

EMANUELE DUARTE HERCULANO

ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus staigeriana* NANOENCAPSULADO PARA
UTILIZAÇÃO COMO CONSERVANTE EM ALIMENTOS

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós- Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção
do Título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. Área de
concentração: Ciência e Tecnologia
de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Haroldo César
Beserra de Paula.

FORTALEZA

2014

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Emanuele Duarte Herculano

EMANUELE DUARTE HERCULANO

ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus staigeriana* NANOENCAPSULADO PARA
UTILIZAÇÃO COMO CONSERVANTE EM ALIMENTOS

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do Título
de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Haroldo César Beserra de Paula (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Pablyana Leila Rodrigues da Cunha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meus caminhos e me dar forças, sem as quais eu não conseguiria.

Agradeço aos meus pais pelo amor concedido, pela oportunidade de me formar e por todos os esforços que fizeram durante todos esses anos.

Ao meu irmão Davyd pelo companheirismo e amizade durante esses anos.

Ao professor Haroldo Paula pelas orientações, conselhos, dedicação e apoio.

À professora Evânia pela contribuição com o desenvolvimento deste trabalho através da disponibilidade do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, para a realização das análises microbiológicas e pelas correções e relevantes sugestões.

À professora Pablyana pela atenção, correções e relevantes sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

À Tereza, técnica do laboratório de Análise Térmica, pela realização das análises de TGA e DSC.

À Nádia, Venícios, e Elis pelo auxílio nas análises de tamanho de partícula e FT-IR.

Aos colegas e amigos do Labiopol e da pós-graduação pela amizade, companheirismo e contribuição para a realização deste trabalho. Em especial, Erick, Fernanda, Lorraine, Vanessa, Maria, Rudson, Mayrla, Diones, Alba Valéria, Flávia, Nara e Mayra.

Às meninas do laboratório de microbiologia, pelo companheirismo e auxílio nas análises de microbiologia, em especial, Flayanna, Gizane, Elaine e Lorena.

Aos professores da pós-graduação que contribuíram para a minha formação.

Ao Paulo, secretário da pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelas ajudas, paciência e o bom humor de sempre.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFC, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, em especial, Sr. Luís e Sr. Adail.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e tecnológico (FUNCAP) pela bolsa concedida.

E a todos, colegas, amigos e familiares, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigada!

“Nada no mundo consegue tomar o lugar da persistência. O talento não consegue; nada é mais comum que homens fracassados com talento. A genialidade não consegue; gênios não recompensados é quase um provérbio. A educação não consegue; o mundo é cheio de errantes educados. A persistência e determinação sozinhas são onipotentes.”

(Calvin Coolidge)

RESUMO

Neste trabalho, o óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* (OES) foi nanoencapsulado e determinado o efeito bactericida de seu princípio ativo contra duas cepas de microrganismos patogênicos, como um estudo preliminar para utilização na conservação de alimentos. O processo ocorreu através da formação de uma nanoemulsão e secagem em *spray-drying* utilizando a goma de cajueiro (GC) como material encapsulante. As nanopartículas foram caracterizadas através das análises de tamanho e distribuição de partícula, potencial zeta, espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise térmica (TGA/DSC), cinética de liberação *in vitro*, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) e estabilidade do encapsulado. Foi também determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM) das nanopartículas, do óleo essencial e da goma de cajueiro para avaliar sua ação antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 (Gram-positiva) e *Salmonella* Enteritidis IAL 1132 (Gram-negativa). As nanopartículas apresentaram tamanho que variaram de $27,70 \pm 3,42$ nm a $432,67 \pm 41,47$ nm, de acordo com a formulação, e a superfície carregada negativamente. A presença do OES nas nanopartículas é observada através de modificações nas resoluções de pico dos espectros obtidos por FTIR. A análise térmica evidenciou os principais eventos de perda de massa das amostras associados à degradação de GC. O teor de OES nanoencapsulado variou entre 4,76 % e 7,12 %. O aumento na proporção de GC favoreceu a uma rápida liberação do óleo em água devido ao aumento do caráter hidrofílico, além de aumentar a capacidade das nanopartículas em reter o OES no invólucro polimérico no decorrer dos 365 dias. Os resultados para CBM indicaram uma ação bactericida do óleo nanoencapsulado e do óleo puro mais eficiente na bactéria Gram-positiva. No entanto, as nanopartículas mostraram um resultado melhor contra a bactéria Gram-negativa, devido a um possível efeito sinérgico entre a GC e o OES.

Palavras-chave: Nanoencapsulação. Goma de cajueiro. Óleo essencial. *Eucalyptus staigeriana*. Concentração Bactericida Mínima. *Salmonella*. *Listeria*.

ABSTRACT

In this study, the *Eucalyptus staigeriana* essential oil (ESO) was nanoencapsulated and determined the bactericidal effect of its active principle against two strains of pathogenic microorganisms, as a preliminary study for use in food preservation. The process occurred by forming a nanoemulsion and spray-drying, using the cashew gum (CG) as encapsulating material. The nanoparticles were characterized by analysis of particle size distribution, zeta potential, absorption spectroscopy in the infrared Fourier transform spectroscopy (FTIR), thermal analysis (TGA/DSC), in vitro release kinetics, gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and stability of the encapsulated. Was also determined the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of nanoparticles, essential oil, and cashew gum to evaluate its antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 (Gram-positive) and *Salmonella* Enteritidis IAL 1132 (Gram-negative). The nanoparticles had size ranging from 27.70 ± 3.42 nm to 432.67 ± 41.47 nm in accordance with the formulation, and negatively charged surface. The presence of ESO in the nanoparticles is observed through changes in peak resolutions of the spectra obtained by FT-IR. Thermal analysis showed the main events of mass loss of the samples associated with the degradation of CG. The content of ESO nanoencapsulated varied between 4.76% and 7.12%. The increase in the proportion of CG favored the rapid release of oil in water due to the increased hydrophilic character, and enhance the ability of the nanoparticles to retain the ESO in the polymeric shell during the 365 days. The results for MBC indicated a bactericidal action of the nanoencapsulated oil, and pure oil more efficient in Gram-positive. However, the nanoparticles showed better results against Gram-negative bacteria, due to a possible synergistic effect between the CG and ESO.

Keywords: nanoencapsulation. Cashew gum. *Eucalyptus staigeriana*. Minimum Bactericidal Concentration. *Salmonella*. *Listeria*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura para diferentes modelos de nanopartículas.....	25
Figura 2 - Fotografia do equipamento <i>Spray dryer</i> B-290 (BÜCHI) e seus principais componentes.....	25
Figura 3 - Principais etapas do processo de nanoencapsulamento por <i>spray drying</i>	26
Figura 4 - Atividade de um emulsificante (Emulsão O/A).....	28
Figura 5 - Representação esquemática da formação de uma emulsão.....	28
Figura 6 - Árvore do cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i> , L.).....	35
Figura 7 - Representação esquemática de um possível fragmento da goma do cajueiro.....	37
Figura 8 - (a) Exsudado obtido de <i>Anacardium occidentale</i> , L. (b) Goma do cajueiro purificada.....	38
Figura 9 - <i>Eucalyptus staigeriana</i>	39
Figura 10 - Estrutura química, número de átomos de carbono e nomenclatura dos dois enantiômeros do limoneno.....	42
Figura 11 - Decomposição do limoneno.....	43
Figura 12 - Fluxograma do processo de produção das nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro através da formação de nanoemulsão e secagem em <i>spray drying</i>	46
Figura 13 - Curva de calibração do óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em etanol.....	48
Figura 14 - Curva de calibração do óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em água destilada.....	50
Figura 15 - Etapas do procedimento de ativação e preparo dos inóculos, liofilizados, das bactérias <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis para utilização na análise de Concentração Bactericida Mínima.....	53
Figura 16 - Etapas do procedimento de determinação da Concentração Bactericida Mínima da goma de cajueiro, do óleo essencial	

	de <i>Eucalyptus staigeriana</i> e das nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro contra a bactéria <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	55
Figura 17 -	Etapas do procedimento de determinação da Concentração Bactericida Mínima da goma de cajueiro, do óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> e das nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro contra a bactéria <i>Listeria monocytogenes</i>	56
Figura 18 -	FT-IR da goma de cajueiro e das nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro.....	61
Figura 19 -	Tamanho e distribuição por volume de partícula das formulações de nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro.....	62
Figura 20 -	(a) Curvas termogravimétricas obtidas através da análise termogravimétrica (TGA), sob atmosfera de nitrogênio, da goma de cajueiro e das formulações de nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro. (b) Derivada primeira das curvas termogravimétricas em função da temperatura (dTG).....	65
Figura 21 -	Curvas obtidas pela Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), sob atmosfera de nitrogênio, da goma de cajueiro e das formulações de nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro.....	67
Figura 22 -	Cinética de liberação <i>in vitro</i> em água destilada para as formulações de nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro - (a) F1 e F3 e (b) F2.....	69
Figura 23 -	Teores do óleo essencial encapsulado para as formulações de nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro acondicionados em recipientes de vidro âmbar sob temperatura ambiente no	

	decorrer de aproximadamente 365 dias.....	72
Figura 24 -	Determinação da Concentração Bactericida Mínima para as nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro contra a bactéria <i>S. Enteritidis</i> , em meio ágar Entérico Hecktoen (DIFCO).....	74
Figura 25 -	Determinação da Concentração Bactericida Mínima para as nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro contra a bactéria <i>L. monocytogenes</i> , em meio ágar Oxford Listeria (OXOID).....	74
Figura 26 -	Determinação da Concentração Bactericida Mínima para o óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro contra a bactéria <i>S. Enteritidis</i> , em meio ágar Entérico Hecktoen (DIFCO).....	75
Figura 27 -	Determinação da Concentração Bactericida Mínima para o óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro contra a bactéria <i>L. monocytogenes</i> , em meio ágar Oxford Listeria (OXOID).....	76
Figura 28 -	Determinação da Concentração Bactericida Mínima para as soluções de goma de cajueiro em diferentes concentrações contra as bactérias <i>L. monocytogenes</i> , em meio ágar Oxford Listeria (OXOID) e <i>S. Enteritidis</i> , em meio ágar Entérico Hecktoen (DIFCO).....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da goma do cajueiro de diferentes origens.....	36
Tabela 2 - Composição percentual relativa do óleo essencial das folhas de <i>E. staigeriana</i>	40
Tabela 3 - Formulações das nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro.....	47
Tabela 4 - Composição do óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> obtida através de cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa.....	59
Tabela 5 - Tamanho e distribuição por volume e potencial zeta das nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro.....	63
Tabela 6 - Teor de óleo encapsulado (T.E.) e eficiência de encapsulamento (EE) para as formulações de nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro.....	64
Tabela 7 - Eventos térmicos e temperaturas máximas de decomposição obtidos através da análise termogravimétrica (TGA), sob atmosfera de nitrogênio, da goma de cajueiro e das formulações de nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro.....	66
Tabela 8 - Eventos térmicos da análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), sob atmosfera de nitrogênio, da goma de cajueiro e das formulações de nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro....	67
Tabela 9 - Coeficientes de correlação para diferentes modelos cinéticos obtidos pela cinética de liberação <i>in vitro</i> das formulações de nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro.....	70
Tabela10 - Parâmetros cinéticos para o modelo de Korsmeyer-Peppas obtidos pela cinética de liberação <i>in vitro</i> das formulações de nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus</i>	

<i>staigeriana</i> em goma de cajueiro.....	71
---	----

Tabela11 - Concentração Bactericida Mínima das nanopartículas de óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em goma de cajueiro, do óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> contra as bactérias <i>S. Enteritidis</i> e <i>L. monocytogenes</i>	73
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (Brain Heart Infusion)
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CTR	Controle
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura (Differential Scanning Calorimetry)
E.E	Eficiência de Encapsulamento
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
GC	Goma de Cajueiro
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa
HE	Meio Entérico de Hecktoen (Hecktoen Enteric)
Nanopartículas	Nanopartículas de goma de cajueiro dopadas com óleo essencial de <i>E. staigeriana</i>
GC-OES	
OES	Óleo Essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i>
OXA	Meio Ágar Oxford Listeria (Oxford Listeria Agar)
Sol. GC	Solução de Goma de Cajueiro
Sol. Nanop.	Solução de Nanopartículas
T.E.	Teor de Óleo Encapsulado
TGA	Análise Termogravimétrica (Thermal Gravimetric Analysis)
DTG	Análise Termogravimétrica Derivada (Derivative Thermogravimetric Analysis)
TSA	Meio Ágar Trypticase de Soja (Tryptone Soya Ágar)
TSA-YE	Meio Ágar Trypticase de Soja - Extrato de Levedura (Tryptone Soya Ágar – Yeast Extract)
T80	<i>Tween</i> 80
TSB	Caldo Trypticase de Soja (Tryptic Soy Broth)
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia/mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1	Nanotecnologia de alimentos.....	21
3.2	Nanoencapsulamento.....	23
3.2.1	<i>Princípios e objetivos.....</i>	23
3.2.2	<i>Nanoencapsulamento por spray drying.....</i>	25
3.2.2.1	<i>Mecanismo de formação das nanopartículas por meio da formação de nanoemulsão.....</i>	27
3.2.3	<i>Mecanismos de liberação.....</i>	29
3.2.4	<i>Aplicações à tecnologia de alimentos.....</i>	30
3.2.5	<i>Material formador de parede.....</i>	34
3.2.5.1	<i>Goma do Cajueiro.....</i>	35
3.3	Óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i>	38
3.4	Limoneno.....	42
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1	Material.....	44
4.2	Métodos.....	44
4.2.1	<i>Purificação da goma do cajueiro.....</i>	44
4.2.2	<i>Análise GC - EM.....</i>	45
4.2.3	<i>Preparação das nanopartículas.....</i>	45
4.2.4	<i>Caracterização das nanopartículas.....</i>	47
4.2.4.1	<i>Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....</i>	47
4.2.4.2	<i>Tamanho e distribuição de partícula e potencial Zeta.....</i>	47
4.2.4.3	<i>Determinação do teor de óleo encapsulado (T.E.) e da eficiência de encapsulamento (E.E).....</i>	48
4.2.4.4	<i>Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria de varredura diferencial (DSC).....</i>	49

4.2.4.5	<i>Cinética de liberação in vitro</i>	49
4.2.4.6	<i>Estudo do teor de óleo encapsulado nas nanopartículas armazenadas a temperatura ambiente</i>	51
4.2.5	<i>Concentração Bactericida Mínima (CBM) das nanopartículas, da goma de cajueiro e do óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i></i>	52
4.2.5.1	<i>Culturas bacterianas</i>	52
4.2.5.2	<i>Preparo do inóculo</i>	52
4.2.5.3	<i>Concentração Bactericida Mínima (CBM)</i>	54
4.2.5.4	<i>Concentrações analisadas de nanopartículas, do óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> e da goma de cajueiro</i>	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Análise GC- EM	59
5.2	Caracterização das nanopartículas	60
5.2.1	<i>Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	60
5.2.2	<i>Tamanho e distribuição de partícula e potencial zeta</i>	62
5.2.3	<i>Teor de óleo encapsulado (T.E) e eficiência de encapsulamento (E.E)</i>	64
5.2.4	<i>Análise térmica</i>	65
5.2.4.1	<i>TGA e dTG</i>	65
5.2.4.2	<i>DSC</i>	67
5.2.5	<i>Cinética de liberação in vitro</i>	68
5.2.6	<i>Estudo do teor de óleo encapsulado nas nanopartículas armazenadas a temperatura ambiente</i>	71
5.3	<i>Concentração Bactericida Mínima (CBM) das nanopartículas, da goma de cajueiro e do óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i></i>	72
6	Conclusão	78
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

O consumidor procura cada vez mais por produtos de melhor qualidade no mercado, visando não somente a manutenção das características organolépticas e nutricionais dos alimentos, mas também sua segurança microbiológica, física e química. Apesar dos vários métodos de conservação de alimentos já existentes, faz-se necessário o estudo e a utilização de novas tecnologias, ou combinações de métodos que possam suprir as necessidades do consumidor (COSTA; DELIZA; ROSENTHAL, 1999). Por outro lado, o produtor também deseja oferecer um produto de qualidade, mantendo o mercado suprido ao longo do ano e sem gastos excessivos.

Nos últimos anos vem sendo comprovadas cientificamente as propriedades antimicrobianas de substâncias presentes nos óleos essenciais produzidos pelas plantas, como consequência do seu metabolismo secundário, apesar de já serem conhecidas empiricamente há séculos. Devido a estas propriedades, alguns destes óleos essenciais, já vêm sendo estudados e aplicados na indústria farmacêutica, como alternativa ao uso de antibióticos (NASCIMENTO *et al.*, 2010), e alimentícia como na substituição parcial ou total de conservantes químicos, por exemplo. Porém existem ainda certas dificuldades na aplicação desses óleos, devido à instabilidade as condições ambientais.

Eucalyptus sp. tornou-se uma planta bastante cultivada no mundo, com aplicações nas indústrias farmacêutica e de perfumaria assim como, na produção de papel e lenha. Através dos conhecimentos empíricos da medicina popular, diversos estudos têm sido publicados sobre as propriedades químicas, biológicas e medicinais do seu óleo essencial, tais como a sua atividade antimicrobiana, larvicida e anti - inflamatória (NASCIMENTO *et al.*, 2010). No Japão, o extrato da folha de *Eucalyptus* sp. foi aprovado como um aditivo natural para alimentos e está incluso na lista de aditivos existentes como um antioxidante (TYAGI; MALIK, 2011).

O encapsulamento é um procedimento utilizado para envolver sólidos, líquidos ou gases, protegendo-os das condições ambientais (luz, ar e umidade), através de uma camada polimérica e já vem sendo utilizado em

diversos setores como nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética. Alguns outros benefícios do processo de encapsulamento são: o aumento de vida útil de um composto volátil, o controle da reação química entre duas espécies ativas e a liberação lenta dos agentes ativos, à medida que a cápsula se dissolve (LANDIM, 2008). O nanoencapsulamento é uma técnica de encapsulamento em escala nanométrica e faz parte de uma ciência denominada nanotecnologia.

Por fim, a indústria de alimentos procura cada vez mais por novos métodos de conservação que além de manter o alimento seguro e com qualidade conserve as características originais, pelo maior tempo possível, após a sua transformação. Dentre estes novos métodos, o nanoencapsulamento de compostos naturais com propriedades ativas, como o óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*, ainda pouco utilizado com esta finalidade, torna-se uma alternativa que necessita ser melhor explorada como uma nova tecnologia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo o nanoencapsulamento do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro através da formação de uma nanoemulsão e secagem por *spray-drying* e determinar o efeito bactericida do seu princípio ativo, limoneno, contra duas cepas de microrganismos patogênicos como um estudo preliminar para utilização na conservação de alimentos. Assim como caracterizar as nanopartículas e estudar o efeito na proporção do material encapsulante e do emulsificante sobre a eficiência do encapsulamento.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a composição do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM);
- ✓ Preparar nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro através da formação de uma nanoemulsão e secagem por *spray-drying*;
- ✓ Caracterizar as nanopartículas e a goma de cajueiro por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria de varredura diferencial (DSC);
- ✓ Determinar o tamanho e distribuição de partícula e potencial zeta das nanopartículas;
- ✓ Determinar o teor de óleo encapsulado (T.E) e a eficiência do encapsulamento (E.E) das nanopartículas;
- ✓ Analisar as cinéticas de liberação *in vitro* das nanopartículas em água e avaliar o mecanismo de liberação do óleo essencial;
- ✓ Avaliar a estabilidade do óleo essencial nanoencapsulado através do T.E no período de aproximadamente 365 dias;
- ✓ Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) das nanopartículas, do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* e da goma de

cajueiro para avaliar sua ação antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 (Gram-positiva) e *Salmonella* Enteritidis IAL 1132 (Gram-negativa).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Nanotecnologia de alimentos

De acordo com Chi-Fai, Shiuan-Huei e Gow-chin (2007) define-se como nanotecnologia a manipulação de materiais em escala atômica, molecular ou macromolecular.

O interesse nesses materiais em nanoescala é devido às novas propriedades adquiridas, podendo ser muito diferentes daquelas em maior escala. É importante ainda ressaltar que essas propriedades podem variar de acordo com o tamanho e a forma. À medida que as partículas têm o seu tamanho reduzido em escala nanométrica, há um aumento na superfície em relação ao volume, o que faz aumentar a reatividade e alterar as propriedades mecânicas, elétricas e ópticas das partículas. As interações individuais entre átomos e moléculas modificam as propriedades físicas, químicas e biológicas das nanopartículas oferecendo novas aplicações funcionais diferentes aos homólogos em macroescala (NEETHIRAJAN; JAYAS, 2011).

A nanotecnologia é um campo interdisciplinar que se estende em várias áreas da ciência, como a física, a química e a biologia, além da engenharia, como nas micro-técnicas de fabricação (NEETHIRAJAN; JAYAS, 2011). Na última década as pesquisas vêm se desenvolvendo com velocidade em vários campos e já existem inúmeras empresas especializadas na fabricação de novos materiais nanométricos, com aplicações na terapia médica e diagnóstica, produção de energia, computação molecular e materiais estruturais. São projetadas nanotecnologias para impactar pelo menos \$ 3 trilhões na economia global em 2020. As indústrias devem requerer uma demanda de pelo menos 6 milhões de trabalhadores até o final da década, para a produção de novas nanotecnologias (DUNCAN, 2011).

Já se tem conhecimento dos usos potenciais da nanotecnologia em praticamente todos os segmentos da indústria alimentícia, incluindo armazenamento, processamento, monitoramento da qualidade e embalagens (NEETHIRAJAN; JAYAS, 2011).

A nanotecnologia pode modificar as propriedades de permeação e barreira (mecânica e química) das embalagens melhorando a resistência. Nas

embalagens ativas um composto é lançado ao alimento quando este começa a perder alguma de suas características, tais como conservantes, antimicrobianos, compostos de sabor, cor e suplementos nutricionais (NEETHIRAJAN; JAYAS, 2011).

Sistemas de embalagens antimicrobianos prolongam a vida útil dos produtos e mantêm a segurança dos alimentos através da redução da taxa de crescimento dos microrganismos. Esses sistemas incluem a adição de sachês de nanopartículas antimicrobianas, a dispersão de agentes bioativos, revestimentos de agentes bioativos sobre a superfície do material de embalagem, a utilização de macromoléculas antimicrobianas com propriedade formadora de filmes ou matrizes comestíveis (NEETHIRAJAN; JAYAS, 2011).

Através de nanosensores, pode-se fazer o rastreamento de microrganismos, toxinas e contaminantes durante todo o processamento dos alimentos, garantindo a qualidade dos produtos desde a matéria-prima até o momento do consumo. Essa tecnologia pode ser aplicada em grãos armazenados a granel onde as pragas dos produtos muitas vezes se escondem. Por meio da resposta aos analitos e voláteis no meio ambiente de armazenamento dos alimentos pode-se detectar a fonte e o tipo de deterioração. Nas embalagens inteligentes, nanosensores alteram a cor ao detectar gases liberados pelos alimentos durante o processo de deterioração, indicando se ainda está apto ao consumo (NEETHIRAJAN; JAYAS, 2011).

Outras utilizações da nanotecnologia na produção de alimentos destacam-se a nanoencapsulação de intensificadores de odor e sabor, o melhoramento da qualidade ou textura dos alimentos, com agentes de viscosidade e geleificação e as nanoemulsões. Na agricultura podem ser citados os sistemas de entrega de vacinas, pesticidas ou fertilizantes, a detecção de patógenos de animais e plantas, sensores que monitoram as condições do solo e na engenharia genética. Na nutrição destacam-se a formulação de nutracêuticos com maior estabilidade e biodisponibilidade, na fortificação de minerais e vitaminas, na purificação de água para beber, nas características sensoriais de suplementos nutricionais e nos sistemas de liberação de nutrientes, de maneira em que são entregues aos seus locais específicos de ação (DUNCAN, 2011).

Ainda pouco se sabe sobre os riscos ao meio ambiente e à saúde humana, associados aos nanomateriais. Devido ao tamanho diminuto e a grande área superficial, nanomateriais podem facilmente penetrar no corpo e nas células causando alguma citotoxicidade ao organismo (WANG *et al.*, 2013). Muitas pesquisas afirmam que existem muito poucos estudos sobre os possíveis riscos associados à nanotecnologia de alimentos para que se afirmem tais conclusões (SIEGRIST *et al.*, 2008).

Para se entender os efeitos tóxicos de nanomateriais é necessária a determinação de suas propriedades físico-químicas tais como, o tamanho e a distribuição de partícula, o estado de aglomeração, a estrutura cristalina, a carga superficial e a porosidade (CHI-FAI; SHIUAN-HUEI; GOW-CHIN, 2007).

Apesar dos possíveis efeitos tóxicos destes materiais em nanoescala, algumas pesquisas têm revelado que existe também a possibilidade de uma significativa redução da toxicidade de algumas substâncias ao serem reduzidos em escala nanométricas, como é o caso do selênio. Uma destas pesquisas relata que a utilização de nanotubos de carbono puro administrados em ratos pode causar a morte, enquanto que nanotubos de carbono dopados com nitrogênio reduziu a sua toxicidade e risco de morte, podendo esta ser uma tecnologia aplicada em embalagens para alimentos (CHI-FAI; SHIUAN-HUEI; GOW-CHIN, 2007).

A regulamentação para nanotecnologia ainda é muito pouco desenvolvida. Não há nenhuma legislação específica além de algumas leis que regulam os efeitos na saúde humana e no meio ambiente de produtos químicos tradicionais. Estes mecanismos existentes que proporcionam atualmente uma rudimentar regulação da nanotecnologia podem evoluir à medida que desenvolvermos uma compreensão melhor das propriedades e dos riscos e benefícios à saúde e ao meio ambiente de nanoamateriais (WANG *et al.*, 2013).

3.2 Nanoencapsulamento

3.2.1 Princípios e objetivos

Podem-se classificar os processos de formação de partículas através da encapsulação em três classes, de acordo com o tamanho das cápsulas

formadas: macro ($> 5000 \mu\text{m}$), micro ($1,0 - 5000 \mu\text{m}$) e nano ($< 1,0 \mu\text{m}$) (BAKER, 1986 apud AZEREDO, 2005; JAFARI *et al.*, 2008). De acordo com Santos *et al.* (2000): macro ($>100 \mu\text{m}$), micro ($1,0 - 100 \mu\text{m}$) e nano ($0,0-1,0 \mu\text{m}$).

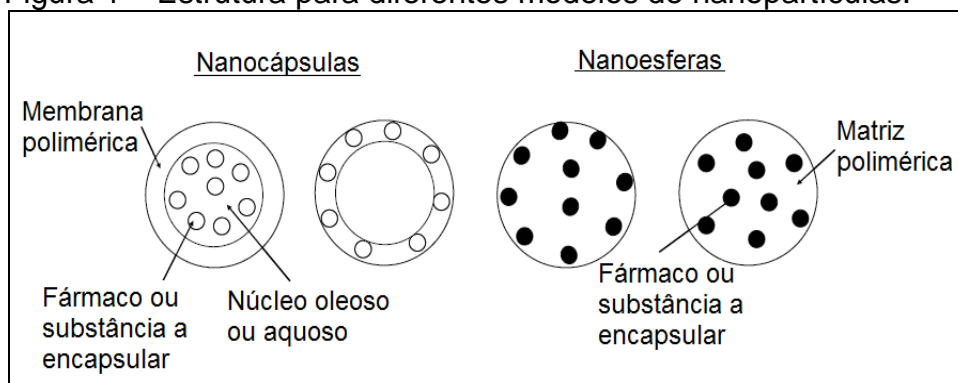
Segundo Assis *et al.* (2012) o nanoencapsulamento é um processo em que uma fina cobertura polimérica envolve sólidos, líquidos ou gases, formando nanopartículas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas.

O material encapsulado é denominado núcleo, ingrediente ativo ou fase interna. Enquanto, a cobertura pode ser designada como material de parede, carreador, membrana, casca ou revestimento (HORST, 2009).

Entre os objetivos principais estão: proteger o seu conteúdo de fatores ambientais (luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos), liberação controlada e sob estímulos, tais como mudança de pH, rompimento físico, intumescimento, dissolução e etc. Além de mascarar sabor e/ou odor desagradável e aumentar o tempo de atuação do composto ativo, prolongando seu efeito (SUAVE *et al.*, 2006).

Segundo sua estrutura as nanopartículas podem ser classificadas em dois grupos: nanocápsulas, aquelas em que o agente ativo está confinado a um núcleo líquido ou sólido e recoberto por uma camada de polímero de espessura variável, como um sistema vesicular e nanoesferas em que o núcleo ativo é uniformemente disperso em uma matriz polimérica, sistema do tipo matricial. Nas nanocápsulas a substância a encapsular pode localizar-se no núcleo sob a forma dissolvida ou suspensa, ou ainda adsorvido a superfície da nanopartícula. Nas nanoesferas o agente ativo pode também estar localizado no interior ou exterior da partícula, sendo homogêneas se o material se encontrar no estado molecular (dissolvido), ou heterogêneas se estiver na forma de partículas (suspensão) (REIS, 2007) (FIGURA 1).

Figura 1 – Estrutura para diferentes modelos de nanopartículas.



Fonte: REIS (2007)

3.2.2 Nanoencapsulamento por spray drying

A secagem por *spray dryer* (FIGURA 2) no nanoencapsulamento consiste resumidamente no processo de obtenção de partículas em escala nanométrica através da aspersão na forma de *spray* de uma solução e/ou suspensão formada pelo agente encapsulante e o princípio ativo, com formação de gotículas e secagem em ar quente para obtenção das partículas secas (ASSIS, 2012; BRAGA, 2005).

Figura 2 – Fotografia do equipamento *Spray dryer* B-290 (BÜCHI) e seus principais componentes

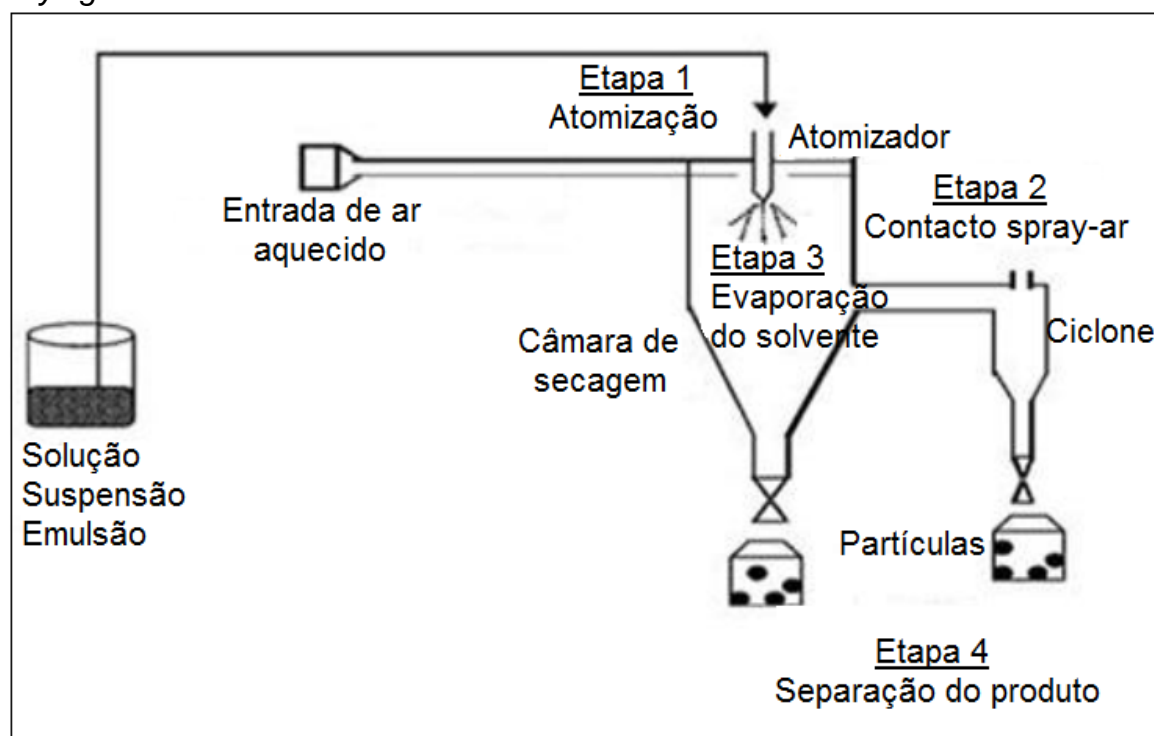


FONTE: Autoria própria.

Onde: (a) material a ser secado; (b) bomba peristáltica; (c) atomizador; (d) câmara de secagem; (e) ciclone; (f) frasco coletor.

O método consiste inicialmente em preparar a solução do polímero de revestimento na qual o ingrediente ativo será nanoencapsulado. O polímero é geralmente dissolvido em um solvente no qual o ingrediente ativo é insolúvel. Este, em seguida, é adicionado à solução sob agitação vigorosa. Em seguida, a solução é bombeada até o pulverizador (Etapa 1), onde é aspergida na forma de gotículas até à câmara de secagem (Etapa 2). Neste momento, o solvente é evaporado através do ar de secagem e as gotículas passam para o estado sólido (Etapa 3). Finalmente, as partículas secas são separadas do ar de exaustão, por força centrífuga, em um separador denominado ciclone e coletadas em um frasco, enquanto o ar de exaustão flui para a parte superior deixando o ciclone (Etapa 4) (FIGURA 3) (ASSIS, 2012; BRAGA, 2005).

Figura 3 – Principais etapas do processo de nanoencapsulamento por *spray drying*.



Fonte: BRASILEIRO (2011).

Entre as vantagens do método estão incluídas a flexibilidade, a rapidez, o baixo custo e a possibilidade de utilização para substâncias termosensíveis, já que o tempo de exposição das partículas ao calor ocorre durante poucos segundos, não ultrapassando a temperatura de 100°C no interior do núcleo. Isso ocorre devido à elevada relação superfície específica /

volume das partículas possibilitando uma rápida evaporação do solvente. Outra vantagem seria, a não necessidade de lavagens posteriores para se retirar resíduos de solvente ou separar as partículas (BRASILEIRO, 2011).

Dentre os fatores que podem influenciar o processo estão: as temperaturas do ar de entrada e de saída, o fluxo de ar ou do fluido de arraste, a distribuição da temperatura e da umidade, o tempo de permanência e a geometria da câmara. Além destes, o tipo e a concentração do agente encapsulante podem influenciar nas características das partículas (BRASILEIRO, 2011).

3.2.2.1 Mecanismo de formação das nanopartículas por meio da formação de nanoemulsão.

Nanopartículas podem ser formadas através da constituição de uma nanoemulsão por meio de um processo em que a solução do material encapsulante e o agente ativo, de polaridades contrárias, são misturados de forma vigorosa.

Denomina-se emulsão, ao sistema formado quando dois líquidos imiscíveis são colocados em contato, sendo que um torna-se disperso no outro, com a formação de glóbulos finitos (LISBÔA, 2012).

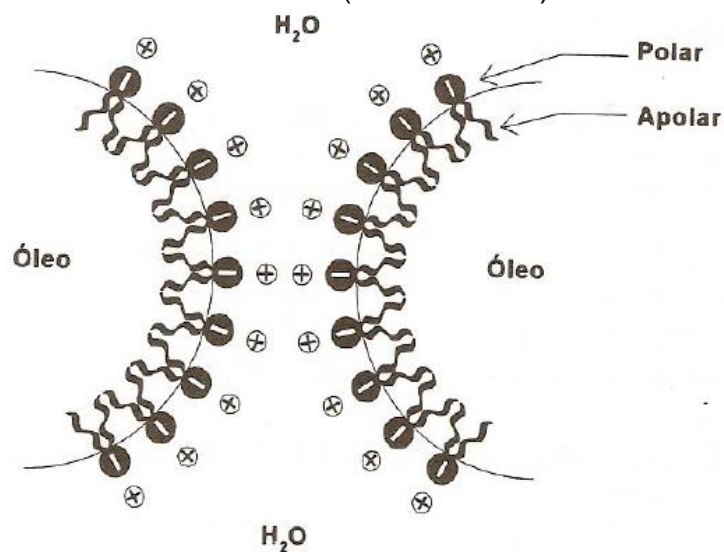
A fase dispersa, ou fase interna, constitui a parte hidrofóbica, não polar da emulsão. Enquanto a fase contínua, ou fase externa, constitui a parte hidrofílica polar, ou seja, trata-se de um sistema óleo / água (O / A). No caso inverso, em que a água é a fase dispersa e o óleo a fase contínua, denomina-se, sistema água / óleo (A / O).

A fase interna da emulsão tenta constantemente se aglomerar e se separar como uma segunda fase causando variação no tamanho da partícula interna, ou seja, o sistema é termodinamicamente instável. Agentes emulsificantes são usados para retardar essa separação inevitável (LISBÔA, 2012).

Os agentes emulsificantes são grandes moléculas que por serem anfifílicas, que contêm grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, promovem a estabilidade da emulsão, através da redução da tensão interfacial, em função de

sua adsorção na interface. A tensão interfacial é a força requerida para quebrar a superfície entre dois líquidos imiscíveis. À medida que a tensão é reduzida, a emulsão é formada e caso essa tensão fosse zero, a emulsão se formaria de forma espontânea (LISBÔA, 2012). A Figura 4 mostra um esquema de como os emulsificantes agem em um sistema do tipo óleo/água. Os grupos terminal polar das moléculas dos emulsificantes interagem com as moléculas de água, enquanto que a porção hidrofóbica interage com a fase lipídica da emulsão (óleo).

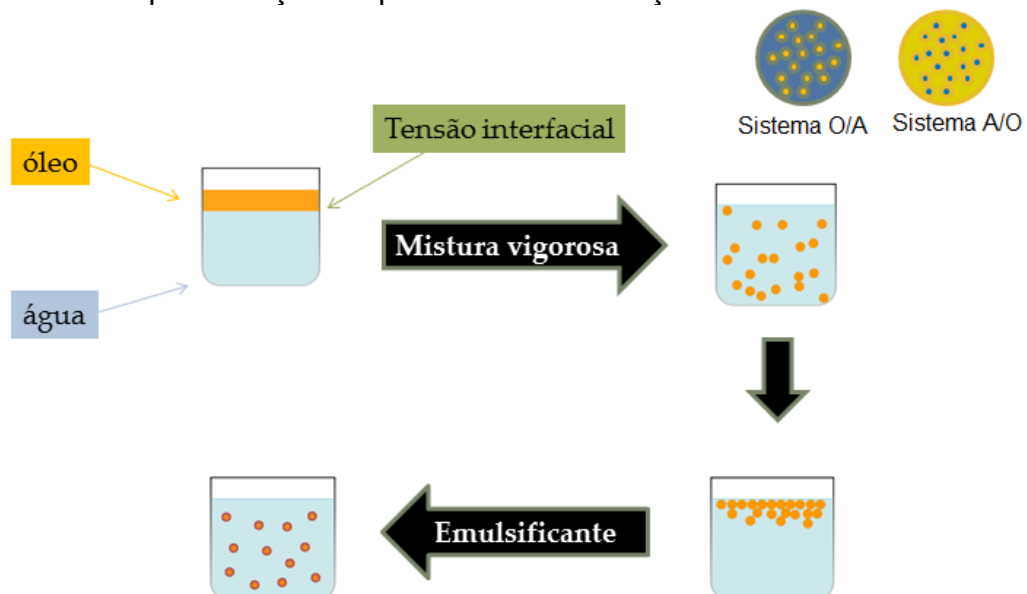
Figura 4 – Atividade de um emulsificante (Emulsão O/A).



Fonte: ARAÚJO (1995)

A Figura 5 mostra um esquema representativo da formação de uma emulsão.

Figura 5 – Representação esquemática da formação de uma emulsão.



Fonte: Autoria própria.

3.2.3 Mecanismos de liberação

Existem vários fatores que estão relacionados com a velocidade de liberação do ingrediente ativo, entre eles estão: a volatilidade do núcleo, a proporção entre o agente encapsulante e o núcleo, a viscosidade e a natureza do agente encapsulante. Quando o agente encapsulante é hidrossolúvel, ocorre uma liberação do ingrediente ativo de forma mais rápida do que quando o agente encapsulante é hidrofóbico (BRASILEIRO, 2011).

A liberação do ingrediente ativo pode ocorrer por diferentes mecanismos de liberação. Por meio de biodegradação, difusão ou por ação mecânica, ocasionada pelo rompimento da parede através de pressão ou variações de temperatura, pH ou solubilidade do meio em que as partículas se encontram (LANDIM, 2008; SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000). Na prática, a liberação dos compostos bioativos ocorre com a combinação de dois ou mais desses mecanismos atuando simultaneamente (COIMBRA, 2010).

A liberação ativada por biodegradação, ocorre por meio da ação de enzimas proteases e lipases quando se utiliza proteínas e lipídios como revestimento (BRASILEIRO, 2011).

A difusão é dirigida através de um gradiente de concentração e de forças atrativas intermoleculares, controlada pela solubilidade da substância encapsulada na matriz e pela sua permeabilidade através desta (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000). A diferença de concentração do ingrediente ativo encapsulado no exterior e interior da membrana semipermeável (permeável ao solvente, mas não ao soluto), leva a formação de um fluxo de fluido do exterior para o interior da capsula, forçando a solução saturada contida no interior a sair pelos orifícios da membrana (pressão osmótica) (COIMBRA, 2010). A difusão também é influenciada pelo intumescimento da cápsula, causado pela adsorção de água ou outro solvente provocando aumento dos poros e espaços livres (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000).

A liberação controlada por valores de pH, ocorre através de alterações da solubilidade do revestimento quando este é mantido em meios com diferentes valores de pH (BRASILEIRO, 2011).

O mecanismo de liberação ativado por meio da temperatura é baseado em duas concepções por meio da mudança do estado físico do

encapsulante: a liberação sensível à temperatura, onde o material se colapsa ou expande quando uma temperatura crítica é atingida e a liberação ativada por fusão, onde o material encapsulante se funde por aumento da temperatura (BRASILEIRO, 2011).

Ocorre também a liberação do ingrediente ativo quando se aplica uma pressão a cápsula, causando ruptura desta. Como por exemplo, durante a mastigação, permitindo a liberação de compostos de sabor em gomas de mascar (SPADA, 2011).

Existem quatro modelos teóricos de curva de liberação: o primeiro considera a existência de um mecanismo de disparo, que inicia a liberação. O calor, luz, pH e degradações químicas da cápsula podem ser responsáveis por esse disparo. O segundo mecanismo assume que a parede da cápsula atua como um reservatório, supondo-se que a taxa de liberação seja constante. O terceiro modelo pressupõe a migração através da parede, mas considera também um efeito adicional de liberação ocasionado por pequenos rompimentos na estrutura da cápsula. O quarto considera a parede como uma membrana semipermeável e seletiva a diferentes massas moleculares (LANDIM, 2008; SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; SUAVE *et al*, 2006).

3.2.4 Aplicações à tecnologia de alimentos

O nanoencapsulamento é aplicado em várias áreas da indústria, como a farmacêutica, agrícola, cosmética, médica e gráfica (REIS, 2007). Na indústria de alimentos pode ser utilizada para preservar e promover a liberação controlada de componentes bioativos, tais como vitaminas, ácidos graxos polinsaturados, carotenoides, coenzimas e polifenóis. Porém essa tecnologia ainda é pouco aplicada com essa finalidade (GOMES, 2011).

Alishahi *et al.* (2011) estudaram o nanoencapsulamento de ácido ascórbico em tripolifosfato de sódio e quitosana com diferentes massas moleculares. Os autores obtiveram nanopartículas com melhor tamanho, morfologia e taxa de liberação, produzidas a partir de quitosanas com baixa massa molecular. Além disso, também puderam concluir que o ácido ascórbico nanoencapsulado conserva suas propriedades por mais tempo do que quando na forma pura.

O ácido ascórbico, ou vitamina C, é um nutriente essencial nos processos fisiológicos de humanos e animais. Porém, o homem e muitos animais não são capazes de produzir essa vitamina, devido não terem a capacidade de sintetizar a enzima l-gulonolactone oxidase, tornando-os dependentes de fontes exógenas. Além disso, a estabilidade da vitamina C as condições ambientais, como altas temperaturas, oxigênio e luz, é baixa e muitas de suas propriedades são perdidas durante o armazenamento de alimentos (ALISHAHI *et al.*, 2011).

Selvarajan e Mohanasrinivasan (2013) nanoencapsularam a bactéria probiótica *Lactobacillus plantarum* VITES07 utilizando óxido de zinco obtendo nanopartículas de 1-19 nm de diâmetro. Segundo Todorov, Le Blanc e Franco (2011) a maior parte dos alimentos que contém bactérias probióticas tem um período curto de comercialização e muitas vezes não contém a quantidade ideal de células viáveis para que se considere um alimento funcional. O nanoencapsulamento desses microrganismos é uma forma eficaz para protegê-los das condições ácidas do TGI e também prolongar o período de validade desses produtos.

Bactérias probióticas são microrganismos que quando ingeridos em quantidades suficientes conferem propriedades benéficas ao organismo hospedeiro (ANNAN; BORZA; HANSEN, 2008). Dentre estas propriedades estão o impedimento de desenvolvimento de patógenos, o controle do colesterol e a melhoria da digestão da lactose. Para que a atuação dessas bactérias seja eficaz é necessário que estas consigam sobreviver no ambiente ácido e as secreções biliares no trato-gastrointestinal (TGI), e cheguem neste em quantidades adequadas para que possam exercer o efeito benéfico (TODOROV; LE BLANC e FRANCO, 2011).

Estaca *et al.* (2012) prepararam nanopartículas de curcumina a partir de polímeros de zeína, proteína do milho, por atomização eletrodinâmica obtendo eficiências de encapsulação em torno de 85-90%. Não houve mudanças significativas no tamanho e morfologia das nanopartículas, nem no conteúdo de curcumina após três meses de armazenamento no escuro a 23°C e uma umidade relativa de 43%. A curcumina é um corante natural extraído da cúrcuma com uma cor atraente amarelo alaranjado luminoso, com propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticancerígena e cicatrizante.

Seu uso em alimentos é limitado devido sua baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade, sua rápida degradação em condições de pH alcalino e neutro ou quando exposta a luz (ESTACA *et al.*, 2012).

Incoronato *et al.* (2011) avaliaram a eficácia de um sistema de embalagens antimicrobianas contendo nanopartículas de prata e argila montmorinólita em ágar para o armazenamento de queijo *Fior di Latte*. Os resultados mostraram que o sistema de embalagem ativa aumentou o prazo de validade do queijo sem afetar a microbiota funcional láctica e as características sensoriais do produto, devido à propriedade dos cátions de prata controlar a proliferação microbiana.

O queijo *Fior di Latte* é um queijo leve, macio, com alto teor de umidade e muito perecível. Embora receba tratamento térmico durante a produção pode haver a ocorrência de contaminação pós-processamento por microrganismos, tais como *Pseudomonas*, coliformes, leveduras e bolores. Estas contaminações trazem riscos para a saúde do consumidor e alterações de sabor, textura e aparência, resultando em perdas econômicas (INCORONATO *et al.*, 2011).

Bakhshi *et al.* (2012) estudaram o nanoencapsulamento de ácido-fólico através de alginato de sódio utilizando a tecnologia eletrohidrodinâmica gerando partículas não-esféricas com uma porcentagem de rendimento de 70% e uma capacidade de encapsulamento de 96%.

As vitaminas, presentes nos alimentos, essenciais para o funcionamento normal do metabolismo, são compostos orgânicos muito sensíveis em relação à temperatura, oxigênio e luz. A encapsulação de vitaminas através de polímeros inertes pode melhorar suas estabilidades.

Hosseini *et al.* (2013) nanoencapsularam óleo essencial de orégano em quitosana e tripolifosfato de sódio obtendo eficiência de encapsulamento variando de 21-47 % e teor de óleo encapsulado variando de 3-8 %, dependendo da formulação.

Os óleos essenciais têm propriedades antioxidantes e antimicrobianas importantes no combate a doenças inflamatórias e degenerativas, assim como atuam como conservantes naturais em alimentos (COSTA *et al.*, 2012). No entanto são compostos voláteis que evaporam e se decompõem durante o processamento de alimentos, formulação de

medicamentos e preparação de filmes antimicrobianos, devido o contato com calor, luz e oxigênio (HOSSEINI *et al.*, 2013).

Arunkumar, Prashanth e Baskaran (2013) produziram nanocápsulas solúveis em água, de luteína, utilizando quitosana de baixo peso molecular. Os resultados das análises *in vivo*, mostraram que os níveis de luteína no plasma (54,5%), fígado (53,9%) e olhos (62,8%) de ratos alimentados com as nanocápsulas foram superiores que o controle.

A luteína é um carotenoide encontrado em frutas e vegetais. Sendo um pigmento antioxidante, pode proteger a pele de danos causados por luz UV, reduzir os riscos de doenças cardíacas e o câncer de pulmão. Devido a seus efeitos benéficos, é de grande interesse nas indústrias de alimentos e farmacêutica. No entanto, luteína é sensível à luz, calor e tem uma baixa solubilidade em água, o que afeta sua estabilidade e biodisponibilidade (ARUNKUMAR, PRASHANTH e BASKARAN, 2013).

Cheng *et al.* (2009) desenvolveram um método rápido, sensível e específico para detecção e captura de *Escherichia coli*, utilizando nanopartículas magnéticas biofuncionais em combinação do método de ATP-bioluminescência. As nanopartículas foram produzidas imobilizando um anticorpo específico anti-*E. coli* na superfície recoberta por amina de nanopartículas magnéticas. As bactérias alvo tornaram-se magnéticas, de modo que podem ser facilmente isoladas da solução da amostra por emprego de um campo magnético externo. A concentração de *E. coli* capturada pelas nanopartículas foi então detectada por ATP-bioluminescência. O método foi utilizado para detectar *E. coli* de leite pasteurizado.

Escherichia coli, são bactérias encontradas em grande quantidade no intestino humano e de outros animais de sangue quente, podem ser espalhadas no meio ambiente, sendo a principal causa de infecções e surtos com consequências graves, tais como diarreia, colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica, em particular pelo serotipo O157:H7. Os métodos atualmente utilizados para detecção de *E. coli* são demorados e com pouca sensibilidade. Com o desenvolvimento da nanotecnologia, nanopartículas magnéticas tem recebido considerável atenção na biotecnologia e na detecção e captura de patógenos (CHENG *et al.*, 2009).

3.2.5 Material formador de parede

Segundo Santos *et al.* (2000) as características para que um revestimento seja considerado ideal são:

- a) Deve ter baixa viscosidade em concentrações elevadas e ser de fácil manipulação;
- b) Ter baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração.
- c) Deve ter habilidade para dispersar ou emulsificar e estabilizar o ingrediente ativo;
- d) Não ser reativo com o material a ser encapsulado;
- e) Deve ter habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula;
- f) Liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação;
- g) Proporcionar proteção ao material ativo contra condições adversas (luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos);
- h) Ter solubilidade em solventes comumente utilizados;
- i) Possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo;
- j) Não apresentar sabor desagradável no caso de consumo;
- k) Deve ser econômico.

Como não existe um material de cobertura ideal, ou seja, que apresente todas as características listadas acima, pode ser feito o uso de combinações entre os materiais encapsulantes e/ou modificadores, como sequestrantes de oxigênio, antioxidantes, agentes quelantes e surfactantes (SPADA, 2011).

Os materiais mais utilizados como encapsulantes são: quitosana, goma arábica, ágar, alginato e carragena; outros carboidratos como amidos, amidos modificados, dextrinas e sacarose; as celuloses carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose; os lipídios parafina, mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras; os materiais inorgânicos sulfato de cálcio e silicatos; as proteínas do glúten, caseína, gelatina e albumina (SPADA, 2011).

3.2.5.1 Goma do Cajueiro

O cajueiro, de nome científico *Anacardium occidentale*, L., pertencente à família *Anacardiácea*, é extensivamente cultivada em países como Brasil, Índia, Moçambique, Quênia e Tanzânia (LIMA *et al.*, 2001; Paula *et al.*, 1998) (FIGURA 6).

A cajucultura é de fundamental importância para a economia dos Estados da Região Nordeste do Brasil, com destaque para os Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. O Ceará participa com mais de 50% do beneficiamento da castanha de caju brasileira e em 2011 exportou 23.534 toneladas de amêndoas, o que equivale a mais de 96% das exportações de amêndoas nacional (CASTANHA, 2012).

Figura 6 – Árvore do cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.).



Fonte: Autoria própria.

Na segunda metade da década de 60, houve uma expansão da cultura do cajueiro nesses três estados devido às condições climáticas, ao baixo preço das terras, à maior concentração de indústrias beneficiadoras desse produto e ao grande incentivo proporcionado pelo Governo Federal, por meio da Sudene (PAULO PESSOA *et al.*, 1995 *apud* OLIVEIRA, 2008).

A cultura do cajueiro gera divisas não só pela comercialização da castanha, mas também pelo líquido da casca da castanha (LCC), pelo

pedúnculo e pela goma do cajueiro, os quais poderiam ser mais explorados (LIMA *et al.*, 2001).

A goma do cajueiro, o exsudado polissacarídico de *Anacardium occidentale*, L., é composta de galactose, glicose, arabinose, ramnose e ácido galacturônico (Paula *et al.*, 1998). Segundo Moura (2009) essa composição varia em função da origem da planta, do tipo de solo, do clima, da época do ano, dentre outros fatores (TABELA 1). A goma do cajueiro ao interagir com a água passa a ter funções de estabilizante, emulsionante e adesiva, podendo ser um adequado substituto da goma arábica que é de alto custo (MOTHÉ; RAO, 2000).

Tabela 1 - Composição da goma do cajueiro de diferentes origens.

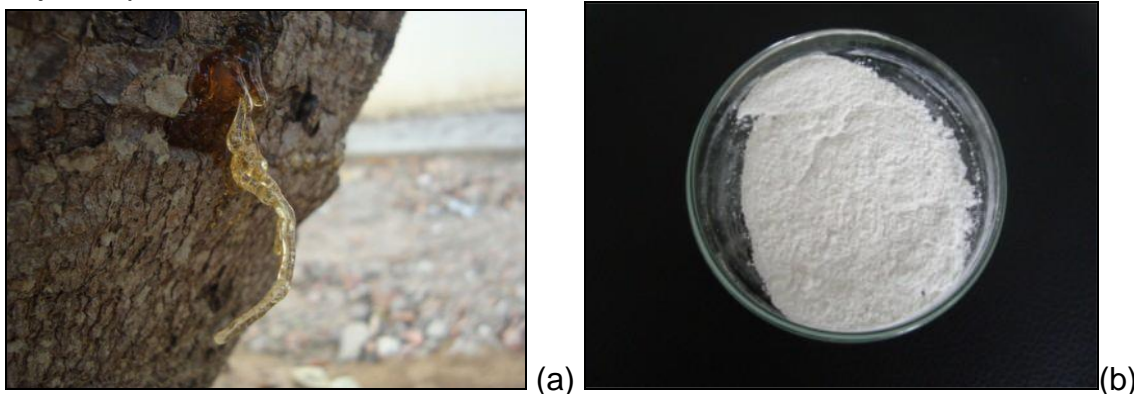
Monossacarídeo	Composição (%)				
	Brasil ^a	Brasil ^b	Índia ^c	Papua ^c	Venezuela ^d
Galactose	72	73	61	63	49
Glicose	14	11	8	9	--
Arabinose	4-6	5	14	15	31
Ramnose	3-2	4	7	7	7
Manose		1	2	1	4
Xilose			2	--	1
Ácido	4-5		4-3	4-5	
Glucurônico					
4 – O – ácido metilglucurônico			1-9	1-2	

Fonte: adaptado de ^c Anderson e Hendrie (1970); ^b Paula e Rodrigues (1995); ^d Pinto *et al* (1995) *apud* ^a Paula, Heatley e Budd (1998).

Na indústria de alimentos a goma do cajueiro pode ser utilizada como estabilizante para sucos, sorvetes e cervejas além de espessante e clarificante de sucos. Na indústria química como aglutinante de cápsulas e comprimidos. Também é utilizada na indústria de cosméticos e na encadernação de livros devida a ação fungicida e inseticida, além de ser uma poderosa cola quando misturada a água (BARBOSA FILHO, 2007 *apud* LANDIM, 2008).

Anderson e Bell (1975) caracterizaram a goma do cajueiro estruturalmente indicando ser constituída de uma cadeia principal de galactose intercalada com ligações β - (1 \rightarrow 3) e ramificada com ligações β - (1 \rightarrow 6). Arabinose está presente como grupos terminais ou em cadeias curtas ligadas

Figura 8 – (a) Exsudado obtido de *Anacardium occidentale* L. (b) Goma de cajueiro purificada.



Fonte: Autoria própria.

A retirada dessas impurezas é inicialmente feita por um tratamento físico-químico denominado isolamento (COSTA; RODRIGUES; PAULA, 1996), a fim de se obter um material puro, homogêneo e com um maior rendimento possível (RODRIGUES, PAULA e COSTA, 1993) (FIGURA 8 - b).

3.3 Óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*

No Brasil as principais espécies de *Eucalyptus* utilizadas para a produção de óleos essenciais são *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* (CHAGAS *et al.*, 2002).

E. staigeriana (FIGURA 9) pertence ao gênero *Eucalyptus*, com aproximadamente 600 espécies, família Myrtaceae. É uma árvore nativa da Austrália, de porte médio, podendo chegar a 22 metros de altura, com copa reduzida e espalhada. Está adaptada a zonas climáticas quentes e subúmidas, solos pobres e bem drenados, matas ou florestas abertas. Seu plantio é feito basicamente para a produção de óleos essenciais para a perfumaria e a madeira é vendida como lenha. (VITTI; BRITO, 2003).

Figura 9 – *Eucalyptus staigeriana*.



Fonte: MACIEL, 2009.

Os óleos essenciais são produtos obtidos de determinadas partes da planta, tais como folhas, caule, casca ou frutas, originários de seu metabolismo secundário. São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Possuem sabor geralmente acre (ácido) e picante, são geralmente incolores ou levemente amarelados e são solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter. Normalmente são instáveis, principalmente na presença da luz, ar, calor, umidade e metais. A maioria possui índice de refração e são opticamente ativos (VITTI; BRITO, 2003).

Os óleos essenciais são formados por uma complexa mistura de componentes, envolvendo de 50 a 100 ou até mais compostos orgânicos. Existem referências da presença de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas etc. Os constituintes que apresentam maior concentração são conhecidos como componentes principais, já os que estão em baixas concentrações são denominados componentes traços (VITTI; BRITO, 2003).

A maioria dos óleos essenciais tem algum grau de atividade antimicrobiana, atribuído à presença de compostos fenólicos e terpenóides. Estas propriedades são particularmente associadas ao seu caráter lipofílico,

levando a acumulação nas membranas e subseqüentes eventos associados, tais como o esgotamento de energia. Os componentes fenólicos dos óleos essenciais sensibilizam a bicamada fosfolipídica das membranas celulares, causando um aumento da permeabilidade e vazamento de componentes vitais intracelulares ou deficiência dos sistemas de enzimas microbianas (GILLES *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais de *Eucalyptus* são produzidos por pequenas cavidades globulares, presentes nas folhas, chamadas glândulas, que se encontram distribuídas em todo o parênquima foliar (VITTI; BRITO, 2003). Os constituintes do óleo essencial de *E. staigeriana* obtidos por cromatografia gasosa estão apresentados na Tabela 2, onde a maioria dos constituintes são (+) limoneno (28,82%), Z-citral (10,77%) e E-citral (14,16%). (MACIEL *et al.*, 2010).

Tabela 2 - Composição percentual relativa do óleo essencial das folhas de *E. staigeriana*.

Constituintes	<i>E. staigeriana</i>
α – Pineno	3,27
o - Cimenol	1,76
(+) Limoneno	28,82
1,8- Cineol	5,39
α - Terpinoleno	9,40
(-) Isopulegol	--
β - citronelal	0,80
Isopulegol	--
B- citronelol	--
Z-citral	10,77
Trans-geraniol	4,20
E-Citral	14,16
Metil geranate	3,66
Acetato de geraniol	3,86
Total	86,09

Fonte: adaptado de MACIEL *et al.* (2010).

(--) resultados não detectados.

Diversas propriedades já foram atribuídas ao gênero *Eucalyptus*, como as atividades inseticida (MACIEL *et al.*, 2010), antimicrobiana (NASCIMENTO *et al.*, 2010), anti-hiperglicêmica, antioxidante, anti-helmíntica (MACEDO, 2008) e acaricida (CHAGAS *et al.*, 2002).

Os extratos obtidos de folhas de *Eucalyptus* foram aprovados como aditivos alimentares e são também utilizados em formulações cosméticas, mas os estudos têm sido focados nas propriedades funcionais desses extratos (GILLES *et al.*, 2010).

Algumas pesquisas tem sido feitas para demonstrar as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de *Eucalyptus* contra uma vasta gama de microrganismos. No entanto, estes estudos estão concentrados em poucas espécies, principalmente *E. citriodora* que possui atividade antifúngica. Apenas alguns estudos têm sido feitos para avaliar a atividade contra bactérias deteriorantes e patogênicas, assim como em leveduras.

Gilles *et al.* (2010) testaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. staigeriana* através do método de disco-difusão em ágar. Os resultados mostraram uma alta atividade contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* apresentando uma zona de inibição maior do que 90 mm (o crescimento do microrganismo foi inibido por toda a placa de petri), quatro vezes maior do que a zona de inibição do antibiótico cloranfenicol testado. A atividade contra a levedura *Candida albicans* ($26,7 \pm 0,7$ mm) mostrou ser duas vezes maior do que o efeito do antifúngico nistatina. Outros resultados mostraram atividade contra a bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis* com uma zona de inibição de $20,3 \pm 1,2$ mm, contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ($15,8 \pm 1,1$ mm) e *Pseudomonas aeruginosa* ($7,7 \pm 0,4$ mm). *Pseudomonas aeruginosa* é conhecida por ter um elevado nível de resistência intrínseca contra muitos agentes antimicrobianos e antibióticos devido à barreira muito restrita da membrana exterior, sendo altamente resistente a drogas sintéticas.

Em outro estudo Wilkinson e Cavanagh (2005) testaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais de diferentes plantas nativas da Austrália. O óleo essencial de *E. staigeriana* apresentou uma alta atividade contra *Escherichia coli* com uma zona de inibição de $18,2 \pm 2,8$ mm e contra *Salmonella typhimurium* com uma zona de inibição de 90 mm. Além de também

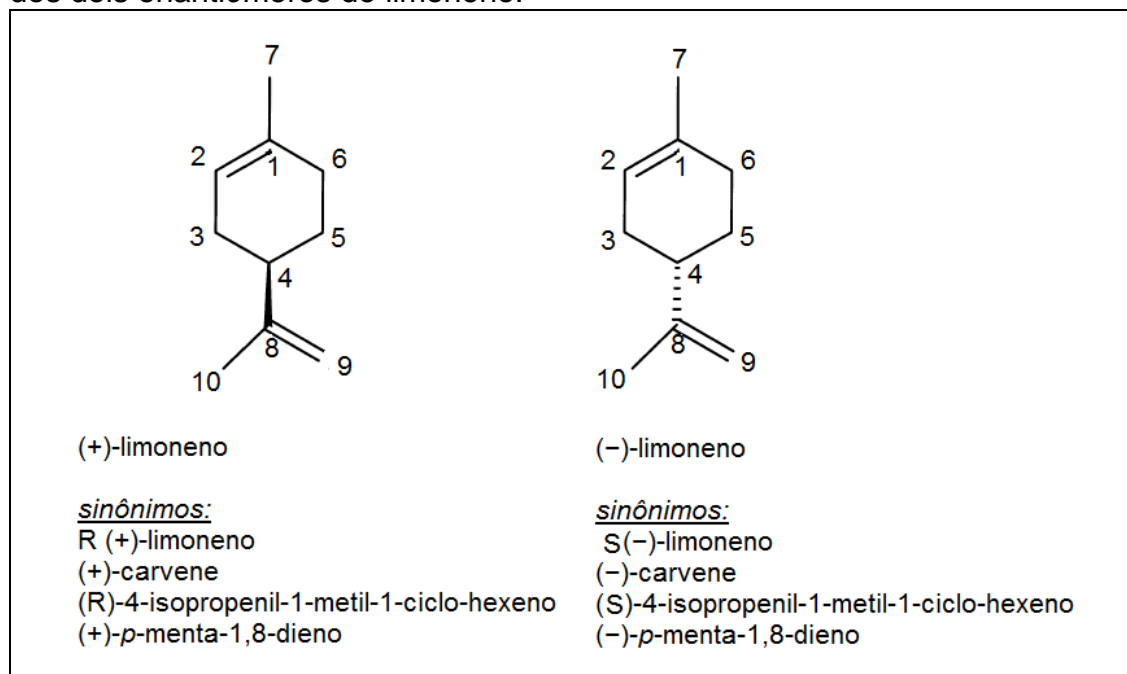
apresentar atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Alcaligenes faecalis* com zonas de inibição de $14,2 \pm 0,6$ mm e $15,2 \pm 0,3$ mm, respectivamente.

3.4 Limoneno

O limoneno é um hidrocarboneto pertencente à classe dos monoterpenos monocíclicos. Por possuir um centro quiral, apresenta isomeria ótica, existindo de duas formas na natureza: (+)-limoneno e (-)-limoneno (DUETZ *et al.*, 2003). (FIGURA 10).

O (-)-limoneno é encontrado em grande quantidade em algumas árvores e ervas como *Mentha* spp.. O (+)-limoneno é o principal constituinte dos óleos essenciais das cascas de citrinos, atuando na prevenção da desidratação e inibição do crescimento microbiano nesses vegetais (DUETZ *et al.*, 2003), constituindo cerca de 90 – 96% destes óleos, sendo um sub-produto na indústria de sucos de frutas (BADEE; HELMY; MORSY, 2011).

Figura 10 - Estrutura química, número de átomos de carbono e nomenclatura dos dois enantiômeros do limoneno.



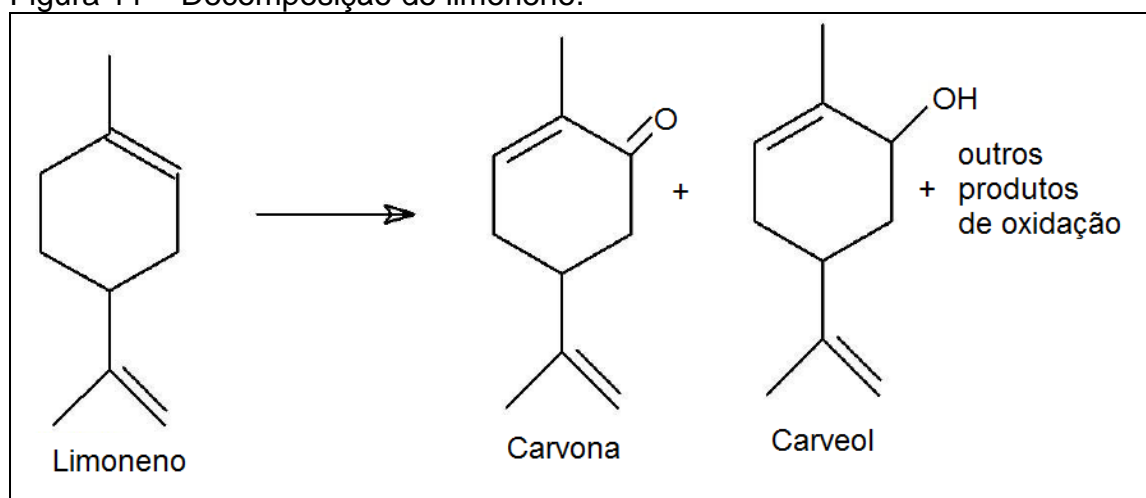
Fonte: DUETZ *et al.* (2003).

O limoneno devido apresentar odor e flavor característico do limão é utilizado em uma variedade de produtos de limpeza, cosméticos, na indústria de alimentos além de atuar como pesticida e repelente (FERRARINI *et al.*, 2008;

HEBEISH *et al*, 2008). A literatura mostra sua utilização também como um agente bactericida, antioxidante, terapêutico e quimio-preventivo (LI; CHIANG, 2011). Crowell, Siar Ayoubi e Burke (1996 *apud* VALLILO *et al*, 2006) enfatizaram resultados positivos no combate a tumores malignos, utilizando-se do (+)-limoneno na terapia de câncer de mama, pâncreas e próstata.

O (+)-limoneno é extraído sob pressão ou vapor de água das cascas de citrinos como a laranja, limão, tangerina, toranja e está presente em inúmeros outros óleos essenciais (FERRARINI *et al*, 2008). Lanças *et al*. (1997) utilizaram a extração por fluido supercrítico do óleo essencial da laranja, afim de reduzir sabores indesejáveis causados pela oxidação de compostos pelo ar, obtendo um produto com melhor qualidade em relação ao método clássico por arraste a vapor. Segundo Filho (1999 *apud* MÜLLER, 2011) a decomposição do (+)-limoneno gera a formação de Carvona e Carveol, subprodutos terpênicos, que modificam o aroma do óleo (FIGURA 11).

Figura 11 – Decomposição do limoneno.



Fonte: MÜLLER (2011).

Devido à volatilidade e a fácil oxidação em contato com a luz, ar, umidade e temperaturas elevadas é necessário novas tecnologias na indústria de aromas a fim de proteger compostos voláteis da degradação. A microencapsulação e outras técnicas, que já vem sendo utilizada na indústria farmacêutica e química, tem vasta aplicação na indústria de alimentos, exigindo-se novas pesquisas devido a constante inovação de produtos no mercado (ABURTO; TAVARES; MARTUCCI, 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O polissacarídeo, goma de cajueiro (GC) utilizado neste trabalho foi obtido através da purificação do exsudado de árvores de *Anacardium occidentale* (cajueiro), oriundas de Fortaleza (CE). O isolamento da goma foi realizado segundo método previamente descrito por Rodrigues, Paula e Costa (1993) com algumas modificações.

O Etanol (99%) e o surfactante *Tween* 80 (T80) foram provenientes da VETEC e o óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* (OES) da AVONDALE ESSENCIAS.

4.2 Métodos

4.2.1 Purificação da goma de cajueiro

O procedimento para a purificação da goma do cajueiro consiste na seguinte metodologia:

- a) pesou-se 10 gramas do exsudado do cajueiro já triturado em almotariz;
- b) dissolveu-se em 100 mL de água destilada e foi deixado sob agitação por 24h;
- c) a solução obtida foi filtrada à vácuo inicialmente em um funil de placa sinterizada nº 0 e em seguida em um funil de placa sinterizada nº 1;
- d) adicionou-se 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para clarificação e 0,5 g de cloreto de sódio (NaCl);
- e) o pH foi ajustado com hidróxido de sódio (NaOH) (25 %) entre 6 e 7;
- f) gotejou-se essa solução em etanol através de funil de separação na proporção de 1:4 v/v e em seguida deixado sob refrigeração por aproximadamente 20 h para eficiente precipitação;

- g) o etanol sobrenadante foi retirado e o precipitado transferido para funil de placa sinterizada nº 2 e lavado com duas porções de 100 mL de etanol e acetona para retirada de pigmentos ou traços de gordura;
- h) a goma foi seca através de jato de ar quente e armazenada à temperatura ambiente em frasco tampado.

4.2.2 Análise CG - EM

A composição do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* foi determinada através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), utilizando um equipamento SHIMADZU modelo QP2010 SE, equipado com uma coluna capilar Rtx-SMS (30 m, ID 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm) e auto injetor AOC-20i. Foi usado hélio como gás de arraste (1 mL/min.). A temperatura inicial da coluna foi mantida à 60 °C e em seguida aumentou-se até 280 °C a uma taxa de 3 °C/min. O detector seletivo de massa foi utilizado no modo de ionização de elétrons, com o intervalo de massa entre 35 e 500.

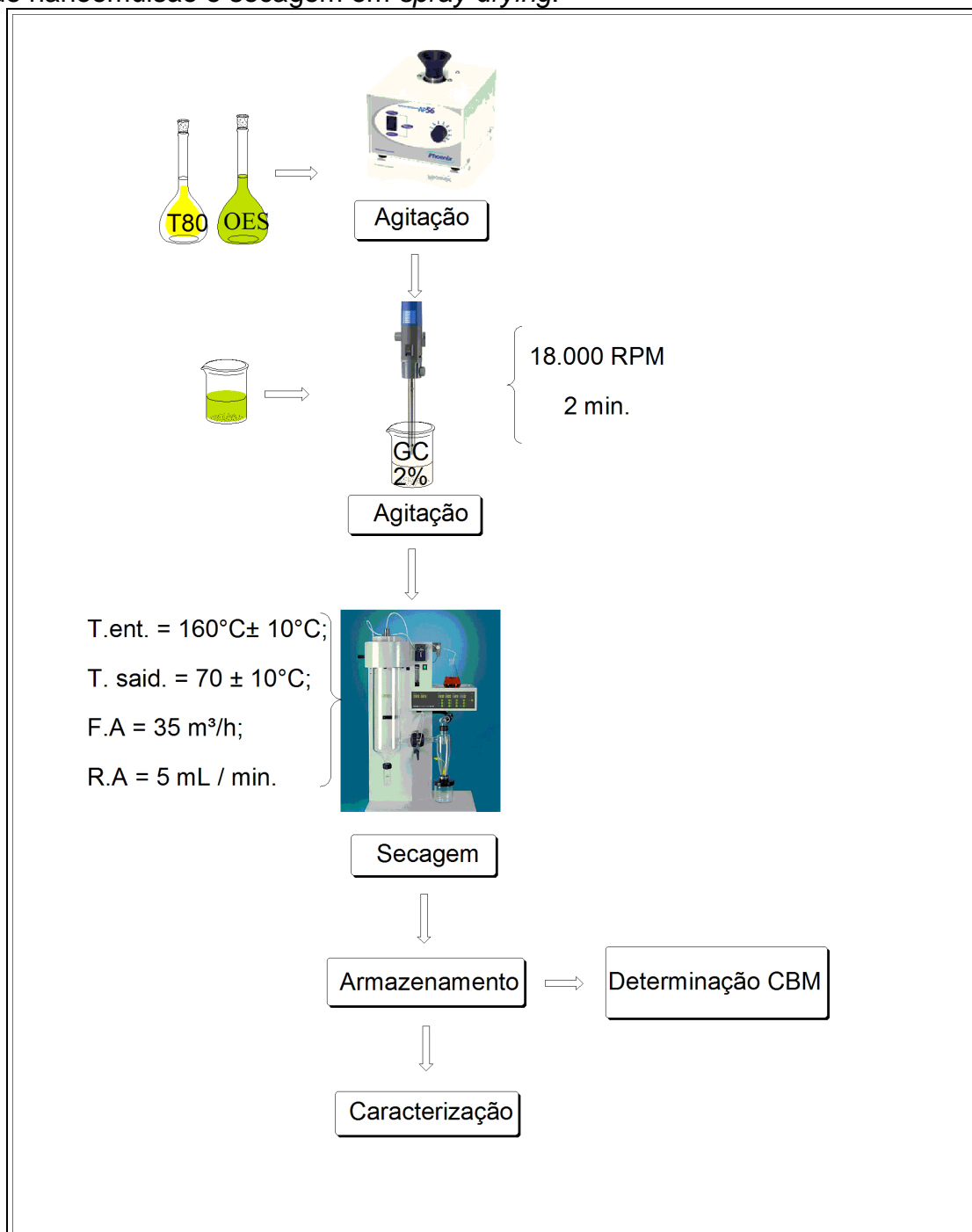
4.2.3 Preparação das nanopartículas

Foram preparadas três formulações de nanopartículas através do método de secagem por *spray dryer*. Este método foi escolhido para utilização neste trabalho devido à disponibilidade de equipamento, o baixo custo do processo e sua grande utilização na indústria de alimentos. A Figura 12 mostra o fluxograma do processo.

Inicialmente, o surfactante *Tween* 80 e o óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* foram misturados com agitação contínua por meio de um agitador de soluções (PHOENIX, modelo AP 56). Em seguida a mistura formada foi gotejada em uma solução de goma de cajueiro a 2 % (m/v), em agitação constante em um ultra homogeneizador Turratec (TECNAL, modelo TE-101) a 18.000 RPM por 2 minutos. A emulsão obtida foi secada em um Mini *Spray Dryer* B-290 (BÜCHI). A secagem foi realizada a uma temperatura de entrada de 160°C ± 10°C, a uma temperatura de saída de 70°C ± 10°C, com um vazão de

ar de 35 m³/h e a uma razão de aspiração de 5 mL/min. O produto nanoencapsulado foi armazenado em vidro âmbar à temperatura ambiente (Paula *et al.* 2010).

Figura 12 – Fluxograma do processo de produção das nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro através da formação de nanoemulsão e secagem em *spray drying*.



FONTE: Autoria própria.

Onde: OES – óleo *E.staigeriana*; T 80 - Tween 80; CBM - concentração bactericida mínima; T. ent. – temperatura de entrada; T. said. – temperatura de saída; F.A- fluxo de ar; R.A- razão de alimentação.

As formulações estabelecidas estão apresentadas na Tabela 3. F.1 que foi definida como padrão, F. 2 estuda o efeito do aumento da proporção da goma de cajueiro e F.3 o efeito da diminuição do óleo essencial e consequente aumento na proporção do *Tween* 80 (TABELA 3).

Tabela 3 – Formulações das nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro.

Designação	Concentração da solução de GC (%)	GC/ OES (m/m)	OES/ T. 80 (m/m)
F.1	2	2:1	2:1
F. 2	2	4:1	2:1
F.3	2	2:1	1:1

F 1: formulação 1; F 2: formulação 2; F 3: formulação 3; GC: Goma de cajueiro; OES: óleo essencial de *Eucalyptus Staigeriana*; T.80 : *Tween* 80.

4.2.4 Caracterização das nanopartículas

4.2.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As nanopartículas foram caracterizadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando pastilhas de KBr, em um aparelho da Perkin Elmer, na faixa de 400 à 4000 cm^{-1} .

4.2.4.2 Tamanho e distribuição de partícula e potencial zeta

O tamanho do diâmetro das partículas e o potencial zeta das amostras em solução foram determinados através de um Nano ZetaSizer modelo Malvern 3600, utilizando um feixe de luz vermelha com comprimento de onda de 633 nm, e um ângulo de medida de 175°. As amostras foram redispersas em água destilada, formando soluções de concentração 0,1% (m/v)

e deixadas em agitação por 24 horas. As análises foram realizadas em triplicata. (PAULA *et al.*, 2011).

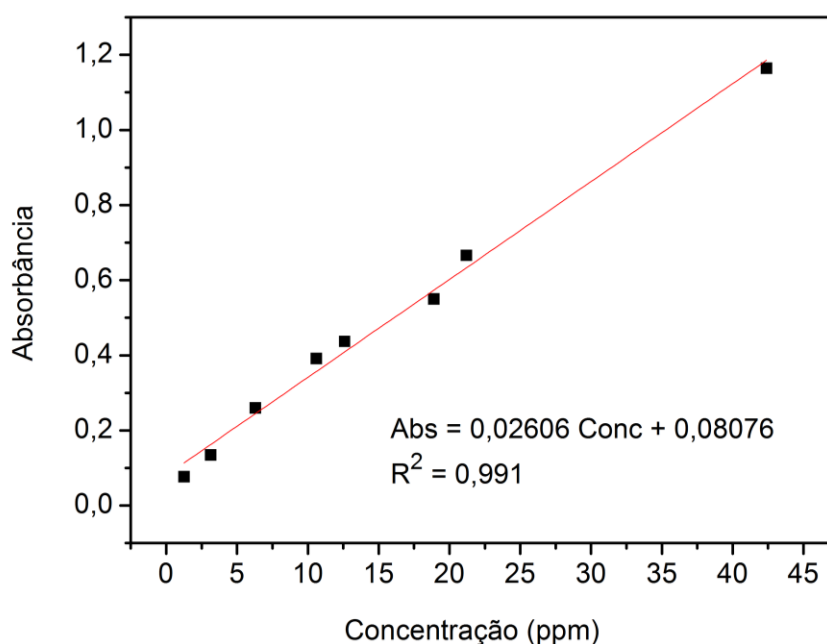
4.2.4.3 Determinação do teor de óleo encapsulado (T.E.) e da eficiência de encapsulamento (E.E.)

O teor de óleo encapsulado, relação percentual entre a massa de óleo efetivamente encapsulada presente na amostra e a massa total da amostra (1), foi determinado por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis no comprimento de onda de 210 nm (Micronal, modelo B582). Determinada massa de cada amostra (10 – 30 mg) foi dissolvida em Etanol (99%), deixada em agitação por duas horas e centrifugada. Em seguida, determinou-se a concentração de óleo no meio através de uma curva de calibração (FIGURA 13). As análises foram realizadas em triplicata (PAULA *et al.* 2011).

$$\text{T.E (\%)} = \frac{\text{Massa OES}}{\text{Massa Total}} \times 100 \quad (1)$$

Onde, OES refere-se ao óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*.

Figura 13 – Curva de calibração do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em etanol.



Fonte: Autoria própria.

A eficiência de encapsulamento (*EE*) foi calculada de acordo com a equação (2).

$$EE (\%) = \frac{M}{M_o} \times 100 \quad (2)$$

Onde *M* é o percentual de óleo efetivamente encapsulado nas nanopartículas (teor de óleo encapsulado) e *Mo* é o percentual relativo de óleo adicionado no processo (relação percentual entre a massa de óleo adicionada inicialmente e a massa total da amostra de nanopartículas).

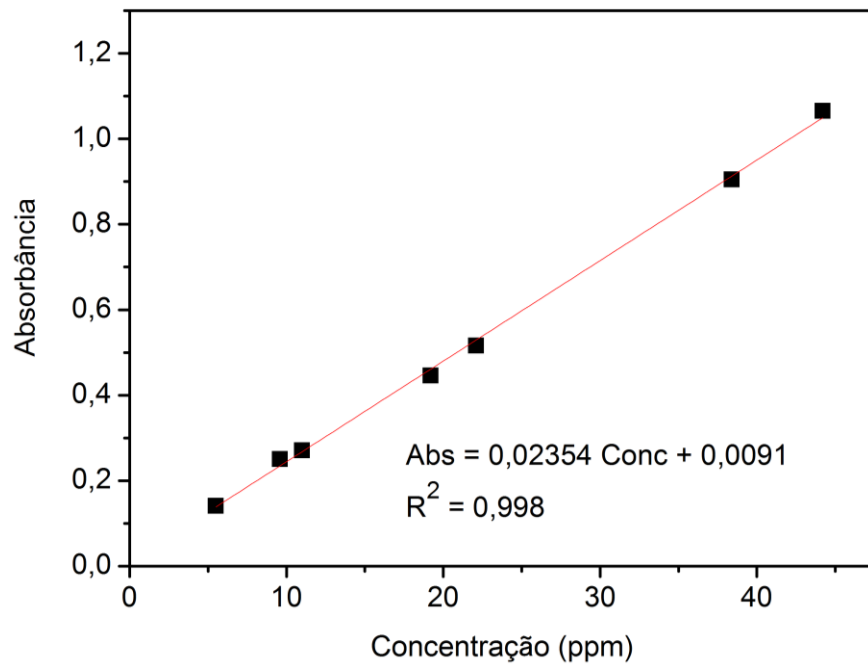
4.2.4.4 Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria de varredura diferencial (DSC).

A estabilidade térmica das partículas foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA) em um equipamento Shimadzu modelo TGA 50 e por calorimetria de varredura diferencial (DSC) em um equipamento Shimadzu modelo DSC 50. Para ambas as análises foram usadas 5 mg da amostra sob atmosfera de nitrogênio e uma razão de aquecimento de 10 °C/min entre 0 e 600 °C.

4.2.4.5 Cinética de liberação in vitro

Uma quantidade de 100 mg da amostra foi dissolvida em 10 mL de água destilada e transferida para uma membrana de diálise com tamanho de poro de 14 kDa (SIGMA) e imersa em 200 mL de água destilada. Alíquotas foram retiradas em determinados intervalos de tempo (inicialmente de 15 em 15 min. e com intervalos maiores na medida em que a liberação tornava-se mais lenta) e analisadas por espectroscopia na região do UV-Vis. Em seguida, foi determinada a concentração de óleo no meio através de uma curva de calibração do óleo em água destilada (FIGURA 14).

Figura 14 – Curva de calibração do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em água destilada.



Fonte: Autoria própria.

Foram calculados os parâmetros cinéticos a fim de caracterizar os vários tipos de liberação. Os modelos utilizados foram o de zero ordem (3), primeira ordem (4), segunda ordem (5), Higuchi (6) e Korsmeyer-Peppas (7) (Dash *et al.*, 2010).

$$C = k_0 t \quad (3)$$

Onde, C é a concentração de óleo liberada, t o tempo, e k_0 a constante de ordem zero.

$$\ln ([C] / [C]_0) = -k t \quad (4)$$

Onde, C_0 é a concentração de óleo inicial e k a constante de primeira ordem.

$$1 / [C] = k t + (1 / [C]_0) \quad (5)$$

Onde, k é a constante de segunda ordem.

$$Q = k t^{1/2} \quad (6)$$

Onde Q é a concentração de óleo liberada e K a constante de Higuchi.

$$M_t / M_\infty = k t^n \quad (7)$$

Onde M_t / M_∞ é a fração de óleo liberada em um tempo t, K é uma constante e n o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação.

Ritger e Peppas (1987) utilizaram o valor n para caracterizar diferentes mecanismos de liberação. De acordo com a teoria cinética do modelo para geometria esférica, n pode assumir diferentes valores.

Para a obtenção do coeficiente de correlação linear, os seguintes gráficos foram plotados: “C vs. t”, para o modelo de ordem zero; “ln C vs. t”, para o modelo de primeira ordem; “1 / C vs. t”, para o modelo de segunda ordem; “C vs. $t^{1/2}$ ”, para o modelo de Higuchi; e “ln M_t / M_∞ vs. ln t”, para o modelo de Korsmeyer-Peppas (SHOAIB *et al.*, 2006).

4.2.4.6 Estudo do teor de óleo encapsulado nas nanopartículas armazenadas a temperatura ambiente

Foi monitorada também o teor de óleo encapsulado nas nanopartículas armazenadas a temperatura ambiente, ou seja, a capacidade das amostras de manter o óleo dentro da matriz polimérica com o decorrer do tempo. As amostras foram armazenadas em prateleiras, a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, e dentro de recipientes de vidro âmbar de capacidade de 30 mL, no qual depois de acondicionada a amostra restava um *head-space* com cerca de 0,5 centímetro.

Os teores de óleo foram determinados no período de aproximadamente 365 dias.

4.2.5 Concentração Bactericida Mínima (CBM)¹ das nanopartículas, da goma de cajueiro e do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*

4.2.5.1 Culturas Bacterianas

Para avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas duas cepas de bactérias patogênicas de grande importância para o controle da segurança de alimentos. Uma linhagem de bactéria Gram-positiva² e uma linhagem de Gram-negativa³. Estas são respectivamente: *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115 - Microbiologics) e *Salmonella* Enteritidis (IAL 1132 – Instituto Adolfo Lutz).

4.2.5.2 Preparo do inóculo

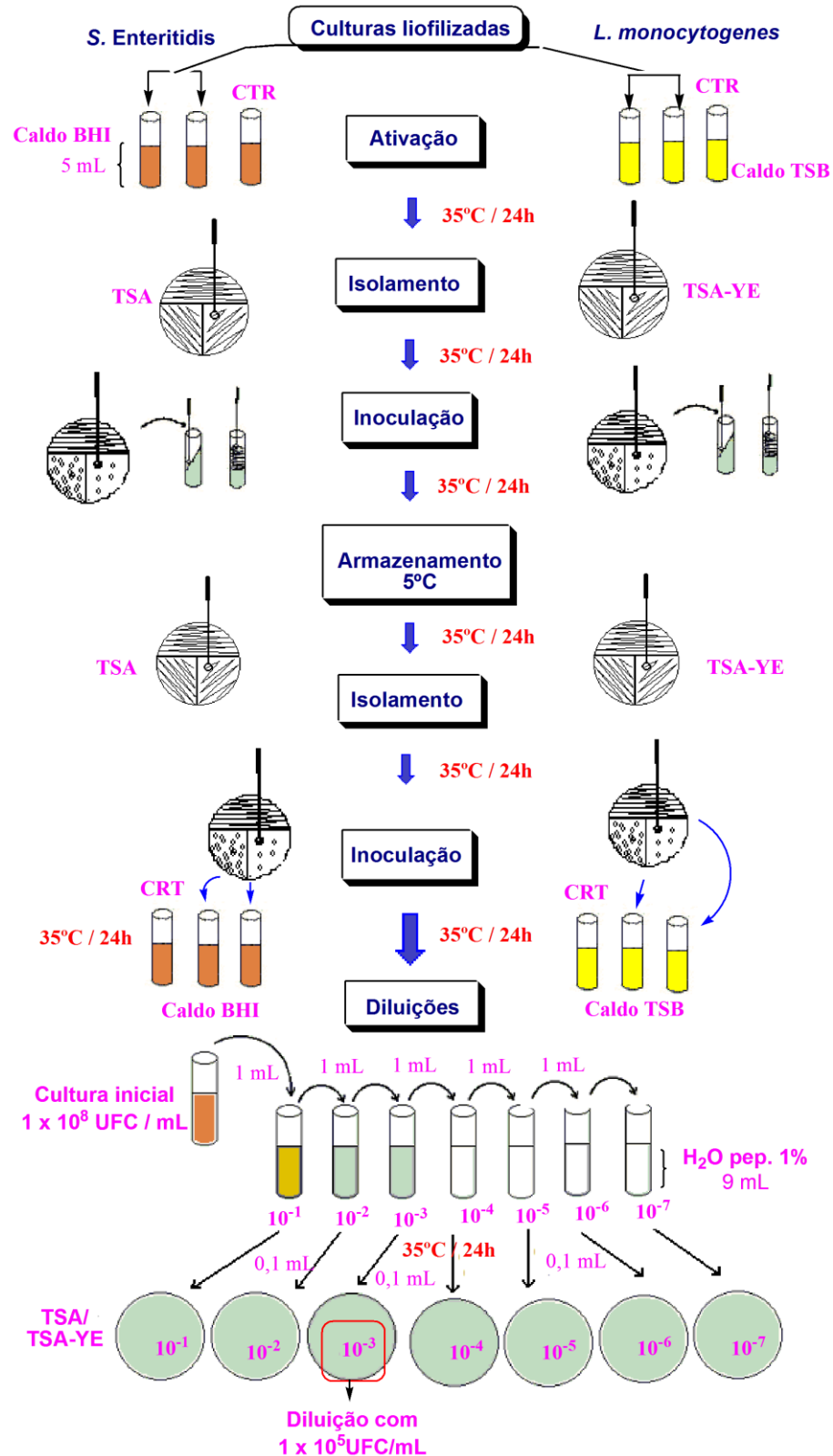
A Figura 15 mostra as etapas do procedimento de preparo do inóculo. As cepas liofilizadas foram reativadas conforme recomendação do fabricante. Inicialmente foram feitas duas culturas subsequentes em caldo tripticase de soja (TSB/Difco), para *L. monocytogenes*, e caldo de infusão de cérebro e coração (BHI/Difco), para *S. Enteritidis* e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h. Em seguida, procedeu-se o isolamento em meio ágar tripticase de soja-extrato de levedura (TSA-YE/Difco) e em meio ágar tripticase de soja (TSA/Difco) para *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, respectivamente. Após isolamento e verificação da pureza da cultura, efetuou-se a inoculação em TSA-YE inclinado e em TSA inclinado e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h.

¹ Concentração Bactericida Mínima (CBM) é a menor concentração do agente antimicrobiano na qual não ocorreu crescimento no meio de cultura (ONAWUNMI, 1989 *apud* BURT, 2004).

² A parede celular de bactérias Gram-positivas é espessa, constituindo quase que totalmente de uma camada rígida de peptideoglicano (MADIGAN *et al.*, 2009).

³ A parede celular de bactérias Gram-negativas é uma estrutura em multicamadas e bastante complexa. A maior parte é formada por uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos e proteínas. A menor parte, cerca de 10 %, é formada de peptideoglicano (MADIGAN *et al.*, 2009).

Figura 15 - Etapas do procedimento de ativação e preparo dos inóculos, liofilizados, das bactérias *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis* para utilização na determinação da Concentração Bactericida Mínima.



Fonte: Autoria própria.

Onde: UFC – unidade formadora de colônia; CTR- controle; TSB - caldo triptona de soja; BHI - caldo de infusão de cérebro e coração; TSA-YE - meio ágar tripticase de soja-extrato de levedura; TSA- meio ágar tripticase de soja; H₂O pep.- água peptonada.

Após incubação as culturas foram estocadas a 5 °C. Em seguida, para o isolamento das colônias de bactérias, foram feitas estrias de cada cepa em placas de Petri contendo os meios TSA-YE e TSA e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h.

Após o período de incubação uma colônia de cada microrganismo, de 1 mm de diâmetro, foi selecionada e inoculada em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo TSB e BHI, de acordo com o microrganismo.

Os tubos foram incubados a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h para obtenção de uma concentração final em torno de 1×10^8 UFC/mL (quantidade padronizada após testes preliminares) para cada microrganismo.

Em seguida, esta suspensão foi diluída em água peptonada 0,1% (Difco) fazendo-se diluições até 10^5 UFC/mL (determinado através de testes preliminares) para a utilização na determinação da Concentração Bactericida Mínima. Para a confirmação das concentrações foram realizadas contagens de colônias viáveis em meios TSA-YE e TSA.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e feitos o controle dos caldos.

4.2.5.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

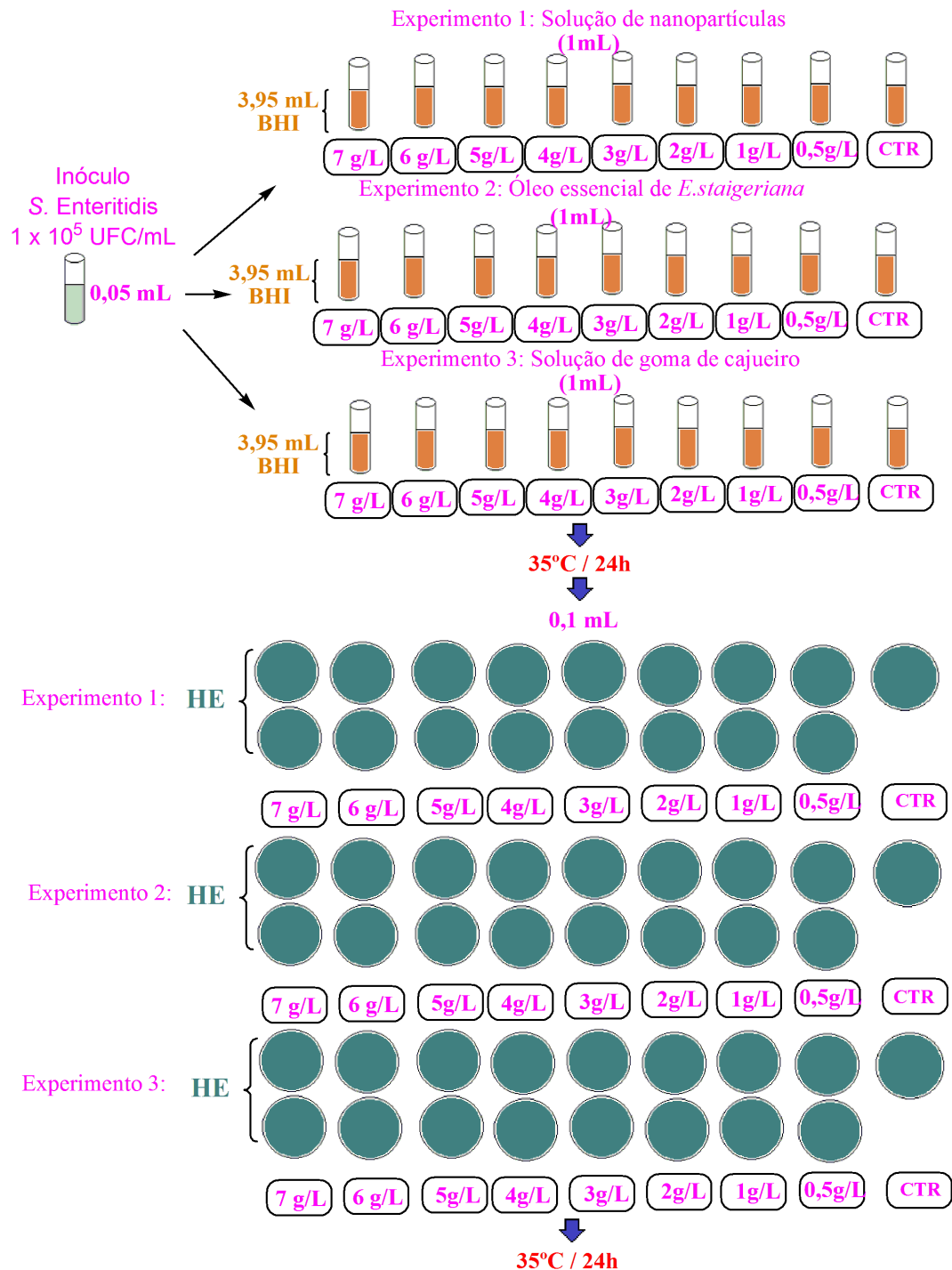
As Figuras 16 e 17 mostram as etapas do procedimento de determinação das CBMs das nanopartículas dopadas com o óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*, do óleo essencial *Eucalyptus staigeriana* e da goma de cajueiro. Foi utilizada uma amostra de nanopartículas de formulação 1, formulação definida como padrão, e dopagem 7,12%, determinado pela análise do teor de óleo encapsulado. Foi determinada também a CBM do óleo essencial não encapsulado e da goma de cajueiro para estes microrganismos.

Foram realizados os seguintes controles: meios de cultura e meios de cultura + inóculo bacteriano.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi impossibilitada devido à ocorrência de turvação do caldo utilizado como meio de cultivo ao se colocar as amostras analisadas.

Os experimentos foram realizados duas vezes em dias distintos e em duplicata segundo Kim, Marshall e Wei (1995).

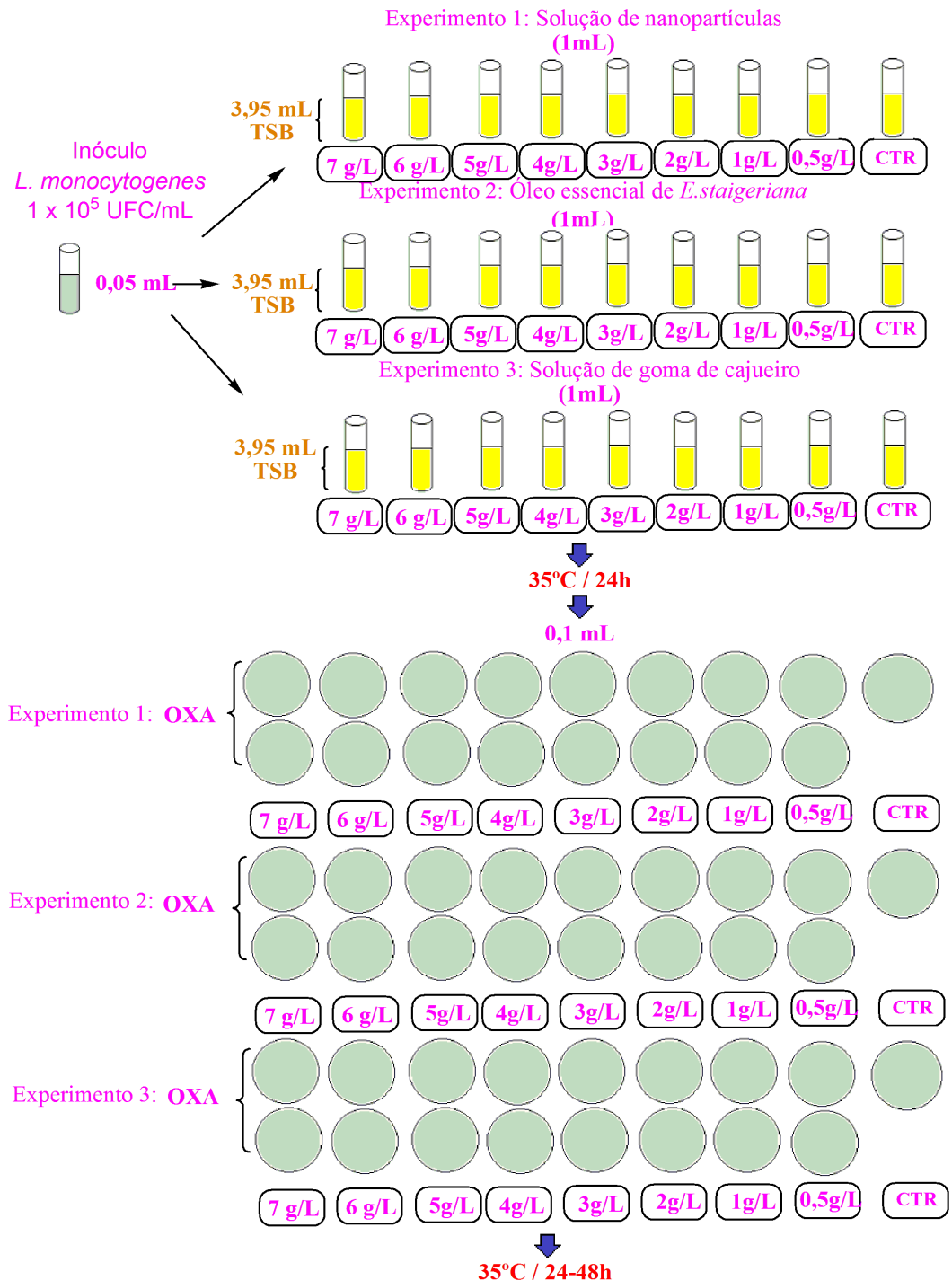
Figura 16 – Etapas do procedimento de determinação da Concentração Bactericida Mínima da goma de cajueiro, do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* e das nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro contra a bactéria *Salmonella* Enteritidis.



Fonte: Autoria própria.

Onde: UFC – unidade formadora de colônia; CTR- controle; BHI - caldo de infusão de cérebro e coração; Sol. Nanop. – solução de nanopartículas; Sol. GC- solução de goma de cajueiro; OES- óleo de *Eucalyptus staigeriana*; HE- meio Entérico de Hecktoen.

Figura 17 – Etapas do procedimento de determinação da Concentração Bactericida Mínima da goma de cajueiro, do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* e das nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro contra a bactéria *Listeria monocytogenes*.



Fonte: Autoria própria.

Onde: UFC – unidade formadora de colônia; CTR- controle; TSB - caldo triptona de soja; Sol. Nanop. – solução de nanopartículas; Sol. GC- solução de goma de cajueiro; OES- óleo de *Eucalyptus staigeriana*; OXA- meio Ágar Oxford *Listeria*.

Em tubos de ensaio contendo 3,95 mL de caldo triptona de soja (TSB/Difco) estéril, para *L. monocytogenes*, e caldo de infusão de cérebro e coração (BHI/Difco), para *S. Enteritidis*, foi adicionado 50 µL da suspensão bacteriana em concentração de 10^5 UFC/mL. Para cada cultura, separadamente, foi adicionado o óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*, a solução de nanopartículas e a solução de goma de cajueiro. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas sob agitação a 200 RPM.

Após incubação, 100 µL da cultura foram inoculados em placas de meio Oxford Listeria (OXA/Oxoid), para *L. monocytogenes*, e ágar Entérico Hecktoen (HE/Difco), para *S. Enteritidis*, e espalhado com alça de Dringalsky. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e observada à presença de crescimento. A menor concentração na qual não ocorreu crescimento foi considerada como a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

4.2.5.4 Concentrações analisadas de nanopartículas, do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* e da goma de cajueiro.

As concentrações analisadas foram de 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 6 g/L e 7 g/L, calculadas em relação ao teor do princípio ativo do óleo essencial, (-)-limoneno, determinado por análise de GC-MS, e do teor de óleo encapsulado. Para as nanopartículas foi preparada uma solução padrão, utilizando-se água destilada estéril, com a quantidade em massa de nanopartículas equivalente a concentração de 7 g/L de (-)-limoneno e feita as diluições necessárias através da equação (8). Para as soluções de goma de cajueiro foram diluídas em água destilada estéril a quantidade de goma equivalente a cada solução anteriormente citada, sendo calculada pela diferença entre o peso total das nanopartículas e a massa em gramas do teor de óleo encapsulado, a fim de se estudar o efeito da goma de cajueiro isolada sobre as bactérias testadas.

Com o objetivo de verificar a eficácia do nanoencapsulamento do óleo essencial sobre o efeito bactericida contra as bactérias testadas, foi determinada a CBM do óleo não nanoencapsulado. As concentrações utilizadas também foram calculadas a partir do teor de seu princípio ativo (-)-limoneno, sendo de 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 6 g/L e 7 g/L.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (8)$$

Onde C_1 é a concentração inicial de 7 g/L, V_1 o volume desta solução a ser adicionada para obter a concentração C_2 , C_2 é a concentração final desejada e V_2 o volume desejado da solução de concentração C_2 .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise CG- EM

A análise constitucional do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM) está descrita na Tabela 4. O principal constituinte do óleo é (-)-limoneno (23,20 %), seguido de geranial (7,98 %), metil geranato (6,29 %) e do eucaliptol (6,03 %). Gilles *et al.* (2010) encontraram eucalyptol (34,8 %), neral (10,8 %), geranial (10,8 %) e α – felandreno (8,8 %) como constituintes principais. A Tabela 4 mostra a análise do óleo extraído das três formulações de nanopartículas, alguns componentes como o linalol, neral, geraniol e acetato de geranil não foram detectados na análise, isso, provavelmente, ocorreu devido a uma menor afinidade entre a goma de cajueiro e estes compostos, não havendo o nanoencapsulamento destes. Já outros, como (-)-limoneno, o eucaliptol e o p-Cimen-8-ol obtiveram alterações percentuais em suas concentrações devido à ausência de alguns componentes do óleo, como os citados anteriormente, que alterou a relação percentual total da análise.

Tabela 4 - Composição do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* obtida através de cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa.

Tempo de retenção (min)	Composto	Concentração (%)			
		OES	F 1	F 2	F 3
5,636	α - Pineno	2,62	ND	3,97	ND
6,834	β - Pineno	1,54	ND	ND	ND
8,362	o - Cimen	4,95	7,89	18,27	ND
8,565	(-) -Limoneno	23,20	8,55	31,10	9,89
8,635	Eucaliptol	6,03	13,16	2,18	ND
11,099	Linalol	2,59	ND	ND	ND
12,471	Óxido de limoneno, cis	0,37	ND	4,12	ND
14,348	4 - Terpeneol	1,29	ND	ND	ND

Continua

Continuação

Tempo de retenção (min)	Composto	Concentração (%)			
		OES	F 1	F 2	F 3
14,721	p – Cimen-8-ol	2,55	70,39	15,90	2,16
14,944	α – Terpineol	1,22	ND	ND	ND
16,576	Nerol	1,70	ND	ND	ND
17,190	Neral	5,20	ND	ND	ND
17,809	Geraniol	5,16	ND	ND	ND
18,548	Geranial	7,98	ND	3,23	ND
19,828	Geranil formato	1,19	ND	ND	ND
20,836	Metil geranato	6,29	ND	21,26	ND
22,037	Acetato de citronelilo	0,43	ND	ND	ND
22,568	Acetato de neril	2,49	ND	ND	ND
23,448	Acetato de geranil	5,90	ND	ND	ND
	Outros constituintes	17,28	ND	ND	ND

Onde: (ND) compostos não detectados.

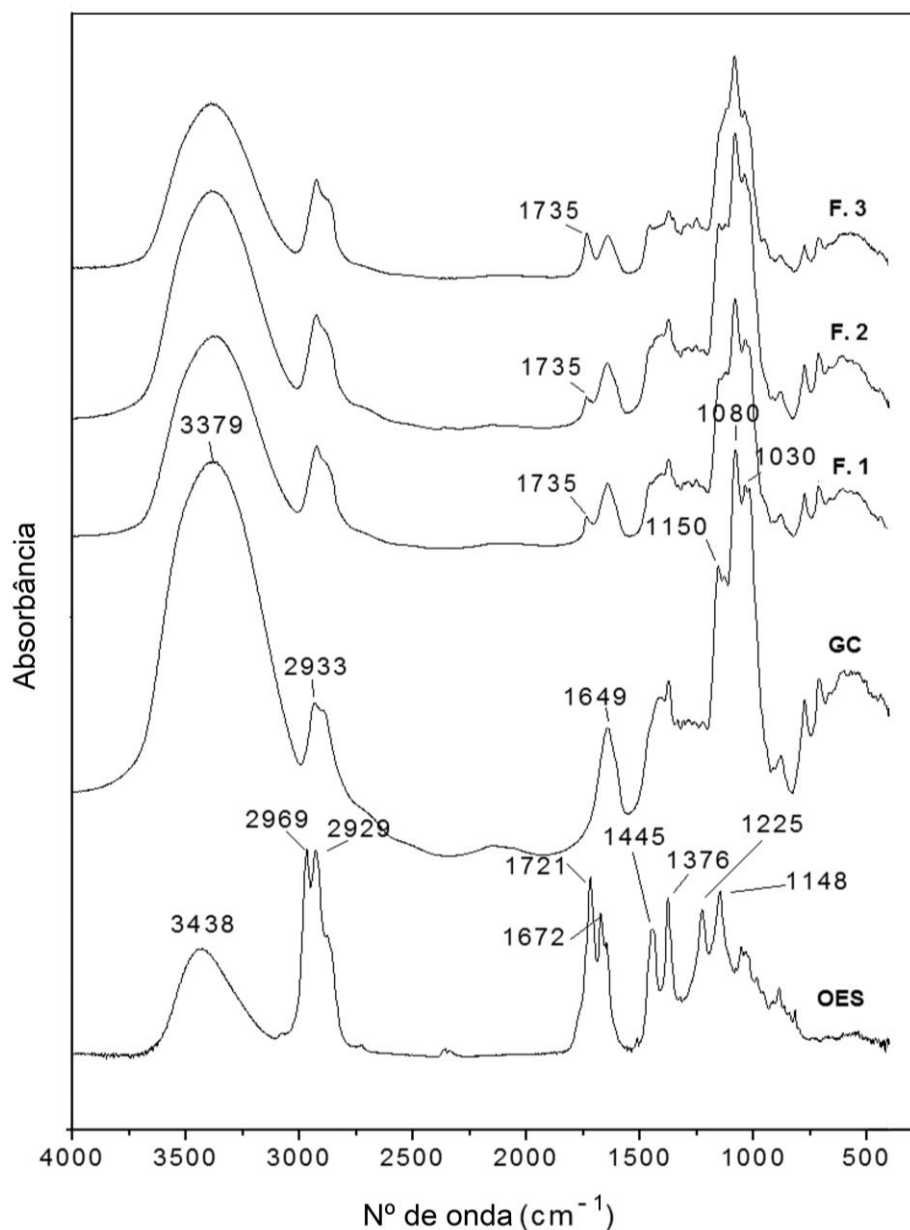
5.2 Caracterização das nanopartículas

5.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização estrutural obtida por espectroscopia FT-IR da goma de cajueiro e das nanopartículas é mostrada na Figura 18.

A goma de cajueiro apresentou uma banda larga em 3379 cm^{-1} devido à vibração de estiramento O-H, uma banda em 2933 cm^{-1} atribuída à vibração de estiramento C-H, e de absorção a 1649 cm^{-1} devido a vibrações de O-H de moléculas de água. Bandas fortes em 1150 , 1080 e 1030 cm^{-1} são devido às vibrações de estiramento de C-O-C de ligações glicosídicas e ramificações O-H de álcoois (SILVA *et al.*, 2009).

Figura 18 - FT- IR da goma de cajueiro e das nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro.



A presença do óleo essencial nas nanopartículas pode ser observada nos espectros das nanopartículas através de modificações nas resoluções. Entre estas, as principais foram: Um aumento na intensidade em 2933 cm^{-1} e uma redução em 1080 cm^{-1} particularmente para F.3, característica do óleo essencial; O aparecimento de uma banda larga em $2852\text{-}2904\text{ cm}^{-1}$. Uma redução em 1150 e 1030 cm^{-1} ; Observa-se o aparecimento de uma banda em 1735 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ de carbonila, com um aumento de intensidade na F.3, formulação em que foi reduzido o teor de óleo essencial com consequente aumento da proporção de *Tween 80*.

O espectro FT-IR do óleo essencial apresentou uma banda larga em 3438 cm^{-1} correspondente a vibrações O-H de álcoois. Apresentou também banda em 2969 cm^{-1} , que caracteriza vibrações de estiramento de grupos metil ($-\text{CH}_3$) e em 2929 cm^{-1} que caracteriza vibrações de grupos metileno ($-\text{CH}_2-$); banda em 1721 cm^{-1} referente ao estiramento C=O de carbonila; banda em 1672 cm^{-1} referente ao estiramento C=C de grupos aromáticos e em 1445 cm^{-1} referente à deformação C-H (ESTEVEZ *et al.*, 2013; SHEET, 2007).

5.2.2 Tamanho e distribuição de partícula e potencial zeta

A Tabela 5 e a Figura 19 apresentam o tamanho e distribuição de partícula por volume para as três formulações de nanopartículas dopadas com óleo de *E. staigeriana*. Pode ser visto que as amostras F.1 e F.2 apresentaram distribuições unimodais, enquanto que F.3 bimodal.

Figura 19 - Tamanho e distribuição por volume de partícula das formulações de nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro.

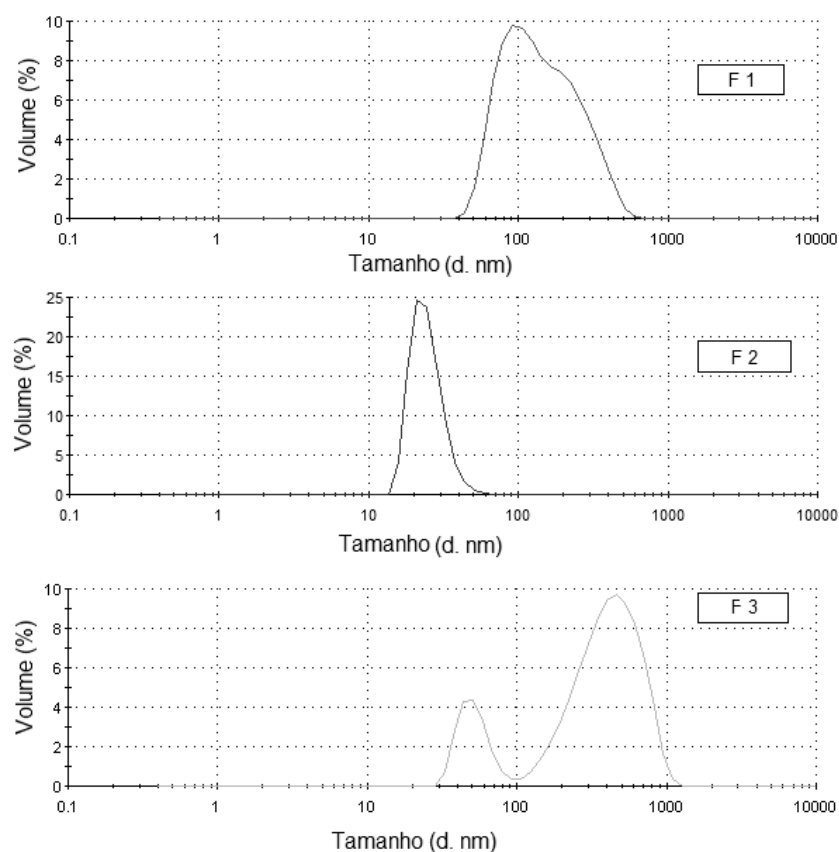


Tabela 5 – Tamanho e distribuição por volume e potencial zeta das nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro.

Formulação	Tamanho de partícula (nm)	Distribuição por volume (%)	Potencial zeta (mV)
F 1	153,80 ± 8,20	100	-24,5 ± 0,45
F 2	27,70 ± 3,42	100	-14,47 ± 1,42
F 3	432,67 ± 41,47	85,50	-10,45 ± 0,21
	29,66 ± 23,36	14,50	

Analisando o resultado obtido em F.2, para o tamanho de partícula, observa-se que ocorreu uma redução em seu valor, em relação à F.1, de 153,80 ± 8,20 nm a 27,70 ± 3,42 nm. Resultado semelhante foi obtido por Paula *et al.* (2012) com valores que decresceram de 357 ± 47 nm à 288 ± 61 nm com o aumento na proporção de goma de cajueiro. Alishahi *et al.* (2011) obtiveram valores de 90 nm a 350 nm em nanopartículas de quitosana carregadas com vitamina C. De Britto *et al.* (2007) fizeram o estudo de nanopartículas de N,N,N-trimetil quitosana como um sistema carreador de vitaminas e obteve partículas com tamanho variando de 196 ± 8 nm a 606 ± 25 nm.

O potencial zeta é um parâmetro importante que caracteriza a carga eléctrica global da superfície de uma partícula. A Tabela 6 mostra os valores do potencial zeta das nanopartículas. Segundo Silva *et al.* (2009) o valor negativo é devido aos grupos de ácido carboxílico sob a forma carboxilada, (-COO⁻) da GC que a tornam um polissacarídeo ligeiramente ácido. Moura Neto *et al.* (2011) afirmam ser devido ao teor de ácido glucurônico, apesar do baixo conteúdo (4,7-6,3%).

O potencial zeta é um indicativo da estabilidade das nanopartículas, sendo considerado bom quando excede o valor de ± 30 mV (SILVA *et al.*, 2011). Observa-se que para as duas formulações F.2 e F.3 ocorreu um decréscimo em seu valor de -24,5 ± 0,45 mV (F.1) para -14,47 ± 1,42 mV e -10,45 ± 0,21 mV, respectivamente, reduzindo a carga negativa da superfície e diminuindo a estabilidade da dispersão das nanopartículas em água. A explicação para a redução do tamanho de partícula e potencial zeta em F.2 poderia está relacionada com a capacidade da goma de cajueiro em enovelar-se

formando aglomerados pequenos e com cargas superficiais menores, propriedade que ocorre em goma de angico, mas não existem dados bibliográficos disponíveis que a suportem.

Alishahi *et al.* (2011) obtiveram potenciais zetas em torno de $49,3 \pm 1,6$ mV – $62,3 \pm 1,5$ mV, enquanto Lv, Yang, Li, Zhang, Abbas, (2014) obtiveram valores variando de $-9,45 \pm 0,10$ mV a $-16,2 \pm 0,71$ mV em nanocápsulas de gelatina/goma arábica carregadas do óleo essencial de in jasmim em pH 7,0.

5.2.3 Teor de óleo encapsulado (T.E) e eficiência de encapsulamento (E.E)

A Tabela 6 apresenta os resultados do teor de óleo encapsulado e eficiência de encapsulamento para as diferentes formulações de nanopartículas. De acordo com o resultado obtido em F.3, observa-se que com a redução do óleo essencial e consequente aumento na proporção de *Tween* 80 ocorreu um aumento na E.E. de 24,89, valor obtido na formulação padrão F.1, para 26,80, porém houve uma redução no T.E. de 7,12 para 6,70.

Tabela 6 – Teor de óleo encapsulado (T.E.) e eficiência de encapsulamento (E.E) para as formulações de nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro.

Formulação	E.E * (%)	T.E. ** (%)
1	24,89	7,12
2	26,16	4,76
3	26,80	6,70

*erro: 0,56 – 1,90 %; ** erro: 0,42 - 1,94 %;

Na F.2 ocorreu também um aumento na E.E. para 26,16 e uma redução no T.E. para 4,76. O aumento da proporção do encapsulante parece não influenciar no aumento do conteúdo de óleo encapsulado, porém ocorreu um incremento na E.E. Conclusões semelhantes foram obtidas por Paula *et al.* (2010).

Tang *et al.* (2013) obtiveram E.E na faixa de 13,8-23,5 % em nanopartículas de catequinas de chá verde preparadas com quitosana e um

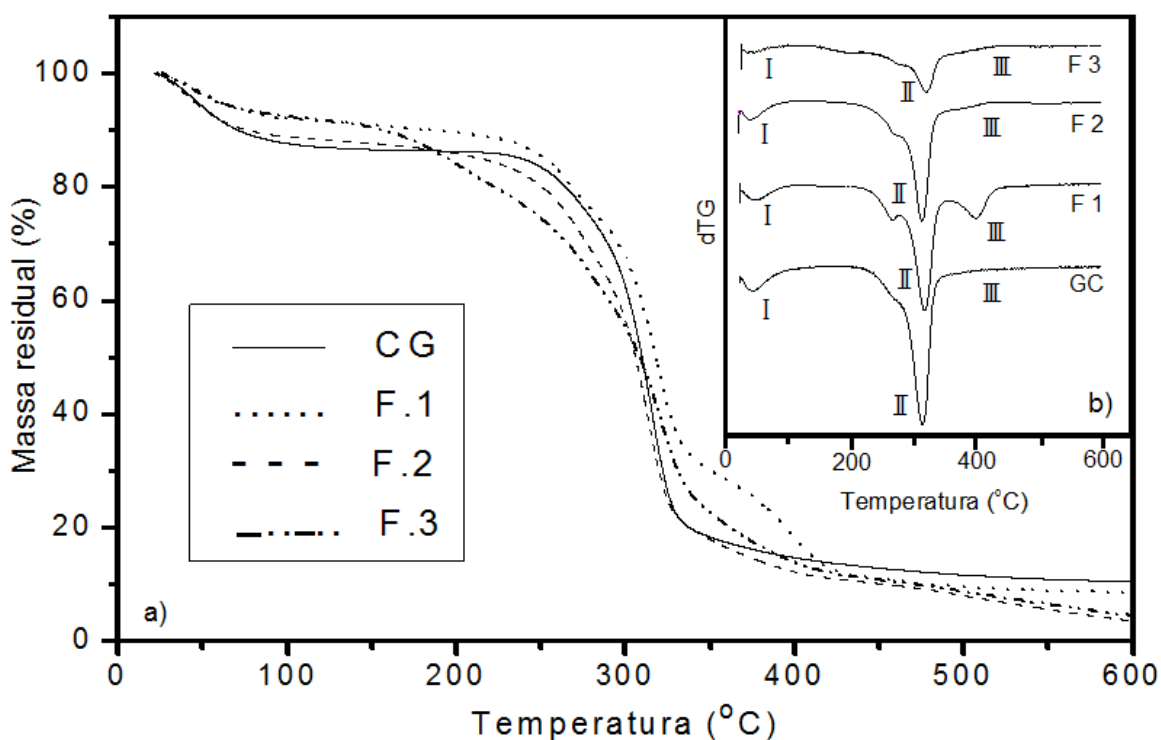
polipeptídeo comestível. Em outro estudo feito por Hosseini *et al.* (2013) foi obtido E.E entre $5,45 \pm 0,45$ % e $24,72 \pm 4,39$ % e T.E variando de $1,32 \pm 0,19$ % a $2,12 \pm 0,17$ % em nanopartículas de quitosana carregadas com o óleo essencial de orégano. Paula *et al.* (2012) nanoencapsularam o extrato obtido de *Moringa oleifera* utilizando goma de cajueiro como material de parede e obtiveram valores de T.E entre $2,6 \pm 0,2$ e $4,4 \pm 0,4$.

5.2.4 Análise térmica

5.2.4.1 TGA e dTG

As curvas termogravimétricas da goma de cajueiro e das nanopartículas são apresentadas na Figura 20.

Figura 20 - (a) Curvas termogravimétricas obtidas através da análise termogravimétrica (TGA), sob atmosfera de nitrogênio, da goma de cajueiro e das formulações de nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro. (b) Derivada primeira das curvas termogravimétricas em função da temperatura (dTG).



Os dados de perda de massa e as temperaturas de pico para os eventos térmicos estão apresentados na Tabela 7. A decomposição da goma em atmosfera de nitrogênio ocorre em três estágios. O primeiro é referente à

perda de umidade e os demais são associados à degradação de GC com a despolimerização e consequente formação de água, CO e CH₄ (SILVA *et al.*, 2009). Os eventos de decomposição da GC ocorreram nas temperaturas de 310 °C e 497 °C. Silva *et al.* (2009) encontraram valores mais baixos, de 256 °C e 320 °C, respectivamente. Essa diferença deve ter ocorrido devido provavelmente as diferentes taxas de aquecimento da análise. Para as nanopartículas, o primeiro evento de decomposição ocorreu na faixa de 313 °C – 321 °C e o segundo evento no intervalo de 400 °C – 510 °C. Em temperaturas de aproximadamente 500 °C, F. 2 e F.3 apresentaram uma maior estabilidade térmica que F.1, formulação padrão, com uma maior temperatura de pico no segundo evento de decomposição.

Tabela 7 – Eventos térmicos e temperaturas máximas de decomposição obtidos através da análise termogravimétrica (TGA), sob atmosfera de nitrogênio, da goma de cajueiro e das formulações de nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro.

Amostra	Eventos	Temperatura máxima (°C)	Perda de massa (%)
GC	I	43	4,00
	II	310	46,50
	III	497	34,80
Massa residual a 600 °C = 10,56 %			
F1	I	47	2,85
	II	319	51,44
	III	400	29,36
Massa residual a 600 °C = 8,56 %			
F2	I	41	3,18
	II	313	56,21
	III	510	33,02
Massa residual a 600 °C = 3,52 %			
F3	I	39	1,42
	II	321	59,58
	III	510	30,60
Massa residual a 600 °C = 4,35 %			

5.2.4.2 DSC

A Figura 21 e a Tabela 8 mostram os dados obtidos por DSC da GC e das nanopartículas dopadas de óleo essencial de *E. staigeriana*.

Figura 21 – Curvas obtidas pela Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), sob atmosfera de nitrogênio, da goma de cajueiro e das formulações de nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro.

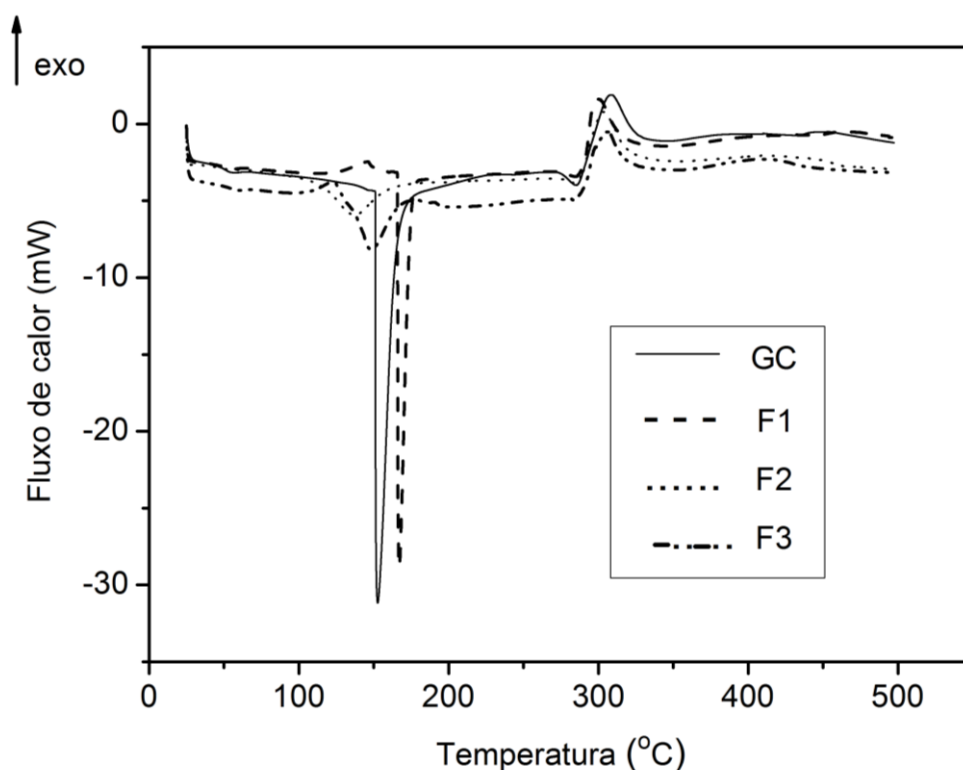


Tabela 8 – Eventos térmicos da análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), sob atmosfera de nitrogênio, da goma de cajueiro e das formulações de nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro.

Amostra	Transição exotérmica		Transição endotérmica	
	Temperatura (° C)	ΔH (J/g)	Temperatura (° C)	ΔH (J/g)
GC	307,3	141,8	152,6	-356,9
F1	300,1	101,9	167,0	-164,1
F2	303,2	125,0	137,9	-104,1
	415,7	38,5		
F3	305,1	111,0	147,6	-101,1
	408,8	47,4		

GC apresentou um pico endotérmico em 152,6 °C, que corresponde à perda de água, e um pico exotérmico em 307,3 °C, devido ao processo de decomposição. Estas temperaturas foram mais elevadas do que aquelas obtidas por Okoye, Onyekweli e Kunle (2012) e Paula *et al.* (2012).

Os eventos de transição endotérmica das nanopartículas variaram de 137,9 °C a 167,0 °C, sendo que F.1, formulação padrão, apresentou maior temperatura de pico em relação às outras. Já para os eventos de transição exotérmica, F.2 e F.3 mostraram-se mais resistentes termicamente que F.1 além de apresentarem um evento de decomposição a mais. Em relação ao segundo evento de transição exotérmica, F.2 obteve maior temperatura de pico, isso provavelmente ocorreu devido ao aumento do teor de goma de cajueiro, tornando-a mais estável termicamente.

As nanopartículas apresentaram uma pequena redução da temperatura de degradação do primeiro evento exotérmico em comparação a goma de cajueiro pura, indicando que a presença do óleo levou a uma diminuição na estabilidade térmica em temperaturas de aproximadamente 300 °C.

5.2.5 Cinética de liberação *in vitro*

Os resultados para o estudo da cinética de liberação estão apresentados na Figura 22. A formulação 3 obteve um perfil de liberação semelhante a F.1, sendo rápido nas primeiras horas e gradual depois das 20 horas do experimento. F.1 apresentou um perfil de liberação mais prolongada, com 67 % de óleo liberado após 144 horas, enquanto F.3 liberou cerca de 93 % em 87 horas.

O aumento na proporção de goma do cajueiro na F.2 favoreceu uma rápida liberação do óleo devido ao aumento do caráter hidrofílico das nanopartículas. Com apenas sete horas do experimento foi liberado em torno de 90 % do óleo.

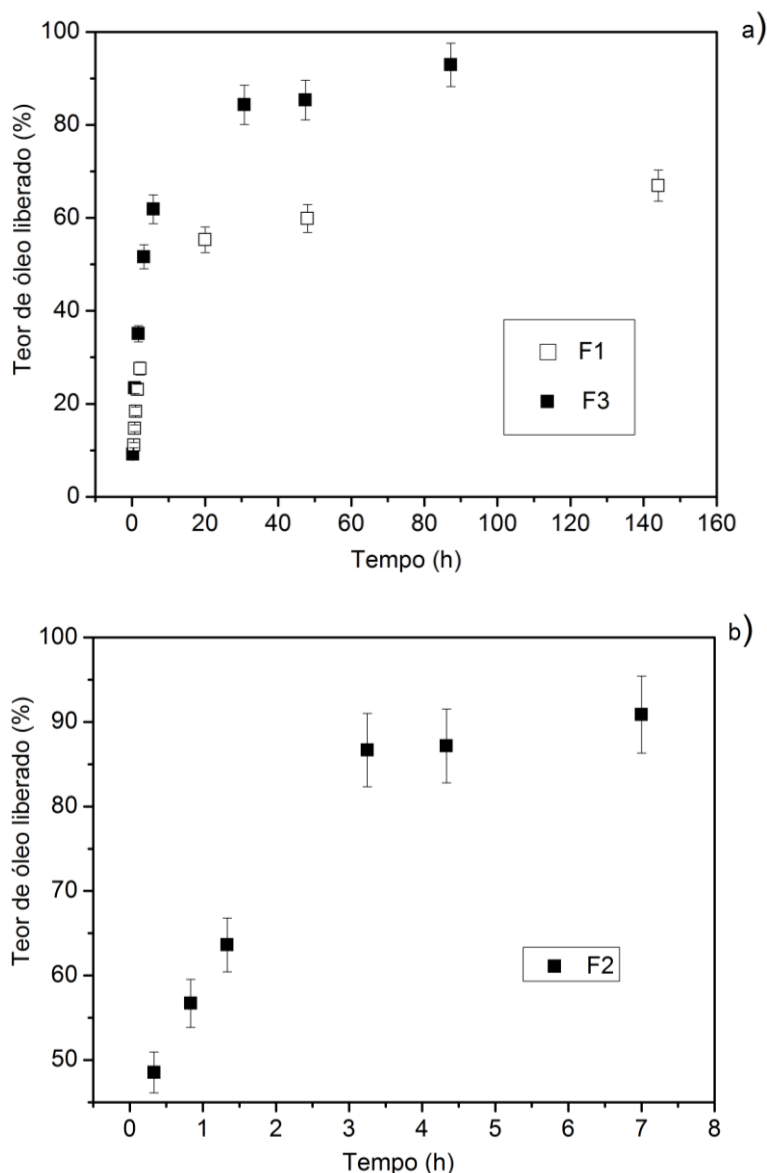
Paula *et al.* (2012) obtiveram uma liberação de quase 100 % do princípio ativo em aproximadamente 25 horas de experimento, em

nanopartículas de goma de cajueiro dopadas do extrato obtido de sementes de *Moringa oleífera*.

Silva *et al.* (2011) avaliaram o efeito do nanoencapsulamento, utilizando quitosana e alginato como material de parede, sobre a velocidade de liberação do herbicida Paraquat, obtendo cerca de 100 % de liberação após 8 horas de experimento.

Keawchaon e Yoksan (2011) estudaram a liberação *in vitro* de nanopartículas de quitosana dopadas com carvacrol e obtiveram 22,5 % de liberação em 60 dias em solução tampão pH ~ 7.

Figura 22 - Cinética de liberação *in vitro* em água destilada para as formulações de nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro - (a) F.1 e F.3 e (b) F.2.



Foi determinado também o tipo de mecanismo cinético mais adequado apresentado na liberação do óleo. Os coeficientes de correlação para diferentes modelos cinéticos estão expressos na Tabela 9. Pode-se observar que, para todas as formulações, os modelos de Korsmeyer-Peppas e de Higuchi apresentaram os melhores coeficientes, sendo seguidos pelo modelo de ordem zero.

Tabela 9 – Coeficientes de correlação para diferentes modelos cinéticos obtidos pela cinética de liberação *in vitro* das formulações de nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro.

Formulação	Coeficiente de correlação (R^2)				
	Ordem zero	Primeira ordem	Segunda ordem	Higuchi	Korsmeyer – Peppas
F 1	0,627	0,507	0,363	0,835	0,933
F 2	1,000	0,860	0,530	0,968	1,000
F 3	0,670	0,429	0,217	0,837	0,874

Um estudo mais detalhado sobre o modelo de Korsmeyer-Peppas foi realizado e seus parâmetros cinéticos calculados, sendo expressos na Tabela 10. De acordo com a teoria cinética do modelo para geometria esférica (RITGER; PEPPAS, 1987), quando o coeficiente “n” for igual a 0,43, se tem uma liberação devida à difusão molecular pura usual devido a um gradiente de potencial químico (difusão Fickiana ou Caso I). Quando o valor de “n” estiver entre 0,43 e 0,85, se tem um comportamento não-Fickiano (transporte anômalo), onde a liberação ocorre por mecanismos conjuntos de difusão e relaxamento (transporte Caso II). Quando n assume o valor de 0,85, a equação corresponde à cinética de liberação de ordem zero, sendo a liberação controlada por mecanismo de transporte de Caso II, ou seja, pelo fenômeno de relaxamento do polímero. Quando n for maior que 0,85 a difusão é controlada pelos mecanismos de inchamento e relaxamento do polímero (transporte super Caso II) (PRAJAPATI, *et al.*, 2012).

As formulações 1 e 3 apresentaram coeficientes de liberação fora dos limites do modelo de Korsmeyer-Peppas. Segundo Shoaib *et al.* (2006) esta lei dá apenas uma visão limitada sobre o mecanismo de lançamento exato do princípio ativo. No entanto, Druzynska e Czubenko (2012) afirmam que esse

caso é chamado de comportamento “Less Fickiano” e também pode ser classificado como difusão Fickiana.

F 2 apresentou o valor de n maior que 0,85 indicando um mecanismo de liberação pelos mecanismos de inchamento e relaxamento do polímero (transporte super Caso II).

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos para o modelo de Korsmeyer-Peppas obtidos pela cinética de liberação *in vitro* das formulações de nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro.

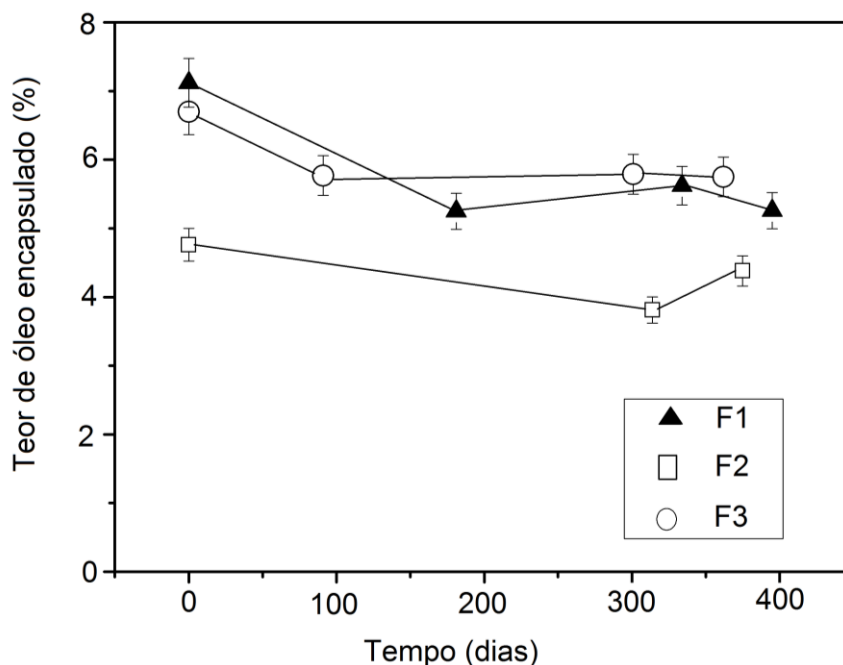
Formulação	k	n
F 1	0,27	0,31
F 2	0,14	1,00
F 3	0,26	0,35

5.2.6 Estudo do teor de óleo encapsulado nas nanopartículas armazenadas a temperatura ambiente

A partir dos resultados obtidos (FIGURA 23) pode-se deduzir que a F.2 foi a formulação que melhor conteve o óleo essencial nanoencapsulado, com menores perdas no decorrer dos 365 dias de experimento. O óleo manteve-se contido nas nanopartículas com uma redução de apenas 8 % em relação ao teor de óleo inicial, determinado pela análise de teor de óleo encapsulado. O aumento da proporção de goma de cajueiro provavelmente proporcionou a formação de um complexo mais estável com o óleo. Já os resultados para F.1 e F. 3 mostraram uma redução maior ao longo do tempo, de 26,12 % e 14,20 %, respectivamente. Ou seja, estas duas formulações foram menos capazes de manter o óleo preso no invólucro polimérico com o decorrer do tempo.

O óleo essencial com o decorrer do tempo provavelmente desprende-se das nanopartículas e manteve-se no *head space* dos recipientes de acondicionamento até ser liberado. O acondicionamento a vácuo dessas nanopartículas poderia ser uma alternativa para que o óleo essencial se mantenha constante e instável durante o período de armazenamento.

Figura 23 – Teores do óleo essencial encapsulado para as formulações de nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro acondicionados em recipientes de vidro âmbar sob temperatura ambiente no decorrer de aproximadamente 365 dias.



5.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM) das nanopartículas, da goma de cajueiro e do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*

De acordo com a Tabela 11 e as Figuras 24 e 25, os resultados de CBM para as nanopartículas mostram que a CBM para *S. Enteritidis* foi de 4 g/L enquanto que para *L. monocytogenes* foi de 3 g/L. O que significa que, foi necessária uma quantidade de 4 g/L e 3 g/L de limoneno (princípio ativo do óleo essencial) nanoencapsulado para se obter uma ausência de crescimento de *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes*, respectivamente.

A CBM segundo Onawunmi (1989) *apud* Burt (2004) é a menor concentração do agente antimicrobiano na qual não ocorreu crescimento no meio de cultura.

A Figura 24 mostra que houve ausência de crescimento nas placas de concentração 4 g/L e 5 g/L, sendo que 4 g/L é considerada a concentração mínima com crescimento, ou seja a CBM. As placas de concentração 3 g/L mostraram o crescimento de bactérias que pode ser identificado pela mudança de coloração do meio de cultura (BHI), pois este contém um indicador ácido-base que altera a coloração do meio com o crescimento de microrganismos e

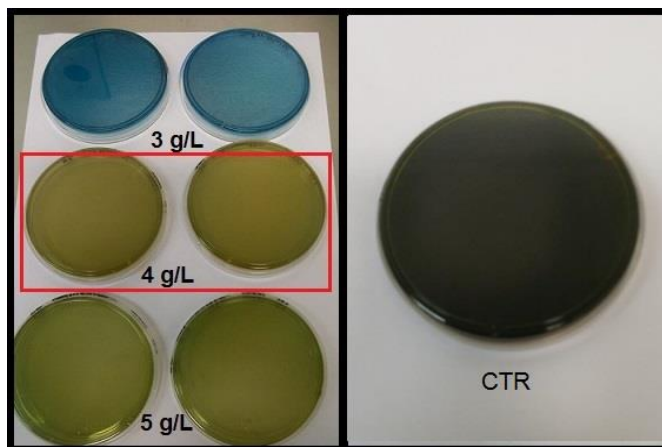
consequente mudança de pH. A placa correspondente ao controle, que consiste no meio de cultura mais bactéria ocorreu bastante crescimento observado pela coloração totalmente escura.

Tabela 11 – Concentração Bactericida Mínima das nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro, do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* contra as bactérias *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes*.

	Concentrações testadas (g/L de l-limoneno)	S. Enteritidis IAL 1132	L. <i>monocytogenes</i> ATCC 19115
		CBM	CBM
Nanopartículas GC-OES	2	Presença	Presença
	3	Presença	Ausência
	4	Ausência	Ausência
	5	Ausência	Ausência
	6	Ausência	Ausência
	7	Ausência	Ausência
	CTR	Presença	Presença
OES	0,5	Presença	Presença
	1	Presença	Presença
	2	Presença	Ausência
	3	Presença	Ausência
	4	Presença	Ausência
	5	Ausência	Ausência
	CTR	Presença	Presença

Onde: GC- goma de cajueiro; OES- óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*; CTR - controle.

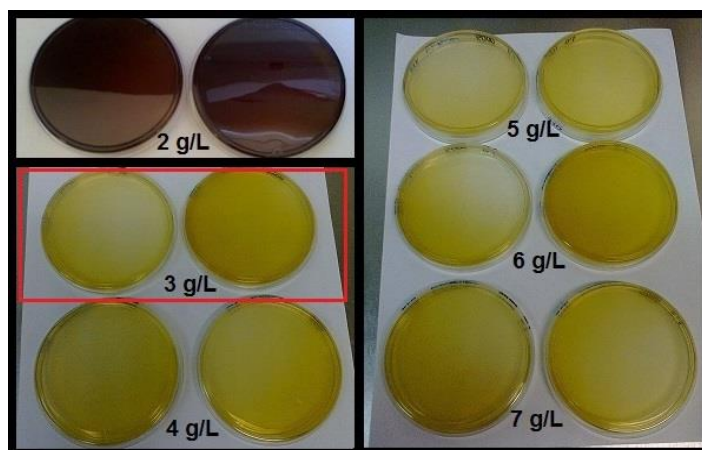
Figura 24 – Determinação da Concentração Bactericida Mínima para as nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro contra a bactéria *S. Enteritidis*, em meio ágar Entérico Hecktoen (DIFCO).



Onde: CTR – controle.

A Figura 25 mostra ausência de crescimento de *L. monocytogenes* em todas as placas com exceção para as de concentração 2 g/L onde ocorreu grande quantidade de crescimento. A concentração de 3 g/L foi a CBM para o microrganismo testado, ou seja a concentração mínima com ausência de crescimento.

Figura 25 – Determinação da Concentração Bactericida Mínima para as nanopartículas de óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro contra a bactéria *L. monocytogenes*, em meio ágar Oxford Listeria (Oxoid).



Os resultados demonstraram uma ação bactericida do óleo nanoencapsulado mais eficiente em *L. monocytogenes* (Gram-positiva) do que em *S. Enteritidis* (Gram-negativa). Esses resultados estão de acordo com o

reportado na literatura. As bactérias Gram-positivas são normalmente mais sensíveis a agentes antimicrobianos que as bactérias Gram-negativas.

A resistência das bactérias Gram-negativas deve-se a presença de uma parede celular em multicamadas e bastante complexa. Cerca de 90% é formada por uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos e proteínas, os 10 % restante é formada de peptídeoglicano. Enquanto que a parede celular das bactérias Gram-positivas é formada por uma camada espessa e rígida de peptídeoglicano (MADIGAN *et al.*, 2009).

Resultado semelhante é observado em relação ao óleo não nanoencapsulado, sendo o efeito bactericida mais eficiente para a bactéria Gram-positiva. Ou seja, é necessária uma concentração menor de óleo para eliminar a bactéria Gram-positiva (2 g/L) em comparação a bactéria Gram-negativa (5 g/L) (TABELA 11 e FIGURAS 26 e 27).

Estes resultados estão de acordo com Tyagi e Malik (2011). Os autores determinaram a CBM para o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* contra duas cepas de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e quatro cepas de bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* α DH5, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*). Os valores para a CBM contra bactérias Gram-positivas foram todas 4,5 g/L, enquanto para as Gram-negativas variaram de 9 e 18 g/L.

Figura 26 – Determinação da Concentração Bactericida Mínima para o óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro contra a bactéria *S. Enteritidis*, em meio ágar Entérico Hecktoen (DIFCO).

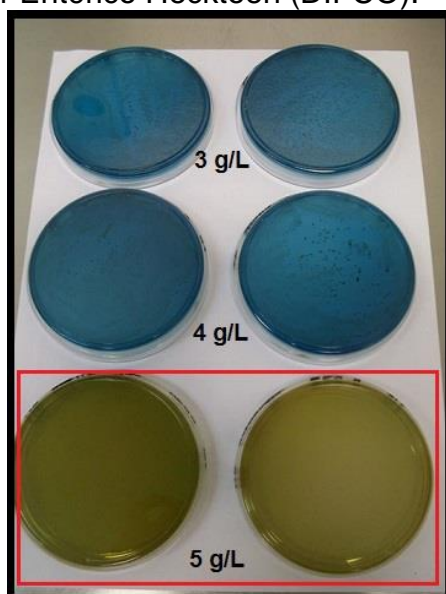


Figura 27 – Determinação da Concentração Bactericida Mínima para o óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* em goma de cajueiro contra a bactéria *L. monocytogenes*, em meio ágar Oxford Listeria (Oxoid).



Onde: CTR – controle.

Os resultados obtidos também mostram que para *S. Enteritidis* o óleo nanoencapsulado mostrou-se mais eficiente que o óleo puro. Já para *L. monocytogenes* o resultado contrário foi observado.

Cátions bivalentes atuam reduzindo a repulsão entre as moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) altamente aniônicos presente na membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas. Mg^{2+} tem o importante papel de formar complexos entre as proteínas da membrana externa e LPS. Tratamento com agentes quelantes como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) afeta o funcionamento da membrana externa destas bactérias (COUGHLIN; TONSAGER; MC GROARTY, 1983; GÄNZLE; WEBER; HAMMES, 1999).

A goma de cajueiro por conter grupamentos ($-COO^-$), e consequentemente uma carga superficial negativa, age como complexante dos íons magnésio (Mg^{+2}) do lipopolissacarídeo presente na parede celular somente de bactérias Gram-negativas, como a *S. Enteritidis*, fazendo com que se tornem sensíveis. Esta hipótese pode ser uma justificativa para os diferentes resultados citados no parágrafo anterior. O óleo essencial nanoencapsulado em goma de cajueiro teve um efeito sinérgico contra a bactéria Gram-negativa, enquanto que o óleo não nanoencapsulado teve uma menor facilidade de penetrar na membrana externa. Para *L. monocytogenes*, devido a ser uma bactéria Gram-positiva e não possuir membrana externa, provavelmente o óleo não nanoencapsulado teve maior facilidade de penetrar na parede celular da

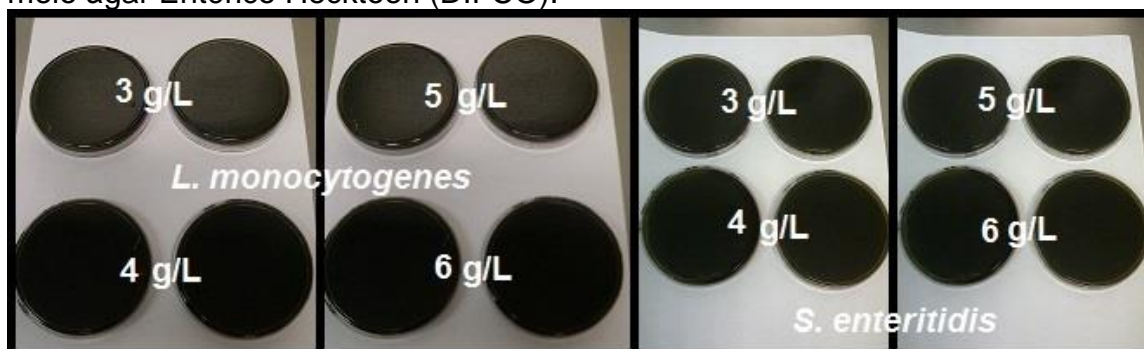
bactéria e sensibilizar a bicamada fosfolipídica da membrana celular com consequente aumento de permeabilidade e vazamento de compostos vitais intracelulares.

Donsi *et al.* (2011) obtiveram valores da CBM de (+)-Limoneno para *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* e *Lactobacillus delbrueckii* maior que 25 g/L enquanto que para o mesmo composto encapsulado em nanoemulsões obteve valores sempre iguais ou inferiores à 25 g/L.

Para as soluções de goma de cajueiro todas as placas apresentaram crescimento, demonstrando nenhuma ação sobre as bactérias estudadas (FIGURA 28).

Campos *et al.* (2012) determinaram a CBM para a goma de cajueiro purificada e para a goma de cajueiro crua. Para todas as bactérias testadas não foi possível determinar a CBM para a goma de cajueiro purificada. No entanto, para a goma crua foi determinada uma CBM de 5 g/L contra as bactérias Gram-positivas *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium*. Os autores atribuíram esse resultado ao processo de purificação da goma.

Figura 28 – Determinação da Concentração Bactericida Mínima para as soluções de goma de cajueiro em diferentes concentrações contra as bactérias *L. monocytogenes*, em meio ágar Oxford Listeria (Oxoid) e *S. Enteritidis*, em meio ágar Entérico Hecktoen (DIFCO).



6 CONCLUSÃO

Os resultados mostram que o (-)-limoneno é o principal constituinte do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*. Foram observadas modificações nas resoluções dos espectros de FT-IR das nanopartículas em relação ao espectro da goma de cajueiro, evidenciando a presença do óleo essencial.

A formulação 1, obteve melhor potencial zeta, maior teor de óleo encapsulado e perfil de liberação mais prolongado. Enquanto que a formulação 2, apresentou maior estabilidade térmica, menor tamanho de partícula, um perfil de liberação rápido e melhor capacidade de reter o óleo essencial com o decorrer do tempo. Já a formulação 3 obteve melhor eficiência de encapsulamento.

A partir destes resultados, conclui-se que dependendo da necessidade e da aplicação das nanopartículas pode-se dar preferência a uma determinada formulação.

O resultado da determinação da Concentração Bactericida Mínima indicou que a bactéria Gram-negativa (*S. Enteritidis*) é mais resistente à ação bactericida do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* do que a bactéria Gram-positiva (*L. monocytogenes*). O nanoencapsulamento do óleo em goma de cajueiro foi essencial para uma melhor eficiência de sua ação sobre a bactéria Gram-negativa. A goma de cajueiro (carga negativa), provavelmente, agiu sinergisticamente com o óleo essencial, atuando como um sequestrante dos cátions Mg^{+2} presente na membrana externa da Gram-negativa, sensibilizando-a. A goma de cajueiro não apresentou ação antibacteriana sobre as bactérias estudadas.

Conclui-se, de uma forma geral, que o óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* nanoencapsulado foi eficiente contra as bactérias estudadas e é uma forma promissora para o desenvolvimento de novas tecnologias de conservação de alimentos, em substituição a conservantes químicos artificiais.

REFERÊNCIAS

- ABURTO, L. C.; TAVARES, D. Q.; MARTUCCI, E.T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n.1, p. 45-48, jan./abr. 1998.
- ALISHAHI, A. *et al.* Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 935-940, jun., 2011.
- ANDERSON, D. M. W.; BELL, P. C. Structural analysis of the gum polysaccharide from *Anacardium occidentale*. **Analytica Chimica Acta**, v. 79, p. 185-197, oct. 1975.
- ANNAN, N.T.; BORZA, A.D.; HANSEN, L. T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, Nova Scotia, Canada, v. 41, n. 2, p. 184-193, 2008.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa, MG: UFV, 2011. 601 p.
- ARUNKUMAR, R.; PRASHANTH, K. V. H.; BASKARAN, V. Promising interaction between nanoencapsulated lutein with low molecular weight chitosan: Characterization and bioavailability of lutein *in vitro* and *in vivo*. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 327-337, nov., 2013.
- ASSIS, L. M. *et al.* Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, abr./jun. 2012.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, jan./mar. 2005.
- BADEE, A. Z. M.; HELMY, S. A; MORSY, N. F. S. Utilisation of orange peel in the production of α -terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202). **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 849-854, jun. 2011.
- BAKHSHI, P. K. *et al.* Application of electrohydrodynamic technology for folic acid encapsulation. **Food Bioprocess Technology**, London, apr. 2012.
- BRAGA, G. K. **Determinação das especificações do processo de spray drying na obtenção de microcápsulas biodegradáveis para a liberação sustentada de princípios ativos com aplicação odontológica**. 2005. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. 2011. 71 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p.223-253, aug. 2004.

CAMPOS, D. A. *et al.* Study of a antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p.270-274, sep. 2012.

CASTANHA de caju: panorama nacional. **Amêndoas do Brasil**, Fortaleza, 04 abr. 2012. Disponível em:
<<http://www.amendoasdobrasil.com.br/pt/blog/item/312-castanha-de-caju-panorama-nacional>>. Acesso em: 27 jul. 2012.

CHAGAS, A. C. S. *et al.* Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus spp* em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

CHENG, Y. *et al.* Combining biofunctional magnetic nanoparticles and ATP bioluminescence for rapid detection of *Escherichia coli*. **Talanta**, v. 77, n. 4, p. 1332-1336, feb. 2009.

CHI-FAI, C.; SHIUAN-HUEI, W.; GOW-CHIN, Y. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 269-280, may. 2007.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. 2010. 242 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

COSTA, M. C.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A. Revisão: tecnologias não convencionais e o impacto no comportamento do consumidor. **Boletim do Ceppa**, Curitiba, v. 17, n. 2, p. 187-210, jul./dez.1999.

COSTA, S. B. *et al.* Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated oregano essential oil. **Journal of Food Engineering**. Portugal, v. 110, n. 2, p. 190-199, may. 2012.

COSTA, S. M. O.; RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. Monitorização do processo de purificação de gomas naturais: goma do cajueiro. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 6, n. 2, p. 49-55, abr./jun. 1996.

COUGHLIN, R. T.; TONSAGER, S.; MC GROARTY, E. J. Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 22, n. 8, p. 2002-2007, apr. 1983.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217-223, may/jun. 2010.

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

De Britto, D. *et al.* N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 487-493, jun. 2007.

DRUZYNSKA, M. G.; CZUBENKO, J.O. Mechanism of water diffusion into noncrosslinked and ionically crosslinked chitosan membranes. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its...**, v. XVII, 2012.

DUETZ, W. A. *et al.* Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. **Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n.4, p. 269- 277, may. 2003.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, n. 1, p. 1-24, nov. 2011.

ESTACA, J. G. *et al.* Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. **Food Hydrocolloids**. Valencia, Spain, v. 28, n.1, p. 82-91, jul. 2012.

ESTEVEZ, B. *et al.* Chemical changes of heat treated pine and Eucalypt wood monitored by FTIR. **Ciencia y Tecnología**, v. 15, n. 2, p. 245-258, 2013.

FERRARINI, S. T. *et al.* Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and β -amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1-2, p. 149-153, oct. 2008.

GÄNZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 207-217, feb. 1999.

GILLES, M. *et al.* Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 731-737, mar. 2010.

GOMES, G. V. L. **Produção e caracterização microestrutural de sistemas lipídicos sólidos micro e nanoparticulados utilizados na encapsulação de beta-caroteno**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

HEBEISH, A. *et al.* Preparation of durable insect repellent cotton fabric: Limonene as insecticide. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 2, p. 268-273, oct. 2008.

HORST, B. L. **Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana e quitosana/alginato através das técnicas de impregnação, coacervação e spray drying**. 2009. 103 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

HOSSEINI, S. F. *et al.* Two-step method for encapsulation of orégano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study. **Carbohydrate polymers**, v. 95, n. 1, p. 50-56, jun. 2013.

INCORONATO, A. L. *et al.* Agar hydrogel with silver nanoparticles to prolong the shelf life of Fior di Latte cheese. **Journal Dairy Science**, v. 94, n. 4, p. 1697-1704, apr. 2011.

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

KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and *in vitro* release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 163-171, may, 2011.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Florida, v. 43, n.11, p. 2839-2845, 1995.

LANÇAS, F. M. *et al.* Novas aplicações de sistemas SFE "home-made". IV. Qualidade dos alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 432-436, dez. 1997.

LANDIM, E. M. C. **Obtenção, caracterização e avaliação da estabilidade de pigmentos naturais microencapsulados**. 2008. 89 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

LI, P. H.; CHIANG, B. H. Process optimization and stability of d- limonene- in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n.1, p. 192-197, jan. 2012.

LIMA, A. C. *et al.* Estimulantes químicos na extração da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n.3, mai./jun. 2001.

LISBÔA, C. P. **Emulsões**. Físico-química de solução de polímeros e surfactantes. Unicamp. Disponível em:

<<http://chipre.iqm.unicamp.br/~wloh/offline/qp433/seminarios/2002/chrislane.pdf>.>. Acesso em: 13 de dez. 2012.

LV, Y. *et al.* Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum Arabic based complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 305-314, mar., 2014.

MACEDO, I. T. F. **Atividade anti-helmíntica de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp sobre nematoides gastrintestinais**. 2008. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

MACIEL, M. V. **Contribuição para o controle da leishmaniose visceral: atividade inseticida de plantas sobre *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ E NEIVA, 1912)**. 2009. 136 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

MACIEL, M. V. *et al.* Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 1, p. 1-7, jan. 2010.

MADIGAN, M.T. *et al.* **Brock: biology of microorganisms**. 12th Edition. San Francisco, 2009. 1160p.

MOTHÉ, C. G.; RAO, M. A. Thermal behavior of gum arabic in comparison with cashew gum. **Thermochimica Acta**, v. 357-358, n. 14, p. 9-13, ago. 2000.

MOURA NETO, E. *et al.* Preparation and Characterization of a Chemically Sulfated Cashew Gum Polysaccharide. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p.1953-1960, oct. 2011.

MOURA, R. E. **Síntese de nanopartículas a base de goma do cajueiro para aplicação em sistemas de liberação de fármacos**. 2009. 67 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

MÜLLER, P. S. **Microencapsulação de óleo essencial de laranja**. 2011. 98 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

NASCIMENTO, A. R. *et al.* Efeito inibitório do óleo essencial do *Eucalyptus* sp., puro e associado a antibióticos, frente a cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isoladas de manipuladores, alimentos, areia e água do mar. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 28, n. 1, p. 141-148, jan./jun. 2010.

NEETHIRAJAN, S.; JAYAS, D. S. Nanotechnology for the food and bioprocessing industries. **Food Bioprocess Technology**, v. 28, n.1, p. 39-47, jan. 2011.

OKOYE, E. I.; ONYEKWELI, A. O.; KUNLE, O. O. Solid state characterization of *Anacardium occidentale* gum. **Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology**, v. 4, n. 19, p. 3709-3716, oct., 2012.

OLIVEIRA, M. A. **Avaliação da influência de adjuvantes de secagem sobre as propriedades de suco de caju atomizado**. 2008. 63 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

PAULA, H. C. B. *et al.* *Lippia sidoides* Essential oil Encapsulation by Angico Gum/Chitosan Nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 12, p. 2359-2366, dec. 2010.

PAULA, H. C. B. *et al.* Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 173-178, mar., 2011.

PAULA, H. C. B. *et al.* Protective effect of cashew gum nanoparticles on natural lervicide from *Moringa oleífera* seeds. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, n. 3, p. 1778-1784, may, 2012.

PAULA, R. C. M.; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of *Anacardium occidentale* exudate polysaccharide. **Polymer International**, v. 45, n. 1, p. 27-35, jan.1998.

PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J.F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudates polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 177-181. 1995.

PRAJAPATI, S. K. *et al.* Formulation and evaluation of once daily sustained release matrix tablete of aceclofenac using natural gums. **Journal of drug delivery & therapeutics**, v. 2, n. 1, jan. 2012.

REIS, A. C. B. P. **Encapsulação de fármacos peptídicos pelo método de emulsificação/gelificação interna**. 2007. 620 p. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra. Coimbra, 2007.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37–42, jun., 1987.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 3, n. 1, p. 31-36, jan./mar. 1993.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-

resina de páprica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n.16, p. 26-30, 2000.

SELVARAJ, S. *et al.* Acyclovir loaded chitosan nanoparticles for ocular delivery. **Der Pharmacia Lettre**, v. 2, n. 3, p. 420-431, 2010.

SELVARAJAN, V.; MOHANASRINIVASAN, V. Biosynthesis and characterization of ZnO nanoparticles using *Lactobacillus plantarum* VITES07. **Materials Letters**, v. 12, n. 1, p. 180-182, dec., 2013.

SHEET, E. M.; SALEH, S. M.; HAMED, A. Y. Primary Identification of Eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) wood lignina monomers by FT-IR spectroscopy. **Mesopotamia Journal of Agriculture**, v. 35, n.1, p. 10-17. 2007.

SIEGRIST, M. *et al.* Perceived risks and perceived benefits of different nanotechnology foods and nanotechnology food packaging. **Appetite**, v. 51, n. 5, p. 283-290, mar., 2008.

SILVA, D. A. *et al.* Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 437-441, mar. 2009.

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

SPADA, J. C. **Uso do amido de pinhão como agente encapsulante**. 2011. 147 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SUAVE, J. *et al.* Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, dez. 2006.

TANG, D.-W. *et al.* Characterization of tea catechins-loaded nanoparticles prepared from chitosan and edible polypeptide. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 33-41, jan. 2013.

TODOROV, S. D.; LE BLANC, J. G.; FRANCO, B. D. G. M. Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. **World Journal Microbiol Biotechnol**. São Paulo, v. 28, n. 3, p. 973-984, sept. 2011.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. **Food Chemistry**, v.126, n.1, p. 228-235, may 2011.

VALLILO, M. I. *et al.* Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.BERG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 805-810, out./dez. 2006.

VITORINO FILHO, R. N. L. **Uso de polissacarídeo extraído do exsudato de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) na terapêutica tópica de feridas.** 2011. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. **Documentos florestais**, n. 17, p. 1-26, ago. 2003.

WANG, J. *et al.* Necessity and approach to integrated nanomaterial legislation and governance. **Science of the Total Environment**, v. 442, n. 1, p. 56-62, jan. 2013.

WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Antibacterial activity of essential oils from australian native plants. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 7, p. 642-646, jul. 2005.