes *in vitro* mostraram que houve um efeito vigoroso no início e libertação lenta depois.

No mesmo ano, o grupo de Salvia-Trujillo [18], sem obter nanocápsulas, avaliou a influência dos parâmetros de processamento no tamanho das gotas, estabilidade, índice de brancura e viscosidade de nanoemulsões de óleo em água microfluizadas contendo óleo de capim-limão (*cymbopogon citratus*) como fase lipídica, e alginato de sódio como fase aquosa. O grupo confirmou o tamanho das gotas e morfologia por microscopia, e demonstraram que a microfluização é uma tecnologia potencial para a preparação de nanoemulsões de óleos essenciais.

Em 2015, o grupo laboratorial de Mohammadi [10] encapsulou o óleo essencial de *Zataria Multiflora* (OEZ) em nanocápsulas de CS por gelificação iónica, baseado no trabalho desenvolvido por Keawchaon and Yoksan, em 2011 [37], e avaliou a capacidade antifúngica e estabilidade do óleo contra o *B. cinere* em morangos. Os investigadores obtiveram cápsulas de tamanho compreendido entre 125 e 275nm, caracterizadas por microscopia eletrónica de transmissão. Os testes *in vitro* registaram uma libertação controlada e regular de OEZ durante 40 dias, a 25°C.

Rao e Khanum, este ano, tentaram aplicar um procedimento para encapsular a curcumina (pigmento do açafrão da Índia) em nanopartículas, livre de solventes [25]. Eles usaram gordura de leite como meio oleoso e caseinato de sódio, uma proteína láctica, como material de revestimento. Eles obtiveram um pó, por *spray drying*, com diâmetros de 40 a 250nm. Tiveram uma eficácia de encapsulamento de 91% e obtiveram melhores de atividade antioxidante resultados com o óleo encapsulado relativamente ao óleo livre.

## Capítulo 3 - Materiais e Métodos

### 3.1. Materiais e equipamentos

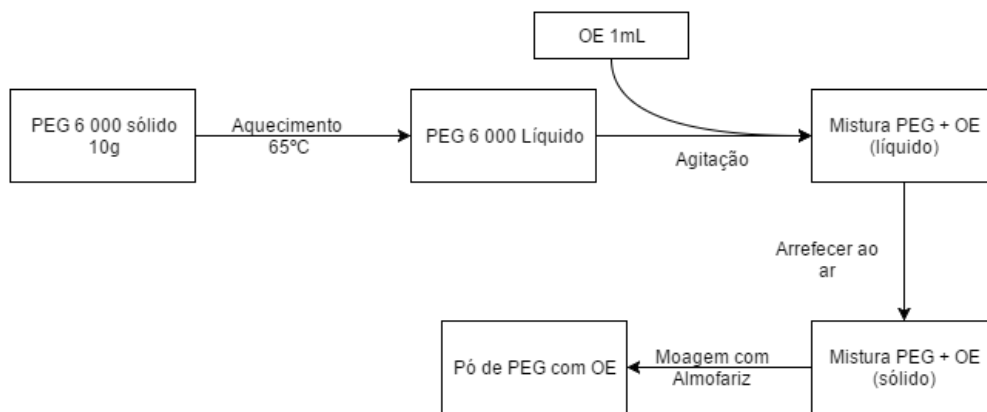
Para a presente dissertação utilizou-se MEG e PEG BioUltra da Fluka, Sigma-Alrich, Alemanha, com diferentes massas moleculares (MW 300; 1 500; 3 000; 4 000; 6 000; 12 000; 20 000; 35 000); OE de *Rosmarinus officinalis* de elevada pureza, foi fornecido pela empresa Blossom Essence, Portugal; ácido dodecilbenzeno sulfúrico de sódio (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>Na), da Sigma-Alrich, Alemanha; ácido acético Glacial 100%, da Pronalab, Portugal; N-Hexano ReagentPlus® ≥99% e Etanol 99,9%, da Sigma-Alrich, Alemanha. Para a caracterização das amostras foram utilizadas soluções específicas para cada uma das análises, descritas junto às mesmas.

Os equipamentos eletrónicos utilizados foram o sonificador UR1 120/240W, RETSCH, Alemanha; Centrifuga Hermle Z 300, Alemanha; Evaporador Rotativo Laborota 4000, da Heidolph, Alemanha; O microscópio eletrónico de varrimento SU3500 e metalizador EMITECH K550, da Terapeak, Canadá; o microscópio eletrónico de transmissão HT770, HITACHI, Alemanha; o calorímetro DSC 204, NETSCH, Alemanha. Foi usado um aparelho da Agilent® Technologies 7890<sup>a</sup> GC-System montado com uma coluna capilar DB5-MS, 30mx0.25mm i. d., com um filme de polidimetilsiloxano (j. & w. LTM Coluna Module) de espessura 0.25µm, e o aparelho de MS (Agilent® Technologies 5975C, INERT XL MS) com detetor de quadrupólo Triples-axis.

### 3.2. Métodos experimentais

#### 3.2.1. Encapsulamento por *Melting-Dispersion*

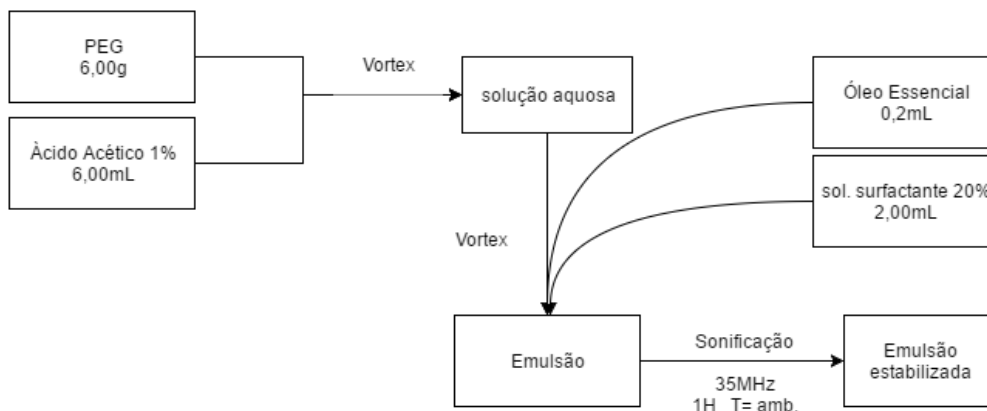
Este método é baseado no trabalho desenvolvido por Peng et al. (2008) e aplicado por F. L. Yang et al. (2009) [17]. Pesou-se 5g de PEG e aqueceu-se até 65°C. Depois de derreter, foi adicionado 1mL de OE e agitado lentamente com uma vareta de vidro para assegurar a distribuição homogénea da mistura. Deixou-se arrefecer à temperatura, e quando a mistura ficou sólida foi moída através de um almofariz até se formar um pó fino. O pó formado foi armazenado num exsiccador para posterior análise por microscopia eletrónica.



Esquema 1 - Esquema Representativo do método de *Melting-Dispersion*

### 3.2.2. Encapsulamento do OE em PEG em fase aquosa

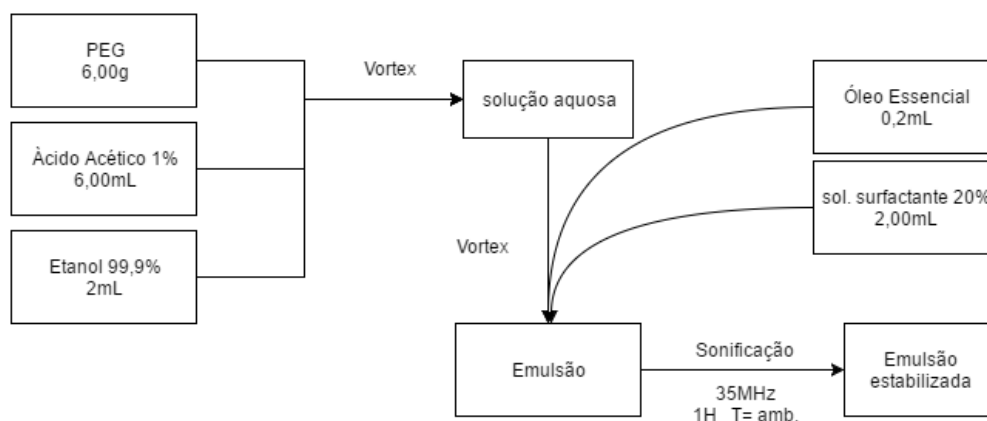
Para cada amostra de PEG estudada, dissolveu-se 2,00g de PEG em 6,0mL de ácido acético aquoso 1% (v/v) preparado em laboratório. A cada solução adicionou-se 0,2mL de OE e 2,0mL de solução aquosa de surfactante 20% (m/v). As misturas foram homogeneizadas, em vortex, seguindo-se uma sonificação a 35MHz por 2h à temperatura ambiente. Armazenaram-se as emulsões em frascos de vidro fechados em refrigeração a 4°C, para posteriores análises (esquema 1).



Esquema 2 - Esquema representativo do método O/A para o encapsulamento do OE em PEG

### 3.2.3. Encapsulamento do OE em PEG em água e etanol (variação do método anterior)

Este método é o mesmo que o descrito no ponto anterior, mas com a adição de 2,00mL de Etanol (esquema 2).



Esquema 3 - Esquema representativo do método O/A para o encapsulamento de OE em PEG com a adição de Etanol

### 3.2.4. Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)

Para as análises Microscopia Eletrônica de Varrimento (*Scanning Electronic Microscopy* - SEM), lavaram-se previamente as amostras, misturando dois terços de amostra com um terço de n-hexano. Deixou-se em repouso e descartou-se a fase menos densa (orgânica), contendo o n-hexano e óleo livre não encapsulado. Foi adicionado ácido fosfotungsténico ( $H_3PO_4 \cdot 12WO_3$ ), a alíquotas de amostra lavada, na proporção de 1:1. Homogeneizaram-se as alíquotas, ficaram em repouso cerca de 30min, e foi retirada uma gota de cada amostra para um porta-amostras do aparelho, para evaporação da água *overnight*. Depois da metalização com ouro, foram observadas no aparelho SEM a diferentes ampliações.

### 3.2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Para as análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão (*Transmission Electronic Microscopy* - TEM) lavaram-se previamente as amostras, de acordo com o método descrito acima. Homogeneizaram-se, ficaram em repouso cerca de 30min e foi colocada uma gota numa superfície, sobre a qual foi colocada uma grelha TEM, para a adsorção das nanocápsulas. Limpou-se o excesso e colocou-se no porta-amostras para observação a diferentes ampliações.

### 3.2.6. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

Para a análise de Calorimetria Diferencial de Varrimento (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC) colocou-se cerca de 5-10mg de amostra num cadinho de alumínio,

lacrou-se e levou-se ao aparelho de DSC, com um fluxo de 10°C/min, com intervalo 20-70°C.

### 3.2.7. Cromatografia Gasosa (GC)/Cromatografia Gasosa-Espetrometria de Massa (GC-MS)

Para a cromatografia gasosa (Gas Chromatography - GC), injetou-se uma amostra de OE de cerca de 1µL no injetor à temperatura de 250°C e manteve-se o detetor dos componentes a 180°C. Foi utilizado hélio como gás de arraste, num caudal de 1mL/min. O perfil de temperaturas utilizado foi isotérmico com temperatura inicial de 60°C durante 5 minutos, aumento gradual de 4°C/min até aos 200°C, e segundo aumento gradual de 10°C/min de 200°C até 280°C. Manteve-se a temperatura a 280°C por 10-15min para se certificar da limpeza total da coluna (gráfico 1).

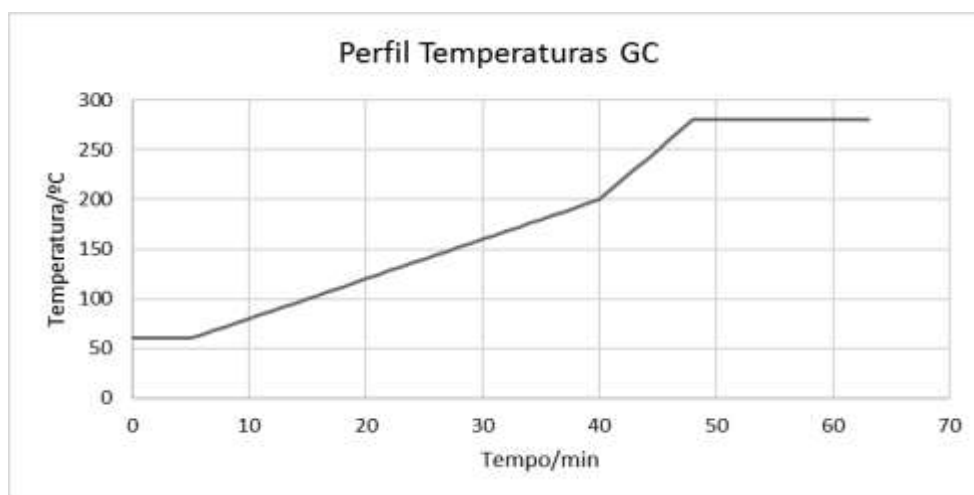


Gráfico 1 - Perfil de temperaturas utilizadas na análise CG e CG-MS

A análise de GC acoplada a Espetroscopia de Massa (*Mass Spectroscopy (MS)*) - GC-MS - permite a separação e identificação pelo espectro de massa de cada componente do óleo. As condições de trabalho no detetor de massas são as mesmas que as anteriores, com a adição de voltagem de ionização de 70eV e com a fonte de ionização à temperatura de 230°C. Os resultados foram analisados no software Chemstation para análise das áreas obtidas e quantificação dos vários componentes. Cada componente foi identificado por comparação do espectro de massas obtido com os espectros de massas de compostos da base de dados de MS “Willey Mass Database”.

## Capítulo 4 - Discussão de Resultados

### 4.1. Análise de GC-MS

Sabendo que os OE são uma mistura complexa de compostos hidrofóbicos, é importante saber de que tipos de compostos o OE de *Rusmarinus officinalis* é composto e a sua percentagem presente no óleo. Através de análise cromatográfica obteve-se a composição qualitativa e quantitativa do OE estudado.

De acordo com análise dos espectros obtidos, identificaram-se um total de 28 compostos, dos quais foi possível calcular a percentagem de 21. Dos restantes compostos identificados apenas foi possível sua qualificação, pois estão presentes no OE com uma percentagem abaixo do limite de quantificação do aparelho. Segundo a análise e tratamento dos dados obtidos, existe uma alta percentagem de mirceno (23.75%), cânfora (16.3%), eucaliptol (12.88%) e  $\alpha$ -pineno (10.99%), e em geral, foram identificados maioritariamente terpenos (mono- e sesqui-), dois álcoois, uma cetona e um éster.

A presença de sesquiterpenos e monoterpenos é notoriamente elevada. Os sesquiterpenos são hidrocarbonetos com fórmula química  $C_{15}H_{24}$ , formados por três unidades isopreno, podendo ser cíclicos ou ramificados. São encontrados em plantas e insetos como agentes de proteção e como uma feromona. Os monoterpenos são hidrocarbonetos de fórmula química  $C_{10}H_{16}$ , formados por duas unidades isopreno, podendo ser cíclicos ou ramificados, que são o principal constituinte da resina.



Ilustração 8 - Composição do OE de Alecrim por GC-MS

Tabela 1 - Tabela de dados de GC-MS dos compostos do óleo essencial de *Rusmarinus Officiallis* (TR- Tempo de Retenção)

TR	Nome	Porcentagem	Grupo
6,12	triciclono	minoritário	Monoterpeno
6,27	$\alpha$ -thujeno	1,25	“
6,46	$\alpha$ -pineno	10,99	“
6,85	canfeno	6,77	“
7,55	$\beta$ -pineno	3,87	“
7,94	mirceno	23,75	“
8,22	$\alpha$ -felandreno	1,23	“
8,5	$\alpha$ -terpineno	1,38	“
8,69	$\rho$ -cimeno	2,32	“
8,79	limoneno	6,62	“
8,83	eucaliptol	12,88	Monoterpenoide
8,96	$\beta$ -ocimeno	1,24	Monoterpeno
9,42	$\gamma$ -terpineno	2,32	“
10,02	terpinoleno	0,99	Terpeno
10,25	linalool	1,12	Monoterpeno
11,12	canfora	16,23	Terpenoide
11,2	borneol	minoritário	Alcool Terpenoide
11,69	terpinen-4-ol	0,8	Álcool Monoterpeno
11,92	$\alpha$ -terpineol	0,86	“
12,24	verbenona	0,66	Cetona
13,4	acetato de(-)bornilo	0,5	Ester
14,41	$\alpha$ -ylangeno	minoritário	Terpeno
14,45	$\alpha$ -copaeno	minoritário	Sesquiterpeno
15,36	$\beta$ -cariofileno	3,24	“
15,81	$\alpha$ -humuleno	0,98	“
16,09	$\gamma$ -muuroleno	minoritário	“
16,42	$\Delta$ -cadineno	minoritário	“
17,32	Óxido de cariofileno	minoritário	“

## 4.2. Métodos de encapsulamento

Foram realizados dois métodos de encapsulamento, baseados em artigo já publicados sobre encapsulamento de OE, referidos anteriormente. Estes dois foram selecionados de vários métodos por serem os mais simples, económicos e livres de solventes orgânicos prejudiciais ao meio ambiente.

O método por *melting-dispersion* foi realizado de acordo com o descrito pelo autor do artigo, à exceção de que no artigo realizam uma peneiração que não foi realizada desta vez. De modo a confirmar sua viabilidade, realizou-se o método e foi-se caraterizar os pós formados por SEM (imagem1).

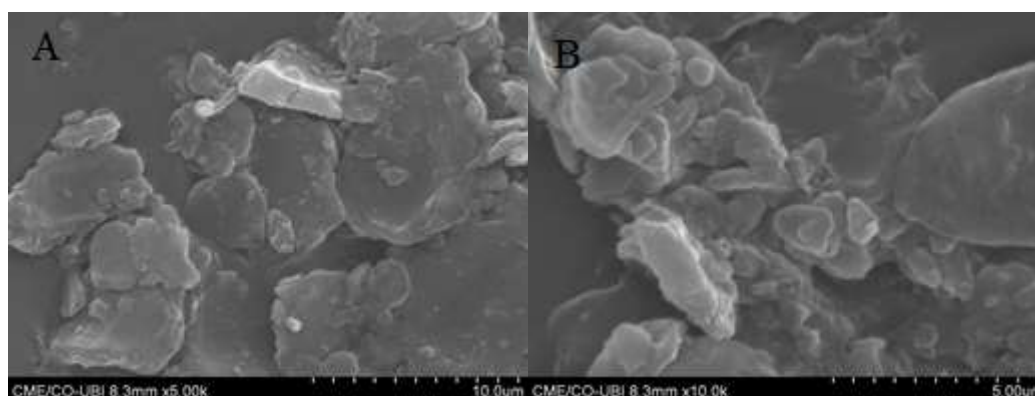


Imagem 1. Imagens SEM de PEG com OE por *Melting-Dispersion*  
A) Ampliação a 5 000x B) Ampliação a 10 000x

Pode-se observar pelas imagens A e B que não existe a presença de formas esféricas que indiquem a presença de cápsulas a nível macroscópico, microscópico ou nanoscópico e existem pedaços de grandes dimensões de PEG solidificado e sem organização evidente. Pode-se verificar que a imagem B não está totalmente nítida, o que pode indicar que o OE se misturou com o polímero e, com a moagem, ficou à superfície deste, contudo sem estar encapsulado.

Assim, por microscopia de varrimento concluiu-se que o método de *Melting-Dispersion* é um método não reprodutível ou viável para o encapsulamento de substâncias voláteis ou sensíveis, como os OE.

Na verdade, os resultados vêm confirmar algumas dúvidas que surgiram na viabilidade deste método. Em primeiro lugar, à medida que se desce da temperatura

de transição vítrea não existe nada que indique que as moléculas de PEG se vão organizar em torno das gotículas de OE de forma a formar uma cápsula. Por outro lado, o método proposto pelos autores do artigo para a transformação da mistura sólida num pó vai transformar a energia mecânica da moagem em energia térmica, o que vai levar à conseqüente liquefação do PEG, destruindo as cápsulas que poderiam ter-se formado.

O segundo método realizado foi baseado na dissolução de PEG em água acidificada e emulsificação do óleo naquela fase, seguida de sonificação. Este método não utiliza equipamentos complexos ou químicos tóxicos que possam degradar os ecossistemas. A sua viabilidade e reprodutibilidade pareceu mais sólida e após realização do encapsulamento e caracterização foi possível verificar várias características e retirar conclusões bastante positivas.

Neste método foram estudadas diferentes variáveis para uma otimização dos resultados. Estudou-se a influência do pH, tamanho do polímero, condições de sonificação e adição de etanol para fluidificar o meio reacionante.

Observou-se que, com o método utilizado, formaram-se emulsões turvas de cor esbranquiçada para todas as amostras de PEG utilizadas. Para provar a existência de nanocápsulas dispersas realizou-se uma caracterização morfológica, por SEM e TEM, e realizaram-se análises calorimétricas, por DSC. Ainda para testar a termoestabilidade e resistência física das emulsões foram realizados testes por centrifugação e através de um sistema de aumento de temperatura, com recurso a um evaporador rotativo.

### **4.3. Análise de Microscopia Eletrónica de Varrimento (TEM)**

#### **4.3.1. Amostras preparadas com PEG 1500, PEG 3000, PEG 4000 e PEG 6000**

As amostras preparadas com PEG de massa molecular compreendida entre massa molar de 1 500 e 6 000 g/mol apresentaram resultados mais promissores, sendo as amostras com PEG de massas de 4 000 e 6 000 que formaram cápsulas mais uniformes e resistentes (imagem 2).

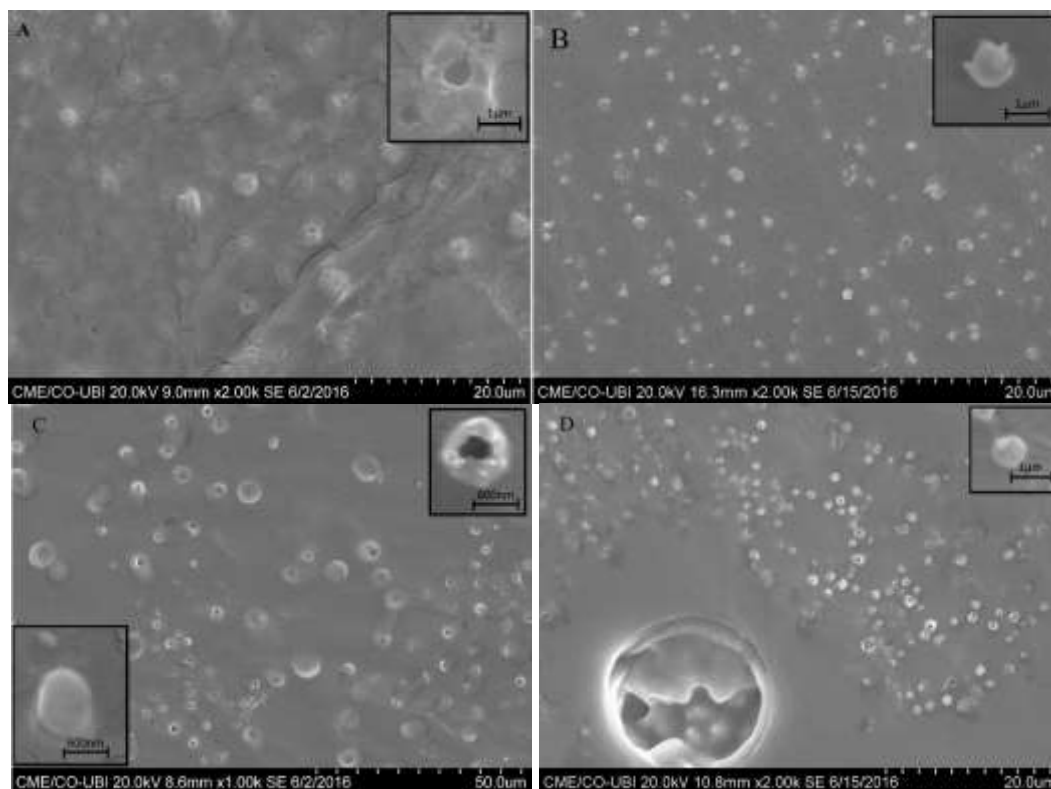


Imagem 2. Imagens SEM das soluções ácidas de PEG com OE: A) PEG 1500 com magnitude 2000x; B) PEG 3 000 com magnitude 2 000x; C) PEG 4 000 com magnitude 1 000x; D) PEG 6 000 com magnitude 2 000x

Na imagem 2 pode-se observar a presença de nanocápsulas de PEG (NC-PEG) com OE em todas as amostras, de espessura elevada e uniforme e em elevado número (exceto PEG 1 500). Pode-se dizer que o OE está dentro destas nanopartículas porque nas que se apresentam abertas vê-se um espaço vazio no seu interior de onde se evaporou o OE no processo de observação.

Observou-se, por fim, a presença de cápsulas rebentadas em quase todas as amostras. A abertura das NC-PEG deveu-se ao calor emitido pelo feixe de eletrões do aparelho microscópico.

#### 4.3.2. Amostras preparadas com MEG

Na imagem 3, tem o resultado da polimerização do MEG ao redor do OE. A imagem está pouco nítida o que indica que existe muito OE livre. No entanto, consegue-se observar a presença de algumas nanopartículas com tamanho bastante heterogéneo, desde 100nm a perto de 1 000nm.

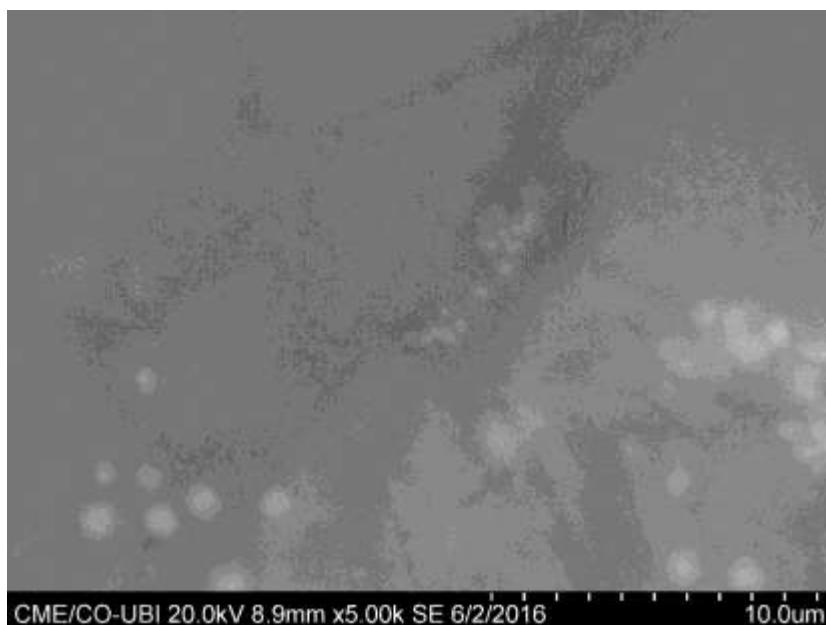


Imagem 3. Imagem SEM da solução ácida de MEG com OE com amplitude de 5 000x

#### 4.3.3. Amostras preparadas com PEG 12 000, PEG 20 000 e PEG 35 000

As amostras com PEG  $\geq 12\ 000$  (imagem 4) formaram sistemas de microemulsões estáveis e homogêneas. É possível que as cadeias de PEG de alta massa molecular não consigam organizar-se de forma a encapsular OE, por serem demasiado longas.

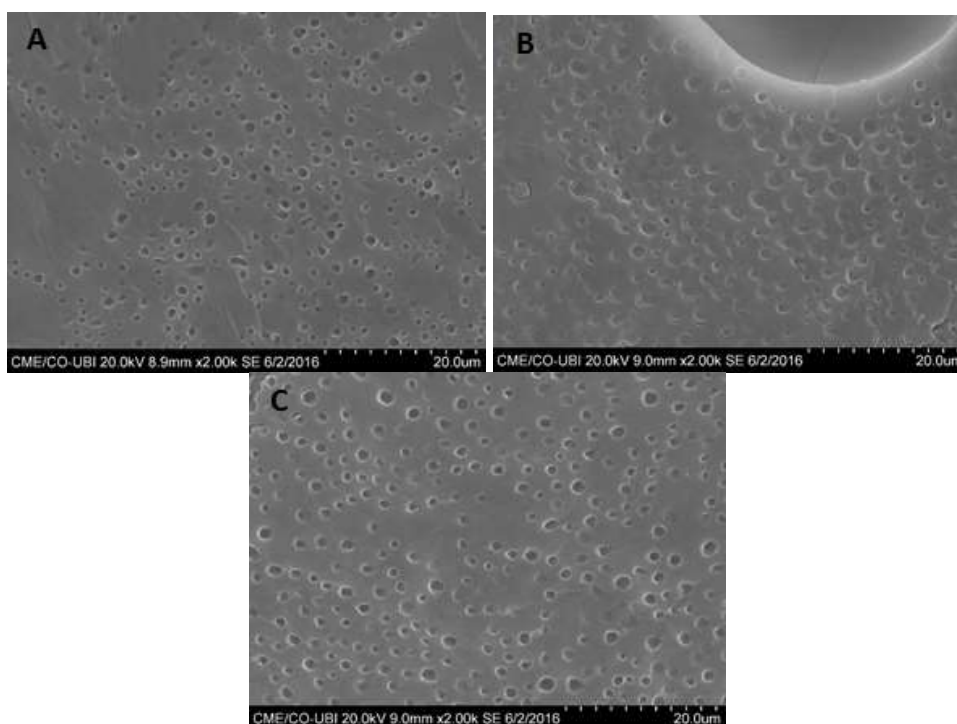


Imagem 4. Imagens SEM das soluções ácidas de PEG com OE com magnitude 2 000x A) PEG 12 000; B) PEG 20 000; C) PEG 35 000

## 4.4. Análise de Transmission Electronic Microscopy (TEM)

As emulsões analisadas por TEM sofreram uma diluição de 1:1, para que não houvesse elevada concentração de cápsulas, o que levaria a um possível rebentamento da grelha de observação ou a uma imagem totalmente escura, devido à sobreposição das NC-PEG.

### 4.4.1. Amostras preparadas com MEG

Nas imagens TEM para a emulsão de NC-MEG (imagem 5), observou-se a presença de nanocápsulas em grande quantidade dispersas e isoladas, com diâmetro médio entre 50 e 100nm. Apesar da imagem ser melhor por esta técnica, continua-se a observar algum OE livre.

Conseguiu-se concluir que o MEG é capaz se organizar em meio ácido ao redor das gotículas de OE não se podendo confirmar por TEM que o monómero polimeriza, formando um polímero de encapsulamento.

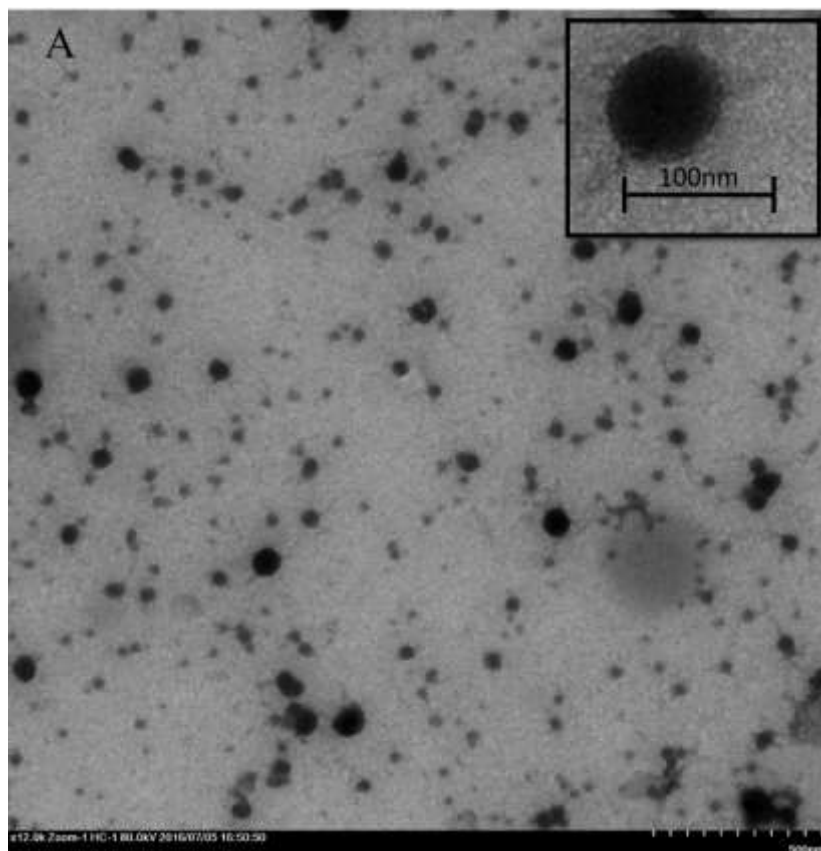


Imagem 5. Imagem TEM Emulsão de OE com MEG com ampliação de 12 000x

#### 4.4.2. Amostras preparadas com PEG 300

Na imagem 6, referente à emulsão de NC-PEG 300, observou-se a formação de NC de PEG uniformes, isoladas e com diâmetro médio inferior a 200nm. Esta emulsão não se conseguiu observar em SEM, porque o PEG 300 puro é líquido.

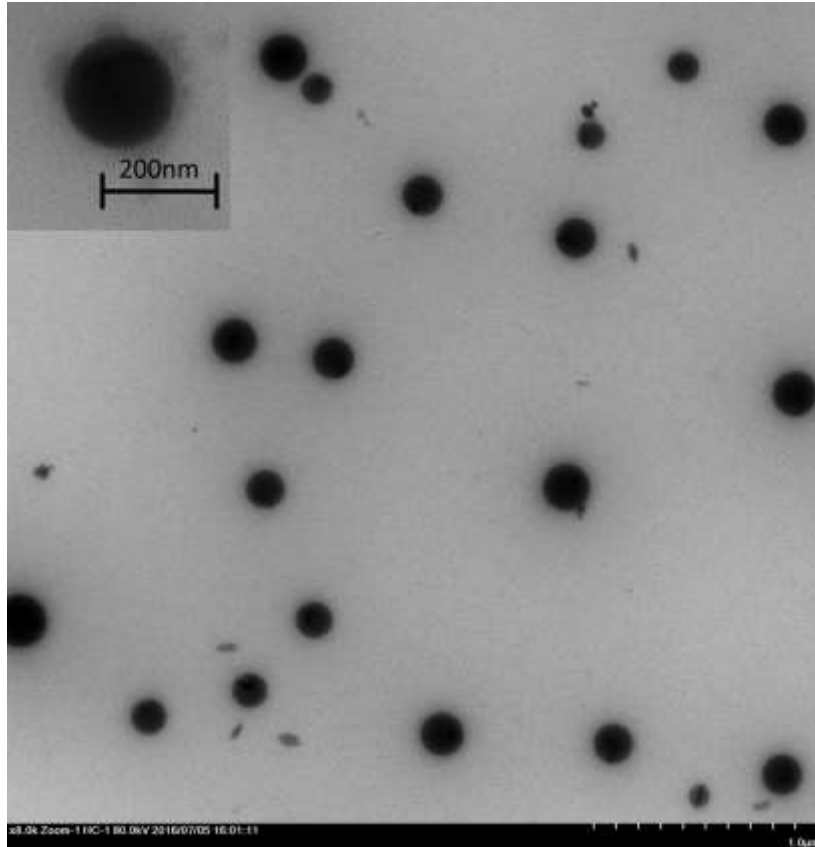


Imagem 6. Imagem TEM Emulsão de solução ácida de PEG 300 com ampliação de 8 000x

#### 4.4.3. Amostras preparadas com PEG 1 500

Pela imagem 7 (a e b), a emulsão de NC-PEG 1 500 é perceptível uma grande quantidade de nanopartículas esféricas, na sua grande maioria com um diâmetro a rondar os 50-200nm e com muito poucas NC com diâmetros de 400 a 600nm. Conseguiu-se observar NC-PEG 1 500 isoladas, estas de tamanho uniforme, e aglomerados de NC-PEG sem coalescência. Aliás, pela imagem B consegue-se perceber que as NC estão bem delimitadas e separadas de forma estável umas das outras.

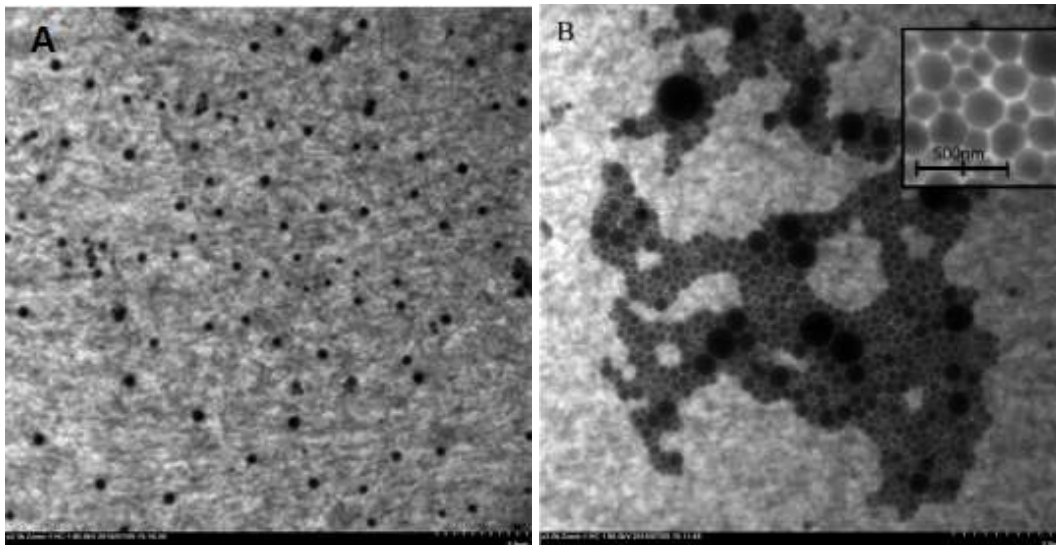


Imagem 7. Imagem TEM Emulsão de PEG 1 500 com OE com ampliação de 2 500x (A) e de 3 000x (B)

#### 4.4.4. Amostras preparadas com PEG 4 000

Por ultimo, na emulsão de NC-PEG 4 000 observou-se grandes quantidades de cápsulas, tamanho médio de 200nm, muito homogêneas com alguns pequenos aglomerados formados, muito estáveis quando dispersos em emulsão e sem coalescência (imagem 8).

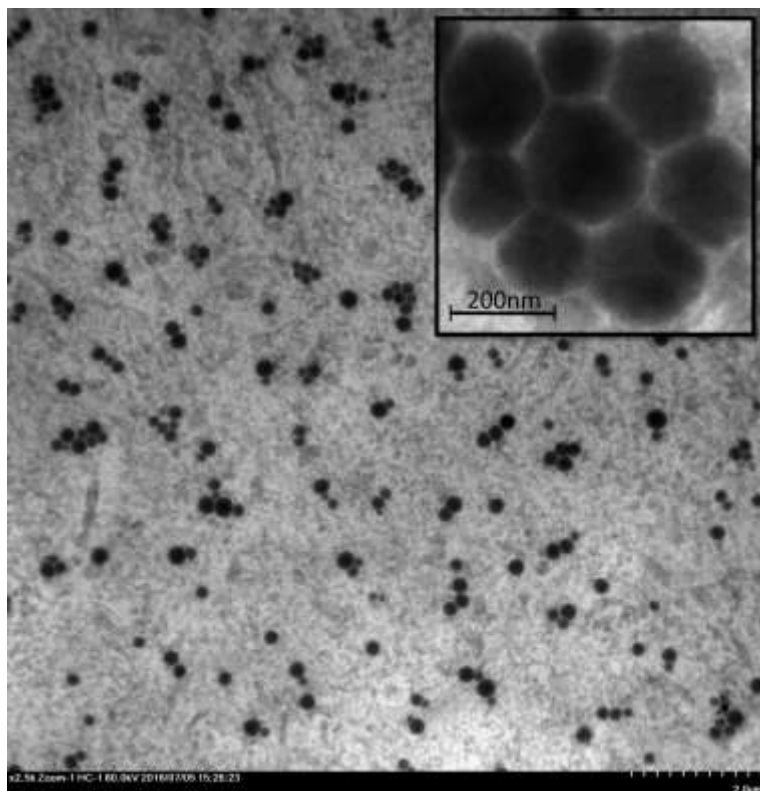


Imagem 8. Imagem TEM Emulsão de solução ácida de PEG 4 000 com ampliação de 2 500x

## 4.5. Estudo da Calorimetria Diferencial (DSC)

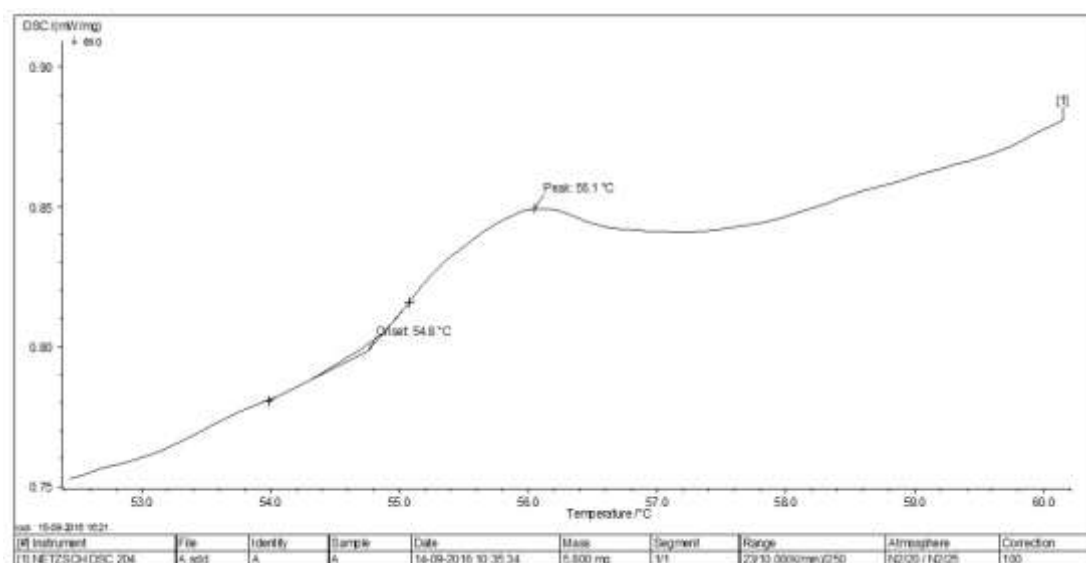


Gráfico 2. Gráfico da análise de DSC da amostra de NC-PEG 4 000

Foram analisadas as amostras das emulsões de NC-PEG 1 500 até 6 000 (gráfico 2). No gráfico 2, observou-se a amostra de NC-PEG 4 000 em que se verifica uma curva de energia com intervalo aproximado de 55 a 56 °C, que está incluído no intervalo de temperatura de transição vítrea do PEG 4 000 (53-59 °C). Assim pode-se concluir que a amostra apresenta nanocápsulas.

## 4.6. Estabilidade das emulsões das NC-PEG

Foi estudada a estabilidade das emulsões das NC-PEG por centrifugação e por um sistema de aumento gradual da temperatura, com recurso a um evaporador rotativo.

Realizou-se um teste à termoestabilidade das emulsões de NC, em que se colocou as amostras uma a uma num evaporador rotativo e estabeleceu-se uma rotação lenta com aumento de temperatura gradual desde a temperatura ambiente. Observou-se que ao aumentar a temperatura das emulsões acima da temperatura de transição vítrea do PEG utilizado havia uma separação de fases, desfazendo as emulsões. Pode-se concluir que, dependendo da massa molar do PEG, as emulsões não são estáveis acima das temperaturas de transição vítrea, acabando por sofrer uma separação de fases.

O teste à resistência à turbulência foi realizado através de uma centrifugação durante 60 min, a 2 000rpm, à temperatura ambiente (imagem 8). Verificou-se que não houve alterações nas condições das amostras (imagem 9 - A). As mesmas foram centrifugadas a uma velocidade de 4 000 rpm, mantendo o tempo e temperatura. Ao duplicar a velocidade de centrifugação observou-se que as fases se separaram, tendo sido desfeitas as nanocápsulas (imagem 9 - B)

Conseguiu-se concluir que o MEG é capaz se organizar em meio ácido ao redor das gotículas de OE não se podendo confirmar por TEM que o monómero polimeriza, formando um polímero de encapsulamento.

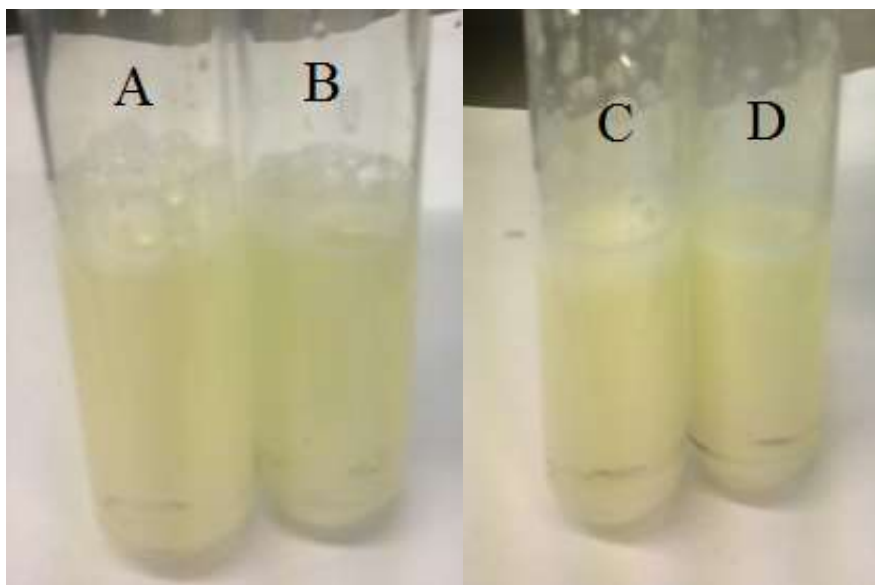


Imagem 9. Amostras com emulsões de NC-PEG com OE antes de centrifugar:  
A) PEG 1 500; B) PEG 3 000; C) PEG 4 000; D) PEG 6 000

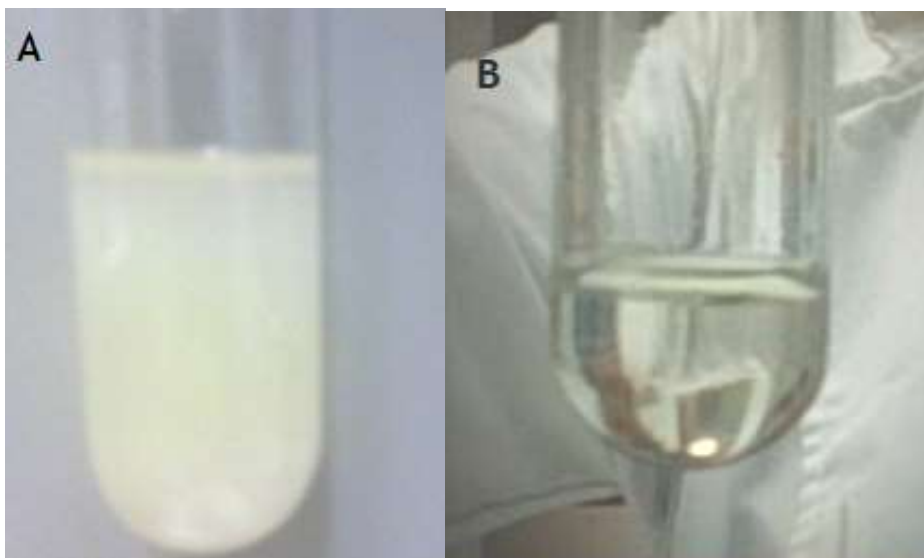


Imagem 10. Amostra de PEG 4000 com OE antes da centrifugação a 2000 rpm (A) e depois de 4000 rpm (B)

Contudo, a forma e as condições como estes testes foram realizados não foram as mais corretas, pois não se realizou um estudo estatístico sobre os mesmos e os aparelhos utilizados, nomeadamente o evaporador rotativo, não foram desenhados para tais funções. Assim, é de alta relevância que haja uma repetição dos ensaios com condições mais rigorosas e dados mais sólidos.

## **4.7. Estudo de outras variáveis**

### **4.7.1. Diminuição da viscosidade do meio com etanol**

Segundo alguns autores, o etanol ajuda a reduzir a viscosidade do meio aquoso e, sendo um solvente orgânico, não consegue dissolver o PEG, levando a um aumento de organização do polímero em redor das gotas de OE e, assim, aumento da eficácia de encapsulamento.

Para verificar esta teoria, realizou-se o encapsulamento do OE em PEG com a adição de etanol ao meio aquoso.

Inicialmente, ao colocar gotas de emulsão numa lamela de microscópio ótico verificou-se o rebentamento imediato das cápsulas. Após esta observação pressupôs-se que o etanol provoca instabilidade imediata da emulsão. Decidiu-se prosseguir com uma análise morfológica por SEM, de modo a observar se haveria formação de NC e qual a sua morfologia.

Pode-se observar pela imagem 11 (A), que as cápsulas formadas pelo PEG 1 500 são muito maiores, estão na microescala, e têm uma espessura muito fina, em relação às observadas sem etanol. Esta observação leva à conclusão que estas cápsulas formadas não têm qualquer tipo de vantagem com a adição do Etanol.

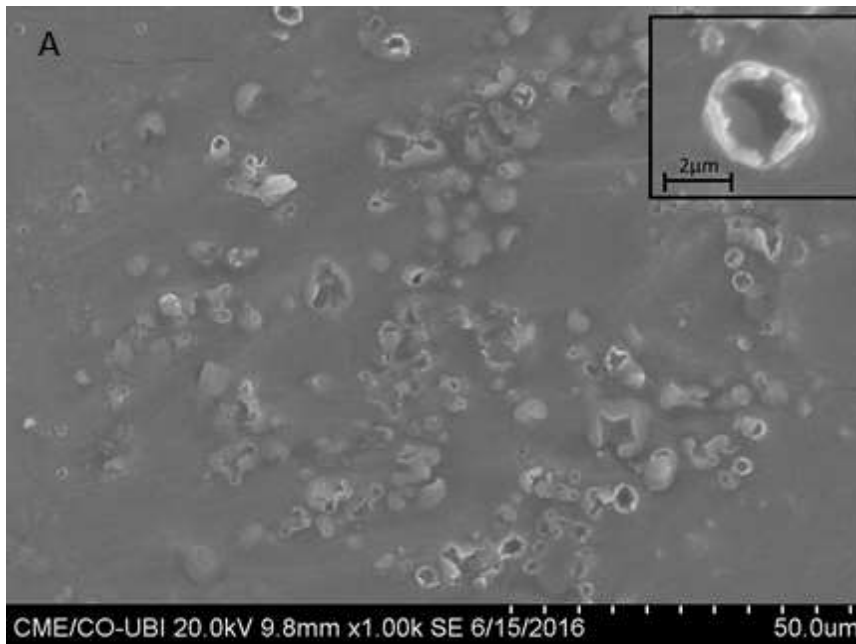


Imagem 11. Imagem SEM de Emulsão de NC-PEG com Etanol. A) PEG 1 500 com amplitude de 1 000x

Na imagem 12 da emulsão de NC-PEG 3 000, observa-se alta concentração de cápsulas com tamanho próximo do limite da nanoescala ( $\pm 900\text{nm}$ ) mas também parece haver uma diminuição da espessura da parede das cápsulas. Pode-se dizer que apesar de manter o tamanho das cápsulas, mais uma vez, o etanol provoca a diminuição na grossura da parede de revestimento, provocando uma diminuição da resistência das NC.

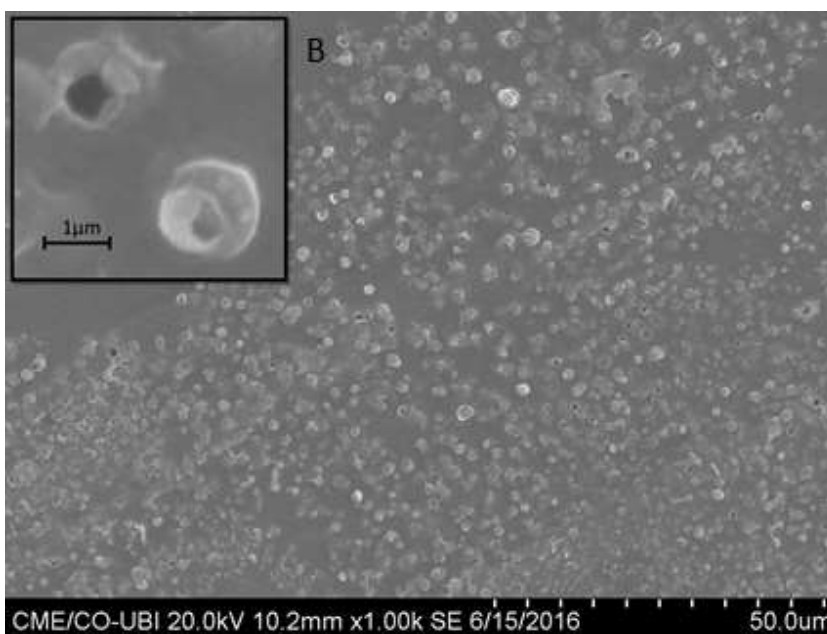


Imagem 12. Imagens SEM de Emulsão de NC-PEG com Etanol. PEG 3 000 com amplitude de 1 000x

A emulsão de NC-PEG 4 000 é muito idêntica à amostra de NC-PEG 3 000, com alta concentração de cápsulas e paredes de revestimento finas, com tamanho entre 700 e 800 nm (imagem 13). Esta amostra mantém-se na nanoescala que, supõe-se, ser uma característica derivada pela adição do etanol.

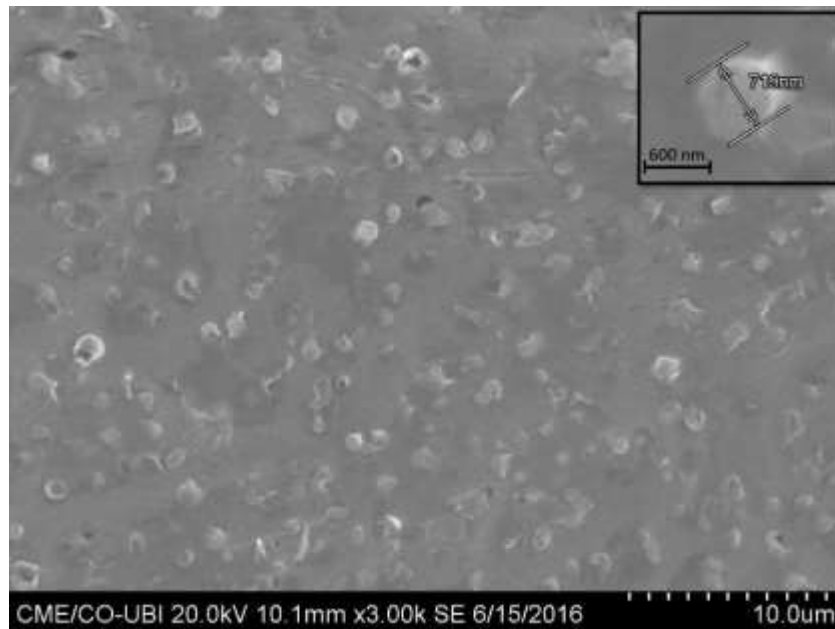


Imagem 13. Imagem SEM de Emulsão de NC-PEG com Etanol. PEG 4 000 com amplitude de 3 000x

A amostra de emulsão de PEG 6 000 não apresentou as mesmas características das outras amostras. Esta emulsão não conseguiu organizar-se ao redor das gotículas de OE, mas formou formas estranhas lineares, durante a secagem, as quais não se conseguiram concluir o que poderão ser.

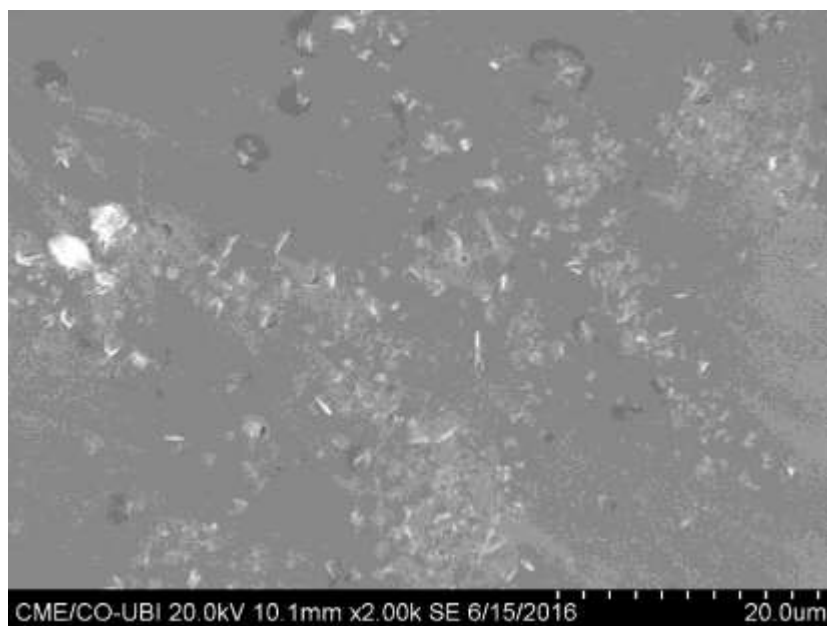


Imagem 14. Imagem SEM da emulsão de NC-PEG 6 000 com etanol, ampliação de 2 000x

Apesar das amostras realizadas com etanol não se mostrarem muito positivas, esta hipótese deverá ser estudada com outras concentrações de etanol misturado água de acordo com o peso molecular do polímero. O objetivo seria que este solvente diminuísse o tamanho das cápsulas formadas sem afetar a sua estabilidade e resistência física.

#### 4.7.2. Estudo de pH

Inicialmente, o método de emulsão de O/A foi realizado com água em vez de ácido acético a 1%. Verificou-se que as emulsões formadas em SEM eram múltiplas e de grandes dimensões (imagem 15).

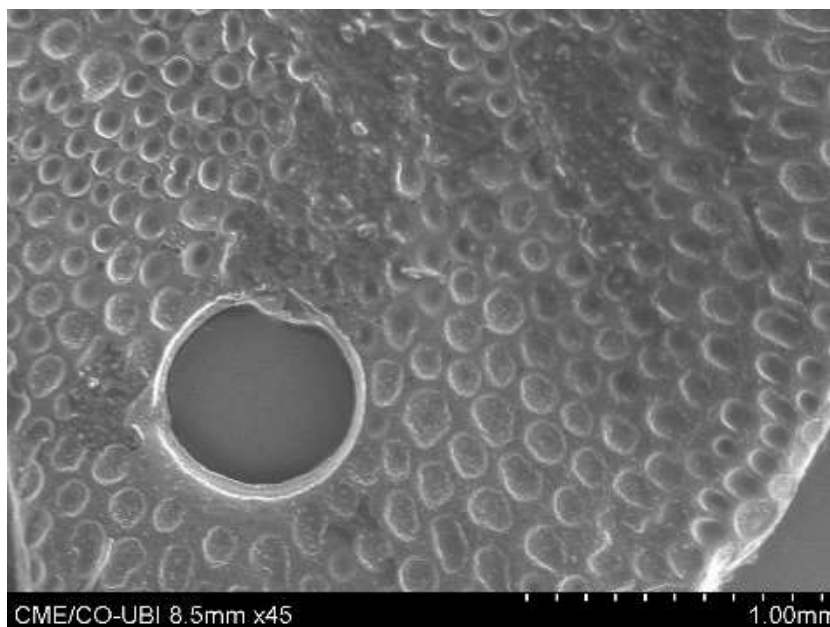


Imagem 15. Imagem SEM de emulsão múltipla de PEG 4 000 com óleo com ampliação de 45x

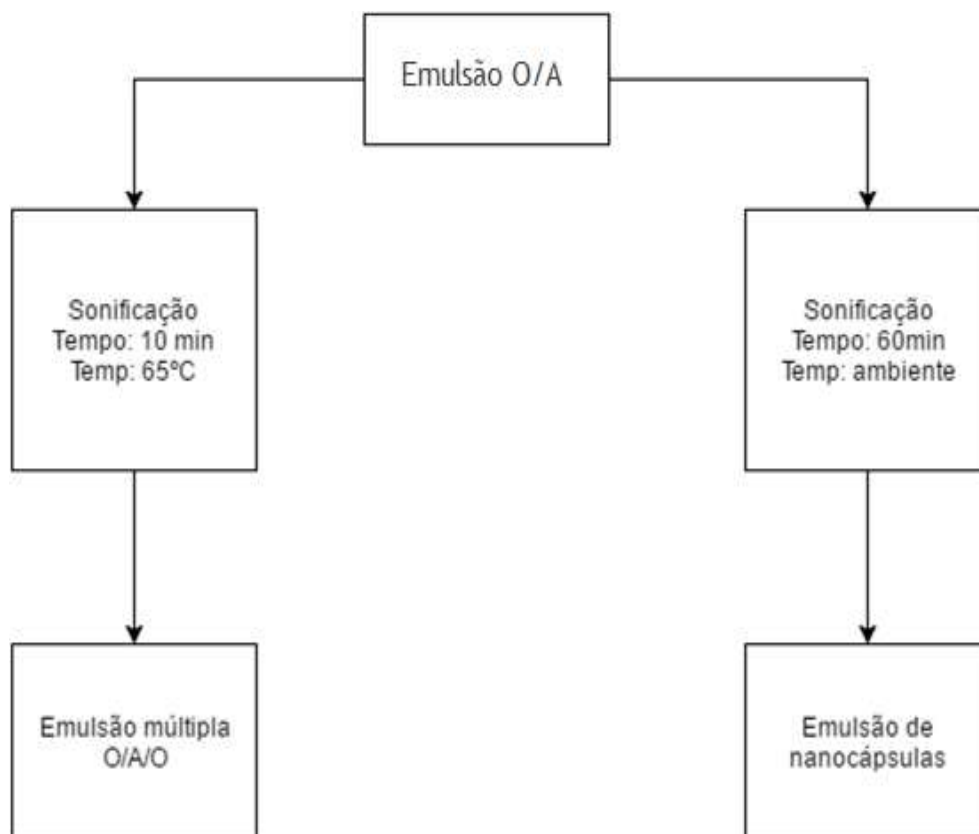
Ao diminuir ligeiramente a acidez do meio verificou-se, nas imagens já observadas anteriormente, a formação de nanocápsulas estáveis. O que se pode afirmar que o pH fracamente ácido favorece a formação de nanocápsulas.

#### 4.7.3. Sonificação - Estudo do tempo e temperatura de processo

A Sonificação é um dos passos mais importantes nos métodos de encapsulamento de agentes bioativos, pois realiza uma homogeneização fina da emulsão e provoca a

diminuição das gotas de OE, e posterior encapsulamento. Contudo, este processo precisa de tempo e outras condições para que a emulsão a sonificar obtenha as características desejadas. Com o intuito de estudar o tempo necessário para que a emulsão atinja o estado de nanocápsulas, realizou-se um estudo sobre o tempo e a temperatura de sonificação.

Numa primeira tentativa, realizou-se uma sonificação de 10min a 65°C (temperatura acima da temperatura de transição vítrea do PEG), e numa segunda, realizou-se uma sonificação à temperatura ambiente durante 1h (esquema 3). As amostras foram, posteriormente, caracterizadas em TEM.



Esquema 4 - Esquema das condições de sonificação e resultados obtidos

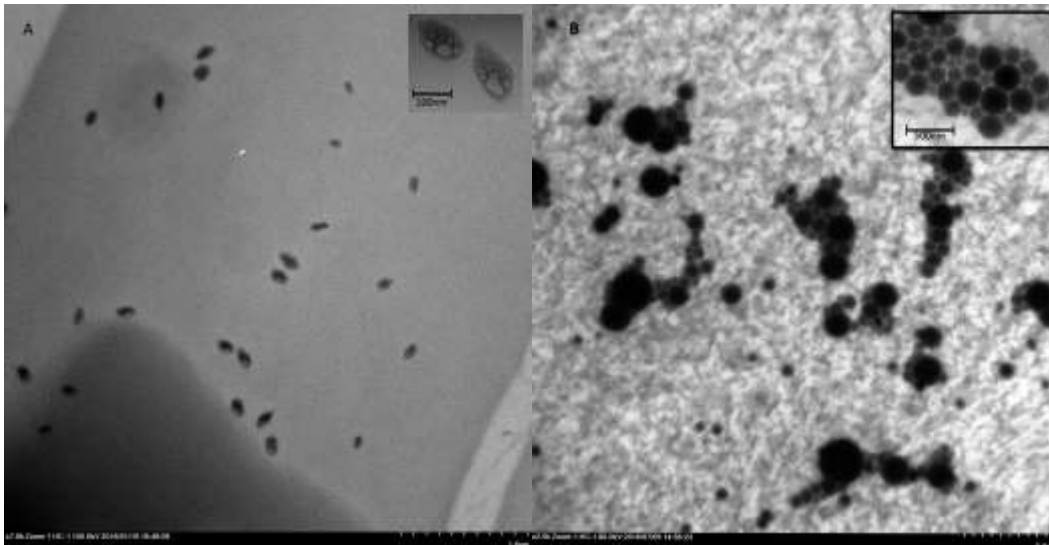


Imagem 16. Imagens TEM de uma A) emulsão múltipla de PEG após sonificação de 10min a 65°C com ampliação de 7 000x; B) emulsão de NC-PEG obtida após sonificação de 60min à temperatura ambiente

Na imagem 14 (A) foi obtida após uma sonificação de 10 min a 65°C. Observa-se a presença de uma emulsão múltipla de óleo em água em óleo (O/A/O), em que há formação de gotas de óleo dentro de gotas de água e estas estão dentro de gotas maiores de OE. A formação deste tipo de emulsão deveu-se ao tempo de sonificação ser demasiado curto e à alta temperatura, acima da temperatura de transição vítrea do PEG. Ou seja, o PEG não conseguiu organizar-se em redor das gotas de OE.

Com um tempo de sonificação maior (60min) e à temperatura ambiente, conseguiu-se obter cápsulas de PEG com OE no seu interior (imagem 14 (B)). Consegue-se perceber que existe uma alta estabilidade entre as cápsulas, pois não se observa coalescência. Estão bem delimitadas e com uma formação homogénea.

## Capítulo 5 - Conclusão

Dos dois métodos realizados, o método de *Melting-Dispersion* não apresentou resultados favoráveis, confirmando-se assim a sua inviabilidade no encapsulamento de OE. O método de emulsão de O/A provou ser um método com grande eficácia e reprodutibilidade. As emulsões NC-PEG com OE encapsulado foram caracterizadas pelas técnicas de SEM, TEM e DSC.

Concluiu-se que a formação de cápsulas de PEG é favorecida em pH fracamente ácido e que são mais pequenas e estáveis em emulsão do que na forma sólida, por secagem ao ar. Provou-se que até PEG 6 000 as cápsulas formadas estão à nanoescala, enquanto que após PEG 12 000, com as condições utilizadas, há formação de microsistemas de emulsões.

Não se concluiu se entre o PEG 6 000 e 12 000 ainda haverá capacidade de outros PEG se organizarem em cápsulas ou se formarão emulsões. Por último, pôde-se concluir que o monómero (MEG) consegue polimerizar-se ao redor das nanogotículas de OE e formar nanocápsulas de tamanho muito reduzido estáveis em solução.

Concluiu-se que o Etanol leva à formação de cápsulas em grande quantidade, mas têm menor resistência e espessura, libertando o óleo do seu interior facilmente, e algumas até aumentaram de diâmetro.

Os estudos de estabilidade térmica e à turbulência provaram que as cápsulas formadas são estáveis a altas rotações e a temperaturas até à temperatura vítrea do PEG, o que é uma conclusão muito positiva. E ficou provado que a técnica de sonificação tem uma elevada importância na formação e estabilidade das NC.

Como conclusão final, sabe-se que ainda existe muito trabalho por realizar, como otimização de processos, estudos rigorosos de estabilidade das emulsões de NC e melhoramentos das análises realizadas.

## Capítulo 6 - Perspetivas futuras

De acordo com os resultados obtidos e conclusões retiradas ainda existe muito trabalho a fazer pela frente.

Primeiramente, deve-se estudar a otimização dos diferentes compostos das emulsões, pelo método utilizado, desde a concentração de PEG, OE e surfactante, natureza do surfactante, pH, a adição de diferentes ácidos e estudar outros pesos moleculares do PEG. Depois é importante realizar um estudo mais rigoroso dos efeitos das condições de sonificação na formação das NC, como o tempo, a temperatura e a intensidade, acompanhado por estudo estatístico.

De acordo com os resultados obtidos pelo MEG, este monómero também deve ser estudado de modo a entender o seu mecanismo de organização ao redor das gotículas de OE. Pelos resultados obtidos, o MEG parece ser um material promissor como revestimento pois, como substância tóxica para os humanos, pode reverter a sua toxicidade e polimerizar pelo método utilizado.

Visto que as condições de sonificação e da estabilidade das emulsões de NC estudadas não tiveram um suporte estatístico, deverá realizar-se um estudo mais pormenorizado deste processo para otimização posterior. Não se conseguiu retirar uma conclusão sólida do efeito da relação tempo-velocidade-temperatura sobre as emulsões, assim propõe-se a realização de estudos de estabilidade mais concretos, com análise estatística posterior, com condições de trabalho planeadas.

A preocupação da interação entre o OE encapsulado e o polímero é um facto importante a ser considerado e por isso é de grande relevância avançar com estudos de interação polímero-OE, pelas técnicas mais indicadas.

Para concluir o capítulo, vê-se grande potencial no PEG como material de encapsulamento para OE devido às suas características e aos resultados obtidos. É importante continuar este projeto, que se mostra inovador e dinâmico, com aplicações em industriais variadas e de elevada importância no quotidiano das pessoas.

## Capítulo 7 - Bibliografía

- [1] F. Solórzano-Santos, M. G. Miranda-Novales (2012) “Essential Oils From Aromatic Herbs As Antimicrobial Agentes” *Curr Opin Biotechnol* 23:136-141, DOI 10.1016/j.copbio.2011.08.005
- [2] S. Burt (2004) “Essential Oils: Their Antibacterial Properties And Potential Applications In Foods – A Review” *INT J Food Microbiol* 94:223-253, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- [3] Á. Martín, S. Varona, A. Navarrete, M. J. Cocero (2010) “Encapsulation and Co-Precipitation Processes with Supercritical Fluids: Applications with Essential Oils”, *Open Chem Eng J*, 4, 31-41. DOI: 10.2174/18741231010040100314
- [4] S. Patel (2015) “Plant Essential Oils And Allied Volatile Fractions As Multifunctional Additives In Meat And Fish-Based Food Products: A Review”, *Food Addit Contam: A*, 32:7, 1049-1064, DOI: 10.1080/19440049.2015.1040081
- [5] N. Parris, P. H. Cooke, K.B. Hicks (2005) “Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles”, *J Agric Food Chem* 53, 4788-4792, DOI: 10.1021/jf040492p
- [6] A. R. Patel, K. P. Velikov (2014) “Zein As A Source Of Functional Colloidal Nano-And Microstructures”, *J Colloid Interface Sci* 19:450-458, DOI: 10.1016/j.cocis.2014.08.001
- [7] A. E. Quirós-Sauceda, J. F. Ayala-Zavala, G. I. Olivas, G. A. González-Aguilar (2014) “Edible Coatings As Encapsulating Matrices For Bioactive Compounds: A Review”, *J Food Sci Technol* 51(9):1674-1685, DOI 10.1007/s13197-013-1246-x
- [8] R. Rehman, M. A. Hanif, Z. Mushtaq, A. M. Al-Sadi (2016) “Biosynthesis Of Essential Oils In Aromatic Plants: A Review”, *Food Rev Int*, 32:2, 117-160, DOI: 10.1080/87559129.2015.1057841
- [9] F. C. Flores, R. F. Ribeiro, A. F. Ourique, C. M. Bueno Rolim, C. B. da Silva, A. R. Pohlmann, R. C. Ruer Beck, S. S. Guterres (2011) “Nanostructured Systems

Containing An Essential Oil: Protection Against Volatilization”, Quim Nova, Vol. 34, No. 6, 968-972, DOI: 10.1590/S0100-40422011000600010

- [10] A. Mohammadi, M. Hashemi, S. M. Hosseini (2015) “Nanoencapsulation Of Zataria Multiflora Essential Oil Preparation And Characterization With Enhanced Antifungal Activity For Controlling Botrytis Cinerea, The Causal Agent Of Gray Mould Disease”, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 28: 73-80, DOI: 10.1016/j.ifset.2014.12.011
- [11] Tian Y, Tan Y, Liu N, Liao Y, Sun C, Wang S and Wu A (2016) “Functional Agents to Biologically Control Deoxynivalenol Contamination in Cereal Grains”. *Front. Microbiol.* 7:395. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00395
- [12] N. K. Kalagatur, V. Mudili, C. Siddaiah, V.K. Gupta, G. Natarajan, M. H. Sreepathi, B. H. Vardhan, V. L. R. Putcha (2015) “Antagonistic Activity Of Ocimum Sanctum L. Essential Oil On Growth And Zearalenone Production By Fusarium Graminearum In Maize Grains”. *Front. Microbiol.* 6:892. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00892
- [13] S. Y. Cheng, M. C. W. Yuen, C. W. Kan, K. K. L. Cheuk, C. H. Chui, K. H. Lam (2009) “Cosmetic textiles with biological benefits: Gelatin microcapsules containing Vitamin C”, *Int J Mol Med* 24: 411-419, DOI: 10.3892/ijmm\_00000247
- [14] S.N. Rodrigues, I.M. Martins, I.P. Fernandes, P.B. Gomes, V.G. Mata, M.F. Barreiro, A.E. Rodrigues (2009) “Scentfashion®: Microencapsulated Perfumes For Textile Application”, *Chem. Eng. J.* 149, 463-472, DOI: 10.1016/j.cej.2009.02.021
- [15] M. Karthikeyan, T. Ramachandran & O.L. Shanmugasundaram (2014) “Synthesis, characterization, and development of thermally enhanced cotton fabric using nanoencapsulated phase change materials containing paraffin wax”, *J Text I*, 105:12, 1279-1286, DOI: 10.1080/00405000.2014.886368
- [16] H. Souguir, F. Salaün, P. Douillet, I. Vroman, S. Chatterjee (2013) “Nanoencapsulation Of Curcumin In Polyurethane And Polyurea Shells By An Emulsion Diffusion Method”, *Chem Eng J* 221:133-145, DOI: 10.1016/j.cej.2013.01.069

- [17] F. L. Yang, X. G. Li, F. Zhu, C. L. Lei (2009) “Structural Characterization of Nanoparticles Loaded with Garlic Essential Oil and Their Insecticidal Activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)”, *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 10156-10162 DOI:10.1021/jf9023118
- [18] L. S. Trujillo, M. A. R. Graü, R. S. Fortuny, O. M. Belloso (2013) “Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions” *Food Hydrocoll* 30: 401-407, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.07.004
- [19] L. M. de Assis, E. R. Zavareze, C. Prentice-Hernández L. A. Souza Soares (2012) “Review: Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods”, *Braz. J. Food Technol*, Campinas, 15:99-109, DOI: 10.1590/S1981-67232012005000004
- [20] P. N. Ezhilarasi, P. Karthik, N. Chhanwal, C. Anandharamakrishnan (2013) “Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review”, *Food Bioprocess Tech* 6:628-647, DOI 10.1007/s11947-012-0944-0
- [21] S. Gourin (2004) “Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends”, *Trends Food Sci Tech* 15, 330-347, DOI: 10.1016/j.tifs.2003.10.005
- [22] R. M. Daudt, J. Emanuelli, I. C. Kulkamp-Guerreiro, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres (2013),” A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos”; *Cienc. Cult.* Vol 65 nº 3 São Paulo
- [23] J. S. Komaiko, D. J. McClements (2016) “Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A review of Available Methods”, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, DOI: 10.1111/1541-4337.12189
- [24] S Y An, M P N Bui, Y J Nam, K N Han, C A Li, J Choo, E K Lee, S Katoh, Y Kumadac, G H Seong (2009) “Preparation of monodisperse and size-controlled poly(ethylene glycol) hydrogel nanoparticles using liposome templates” *J Colloid Interface Sci*; 331(1):98-103. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.11.022
- [25] P. J. Rao, H. Khanum (2016) “A green chemistry approach for nanoencapsulation of bioactive compound - Curcumin”, *LWT-Food Sci Technol* 65:695-702, DOI: 10.1016/j.lwt.2015.08.070

- [26] K. Bouchemal, S. Briançon, E. Perrier, H. Fessi (2004) “Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation”, *Int. J. Pharm.* 280:241-251, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.05.016
- [27] M. Maswal, A. A. Dar (2014) “Formulation challenges in encapsulation and delivery of citral for improved food quality”, *Food Hydrocoll* 37:182-195, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.10.035
- [28] H. J. Jang, C. Y. Shin, K.B. Kim (2015) “Safety Evaluation of Polyethylene Glycol (PEG) Compounds for Cosmetic Use”, *Toxicol. Res.* 31:105-136, DOI: 10.5487/TR.2015.31.2.105
- [29] J. Akbari, M. Saeedi, K. M. Semnani, H. R. Kelidari, F. S. Moghanlou, G. Zareh, S. Rostamkalaei (2015) “The Effect of Tween 20, 60, and 80 on Dissolution Behavior of Sprionolactone in Solid Dispersions Prepared by PEG 6000”, *Adv Pharm Bull*, 5 (3), 435-441, DOI: 10.15171/apb.2015.059
- [30] H. Schiweck, A. Bär, R. Vogel, E. Schwarz, M. Kunz, C. Dusautois, A. Clement, C. Lefranc, B. Lüssem, M. Moser, S. Peters, "Sugar Alcohols" *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2012, Wiley-VCH, Weinheim. DOI: 10.1002/14356007
- [31] T. R. Birrin (2015) “Nanoemulsões produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP) para encapsulação de curcumina: parâmetros de produção, estabilidade físico-química e incorporação em sorvete”, *Dissertação, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade São Paulo*
- [32] C. Gómez-Gaete (2004) “Nanopartículas Poliméricas: Tecnología Y Aplicaciones Farmacéuticas”, *Rev. Farmacol. Chile*, 7(2) 7-16
- [33] P. Calvo, C. Remuñán-López, J. L. Vila-Jato, M. J. Alonso (1997) “Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers” *J. Appl. Polym. Sci.*, 63, 125-132 DOI: 0021-8995/97/010125-08
- [34] C. Turchiuli, M. Fuchs, M. Bohin, M. E. Cuvelier, C. Ordonnaud, M. N. Peyrat-Maillard, E. Dumoulin. (2005) “Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration” *Innov. Food Sci. & Emerg. Technol.* 6 29 - 35 DOI: 10.1016/j.ifset.2004.11.005

- [35] S. F. Hosseini, M. Zandi, M. Rezaei, F. Farahmandghavi (2013) "Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study" *Carbohydr Polym.* 95, 50- 56 DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.02.031
- [36] R. Yoksan, J. Jirawutthiwongchai, K. Arpo (2010) "Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes" *Colloids Surf., B: Biointerfaces* 76 292-297 DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.11.007
- [37] L. Keawchaon, R. Yoksan (2011) "Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles" *Colloids Surf., B: Biointerfaces* 84 163-171 DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.12.031