



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LÁYSA ROCHA LIMA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS**

FORTALEZA

2019

LÁYSA ROCHA LIMA

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.
Orientador: Dr. Rodrigo Silveira Vieira
Coorientadora: Dra. Fábiana Karine Andrade

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L698c Lima, Láysa Rocha.
Caracterização e avaliação da atividade biológica de micropartículas de quitosana contendo óleos essenciais /
Láysa Rocha Lima. – 2019.
90 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.

Coorientação: Profa. Dra. Fábiana Karine Andrade.

1. Quitosana. 2. Micropartículas. 3. Óleo de Copaíba. 4. Óleo Essencial de Gerânio. 5. Óleo Essencial de
Lemongrass. I. Título.

CDD 660

LÁYSA ROCHA LIMA

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 17/06/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Profa. Dra. Selene Maia de Moraes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Aos meus pais, Conceição de Maria e Antônio Carlos, por todo amor e dedicação, pelo apoio incondicional e constante incentivo.

Ao meu irmão, João Cândido, e ao meu namorado, Túlio, pelo companheirismo e por todo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu professor orientador Dr. Rodrigo Silveira Vieira pela orientação, disponibilidade e apoio.

À Dra. Fábila Karine Andrade, pela coorientação, por todo apoio e disponibilidade, que foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

À professora Dra. Selene Maia de Moraes, agradeço pela colaboração e suporte, que foram fundamentais na elaboração desta pesquisa.

Aos professores Dra. Marisa Masumi Beppu, Dra. Maria Valderez Ponte Rocha e Dr. Roberto Nicolete pelas contribuições pertinentes para a conclusão deste trabalho.

As minhas amigas Silvia Shelly, Janelene Eloi, Lana Garcia, Érika Patrícia Gomes, agradeço por toda ajuda e incentivo, que foram de grande importância para o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

À Dra. Arcelina Pacheco e Daniela Ribeiro Alves pela colaboração e disponibilidade.

Aos demais amigos do NPL (UFC), do LPQN (UECE), LABPIM (UFC) e da Embrapa Agroindústria Tropical, pela colaboração e disponibilidade, pela estrutura oferecida nestes laboratórios, que foram fundamentais para as atividades desenvolvidas durante esta pesquisa.

À FUNCAP pela concessão da bolsa de mestrado, possibilitando a minha dedicação exclusiva a esta pesquisa.

RESUMO

Os óleos essenciais (OEs) são compostos bioativos com potencial terapêutico, apresentando inúmeras atividades biológicas tais como: analgésica, anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana, sendo por isso, descritos como terapia alternativa ou coadjuvante a tratamentos convencionais. No entanto, os OEs são suscetíveis à degradação por agentes físicos e químicos, necessitando de uma proteção externa, que pode ser proporcionada pelo seu encapsulamento dentro de partículas à base de quitosana, um polímero biocompatível e biodegradável. Assim, o objetivo deste estudo foi produzir micropartículas de quitosana carregadas com óleo resina de copaíba e óleos essenciais (MP-OEs) de lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*), gerânio (*Pelargonium x ssp*) e copaíba (*Copaifera officinalis*), e avaliar a atividade biológica das micropartículas quanto à inibição da acetilcolinesterase, toxicidade frente à *Artemia salina* e ensaio de hemólise. As micropartículas foram produzidas por *spray drying* e caracterizadas quanto à eficiência (EE) e teor de encapsulamento (TE), MEV, distribuição de tamanho de partícula, potencial zeta, análises térmicas e FTIR. Os óleos de lemongrass, gerânio e copaíba foram analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa, sendo os principais componentes: o citral (83,17%), o citronelol (24,53%) e o β -cariofileno (51,49% e 58,96%), respectivamente. A EE foi obtida na faixa de 4,8 – 58,6%, sendo as NP-OEs de gerânio e óleo resina de copaíba as que apresentaram os melhores resultados. As micropartículas apresentaram geometria esférica e tamanho médio variando entre 2 μm e 3 μm . Os valores do potencial zeta dos NP-OEs foram positivos (+29 a +47 mV). Os termogramas indicaram a estabilidade térmica das NP-OEs, apresentando uma maior degradação acima de 250 °C. Baseado nos resultados de inibição da acetilcolinesterase pode-se inferir que os óleos essenciais e as micropartículas apresentaram boa atividade (IC_{50} na faixa de 11,92 $\mu\text{g/mL}$ a 28,18 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 25 min de incubação da enzima), já a atividade contra a *Artemia salina* mostrou que os EOs de gerânio e copaíba apresentaram maior toxicidade. As micropartículas não apresentaram caráter hemolítico em concentrações até 0,1 mg/mL. Ensaio *in vitro* de liberação dos OEs presentes nas micropartículas também foram realizados e os resultados evidenciam o potencial uso das micropartículas de quitosana como dispositivo para a liberação controlada de óleos essenciais.

Palavras-chave: Quitosana, Micropartículas, Óleo de Copaíba, Óleo Essencial de Gerânio, Óleo Essencial de Lemongrass.

ABSTRACT

Essential oils (EOs) are bioactive compounds with therapeutic potential, presenting innumerable biological activities such as: analgesic, anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial, so they have been described as an alternative or as supporting therapy to conventional treatments. However, EOs are susceptible to degradation by physical and chemical agents, requiring external protection, which can be provided by encapsulation with chitosan-based particles, a biocompatible and biodegradable polymer. Thus, the objective of this study was to produce chitosan microparticles loaded with copaiba resin oil and essential oils (MP-EO) of Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*), Geranium (*Pelargonium x ssp*) and Copaiba (*Copaifera officinalis*), and evaluate the biological activity of the microparticles for acetylcholinesterase inhibition, toxicity to *Artemia salina* and hemolysis assay. Microparticles were produced by spray drying and characterized by efficiency (EE) and encapsulation content (EC), SEM, particle size distribution, zeta potential, thermal analysis and FTIR. The Lemongrass, Geranium and Copaiba were analyzed by GC-MS, and the main components are citral (83.17%), citronellol (24.53%) and β -caryophyllene (51.49% and 58.96%), respectively. The EE was in the range of 4.8 – 58.6%, in which the MP-EOs with copaiba resin oil and geranium presented the better results. The microparticles presented spherical morphology and the average size range was 2 μm to 3 μm . Zeta potential values of the MP-EOs were found to be positive (+29 to +47 mV). The thermograms indicated thermal stability of MP-EOs with higher degradation over 250 °C. Based on acetylcholinesterase inhibition activity results, the essential oils and microparticles had good activity (IC_{50} in the range 11.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 28.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ within 25 min of enzyme incubation), and the activity against *Artemia salina* showed that the EOs of geranium and copaiba presented higher toxicity. All microparticles were non-hemolytic at concentrations up to 0.1 mg/mL. *In vitro* assays of EO release from the microparticles were also performed and the results evidenced the potential use of chitosan microparticles as a system for the controlled release of essential oils.

Keywords: Chitosan, Microparticles, Copaiba Oils, Geranium Essential Oil, Lemongrass Essential Oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Folhas e frutos da <i>Copaifera officinalis</i>	19
Figura 2	– Fórmula estrutural dos ácidos diterpênicos encontrados no óleo de copaíba	19
Figura 3	– Fórmula estrutural do β -cariofileno	20
Figura 4	– <i>Cymbopogon flexuosus</i> (lemongrass)	21
Figura 5	– Fórmula estrutural do neral e do geranial	22
Figura 6	– Flores de Gerânio (<i>Pelargonium graveolens</i>)	22
Figura 7	– Fórmula estrutural do citronelol	23
Figura 8	– Fórmula estrutural do geraniol	23
Figura 9	– Representações dos tipos de nanopartículas polimérica	24
Figura 10	– <i>Spray dryer</i> : 1) Amostra líquida; 2) Bomba; 3) Câmara de secagem; 4) Cilindro coletor da amostra seca	27
Figura 11	– Fórmula estrutural da quitina e da quitosana	28
Figura 12	– Síntese e hidrólise da acetilcolina	29
Figura 13	– Ensaio de liberação do óleo essencial encapsulado na micropartícula utilizando membrana de diálise	39
Figura 14	– Cromatograma CG-EM do óleo essencial de gerânio	42
Figura 15	– Cromatograma CG-EM do óleo essencial de lemongrass	42
Figura 16	– Cromatograma CG-EM do óleo essencial de copaíba	43
Figura 17	– Cromatograma CG-EM do óleo resina de copaíba	43
Figura 18	– Micrografia das micropartículas: (A) MQ; (B) MORC; (C) MOEC; (D) MOEC-T ₈₀ ; (E) MOEL1; (F) MOEL2; (G) MOEL-T ₈₀ ; (H) MOEG1; (I)MOEG2; (J) MOEG-T ₈₀	49
Figura 19	– Gráficos de distribuição de tamanho de partículas ajustados a curva de Gauss	52
Figura 20	– Espectro de infravermelho para quitosana comercial, micropartícula de quitosana e ORC	56
Figura 21	– Espectro de infravermelho para as micropartículas	57

Figura 22	– Curvas termogravimétricas da quitosana comercial (Qt), do óleo resina de copaíba (OR) e dos óleos essenciais de copaíba (OEC), lemongrass (OEL) e gerânio (OEG): A) TGA; B) DTG	58
Figura 23	– Curvas termogravimétricas das micropartículas: A) TGA; B) DTG	59
Figura 24	– DSC do óleo resina de copaíba e dos óleos essenciais de copaíba, lemongrass e gerânio	62
Figura 25	– DSC das micropartículas	63
Figura 26	– Perfil de liberação da micropartícula com OE de gerânio na proporção 1:5 (MOEG2) em pH 2,0 e 7,4	64
Figura 27	– Atividade de inibição da AChE dos óleos, da quitosana comercial e da Anfotericina B e fisiostigmina no tempo de 25 min	67
Figura 28	– Atividade de inibição da AChE das micropartículas no tempo de 25 min	68
Figura 29	– Atividade de inibição da AChE das micropartículas, óleos e Anfotericina B no tempo de incubação de 48h	69
Figura 30	– Estudo de hemocompatibilidade das micropartículas	71
Figura 31	– Curva de calibração dos OE de gerânio (214,5 nm) e lemongrass (229nm) em etanol	87
Figura 32	– Curva de calibração do óleo resina (229nm) e do óleo essencial de copaíba (219nm) em etanol	87
Figura 33	– Curva de calibração dos OE de Gerânio (205 nm) em PBS e 10% (v/v) de Etanol (95% PA)	88
Figura 34	– Curva de calibração dos OE de Gerânio (203,5 nm) em HCl e 10% (v/v) de Etanol (95% PA)	88
Figura 35	– Modelo cinético de ordem zero	89
Figura 36	– Modelo cinético de primeira ordem	89
Figura 37	– Modelo cinético de Higuchi	90
Figura 38	– Modelo cinético de Korsmeyer-Peppas	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Condições de operação do <i>spray dryer</i> para cada amostra de micropartícula obtida	35
Tabela 2	– Composição percentual dos principais constituintes dos óleos essenciais analisados no CG-EM	44
Tabela 3	– Eficiência (EE), teor (TE) e o rendimento (RE) do processo de encapsulamento das micropartículas	46
Tabela 4	– Potencial zeta para as micropartículas e para quitosana	54
Tabela 5	– Análise termogravimétrica para a quitosana, os óleos e para as micropartículas	60
Tabela 6	– Coeficientes de correlação dos modelos cinéticos de liberação	65
Tabela 7	– Toxicidade das amostras frente à <i>Artemia salina</i>	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Plantas medicinais – óleos essenciais	17
3.1.1	Óleo de Copaíba	18
3.1.1.1	Óleo resina de copaíba	19
3.1.1.2	Óleo essencial de copaíba	20
3.1.2	Óleo essencial de Lemongrass (<i>Cymbopogon flexuosus</i>)	21
3.1.3	Óleo essencial de Gerânio (<i>Pelargonium graveolens</i>)	22
3.2	Encapsulamento de óleos essenciais	23
3.2.1	Micropartículas e nanopartículas poliméricas	24
3.2.1.1	Polimerização de monômeros	25
3.2.1.2	Polímeros pré-formados	25
3.2.2	Spray drying	26
3.3	Quitosana	28
3.4	Acetilcolinesterase	29
3.5	Artemia salina	31
3.6	Liberação controlada de fármacos	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Materiais	34
4.2	Caracterização dos óleos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa	34
4.3	Preparação das micropartículas de quitosana incorporadas com óleo essencial	34
4.4	Teor e eficiência de encapsulamento e rendimento do processo	36
4.5	Caracterização das micropartículas	37
4.5.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
4.5.2	Distribuição do tamanho das micropartículas	37
4.5.4	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	38

4.5.5	<i>Termogravimetria</i>	38
4.5.6	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	38
4.6	Perfil de liberação <i>in vitro</i>	38
4.7	Avaliação da atividade biológica das micropartículas e dos óleos essenciais	39
4.7.1	<i>Atividade de inibição da acetilcolinesterase</i>	39
4.7.2	<i>Toxicidade em Artemia salina</i>	40
4.7.3	<i>Hemólise</i>	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Caracterização dos óleos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa	42
5.2	Teor e eficiência de encapsulamento e rendimento do processo	45
5.3	Caracterização das micropartículas	48
5.3.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	48
5.3.2	<i>Distribuição do tamanho das micropartículas</i>	51
5.3.3	<i>Potencial zeta</i>	54
5.3.4	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	55
5.3.5	<i>Termogravimetria</i>	57
5.3.6	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	61
5.4	Perfil de liberação <i>in vitro</i>	64
5.5	Avaliação da atividade biológica das micropartículas e dos óleos essenciais	66
5.5.1	<i>Atividade de inibição da acetilcolinesterase</i>	66
5.5.2	<i>Toxicidade em Artemia salina</i>	69
5.5.3	<i>Hemólise</i>	71
6	DISCUSSÃO GERAL	73
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO	87
	APÊNDICE B - MODELOS CINÉTICOS APLICADOS	89

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais extraídos de plantas, como os óleos essenciais, no tratamento de diversas enfermidades, incentiva o estudo das propriedades terapêuticas desses produtos para o desenvolvimento de novas terapias. Os óleos essenciais são misturas de diversos compostos voláteis, biosintetizados pelas plantas como metabólitos secundários, tais como os terpenos, terpenóides e compostos fenólicos, que apresentam atividades biológicas como: anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antifúngica, analgésica, antiséptica, inseticida, antiparasitária, antioxidante, cicatrizante, dentre outras. A composição dos óleos essenciais varia de acordo com a espécie da planta e também pode ser influenciada por fatores ambientais, como: o tipo de solo, clima, época da colheita, processo de extração, etc. (EL ASBAHANI *et al.*, 2015; RAJAEI *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017).

O Brasil destaca-se pelos seus diferentes biomas, como exemplo a Caatinga, o Cerrado, a Mata Atlântica e principalmente a Amazônia, os quais apresentam uma enorme biodiversidade, com diversas espécies de plantas com propriedades terapêuticas, capazes de contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos. A planta do gênero *Copaifera*, conhecida como copaíba, copaibeira ou pau-de-óleo possui ampla distribuição no território brasileiro, o óleo de copaíba muito utilizado como anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante, apresenta outras aplicações além do uso medicinal, também é utilizado como combustível de iluminação, como fixador de odores, em aditivos de alimentos, cremes e sabonetes. Outro óleo que apresenta propriedades biológicas é o óleo essencial de capim-limão, ou óleo de lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*), como é conhecido internacionalmente, é utilizado como calmante na aromaterapia, apresenta aroma cítrico, devido à alta quantidade do citral, sendo por isso, aplicado também em fragrâncias, perfumes e alimentos. O óleo essencial de gerânio, também é utilizado na medicina popular e na aromaterapia, como calmante, analgésico, cicatrizante, dentre outras. O gerânio pertence ao gênero *Pelargonium*, uma planta aromática, que apresenta uma essência agradável de rosas e por isso, também tem ampla aplicação na fabricação de fragrâncias, perfumes e cosméticos (BALTI *et al.*, 2018; DEBONE *et al.*, 2019; TABARI, M. A. *et al.*, 2017; TOBOUTI *et al.*, 2017).

Assim, além da utilização terapêutica, os óleos essenciais possuem também ampla aplicação nas indústrias de perfumes e fragâncias, cosméticos, alimentos, bebidas, dentre outras. Porém, a utilização direta dos óleos essenciais pode ser comprometida, devido algumas desvantagens, como a insolubilidade em água, volatilidade e sensibilidade a fatores ambientais, sendo necessário o uso de técnicas de encapsulamento visando à proteção dos

óleos essenciais, aumentando sua estabilidade e consequente melhora da eficiência de sua aplicação (EL ASBAHANI *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2017).

Nesse contexto, a quitosana, polímero natural, utilizada na indústria farmacêutica, por apresentar atividade antimicrobiana e antioxidante, além de ser biocompatível e biodegradável, também tem ganhado destaque como material de suporte, na síntese de sistemas de encapsulamento. As micropartículas são capazes de proteger os componentes bioativos contra degradação, além de diminuir uma possível toxicidade e de proporcionar uma liberação controlada, assegurando assim, vantagens como a redução do número de dosagens e a diminuição ou eliminação de possíveis efeitos colaterais (GRIGORAS, 2017; MUXIKA *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2017). Assim, os sistemas de encapsulamento de produtos naturais biologicamente ativos, como os óleos essenciais, apresentam papel importante na busca por soluções às dificuldades vinculadas à terapia convencional. As limitações apresentadas por alguns tratamentos, à base de compostos sintéticos, estimulam a pesquisa por alternativas mais eficientes e menos agressivas, capazes de auxiliar na cura de diversas doenças.

Objetivando superar estes desafios, como a volatilidade e a sensibilidade a degradação, além de buscar aumentar a eficiência das atividades biológicas dos óleos essenciais, através de uma liberação sustentada, este trabalho teve como proposta o encapsulamento desses óleos em micropartículas de quitosana, com intuito de produzir sistemas carreadores estáveis de bioativos com potencial aplicação farmacêutica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir, caracterizar e avaliar a atividade biológica de micropartículas de quitosana contendo óleo resina de copaíba e óleos essenciais de lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*), gerânio (*Pelargonium x ssp*) e copaíba (*Copaifera officinalis*).

2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar os óleos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa
- b) Produzir as micropartículas de quitosana por *spray drying*.
- c) Determinar a eficiência, o teor e o rendimento de encapsulamento.
- d) Caracterizar as micropartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura, distribuição de tamanho de partícula, Potencial Zeta, Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Análises Térmicas (TGA e DSC).
- e) Avaliar a liberação *in vitro* dos óleos essenciais das micropartículas.
- f) Avaliar a atividade biológica das micropartículas e dos óleos quanto à inibição da acetilcolinesterase, toxicidade frente à *Artemia salina* e ensaio de hemólise.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plantas medicinais – óleos essenciais

Baseado na prática histórica do uso popular de plantas medicinais, muitas pesquisas comprovam, que essas são fontes potenciais de agentes terapêuticos, servindo para o alívio ou cura de enfermidades. No Brasil é possível encontrar uma ampla variedade de plantas, que são utilizadas como alternativa natural no tratamento e prevenção de várias doenças. Os compostos biologicamente ativos podem ser encontrados em diversas partes das plantas, como folhas, flores, sementes e raízes, utilizadas na obtenção de extratos vegetais e óleos essenciais. O estudo das propriedades biológicas dessas plantas e de seus derivados apresenta importância significativa no desenvolvimento de novos fármacos, que possam apresentar vantagens em relação aos fármacos tradicionais, como menor toxicidade e maior eficácia (ACCIOLY, 2009; STEFFENS 2010).

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis, biossintetizados como metabólitos secundários por espécies de plantas aromáticas, e são produzidos em diversos órgãos das plantas. Essas substâncias são sintetizadas para desempenhar funções importantes, como de defesa do vegetal contra patógenos e herbívoros, proteção a estresse abiótico, servem para atrair organismos benéficos ao seu crescimento e reprodução, na adaptação e interação com o meio ambiente, não sendo diretamente relacionados com o desenvolvimento da planta. Os metabólitos secundários são divididos em três grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (PINTO, 2014; VIZZOTTO, 2010).

Os terpenos ou terpenoides representam a maior classe de metabólitos, são produzidos através das vias do ácido mevalônico. São formados por unidades pentacarbonadas (C₅), os isoprenos, sendo classificados de acordo com o número de unidades que o constituem, em: monoterpenos (2 isoprenos – C₁₀), sesquiterpenos (3 isoprenos – C₁₅), diterpenos (4 isoprenos – C₂₀), triterpenos (5 isoprenos – C₃₀), tetraterpenos ou carotenoides (8 isoprenos – C₄₀). Uma planta pode sintetizar vários terpenos diferentes, sendo os monoterpenos e sesquiterpenos, os que ocorrem em maior abundância nos óleos essenciais. Devido ao baixo peso molecular dos monoterpenos e de alguns sesquiterpenos, esses são compostos voláteis e desempenham funções de defesa da planta, já os carotenoides são importantes compostos antioxidantes, que confere ao vegetal, cores entre o amarelo ao avermelhado (EL ASBAHANI *et al.*, 2015; SANTOS, 2015; VIZZOTTO, 2010).

Assim, os óleos essenciais podem ser constituídos por uma variedade de compostos, desde hidrocarbonetos terpênicos aos demais compostos oxigenados, cuja composição varia devido alguns fatores como: a espécie da planta, o ciclo vegetativo, fatores climáticos, tipo de solo e o processo de extração. As propriedades dos óleos são definidas de acordo com sua composição, sendo que os constituintes majoritários geralmente determinam as características do óleo, embora, compostos em menores concentrações também podem conferir propriedades importantes ao óleo. Desde a antiguidade, esses óleos são usados como aromatizantes em alimentos e bebidas, devido ao aroma intenso, como também eram usados como medicamentos, por apresentarem propriedades antimicrobianas. Os óleos essenciais apresentam natureza hidrofóbica, sendo geralmente lipofílico e solúvel em solventes orgânicos, geralmente são incolores ou levemente amarelado (PINTO, 2014; RAJAEI *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017).

3.1.1 Óleo de Copaíba

O óleo de copaíba é extraído da planta do gênero *Copaifera*, pertencente à família Leguminosae e a subfamília Caesalpinioideae. Essa árvore (Figura 1) é popularmente chamada de copaíba, podendo chegar a 36 m de altura, das várias espécies descritas, 16 são endêmicas no Brasil e podem ser encontradas em várias regiões brasileiras, principalmente na Amazônia e no Cerrado, bem como, em outros países da América do Sul e na África. Algumas das espécies encontradas no Brasil são: *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora*, *Copaifera langsdorffii*, *Copaifera brasiliensis* Dwyer, *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke (ARRUDA *et al.*, 2019; BARBOSA, 2012; PIERI *et al.*, 2009).

Figura 1 - Folhas e frutos da *Copaifera officinalis*.

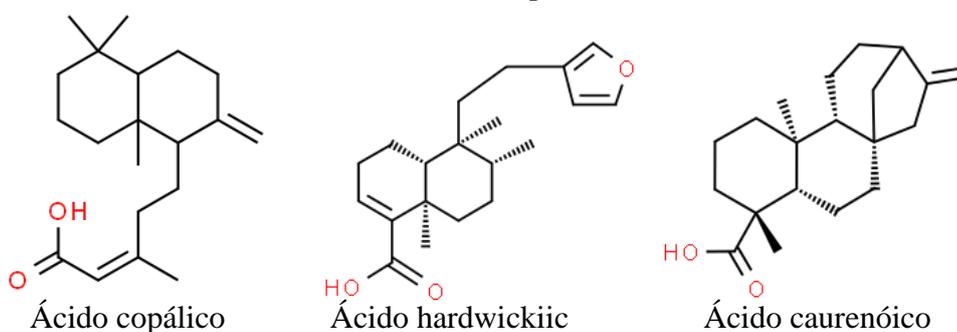


Fonte: www.ferquima.com.br (2019).

3.1.1.1 Óleo resina de copaíba

O óleo resina de copaíba é muito utilizado na medicina popular, sendo extraído diretamente do tronco da árvore. Este óleo é constituído por ácidos diterpênicos, que formam a porção resinosa e encontram-se dissolvidos nas substâncias voláteis, os sesquiterpenos, os quais representam cerca de 90% da massa do óleo. A fração fixa (resinosa) da copaíba começa a se degradar em temperaturas próximas de 300 °C e possuem coloração variando entre o amarelo e o caramelo. Apesar de constituir a menor fração do óleo, os diterpenos estão associados a atividades biológicas importantes, como: anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral. O ácido copálico (Figura 2) é sugerido como marcador químico, por estar presente na maioria das frações resinosas da copaíba, além desse, outros diterpenos comum é o ácido hardwickiic e o ácido caurenóico (Figura 2), que apresenta também atividade antiparasitária (ARRUDA *et al.*, 2019; DEBONE *et al.*, 2019; DEUS, 2011).

Figura 2 - Fórmula estrutural dos ácidos diterpênicos encontrados no óleo de copaíba.



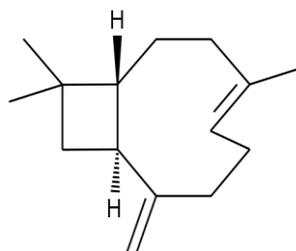
Fonte: www.chemspider.com (2019).

De acordo com a espécie de copaíba, da qual o óleo-resina é extraído, este pode apresentar diferentes concentrações e tipos de sesquiterpenos e diterpenos. A combinação destes dois constituintes pode estar relacionada à atividade antibacteriana do óleo, que provoca danos à parede celular das bactérias, sendo essa atividade demonstrada em diferentes microorganismos, tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas (ARRUDA *et al.*, 2019; TOBOUTI *et al.*, 2017).

3.1.1.2 Óleo essencial de copaíba

O óleo essencial de copaíba é obtido a partir da destilação do óleo resina de copaíba, sendo, portanto, composto apenas pela fração volátil do óleo, que é formado por sesquiterpenos. O principal componente do óleo de copaíba é o sesquiterpeno β -cariofileno (Figura 3), representando cerca de 50% da fração volátil, outros constituintes comuns são: o β -bisaboleno, cadineno, α -humuleno ou β -humuleno e α -copaeno. Assim, como no óleo resina, a composição do óleo essencial de copaíba pode variar dependendo da espécie, de fatores ambientais e dos processos de obtenção do óleo (TOBOUTI *et al.*, 2017).

Figura 3 - Fórmula estrutural do β -cariofileno.



Fonte: www.chemspider.com (2019).

O óleo de copaíba apresenta várias atividades biológicas como: anti-inflamatória, antiviral, antisséptica. Ainda pode ser usado como um analgésico, germicida, expectorante, diurético, para cicatrização de feridas, entre outros. A aplicação do óleo de copaíba também abrange outras áreas como na indústria de perfumes, cosméticos, vernizes e solventes e na indústria alimentícia (PIERI *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2008; TOBOUTI *et al.*, 2017).

3.1.2 Óleo essencial de Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*)

A espécie *Cymbopogon flexuosus* é originária da Índia e pertence à família Poaceae, sendo popularmente conhecida como capim-limão ou lemongrass (Figura 4). É uma das espécies mais difundidas do gênero, bastante cultivada nas regiões tropicais, juntamente com a *Cymbopogon citratus*, conhecida no Brasil como erva-cidreira, capim-cidreira ou capim-santo. O óleo essencial é obtido principalmente por destilação a vapor da parte aérea da planta (AGNOLIN *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2017).

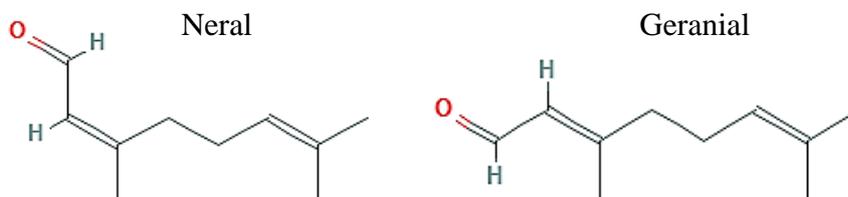
Figura 4 - *Cymbopogon flexuosus* (lemongrass).



Fonte: www.chamel.com.br (2019).

Estudos demonstram as várias propriedades terapêuticas do óleo essencial de lemongrass, que apresenta atividade antimicrobiana e antitumoral, demonstrando citotoxicidade para células cancerígenas humanas. Além de ser utilizado como analgésico, anti-inflamatório, diurético, para distúrbios nervosos e gastrointestinais, é também bastante usado para conferir sabor e fragrância em produtos diversos. O principal componente do óleo essencial de lemongrass é o citral (Figura 5), uma mistura de dois compostos isômeros: o geranial e o neral, que compreende cerca de 70% a 80% da massa do óleo, sendo um indicador da qualidade do mesmo. O citral apresenta atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, é antisséptico e repelente de mosquitos (BALTI *et al.*, 2018; HAN; PARKER, 2017; SHARMA *et al.*, 2009).

Figura 5 - Fórmula estrutural do neral e do geranial.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (2019).

3.1.3 Óleo essencial de Gerânio (*Pelargonium graveolens*)

O óleo essencial de Gerânio (*Pelargonium graveolens*), também conhecido como malva-cheirosa, é obtido a partir da destilação das partes aéreas da planta, e pertencente à família Geraniaceae, bastante cultivada como planta ornamental, devido à beleza das flores (Figura 6) e a sua agradável essência. O óleo essencial de gerânio é muito valorizado pela indústria de perfumes e cosméticos, por causa de seu aroma semelhante às rosas, sendo utilizado para conferir fragrância em diversos produtos, além de ser usado como suplemento ou substituto de óleos de rosas mais caras (CARMEN; HANCU, 2014; RAVINDRA; KULKARNI, 2015; TABARI, M. A. *et al.*, 2017).

Figura 6 - Flores de Gerânio (*Pelargonium graveolens*).

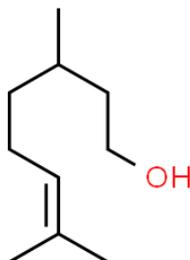


Fonte: www.florafiora.com.br (2019).

Devido à suas propriedades terapêuticas, difundida pela medicina popular, o óleo essencial de gerânio é também utilizado na aromaterapia. Dados encontrados na literatura comprovam a atividade inseticida e antimicrobiana desse óleo, que também é utilizado para auxiliar no tratamento de problemas intestinais e respiratórios e no equilíbrio hormonal. O óleo essencial de gerânio é constituído principalmente por dois monoterpenos, o citronelol

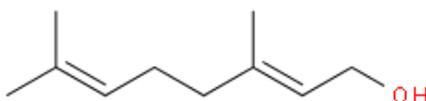
(Figura 7) e o geraniol (Figura 8), sendo este último muito importante na valorização comercial do óleo e apresenta atividade antitumoral (CARMEN; HANCU, 2014; CHO *et al.*, 2016; RAVINDRA; KULKARNI, 2015).

Figura 7 - Fórmula estrutural do citronelol.



Fonte: www.chemspider.com (2019).

Figura 8 - Fórmula estrutural do geraniol.



Fonte: www.chemspider.com (2019).

3.2 Encapsulamento de óleos essenciais

Os óleos essenciais apresentam desvantagens como a baixa solubilidade em água, a volatilidade e instabilidade, sendo susceptíveis à degradação por oxidação, luz ou calor. Assim, é necessário o desenvolvimento de tecnologias, para superar tais limitações e ampliar seu uso. Dessa forma, a utilização de técnicas de encapsulamento, como micro ou nanocarreadores de compostos bioativos é uma estratégia promissora, uma vez que estes sistemas são capazes de proteger os óleos essenciais contra a degradação por fatores ambientais (luz, calor, oxigênio, umidade e acidez), aumentando sua estabilidade e melhorando sua aplicação como agentes de liberação controlada (EL ASBAHANI *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2017).

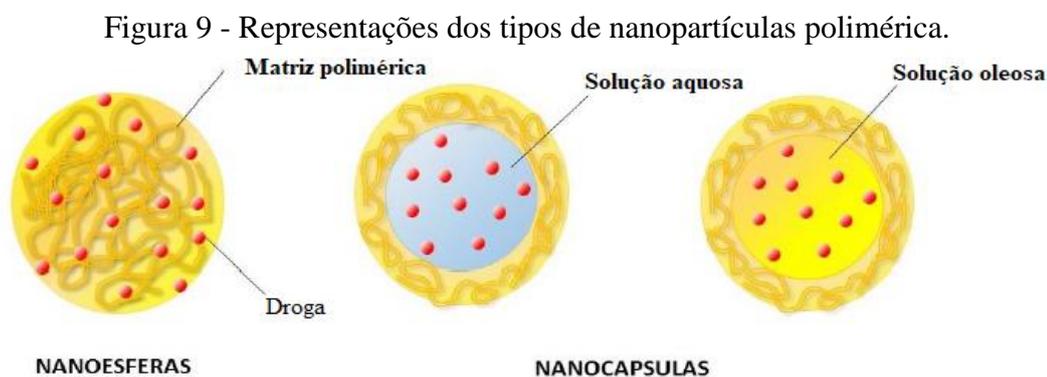
Existem vários sistemas carreadores de fármacos ou de componentes bioativos, dos quais dois tipos de nanopartículas ou micropartículas se destacam: as lipídicas sólidas e as poliméricas. Estas partículas podem ser produzidas em diferentes tamanhos (micrômetros ou nanômetros) e apresentam vantagens como a proteção do ativo e a possibilidade de liberação controlada, entre outras. A escolha do melhor tipo de partícula deve levar em consideração alguns itens como a capacidade de carga de droga, toxicidade, possibilidade de entrega

localizada (alvo), produção em larga escala e custos gerais (HARMS; MÜLLER-GOYMANN, 2011).

3.2.1 *Micropartículas e nanopartículas poliméricas*

Partículas poliméricas da ordem de micrômetros ou nanômetros podem ser obtidas a partir de polímeros sintéticos como os poliésteres alifáticos (poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico), poli (ϵ -caprolactana) (PCL)) e o polietileno glicol (PEG), ou a partir de polímeros naturais como a quitosana, alginato, gelatina, albumina entre outros. Esses materiais poliméricos podem ser biodegradáveis ou não, mas para o uso dessas nano/micropartículas como carreadores de princípios ativos, a preferência é que o polímero seja biocompatível, ou seja, que não deve induzir reações tóxicas ou imunológicas, e que o polímero seja biodegradável, podendo ser eliminado do corpo por mecanismos metabólicos naturais, evitando procedimentos cirúrgicos (PEIXOTO, 2013; MENESE, 2016). Alguns polímeros podem ser citotóxicos, entretanto, esses podem ser quimicamente modificados, obtendo propriedades físico-químicas desejadas, diminuindo a toxicidade dos polímeros e direcionando as nano/micropartículas para alvos específicos (MARCATO, 2009; MEHNERT; MADER, 2012).

As micropartículas ou nanopartículas poliméricas podem ser classificadas em: microesferas ou nanoesferas, na qual o composto ativo encontra-se disperso na matriz polimérica sólida, assim como microcápsulas ou nanocápsulas, que é uma estrutura do tipo reservatório, a qual possui um núcleo líquido bem definido (aquoso ou oleoso) envolto pelo material polimérico sólido (SALAZAR, 2015; CRUCHO; BARROS, 2017). A Figura 9 mostra os tipos de nanopartículas poliméricas.



Uma das principais desvantagens das nano/micropartículas polimérica é o uso de solventes orgânicos no processo de produção, que podem persistir como resíduos, aumentando a citotoxicidade das formulações, além de outras impurezas como: sais, outras partículas e demais resíduos de reagente, que podem ficar adsorvidos nas nano/micropartículas e presentes na suspensão. Outra desvantagem é a dificuldade na ampliação de escala dos processos de obtenção. Porém, em comparação com as partículas do tipo lipídicas sólidas, as partículas poliméricas apresentam uma maior capacidade de carga, melhor eficiência de encapsulamento e maior estabilidade (CRUCHO; BARROS, 2017; HARMS; MÜLLER-GOYMANN, 2011; MEHNERT; MADER, 2012).

As nano/micropartículas poliméricas podem ser obtidas a partir da polimerização de monômeros ou a partir de polímeros pré-formados. A escolha da técnica a ser utilizada para a preparação das nano/micropartículas depende principalmente do tipo de polímeros, das propriedades do composto ativo e das características almejadas para as partículas (CRUCHO; BARROS, 2017).

3.2.1.1 Polimerização de monômeros

Na polimerização de monômeros, os polímeros são obtidos em forma nano/micropartículas, através de métodos como: polimerização em emulsão, polimerização interfacial ou polimerização por radiação controlada. Uma das desvantagens dessas técnicas é a formação de resíduos tóxicos, que requerem purificações extensivas para conseguir obter um produto que possa ser utilizado com fins farmacêuticos (CRUCHO; BARROS, 2017).

3.2.1.2 Polímeros pré-formados

As nano/micropartículas poliméricas podem ser obtidas a partir da mistura de uma fase orgânica, contendo o polímero e o ativo, a uma fase aquosa de tensoativo, formando primeiramente uma emulsão e com a remoção do solvente ocorre à precipitação das partículas. As técnicas mais comuns que obedecem a essas etapas são: a emulsificação-evaporação de solvente, a emulsificação-difusão de solvente e *salting-out*. Existem outras técnicas em que a formação da emulsão não é uma etapa necessária para a obtenção das nano/micropartículas poliméricas, como a técnica de nanoprecipitação, diálise e a técnica de fluido supercrítico (CRUCHO; BARROS, 2017).

Além dessas técnicas anteriormente citadas, existe também a gelificação iônica, em que nano/micropartículas são obtidas após o gotejamento da solução de polímero em uma solução aquosa de tripolifosfato de sódio (TPP). Essa dispersão passa pelo processo de secagem, a fim de aumentar a estabilidade das micropartículas poliméricas, esse processo pode ser realizado, por exemplo, através da liofilização ou pelo *spray drying* (BUGNICOURT; LADAVIÈRE, 2016). As micropartículas poliméricas também podem ser obtidas diretamente por *spray drying*, como por exemplo, micropartículas de quitosana podem ser obtidas a partir de uma solução de quitosana com o ativo, sem a presença de TPP (BLANCO, 2011; LI *et al.*, 2010).

3.2.2 *Spray drying*

A secagem por aspersão ou atomização, conhecido como *spray drying*, consiste em pulverizar um fluido, através de um atomizador para dentro de uma câmara, na qual as gotículas do fluido são dispersas e entram em contato com uma corrente controlada de ar quente. A transferência de calor permite uma rápida evaporação do solvente, presente na superfície das gotículas, formando o produto em pó, o qual, é depositado em um cilindro coletor, como mostra a Figura 10. A atomização é responsável pelo aumento da área superficial das gotículas, melhorando a taxa de transferência de calor e resultando em uma secagem muito rápida. Desse modo, preserva-se o produto das altas temperaturas, devido ao curto tempo de contato com o ar quente, a fim de evitar sua degradação térmica (OLIVEIRA, 2012; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Figura 10 - *Spray dryer*: 1) Amostra líquida; 2) Bomba; 3) Câmara de secagem; 4) Cilindro coletor da amostra seca.



Fonte: autor.

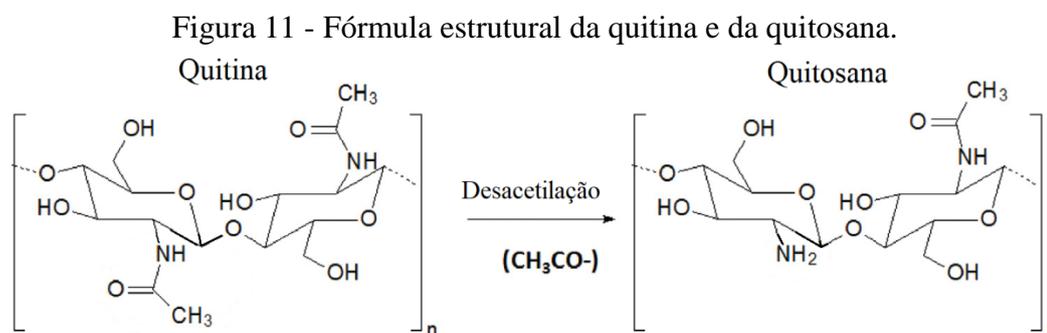
A temperatura do ar de entrada é um dos parâmetros mais importantes no processo de secagem por aspersão, essa deve estar acima do ponto de ebulição do solvente utilizado, geralmente entre 150 °C a 220 °C. A vazão de alimentação também influencia na qualidade do produto e quanto maior, a temperatura constante, maior o tamanho das partículas formadas. A técnica de *spray drying* apresenta algumas vantagens consideráveis, como o baixo custo, por exemplo, em relação à liofilização, a possibilidade de produção em escala industrial e a flexibilidade do processo, sendo bastante utilizada na indústria alimentícia, farmacêutica, na secagem de extratos vegetais, na microencapsulação e nanoencapsulação, além disso, esse método não exige o uso de solventes orgânicos, assim, não produz resíduo e não necessita de etapas de purificação (ESTEVINHO *et al.*, 2013; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Alguns trabalhos, encontrados na literatura, relatam o encapsulamento de diferentes ingredientes alimentares pela técnica de *spray drying*, como óleo de peixe, óleo de soja, sabores de orégano, óleo resina de cominho, até carotenoides, como o licopeno (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Oliveira *et al.* (2014) encapsularam o óleo essencial de *Lippia sidoides* em matrizes de alginato e goma de caju, por *spray drying*, operando a uma

temperatura de entrada de 170 °C, enquanto, Kumar *et al.* (2017) encapsularam o composto esqualeno, utilizando quitosana como material de parede, através da técnica de *spray dring*.

3.3 Quitosana

A quitosana é um biopolímero proveniente da desacetilação alcalina da quitina, um polímero presente em abundância na natureza e o principal componente do exoesqueleto de artrópodes e da parede celular de fungos e leveduras. A quitina é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, quando o seu grau de desacetilação é superior a 50% essa passa a ser um copolímero, denominado de quitosana. A Figura 11 mostra a estrutura química da quitina e da quitosana (BLANCO, 2011; MUXIKA *et al.*, 2017; SALAZAR, 2015).



Fonte: Muxika *et al.* (2017).

A quitosana é um polissacarídeo de cadeia linear composto por unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações glicosídicas β -(1-4). Esse polímero se dissolve em soluções de ácidos orgânicos ou ácidos inorgânicos diluídos, devido à protonação do grupo amino presente na cadeia polimérica, que se torna catiônica, assim a quitosana é capaz de interagir com várias moléculas, entre essas as membranas celulares (carregadas negativamente) de microrganismos, apresentando dessa forma atividade antimicrobiana. O grupo amino é também responsável por diversas outras reações químicas, fornecendo propriedade antioxidante, biocompatibilidade e biodegradabilidade (GRIGORAS, 2017; KUMAR *et al.*, 2017; MUXIKA *et al.*, 2017; PILLAI *et al.*, 2009).

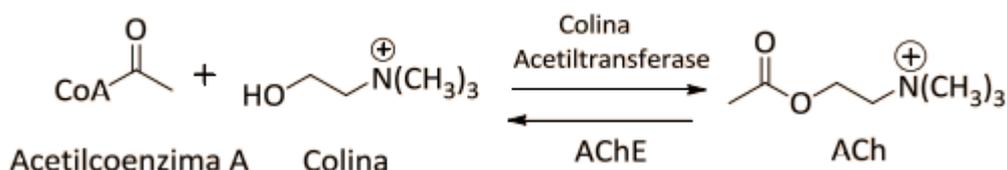
Devido às propriedades apresentadas pela quitosana, sua aplicação é ampla e em diferentes áreas, por exemplo, no tratamento de águas residuais, como adsorvente de poluentes orgânicos e inorgânicos, na agricultura como antivírus para plantas, na indústria alimentícia como ingrediente funcional ou em embalagens ajudando na manutenção da qualidade dos produtos. A quitosana também pode ser aplicada como curativo para

cicatrização de feridas, na área de cosméticos como aditivo para protetores solares, na indústria de papel melhorando propriedades mecânicas, na indústria têxtil no desenvolvimento de materiais biocompatíveis e antibacterianos. Além disso, a quitosana apresenta propriedades tais como gelificação *in situ*, mucoadesiva e filmogênica, que a torna vantajosa na preparação de sistemas de liberação controlada de compostos ativos (GARCIA *et al.*, 2018; MUXIKA *et al.*, 2017; SALAZAR, 2015). Diversos estudos encontrados na literatura abordam o uso da quitosana como matriz polimérica no preparo de micro/nanoemulsões ou no micro/nanoencapsulamento de óleos essenciais. Shetta *et al.* (2019) produziram micropartículas de quitosana para encapsular óleos essenciais de hortelã-pimenta e chá verde, Hasani *et al.* (2018) prepararam micropartículas com óleo essencial de limão em um sistema Chitosan-Hicap, já Dima *et al.* (2016) produziram microcápsulas de quitosana com óleo essencial de *Coriandrum sativum L.*

3.4 Acetilcolinesterase

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor, que constitui o sistema colinérgico presente no sistema nervoso central e periférico e também na junção neuromuscular. No sistema de neurotransmissão colinérgica, a acetilcolina é sintetizada a partir da colina e da acetilcoenzima A, através da catálise da colina acetiltransferase, quando ocorre um impulso nervoso a ACh é liberada pelo neurônio transmissor para a região sináptica e se liga aos receptores colinérgicos, dando continuidade a transmissão, após essa interação, a ACh é então, hidrolisada pela catálise da enzima acetilcolinesterase (AChE), produzindo colina e acetato, como mostra a Figura 12 (ARAÚJO, 2016; MOTA, 2012).

Figura 12 - Síntese e hidrólise da acetilcolina.



Fonte: Araújo *et al.* (2016).

A Doença de Alzheimer (DA) está relacionada às disfunções do sistema colinérgico, principalmente pela redução dos níveis de acetilcolina. A inibição da enzima acetilcolinesterase, portanto, permite o aumento do nível de acetilcolina nas sinapses, intensificando a transmissão colinérgica. Assim, alguns anticolinesterásicos são utilizados no

tratamento dessa doença, como a tacrina, galantamina, donepezil e a rivastigmina. Entretanto, além desses fármacos apresentarem eficácia relativamente baixa, também apresentam como efeitos colaterais náuseas, vômitos e diarreias, a tacrina é também altamente hepatotóxica (ARAÚJO, 2016; VENTURA, 2010).

Os fármacos anticolinesterásicos são inibidores reversíveis da AChE, que atrasam a hidrólise da acetilcolina e, assim, prolongam a ação dos receptores colinérgicos, por isso, são chamados de agentes colinérgicos de ação indireta. Além da DA, estes agentes podem ser indicados para tratamento de outras doenças, como o glaucoma, pois conseguem reduzir a pressão intraocular devido ao aumento da transmissão colinérgica, bem como no tratamento e diagnóstico da miastenia gravis, que é uma doença autoimune com falência da neurotransmissão nos músculos esqueléticos e, portanto, os anticolinérgicos aumentam a força de contração dos músculos. A fisostigmina, outro inibidor reversível da AChE, é obtida da *Physostigma venenosum* L. (fava-de-calabar), foi o primeiro inibidor utilizado para a DA, também foi utilizado no tratamento de miastenia gravis e atualmente é utilizado no tratamento de glaucoma (ARAÚJO, 2016; GALLACCI; CORDELLINI; 2016). Já os anticolinesterásicos irreversíveis são compostos organofosforados, sendo geralmente utilizados como: armas químicas, pesticidas e inseticidas, apenas duas substâncias são utilizadas com finalidades terapêuticas, para o tratamento de glaucoma: o isofluorato e o ecotiofato, cuja administração é unicamente por via oftálmica (OLIVEIRA, 2008; MIRA *et al.*, 2010).

A inibição da enzima AChE também pode ser um possível mecanismo de ação leishmanicida, pois o principal fosfolípídio que constitui a membrana plasmática da *Leishmania*, é a fosfatidilcolina (FC), que é sintetizada a partir da colina proveniente do hospedeiro. Portanto, a inibição da enzima reduz os níveis de colina e conseqüentemente, a membrana plasmática do parasita fica comprometida podendo sofrer lise (PULIDO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2015; VILA-NOVA *et al.*, 2012). Estudos na literatura demonstram a relação da atividade de inibição da acetilcolinesterase de extratos de plantas com a atividade leishmanicida. Silva *et al.* (2015) mostraram que extratos da *Annona glabra* L. apresentam boa inibição da AChE e atividade leishmanicida contra *Leishmania infantum chagasi*. Vila-Nova *et al.* (2012), avaliaram a atividade leishmanicida e antiacetilcolinesterase de compostos fenólicos isolados da *Dimorphandra gardneriana* e *Platymiscium floribundum*, destacando a boa atividade da escoparona em ambos os testes. Martins *et al.* (2018) em seus estudos também mostraram uma boa atividade de inibição da AChE e ação leishmanicida dos extratos de *Jatropha gossypifolia* L. (Pião Roxo).

3.5 *Artemia salina*

A *Artemia salina* é um pequeno crustáceo, muito utilizado em testes toxicológicos de produtos naturais, por ser um bioensaio prático, rápido, seguro e econômico. Esse teste pode ser considerado uma avaliação preliminar de compostos bioativos, os quais a toxicidade frente à *Artemia salina* pode indicar uma possível atividade biológica dos mesmos, uma vez que ocorre uma boa correlação com testes mais específicos para atividades: antitumoral, antifúngica, inseticida e antiparasitária, ou seja, uma maior toxicidade sugere um maior potencial para essas atividades (AMARANTE *et al.*, 2011; KARCHESY *et al.*, 2016). Alguns estudos demonstram que a letalidade para a *Artemia salina* pode ser correlacionada à toxicidade frente à *Leishmania*, como no trabalho de Vila-Nova *et al.* (2013), os quais demonstraram que compostos isolados da *Platymiscium floribundum* e *Annona muricata*, com alta toxicidade para a *Artemia salina* apresentaram alta atividade antileishmania contra *L. donovani*, *L. mexicana* e *L. major*. Silva *et al.* (2014) reportaram a alta toxicidade do limãozinho (*Zanthoxylum syncarpum* Tull.) contra a *A. salina*, apresentando também boa atividade leishmanicida contra e *Leishmania infantum chagasi* e atividade larvicida frente o *Aedes aegypti*.

Além disso, a *Artemia salina* também é utilizada como ensaio ecotoxicológico, em ambientes marinhos e na qualidade das águas em geral, determinando o grau de poluição de ambientes aquáticos, bem como na detecção de potenciais poluentes naturais ou sintéticos. A *Artemia salina* também é usada em testes toxicológicos de nanomateriais e na detecção de toxinas de fungos (KARCHESY *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2018).

3.6 Liberação controlada de fármacos

O encapsulamento de compostos bioativos, como os óleos essenciais, possibilita a proteção dos componentes ao meio externo, bem como um melhor aproveitamento do composto pelo organismo e uma liberação mais prolongada, que pode proporcionar um menor número de administrações e a diminuição de efeitos colaterais. Já as formas farmacêuticas convencionais são elaboradas de forma que sua liberação seja rápida após a administração, apresentando dificuldades para manter a concentração plasmática dos fármacos dentro da faixa terapêutica, por um período mais prolongado. Após a primeira dose administrada, a concentração do fármaco no organismo aumenta, até alcançar uma concentração máxima e então, começa a diminuir, devido aos processos metabólicos e de eliminação da droga pelo

organismo, assim, várias doses são necessárias para manter a concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica durante o tratamento. Essa desvantagem gera problemas quanto à ineficácia do medicamento, quando o mesmo se encontra em concentrações abaixo do nível mínimo efetivo, pode levar ao aparecimento de microrganismos resistentes e, se o fármaco alcançar um nível de concentração acima do máximo desejado, pode conduzir a toxicidade. Nesse contexto, os sistemas de liberação controlada de fármacos, têm como objetivo uma liberação por período mais prolongado, de forma a manter as concentrações dentro da faixa terapêutica, diminuindo as dosagens necessárias e conseqüentemente, a toxicidade, aumentando a biodisponibilidade da droga, protegendo o ativo de degradação química ou física e conduzindo-o ao sítio ativo (PEIXOTO, 2013; RAMOS, 2018).

Os mecanismos de liberação do fármaco no organismo podem envolver basicamente, processos de difusão, erosão, intumescimento e estímulos externos, como pH e temperatura. O processo de difusão ocorre devido ao gradiente de concentração, já os processos de erosão, muito associado a materiais biodegradáveis, são controlados por reações químicas de degradação da matriz. Nos processos controlados por solventes, ocorre o aumento da capacidade da matriz de absorver fluidos sem se dissolver, provocando o intumescimento (expansão), que melhora a mobilidade das moléculas do ativo, facilitando a difusão. Os mecanismos de liberação de fármacos variam com o tipo de matriz, o tipo de ativo e do meio em que ocorre, além disso, alguns sistemas podem apresentar uma combinação de mecanismos possíveis. A maioria dos sistemas poliméricos apresentam processos de liberação que abrangem a difusão. Esse fenômeno refere-se ao movimento espontâneo das moléculas, de uma região de alta concentração para uma de menor concentração, em um determinado volume, e pode ser descrito pelas leis de Fick (ESTEVINHO *et al.*, 2013; RAMOS, 2018).

A primeira Lei de Fick descreve a difusão em estado estacionário, ou seja, quando a concentração varia apenas em relação à posição, enquanto que a segunda Lei de Fick é usada para difusão que ocorre em estado não estacionário, ou seja, a concentração varia com o tempo e com a posição. Para sistemas unidimensionais essas duas leis são descritas pelas Equações 1 e 2, respectivamente:

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que o J representa o fluxo difusivo, D é o coeficiente de difusão, o sinal negativo indica que a difusão ocorre no sentido contrario ao gradiente de concentração, o C é a concentração que depende da posição (x) e do tempo (t). Essas equações serviram como base para o desenvolvimento de modelos matemáticos teóricos e empíricos de liberação de fármacos (LAO *et al.*, 2011; RAMOS, 2018).

O modelo cinético de ordem zero (Eq. 3) é considerado o perfil de liberação ideal, uma vez que a taxa de liberação é constante, ou seja, quantidades iguais de fármaco são liberadas por unidade de tempo. Já no modelo cinético de primeira ordem (Eq. 4), a liberação ocorre proporcionalmente à quantidade remanescente de fármaco no interior da matriz. Na prática, algumas formas farmacêuticas apresentam perfil de liberação diferente desses modelos teóricos, e alguns modelos matemáticos empíricos foram desenvolvidos para tentar descrever a cinética de liberação desses sistemas. O modelo de Higuchi (Eq. 5) é baseado na primeira lei de Fick e compreende a difusão em estado estacionário ou pseudoestacionário, este modelo descreve o perfil de liberação de sistemas em que o fármaco encontra-se uniformemente disperso por toda a matriz. O modelo de Korsmeyer-Peppas (Eq. 6), conhecido como lei de potência, é semiempírico e usado para descrever o perfil de liberação de sistemas poliméricos. Este modelo pode ser empregado para vários tipos de mecanismos de liberação, os quais podem ser caracterizados pelo valor de n (LAO *et al.*, 2011; ESTEVINHO *et al.*, 2013; RAMOS, 2018). As equações de cada modelo cinético estão descritas abaixo:

$$\text{Ordem zero:} \quad Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{Primeira ordem:} \quad Q_t = Q_0 e^{-K_1 t} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\text{Higuchi:} \quad Q_t = K_H \sqrt{t} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\text{Korsmeyer-Peppas:} \quad \frac{Q_t}{Q_\infty} = K_k t^n \quad (\text{Eq. 6})$$

Em que Q_0 é a concentração inicial (geralmente é igual à zero), Q_t é a concentração de fármaco liberado no tempo t , os valores de K representam a constante cinética de cada equação, n é o expoente de liberação que define o mecanismo de transporte e $(\frac{Q_t}{Q_\infty})$ representa a fração de fármaco liberado no tempo t .

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A quitosana comercial (Qt) utilizada neste trabalho foi a de baixo peso molecular, com grau de desacetilação de 75-85% e 50.000-190.000 Da, fornecida pela Sigma-Aldrich (Cod: 448869). Segundo Garcia *et al.* (2018), esta quitosana apresenta ação antifúngica contra biofilmes da *Candida spp.*, comparáveis a quitosana de médio e alto peso molecular, além disso, a quitosana de baixo peso molecular apresenta uma menor viscosidade, favorecendo a preparação das formulações.

Os óleos estudados foram obtidos comercialmente, sendo o óleo resina de copaíba, adquirido em feira-livre no estado do Pará, já os óleos essenciais foram comprados na Ferquima Ind. e Com. Ltda, de acordo com a fornecedora, o Óleo essencial de Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) é proveniente da destilação a vapor das folhas, o Óleo essencial de Gerânio Bourbon (*Pelargonium x spp*), da destilação a vapor das flores e o Óleo essencial de copaíba (*Copifera officinalis*), da destilação a vapor do óleo resina de copaíba (Ferquima Ind. e Com. Ltda). A enzima Acetilcolinesterase humana (recombinante, expresso em células HEK 293) foi fornecida pela Sigma-Aldrich.

4.2 Caracterização dos óleos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa

Os óleos essenciais e o óleo resina de copaíba foram analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) em equipamento Shimadzu QP-2010 Ultra. A coluna cromatográfica utilizada foi Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), a temperatura da coluna foi programada de 35 °C a 180 °C aumentando 04 °C/min, de 180 °C a 280 °C a uma taxa de 17 °C/min e a 280 °C por 10 minutos. O gás hélio foi utilizado como gás carreador (24,2 mL/min) e a temperatura do injetor foi de 250 °C. Os compostos foram identificados por seus tempos de retenção relativos na cromatografia gasosa e pela comparação de seus espectros de massa com os presentes no banco de dados (NIST).

4.3 Preparação das micropartículas de quitosana incorporadas com óleo essencial

As micropartículas de quitosana contendo óleos essenciais de copaíba (OEC), lemongrass (OEL), gerânio (OEG) e também óleo resina de copaíba (ORC) foram obtidas

pelo processo de secagem por *spray drying*. Primeiramente, a solução de quitosana foi preparada com 1% (m/v) de massa do polímero dissolvida em ácido acético (0,5% v/v). Após agitação mecânica por um período de 24h, o óleo essencial foi adicionado à solução em diferentes proporções (Tabela 1). Em seguida, utilizou-se um homogeneizador Ultra Turrax (IKA-T25) a 10.000 rpm durante uma hora, logo após, a solução foi sonicada por 2 min, seguindo para o *spray drying*, modelo Buchi Mini Spray Dryer B-290, sendo mantida em agitação magnética até o final do processo de secagem.

Foram obtidas as seguintes micropartículas de quitosana: MORC (carregada com Óleo Resina de Copaíba), MOEC (carregada com OE de Copaíba), MOEL (carregada com OE de Lemongrass) e MOEG (carregada com OE de Gerânio). Para cada óleo foram preparadas amostras, nas proporções de 1:10 e 1:5 de massa de óleo em relação à massa de polímero, com ou sem o surfactante Tween-80 (1% em relação à massa de polímero) resultando em 9 amostras. Uma amostra controle de micropartícula de quitosana (MQ), sem a presença de óleo, foi produzida seguindo o mesmo procedimento descrito acima. As amostras obtidas e as condições de secagem estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições de operação do *spray dryer* para cada amostra de micropartícula obtida.

Amostra	Sigla	Proporção	Surfactante (%)	Temperatura de entrada (°C)
		óleo/polímero (m/m)		
1	MQ	-	-	160
2	MORC	1:10	-	140
3	MOEC	1:5	-	165
4	MOEC-T ₈₀	1:10	1	165
5	MOEL1	1:10	-	165
6	MOEL2	1:5	-	165
7	MOEL-T ₈₀	1:10	1	165
8	MOEG1	1:10	-	165
9	MOEG2	1:5	-	165
10	MOEG-T ₈₀	1:10	1	165

(-) Ausência de óleo ou surfactante.

4.4 Teor e eficiência de encapsulamento e rendimento do processo

A determinação da eficiência do processo de encapsulamento e do teor de óleo encapsulado nas micropartículas de quitosana foi realizada através do espectrofotômetro UV/Visível (modelo Biomate 3S), seguindo a metodologia de Mohammadi, Hashemi e Hosseini (2015) e Martinac *et al.*(2005), com algumas modificações. As amostras (10 mg) foram dissolvidas em 20 mL de uma mistura de HCl (0,01 M) e etanol 95% na razão de 3:2 (v/v). A solução ficou em repouso por um período de aproximadamente 24h e, então, foi submetida ao banho ultrassônico (equipamento UltraSonic Cleaner USC 1450) por 35 minutos e depois centrifugada a 8500 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente (25 °C). O sobrenadante foi coletado e filtrado, e em seguida a absorbância foi medida no espectrofotômetro e calculada a concentração. As análises foram realizadas em triplicata. Uma curva de calibração foi construída para cada um dos óleos em etanol absoluto (ANEXO A).

A eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada a partir da concentração de óleo extraída da micropartícula e determinada na curva de calibração (C), em relação à concentração teórica de óleo da solução inicial (C_t), ou seja, considerando 100% de óleo encapsulado, conforme a Equação 7.

$$EE(\%) = \frac{C}{C_t} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

O teor de encapsulamento (TE) foi calculado de acordo com a Equação 8, em que “C” é a concentração determinada pelo método descrito acima, “V” é o volume de diluição da amostra e “m” é a massa de micropartícula utilizada na análise.

$$TE(\%) = \frac{C \times V}{m} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

O rendimento do processo de encapsulamento (RE) foi determinado pela razão entre a massa de micropartículas produzida (m) e a soma da massa dos componentes de interesse (quitosana (m_q) e OE (m_o)) inseridas inicialmente na formulação, conforme a Equação 9.

$$RE (\%) = \frac{m}{(m_q + m_o)} \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

Testes preliminares também foram realizados com a amostra controle MQ, seguindo o procedimento descrito anteriormente, constatando-se que o polímero não interfere nas leituras do espectrofotômetro, nos comprimentos de onda estudados, apresentados no Anexo A.

4.5 Caracterização das micropartículas

4.5.1 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

As micropartículas foram analisadas quanto à morfologia através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pelo equipamento LEO Electron Microscopy/Oxford (Leo 440). As amostras foram metalizadas e as imagens foram obtidas em três ampliações: 3.000x, 6.000x e 10.000x em dois campos por amostra, com tensão de 15 kV.

4.5.2 *Distribuição do tamanho das micropartículas*

A partir das micrografias obtidas pelo MEV, as micropartículas foram medidas em relação ao tamanho médio com o auxílio do software livre ImageJ 1.52a. Com os dados obtidos, um histograma foi construído e ajustado a uma curva de distribuição normal. Os valores de diâmetro médio foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), com comparações múltiplas pelo teste de Tukey, considerando significativos valores de $p < 0,05$.

4.5.3 *Potencial zeta*

O potencial zeta das micropartículas foi determinado em um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom). As amostras foram dispersas em água (0,5 mg/mL) e colocadas em banho de ultrassom UltraCleaner (USC-1400A) por três minutos antes das leituras.

4.5.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises foram realizadas em equipamento Perkin Elmer modelo Spectrum Two. As amostras de micropartículas foram analisadas em pastilhas de KBr (previamente seco a 105 °C) e os óleos foram analisados em célula para líquido utilizando discos de KBr, na faixa de comprimento de onda de 4.000 a 450 cm^{-1} .

4.5.5 Termogravimetria

As análises termogravimétricas (TGA) das micropartículas foram obtidas no equipamento STA 6.000 analyzer (PerkinElmer Instruments; Shelton, USA) na faixa de temperatura entre 25 °C e 700 °C, utilizando uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio a 50 mL/min. A derivada da curva termogravimétrica (DTG) foi expressa como a variação de massa em função da temperatura.

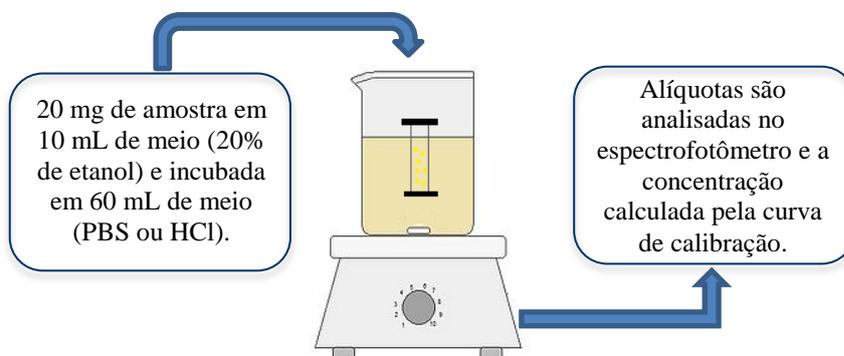
4.5.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As amostras foram analisadas por calorimetria exploratória diferencial no equipamento Q20 DSC (TA Instruments; New Castle, USA), em uma faixa de temperatura de 25 °C a 400 °C com a taxa de aquecimento de 10 °C/min, com fluxo de nitrogênio a uma vazão de 50 mL/min.

4.6 Perfil de liberação *in vitro*

O perfil de liberação do OE da micropartícula foi avaliado em dois meios: uma solução salina tamponada de fosfato (PBS) (pH = 7,4) e em uma solução tampão de HCl (pH = 2,0), seguindo a metodologia de Natrajan *et al.* (2015) com modificações. O estudo foi realizado utilizando-se uma membrana de diálise (12 - 14 KDa), contendo 20 mg de amostra e 10 mL de meio de liberação com 20% (v/v) de etanol (95%). A membrana foi incubada em 60 mL de meio (PBS ou HCl), à temperatura ambiente e agitação suave (Figura 13). Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo específicos, para análise no espectrofotômetro UV-vis (Biomate 3S), sendo a mesma quantidade de meio adicionada novamente ao sistema para manutenção do volume total. A quantidade de OE liberado foi calculada a partir da curva de calibração do óleo em PBS e em HCl (ANEXO A).

Figura 13 - Ensaio de liberação do óleo essencial encapsulado na micropartícula utilizando membrana de diálise.



Fonte: autor.

Os dados obtidos nos ensaios de liberação foram ajustados aos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas, para avaliar a cinética de liberação (KORSMEYER *et al.*, 1983; HIGUCHI, 1963).

4.7 Avaliação da atividade biológica das micropartículas e dos óleos essenciais

4.7.1 Atividade de inibição da acetilcolinesterase

Os testes da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi realizada em placas de 96 poços de fundo chato, utilizando leitor Elisa BIOTEK, baseando-se na metodologia descrita por ELLMAN *et al.* (1961). Foram utilizadas as seguintes soluções por poço: 25 μL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM), 125 μL de 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzólico] (3 mM) na solução Tris/HCL, 50 μL da solução Tris/HCL (50 mM, pH = 8) com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA), 25 μL das amostras dissolvidas em metanol e diluídas 10 vezes na solução Tris/HCL (50 mM, pH = 8) para obter uma concentração final de 0,2 mg/mL (RHEE *et al.*, 2001; TREVISAN *et al.*, 2003). A absorbância foi aferida a 405 nm durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 25 μL da enzima AChE (0,25 U/mL) e a absorbância foi aferida por minuto até o total de 25 minutos e 48 horas de incubação da enzima. Todas as soluções, com exceção da amostra, foram utilizadas como padrão negativo e, a Fisostigmina (Fiso), que é um bom inibidor da acetilcolinesterase, foi utilizada como controle positivo. As amostras foram preparadas em soluções na concentração de 2,0 mg/mL de óleo essencial e de OE encapsulado nas micropartículas e foram diluídas por diluição seriada. A porcentagem de inibição da AChE foi calculada através da comparação das

velocidades de reação das amostras em relação ao branco. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e após os testes, os dados foram tratados e realizado teste de curva de regressão não linear no programa estatístico GraphPad Prism v5.01 para obter os resultados de IC₅₀, sendo esses comparados por teste de Tukey, considerando significativos valores de $p < 0,05$.

4.7.2 Toxicidade em *Artemia salina*

Para o ensaio de letalidade contra *Artemia salina* primeiramente, os ovos foram incubados em água salina, à temperatura do ambiente (entre 24 °C e 29 °C), por um período de 48 horas para eclodirem. As amostras foram preparadas por diluição seriada, em concentrações de 1.000 µg/mL a 1 µg/mL de óleo ou micropartícula. Nos tubos de ensaio contendo as amostras de OE foram adicionados 2,0% de dimetilsulfóxido (DMSO) e água salina, nas amostras de micropartículas foi adicionada apenas água salina. 10 larvas de *Artemia* foram adicionadas nos tubos de ensaio contendo as amostras de óleo e micropartículas, permanecendo incubadas na presença de luz por 24 horas, o número de larvas mortas foi contabilizado após esse período e, então calculado a CL₅₀. Os ensaios foram realizados em triplicata e o controle negativo foi preparado utilizando-se apenas água salina, DMSO e os reagentes utilizados na solubilização das amostras.

4.7.3 Hemólise

A propriedade hemolítica das micropartículas foi avaliada seguindo o protocolo descrito por Neun, Ilinskaya e Dobrovolskaia (2018), baseado nas normas internacionais ASTM F756-13 (2013) e ASTM E2524-08 (2013). Amostras de sangue de doadores humanos saudáveis foram coletadas em tubos contendo citrato de sódio (3,2%) como anticoagulante. O sangue total foi diluído em PBS livre de Ca²⁺/Mg²⁺ para ajustar a hemoglobina total na concentração de 10 ± 2 mg/mL (HT). Os testes foram realizados em eppendorfs, 100 µL das amostras foram adicionadas a 700 µL de PBS livre de Ca²⁺/Mg²⁺ e 100 µL de HT, sendo incubadas em 37 °C, os eppendorfs foram invertidos gentilmente a cada 30 min por 3h e, então, centrifugados por 15 min a 800 x g. 100 µL do sobrenadante coletado com as amostras foram colocados em uma placa de 96 poços e adicionados 100 µL do reagente Drabkin's (Sigma), a placa foi selada e agitada suavemente e a absorbância medida em 540 nm. A concentração de hemoglobina livre (HC) foi calculada utilizando uma curva de calibração. As

amostras foram testadas em duplicatas nas concentrações finais de: 0,004 mg/mL; 0,02 mg/mL; 0,1 mg/mL e 1 mg/mL, o Triton X-100 (1%) foi utilizado como controle positivo para hemólise e o PBS como controle negativo (ausência de hemólise). A concentração de hemoglobina (HC) foi determinada usando uma curva de calibração preparada com hemoglobina humana (Sigma) e calculada pela Equação 10.

$$HC = A \times F \times d \quad (\text{Eq. 10})$$

Em que “A” é a absorbância, “F” corresponde à inclinação da curva e “d” a diluição. O índice hemolítico (HI) foi calculado pela razão entre a concentração de hemoglobina liberada no sobrenadante e a concentração total de hemoglobina no tubo, conforme a Equação 11.

$$HI(\%) = \frac{HL}{HT} \times 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos óleos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa

Para avaliar a composição química dos óleos utilizados neste estudo, esses foram analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa. As Figuras 14 a 17 mostram os cromatogramas obtidos para cada óleo.

Figura 14 - Cromatograma CG-EM do óleo essencial de gerânio.

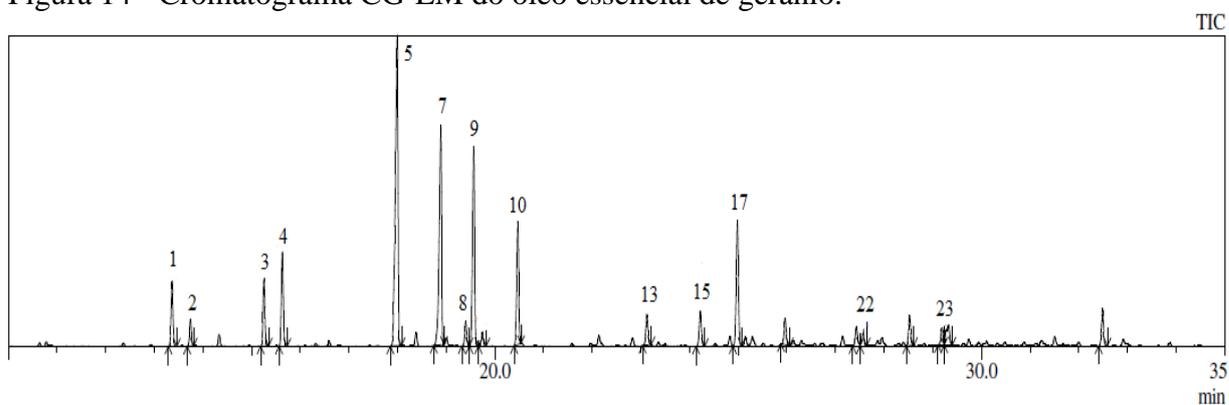


Figura 15 - Cromatograma CG-EM do óleo essencial de lemongrass.

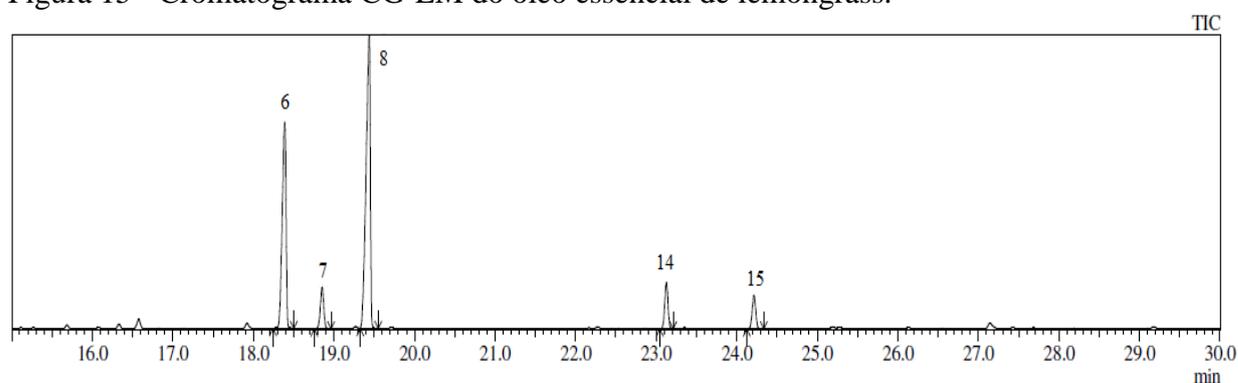


Figura 16 - Cromatograma CG-EM do óleo essencial de copaíba.

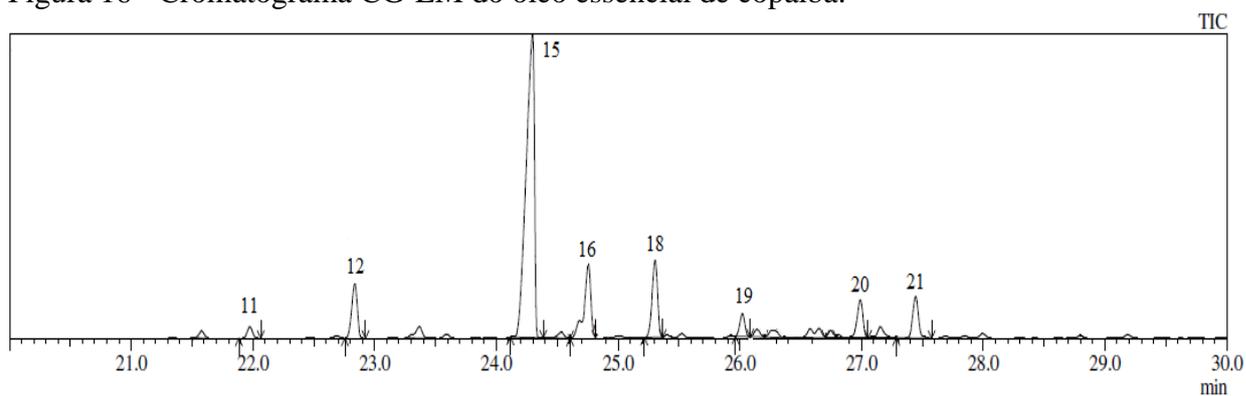
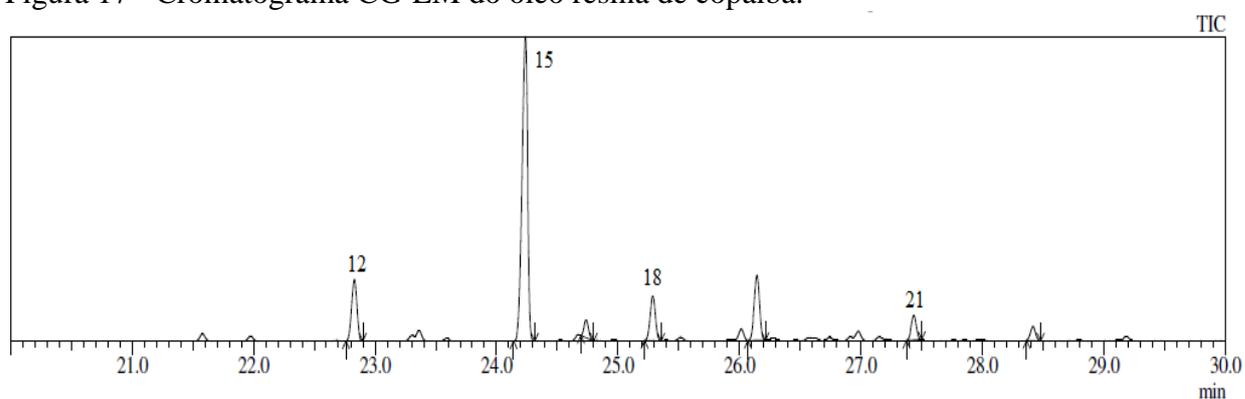


Figura 17 - Cromatograma CG-EM do óleo resina de copaíba.



A Tabela 2 mostra os constituintes químicos identificados em cada óleo, com seus respectivos tempo de retenção (TR) na coluna cromatográfica, o índice Kováts (IK) e o percentual em massa de cada componente.

Tabela 2 - Composição percentual dos principais constituintes dos óleos essenciais analisados no CG-EM.

Picos	Componentes	TR (min)	IK	OEG (%)	OEL (%)	OEC (%)	ORC (%)
1	linalol	13,371	1096	3,62	-	-	-
2	óxido de rosa	13,747	1125	1,49	-	-	-
3	<i>trans</i> -mentona	15,258	1142	3,82	-	-	-
4	<i>cis</i> -mentona	15,637	1162	5,46	-	-	-
5	citronelol	17,999	1225	24,53	-	-	-
6	neral	18,391	1238	-	32,47	-	-
7	geraniol	18,892	1252	15,57	5,81	-	-
8	geranial	19,406	1267	1,43	50,70	-	-
9	formiato de citronelila	19,570	1273	12,31	-	-	-
10	formiato de geranila	20,474	1298	7,25	-	-	-
11	α -cubebeno	21,978	1348	-	-	1,21	-
12	α -copaeno	22,830	1376	-	-	6,11	11,16
13	β -bourboneno	23,128	1388	1,96	-	-	-
14	acetato de geranila	23,132	1392	-	6,19	-	-
15	β -cariofileno	24,226	1408	2,27	4,83	51,49	58,96
16	α -bergamoteno	24,758	1434	-	-	10,33	-
17	γ -muroleno	24,986	1449	8,03	-	-	-
18	β -humuleno	25,288	1455	-	-	8,58	8,25
19	α -muroleno	26,024	1500	-	-	2,4	-
20	β -bisaboleno	26,993	1507	-	-	4,63	-
21	δ -cadineno	27,436	1523	-	-	4,79	4,4
22	butanoato de citronelila	27,565	1530	1,06	-	-	-
23	óxido de cariofileno	29,191	1580	1,11	-	-	-
Total (%)				89,91	100	89,54	82,77

(-) Não foi identificado; OEG: Óleo Essencial de Gerânio; OEL: Óleo Essencial de Lemongrass; OEC: Óleo Essencial de Copaíba; ORC: Óleo Resina de Copaíba.

O óleo essencial de gerânio apresentou o maior número de constituintes, dentre os óleos estudados, sendo composto principalmente por monoterpenoides, destacando-se como componentes majoritários: o citronelol e o geraniol. Já no óleo essencial de Lemongrass foram identificados apenas cinco constituintes, pertencentes à classe de monoterpenoides,

com exceção do β -cariofileno, que é um sesquiterpeno e representa menos de 5% do percentual mássico do óleo. Cerca de 83% da composição mássica do Lemongrass é formada pelo citral, que é o par de terpenoides formado pelos isômeros geranial e neral.

As frações voláteis dos óleos de copaíba são constituídas por sesquiterpenos, sendo o constituinte majoritário, o β -cariofileno, que está presente em maior quantidade no óleo resina de copaíba com 58,96%, enquanto que o óleo essencial de copaíba tem 51,49%. Os dois óleos apresentam uma composição química significativamente diferente, apresentando alguns componentes em comum, como o α -copaeno, β -humuleno e δ -cadineno, com percentuais mássicos distintos em relação ao α -copaeno, além do β -cariofileno, que está presente em todos os óleos analisados. Os dados apresentados estão de acordo com a literatura.

5.2 Teor e eficiência de encapsulamento e rendimento do processo

As micropartículas produzidas foram analisadas quanto à eficiência de encapsulamento (EE) e quanto ao teor de óleo encapsulado nas micropartículas, O resultado é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Eficiência (EE), teor (TE) e o rendimento (RE) do processo de encapsulamento das micropartículas.

Micropartículas	EE (%)	TE (%)	RE (%)
MQ	-	-	51,0
MORC	58,57 ± 0,06	5,32	27,3
MOEC	4,77 ± 0,01	0,80	22,8
MOEC-T ₈₀	13,00 ± 0,01	1,18	39,4
MOEL1	12,55 ± 0,06	1,14	32,7
MOEL2	11,47 ± 0,08	1,91	18,9
MOEL-T ₈₀	19,37 ± 0,06	1,76	33,0
MOEG1	35,22 ± 0,02	3,20	26,4
MOEG2	58,48 ± 0,10	9,75	47,7
MOEG-T ₈₀	39,58 ± 0,03	3,60	25,0

(-) Sem presença de bioativo encapsulado; MQ: micropartícula de quitosana sem bioativo; MORC: micropartícula de quitosana contendo óleo resina de copaíba; MOEC: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba; MOEC-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba na presença de Tween-80; MOEL1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:10); MOEL2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:5); MOEL-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass na presença de Tween-80; MOEG1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:10); MOEG2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:5); MOEG-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio na presença de Tween-80.

As micropartículas foram produzidas em duas proporções diferentes de massa de óleo em relação à massa de polímero, com intuito de avaliar qual seria a concentração de óleo ideal para obter uma boa eficiência de encapsulamento e um maior teor de óleo encapsulado. A EE variou de 4,8% a 58,6%, enquanto que o TE variou de 0,80% a 9,75%, sendo os melhores resultados apresentados pelas micropartículas com óleo essencial de gerânio na proporção de 1:5 e óleo resina de copaíba. O rendimento do processo de encapsulamento por *spray dryer* também variou bastante, de 18,9% a 51%. Os resultados obtidos nesse teste estão de acordo com dados citados na literatura (PAULA *et al.*, 2010; HERCULANO *et al.*, 2015; WEBBER *et al.*, 2018).

O encapsulamento do óleo essencial de gerânio, de modo geral, apresentou bons resultados em relação à EE e TE, indicando uma boa interação entre a matriz polimérica e o OE. O óleo essencial de gerânio é composto principalmente pelo geraniol e citronelol, álcoois terpênicos de cadeia acíclica relativamente pequena (monoterpeno), o citronelol é também ligeiramente solúvel em água, essas características podem ter contribuído para um maior teor de encapsulamento desse óleo, em comparação aos demais. A micropartícula MOEG2

apresentou maior EE e TE que a MOEG1, logo o aumento da concentração inicial do OEG permitiu melhores resultados.

As formulações preparadas com OE de lemongrass apresentaram baixa eficiência de encapsulamento, com uma pequena diferença, entre a micropartícula MOEL1 ($12,55 \pm 0,06$) e a MOEL2 ($11,47 \pm 0,08$), esta, no entanto, apresentou maior TE, uma vez que a concentração inicial de OE nesta formulação foi maior. Esse resultado pode estar relacionado a uma fraca interação entre o polímero e o óleo, sendo este constituído principalmente pelo citral, que é um aldeído insolúvel em água. Em relação à micropartícula preparada com o óleo essencial de copaíba na proporção de 1:5 (MOEC), esta apresentou a menor eficiência de encapsulamento (4,8%), sendo muito inferior a EE da micropartícula com óleo resina de copaíba na proporção de 1:10 (MORC), indicando uma maior interação do polímero com o óleo resina, facilitando o processo de encapsulamento. Esses dois óleos de copaíba são constituídos por sesquiterpenos, que apresentam uma cadeia carbônica maior que a dos monoterpenos (C15), diferenciando-se principalmente pela presença de componentes resinosos no ORC, os ácidos diterpênicos.

Diante desses resultados e com base na literatura, pode-se observar que a quantidade de OE inserida inicialmente na formulação, exerce influência na eficiência de encapsulamento, de acordo com um limite de saturação do óleo no sistema. A EE tende a diminuir com o aumento da concentração inicial de óleo se o mesmo já tiver superado o limite de saturação, pois uma quantidade satisfatória de polímero é necessária, para que este possa revestir o OE adequadamente. Hasheminejad *et al.* (2019) observaram que a eficiência de encapsulamento do óleo essencial de cravo em micropartículas de quitosana, diminuiu significativamente com o aumento da concentração inicial do OE na formulação, enquanto Feyzioglu e Tornuk (2016), observaram um aumento na eficiência de encapsulamento do óleo essencial de segurelha (*Satureja hortensis L.*) em micropartículas de quitosana, com o aumento da concentração inicial de OE na formulação de 1% para 1,4%, porém diminuiu em concentrações acima de 1,4%. Nos dois estudos as micropartículas foram produzidas por gelificação iônica.

O surfactante Polisorbato 80 (Tween®) foi adicionado na tentativa de melhorar a eficiência de encapsulamento, já que o mesmo é capaz de diminuir a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis, facilitando a emulsificação e aumentando, assim, a interação entre o óleo e a solução aquosa contendo o polímero. Dessa forma, 1% de Tween-80 foi adicionado nas formulações de proporção 1:10 (OE/polímero). A partir dos dados da Tabela 3, pode-se

observar que o surfactante aumentou a eficiência de encapsulamento das micropartículas, principalmente do óleo essencial de lemongrass, em que MOEL-T₈₀ obteve uma EE maior do que as MOEL1 e MOEL2. Assim, como MOEG-T₈₀ também apresentou um aumento na EE em relação à formulação MOEG1 (proporção 1:10). Diante da baixa EE da MOEC (proporção de 1:5), a micropartícula com OE de copaíba na proporção de 1:10, foi obtida com a adição do tensoativo na formulação (MOEC-T₈₀) obtendo-se um aumento na EE e no TE em relação a MOEC, porém, com valores ainda muito pequenos, indicando que uma formulação desse óleo na proporção de 1:10 sem a presença do Tween-80, apresentaria resultados com valores de TE inferiores aos obtidos pela MOEC-T₈₀.

A baixa eficiência e o baixo teor de encapsulamento, apresentado pela maioria das micropartículas obtidas, podem ter sido influenciados por parâmetros, como o tempo de agitação no homogeneizador, bem como pelo método de secagem utilizado. Neste trabalho utilizou-se a técnica *spray drying* e como os óleos essenciais são constituídos principalmente por componentes voláteis, a temperatura usada nesse processo pode levar a alguma perda de massa dos óleos, embora a secagem seja rápida, a fim de se preservar o produto.

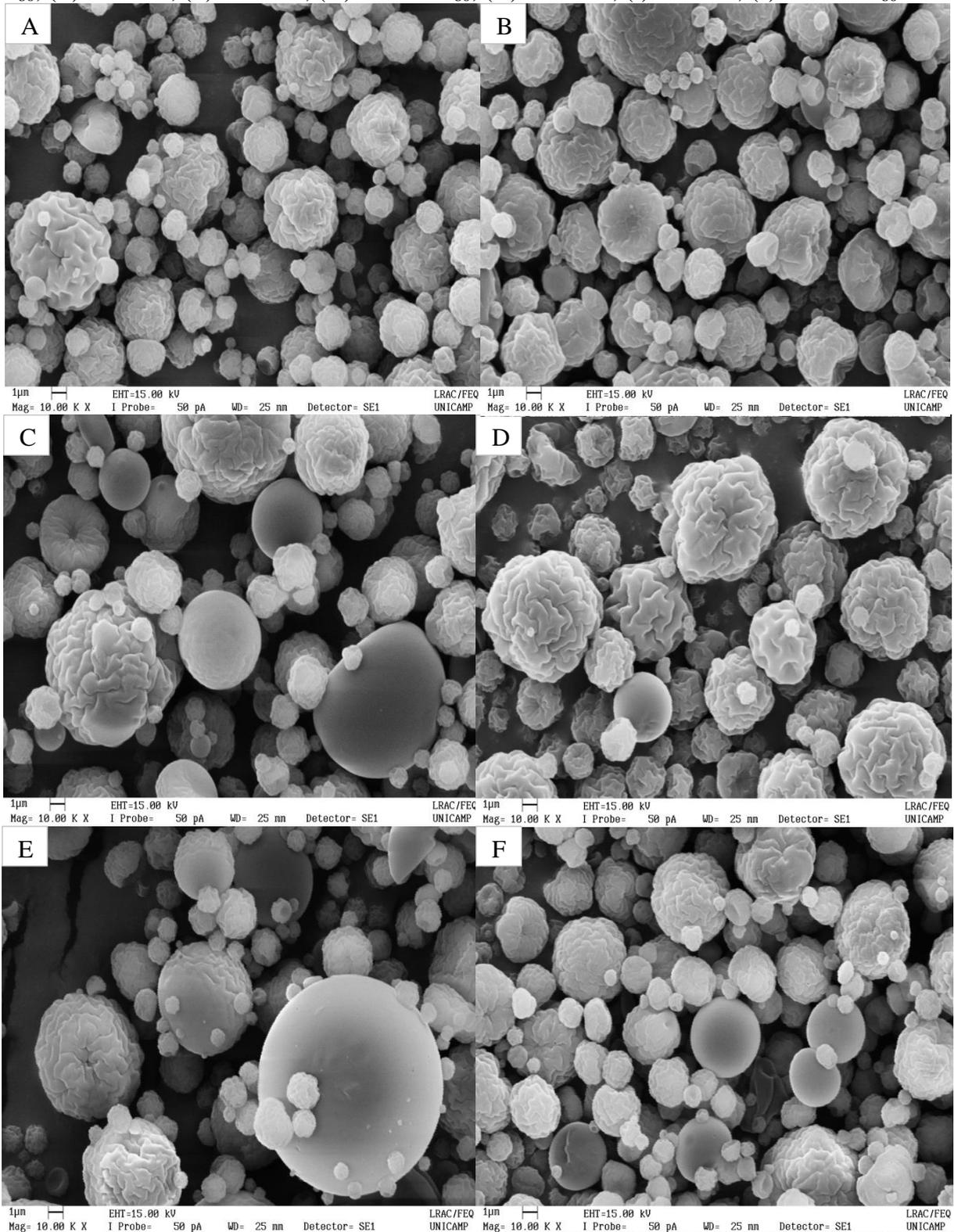
5.3 Caracterização das micropartículas

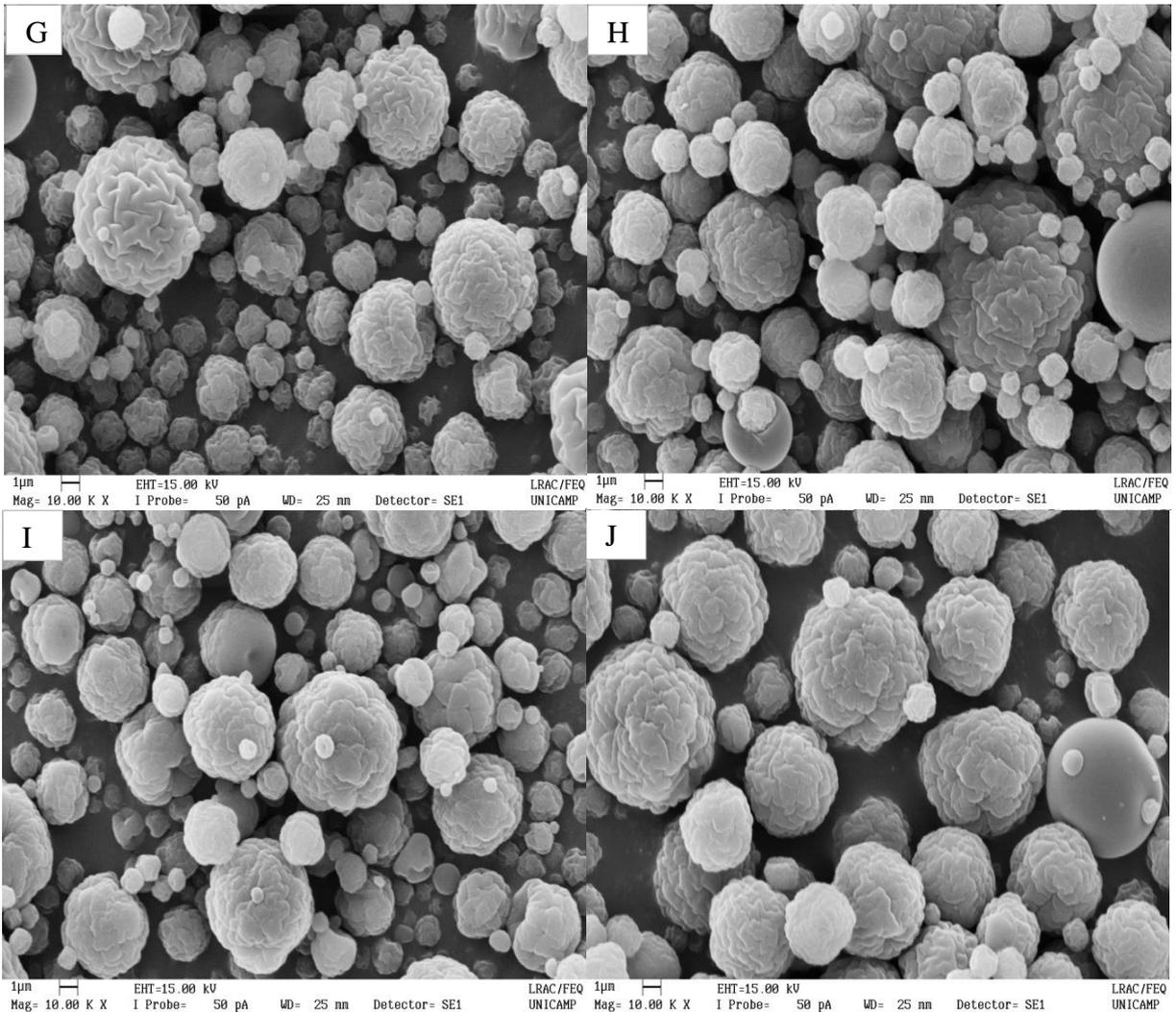
As micropartículas foram caracterizadas quanto à forma, tamanho, carga superficial, composição química e análises térmicas, conforme os resultados apresentados a seguir.

5.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micropartículas produzidas foram analisadas através da técnica de microscopia eletrônica de varredura, para obtenção de informações relativas à morfologia e ao tamanho das partículas. As micrografias, apresentadas na Figura 18, revelam que as diferentes formulações de micropartículas apresentaram formas semelhantes, com geometria esférica, relativamente regular e de superfície rugosa.

Figura 18 - Micrografia das micropartículas: (A) MQ; (B) MORC; (C) MOEC; (D) MOEC-T₈₀; (E) MOEL1; (F) MOEL2; (G) MOEL-T₈₀; (H) MOEG1; (I)MOEG2; (J) MOEG-T₈₀.





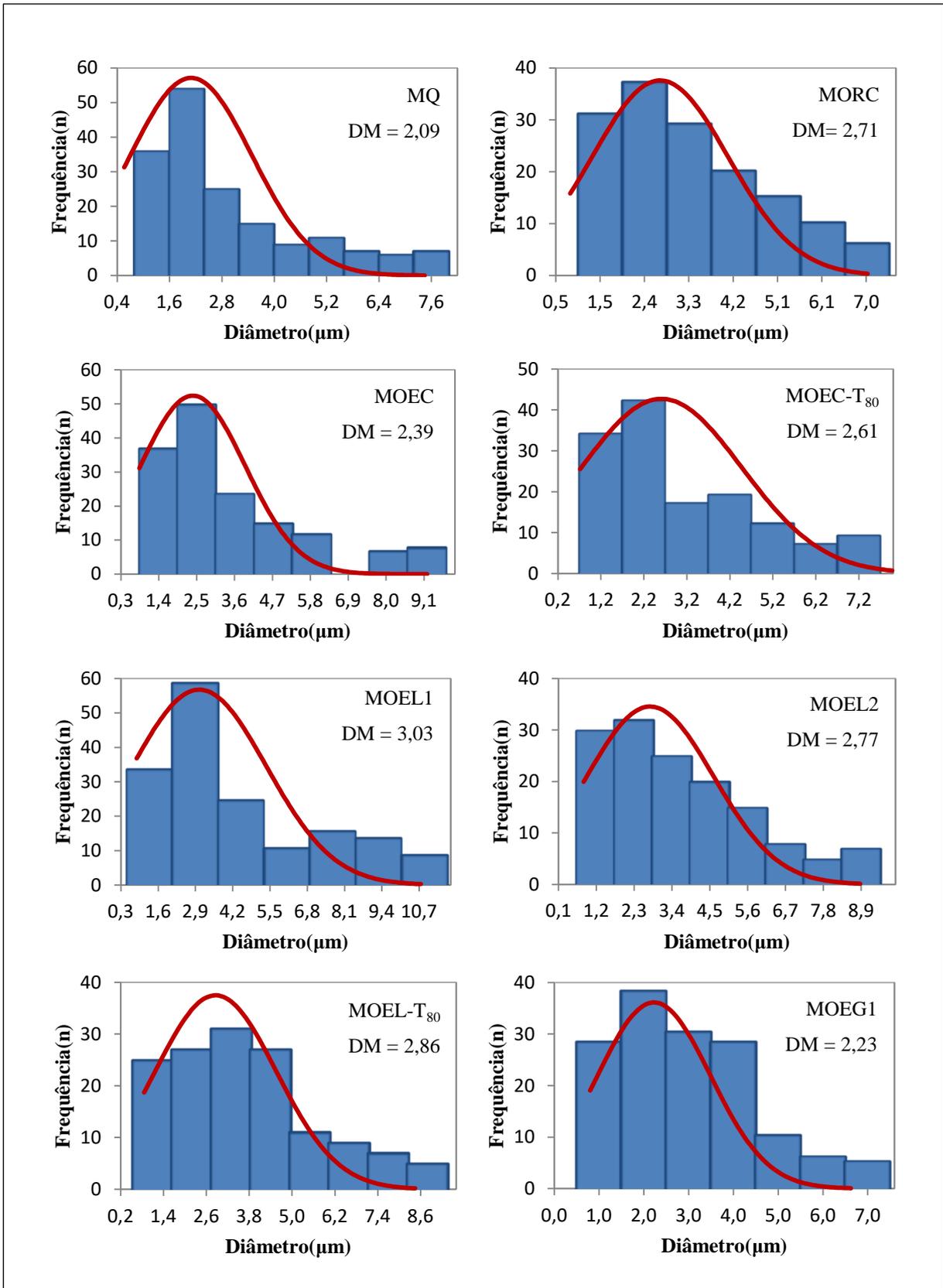
(A) MQ: micropartícula de quitosana sem bioativo; (B) MORC: micropartícula de quitosana contendo óleo resina de copaíba; (C) MOEC: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba; (D) MOEC-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba na presença de Tween-80; (E) MOEL1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:10); (F) MOEL2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:5); (G) MOEL-T80: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass na presença de Tween-80; (H) MOEG1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:10); (I) MOEG2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:5); (J) MOEG-T80: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio na presença de Tween-80.

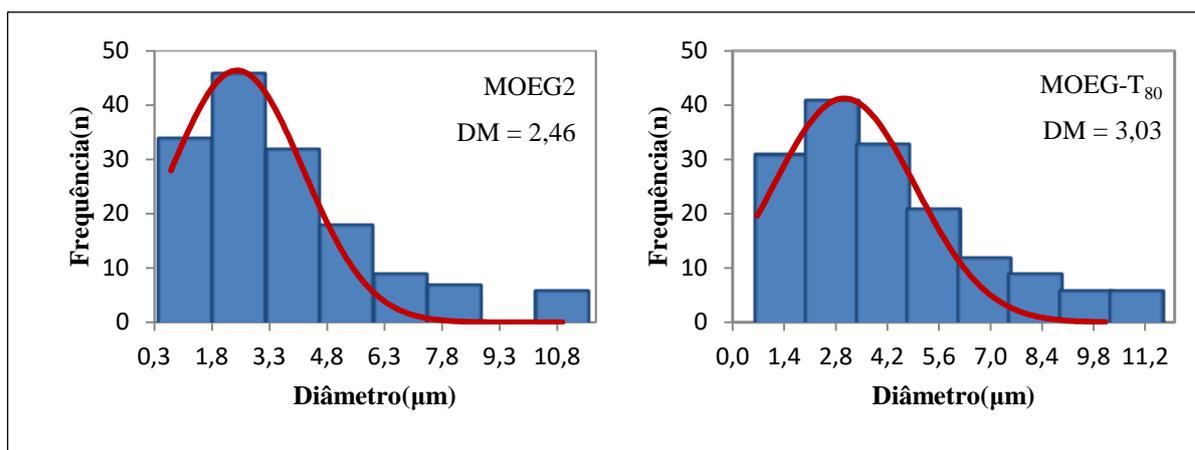
Conforme apresentado na Figura 18, algumas micropartículas apresentaram pequenas concavidades na superfície rugosa, que podem ser atribuídas ao processo de secagem por pulverização, devido ao encolhimento das partículas produzidas (SAÉNZ *et al.*, 2009; CAMPELO *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2017). Observa-se também, que em geral, essas micropartículas não apresentam porosidade ou físsuras, indicando, portanto, uma maior proteção do bioativo encapsulado.

5.3.2 Distribuição do tamanho das micropartículas

Através da análise das micrografias, pelo software ImageJ, ao menos 110 partículas foram medidas para cada formulação. Os gráficos de distribuição de tamanhos foram traçados a partir dos dados obtidos e, ajustados a uma curva Gaussiana, determinando o diâmetro médio das micropartículas, como mostra a Figura 19.

Figura 19 - Gráficos de distribuição de tamanho de partículas ajustados a curva de Gauss.





DM: Diâmetro Médio; MQ: micropartícula de quitosana sem bioativo; MORC: micropartícula de quitosana contendo óleo resina de copaíba; MOEC: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba; MOEC-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba na presença de Tween-80; MOEL1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:10); MOEL2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:5); MOEL-T80: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass na presença de Tween-80; MOEG1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:10); MOEG2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:5); MOEG-T80: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio na presença de Tween-80.

Todas as formulações de micropartículas apresentaram uma distribuição unimodal, com maior frequência em uma faixa de diâmetros entre 0,85 μm a 3,3 μm, aproximadamente. Assim, as amostras exibiram, diâmetro médio variando entre 2 μm e 3 μm. Embora, a micropartícula de quitosana sem bioativo (MQ) tenha apresentado o menor tamanho médio (2,09 μm), a comparação dos valores de diâmetro médio das amostras, através da análise de variância (ANOVA), mostra que não há diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), ou seja, a incorporação do óleo e a presença de surfactante, não exerceram influência sobre o tamanho médio das partículas.

Os resultados obtidos são comparáveis aos trabalhos encontrados na literatura, considerando-se a metodologia empregada. Carli (2017) produziu micropartículas de quitosana contendo extrato de *Rapanea ferrugínea* por secagem em *spray dryer* (Buchi B-290) operando com temperatura de entrada de 150 °C, obtendo tamanho médio de partícula na ordem de 1 μm a 2 μm, o autor também mostrou que a concentração de bioativo e os agentes dispersantes utilizados, não exerceram influência estatisticamente significativa em relação ao tamanho médio de partícula. Spagnol *et al.* (2018), produziram micropartículas de quitosana seca contendo ácido caféico, com diâmetro na faixa de 1 μm a 5 μm, utilizando *spray dryer* (Buchi B-290 Mini) na temperatura de entrada de 180 °C. Webber *et al.* (2018), também produziram micropartículas de quitosana contendo glutathione por secagem em *spray dryer* (Buchi B-290), operando na temperatura de entrada de 130 °C.

5.3.3 Potencial zeta

A quitosana e as micropartículas foram analisadas quanto ao potencial zeta em meio aquoso. Este potencial está relacionado à carga adquirida pela superfície das partículas, em relação ao meio em que as mesmas se encontram dispersas, medindo a intensidade da atração ou repulsão eletrostática entre essas cargas. Essa medida é fortemente influenciada pela composição química das partículas, sendo utilizada para determinar o comportamento das mesmas no meio líquido. Assim, essa carga superficial pode influenciar fortemente a estabilidade de emulsões, bem como a interação com os fluidos corporais e com as membranas celulares, no caso de sistemas de entrega de fármacos (DOROUD; RAFATI, 2012; PINTO, 2014). A Tabela 4 mostra o resultado do potencial zeta para cada amostra.

Tabela 4 - Potencial zeta para as micropartículas e para quitosana.

Amostra	Potencial zeta (mV)
Qt*	+19,02 ± 0,25
MQ	+31,87 ± 0,63
MORC	+30,57 ± 0,75
MOEC	+46,26 ± 1,41
MOEC-T ₈₀	+43,28 ± 2,49
MOEL1	+30,75 ± 0,39
MOEL2	+29,19 ± 0,47
MOEL-T ₈₀	+45,26 ± 1,70
MOEG1	+46,54 ± 0,69
MOEG2	+36,87 ± 0,71
MOEG-T ₈₀	+47,34 ± 0,15

Qt: quitosana comercial; MQ: micropartícula de quitosana sem bioativo; MORC: micropartícula de quitosana contendo óleo resina de copaíba; MOEC: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba; MOEC-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba na presença de Tween-80; MOEL1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:10); MOEL2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:5); MOEL-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass na presença de Tween-80; MOEG1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:10); MOEG2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:5); MOEG-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio na presença de Tween-80. *Amostra estatisticamente diferente das demais, os resultados foram obtidos por análise de variância (ANOVA), utilizando teste de Tukey, considerando significativos valores de $p < 0,05$.

Todas as amostras apresentaram potencial zeta positivo, variando entre +19 mV a +47,34 mV, o que pode estar relacionado ao grupo amino da quitosana, que confere caráter

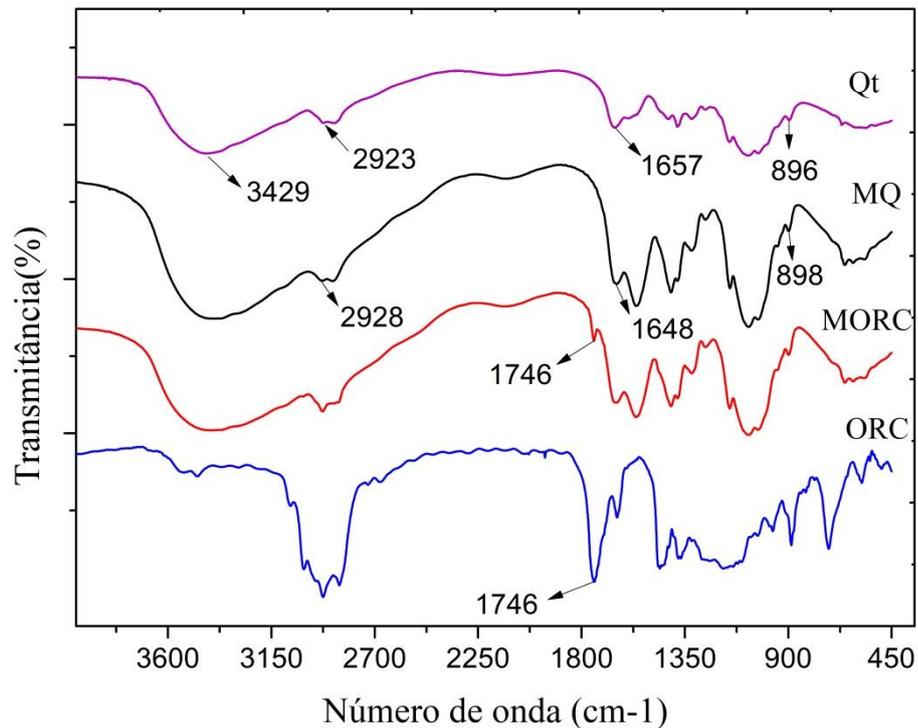
catiônico a matriz polimérica. Os resultados foram analisados estatisticamente, por análise de variância (ANOVA), e os valores apresentados nesse estudo estão de acordo com resultados encontrados na literatura (HASANI *et al.*, 2018; HASHEMINEJAD *et al.*, 2019).

O aumento do potencial zeta das micropartículas em relação à quitosana comercial (+19,02 mV) pode ser referente ao preparo das formulações em meio ácido, permitindo uma maior protonação dos grupos aminos. Em relação às demais amostra, pode-se observar que as micropartículas dos óleos essenciais de copaíba (MOEC), de gerânio (MOEG1 e MOEG-T₈₀) e de lemongrass (MOEL-T₈₀) apresentaram valores de potencial zeta elevado, e a comparação entre estes, pelo teste de Tukey, mostra que não há uma diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Já as micropartículas MORC, MOEL1 e MOEL2 apresentaram valores de potencial zeta muito próximos entre si e em relação à MQ, sendo que a diferença entre essas medidas não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$), o que pode indicar que os óleos não demonstraram influência no valor do potencial zeta. O caráter catiônico adquirido pela superfície das micropartículas pode aumentar a interação com as membranas celulares, que possuem carga superficial negativa, facilitando a endocitose (DOROUD; RAFATI, 2012; KUNJACHAN *et al.*, 2011).

5.3.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho da quitosana comercial e da micropartícula de quitosana sem óleo essencial (MQ) estão representados na Figura 20. A quitosana apresenta picos característicos de estiramento em 3429 (das ligações OH e NH₂), em 2923 (das ligações CH), em 1657 (ligações C=O da amida I) e em 896, referente à vibração e estiramento do anel piranosídico. A quitosana em forma de micropartícula apresentou picos de maior intensidade e um deslocamento do pico de 1657 para 1648, comparado a quitosana comercial. A micropartícula contendo o óleo resina de copaíba (MORC) apresentou um pico (em 1746) adicional em relação aos picos que aparecem na amostra MQ, possivelmente uma banda característica dos componentes terpenoides presentes no óleo, como mostra a Figura 20 (HASANI *et al.*, 2018; HASHEMINEJAD *et al.*, 2019; SHETTA *et al.*, 2019).

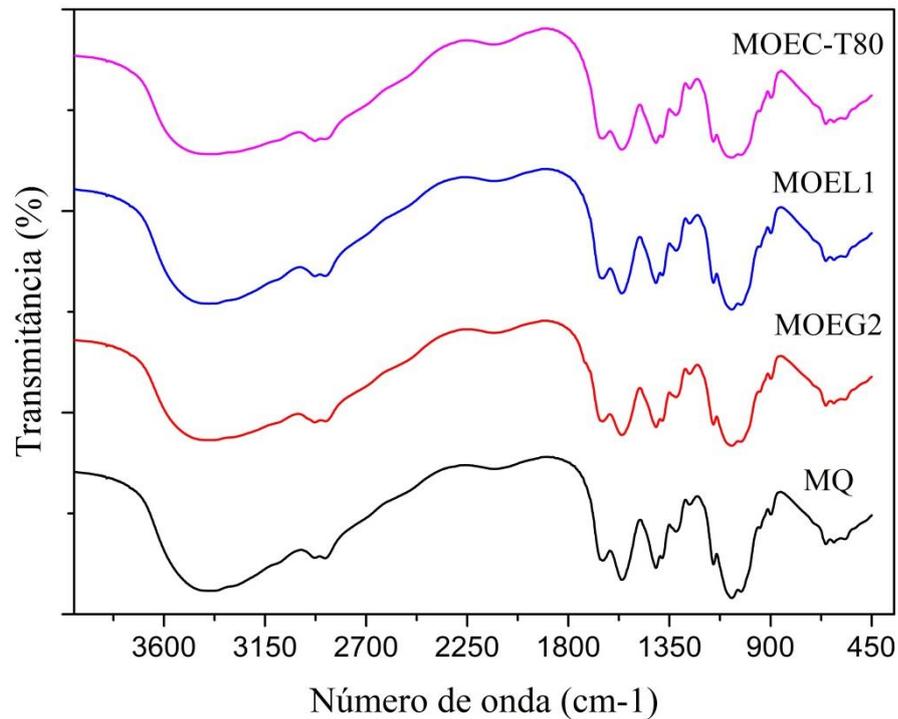
Figura 20 - Espectro de infravermelho para quitosana comercial, micropartícula de quitosana e ORC.



Qt: quitosana comercial; MQ: micropartícula de quitosana sem bioativo; MORC: micropartícula de quitosana contendo óleo resina de copaíba; ORC: óleo resina de copaíba.

As demais micropartículas de quitosana apresentaram comportamentos similares de absorção do espectro, como mostra a Figura 21, apresentando as mesmas bandas características da micropartícula de quitosana sem óleo encapsulado. Esses resultados demonstram que os óleos estão fisicamente ligados a matriz de quitosana, e estão de acordo com os observados por Hasani *et al.* (2018), que encapsularam óleo essencial de limão em micropartículas de Chitosan-Hicap.

Figura 21 - Espectro de infravermelho para as micropartículas.

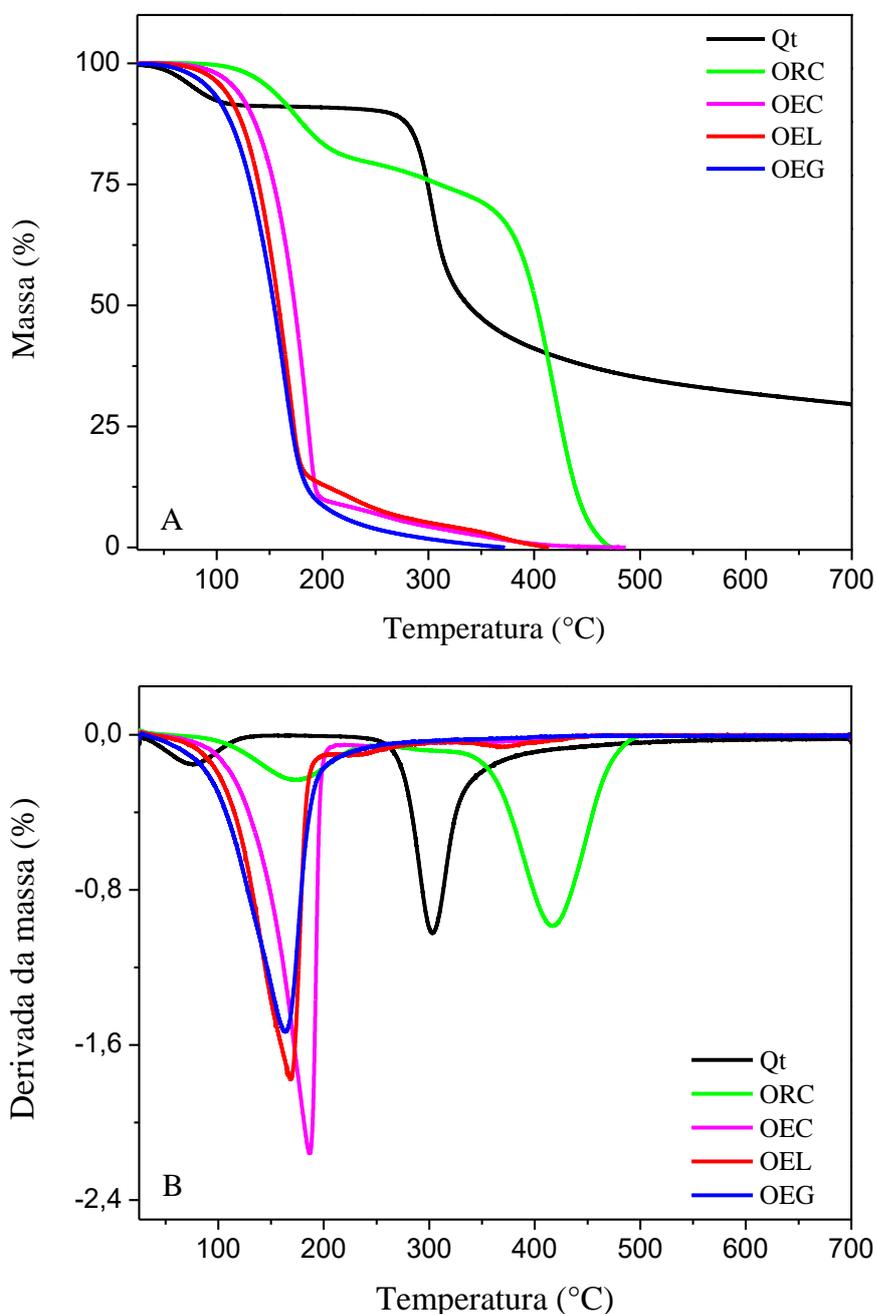


MOEC-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba na presença de Tween-80; MOEL1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:10); MOEG2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:5); MOEG-T80: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio na presença de Tween-80. MQ: micropartícula de quitosana sem bioativo.

5.3.5 Termogravimetria

Os componentes utilizados nas formulações foram analisados por termogravimetria, para avaliação do comportamento térmico de cada amostra. A Figura 22 mostra as curvas de TGA e DTG.

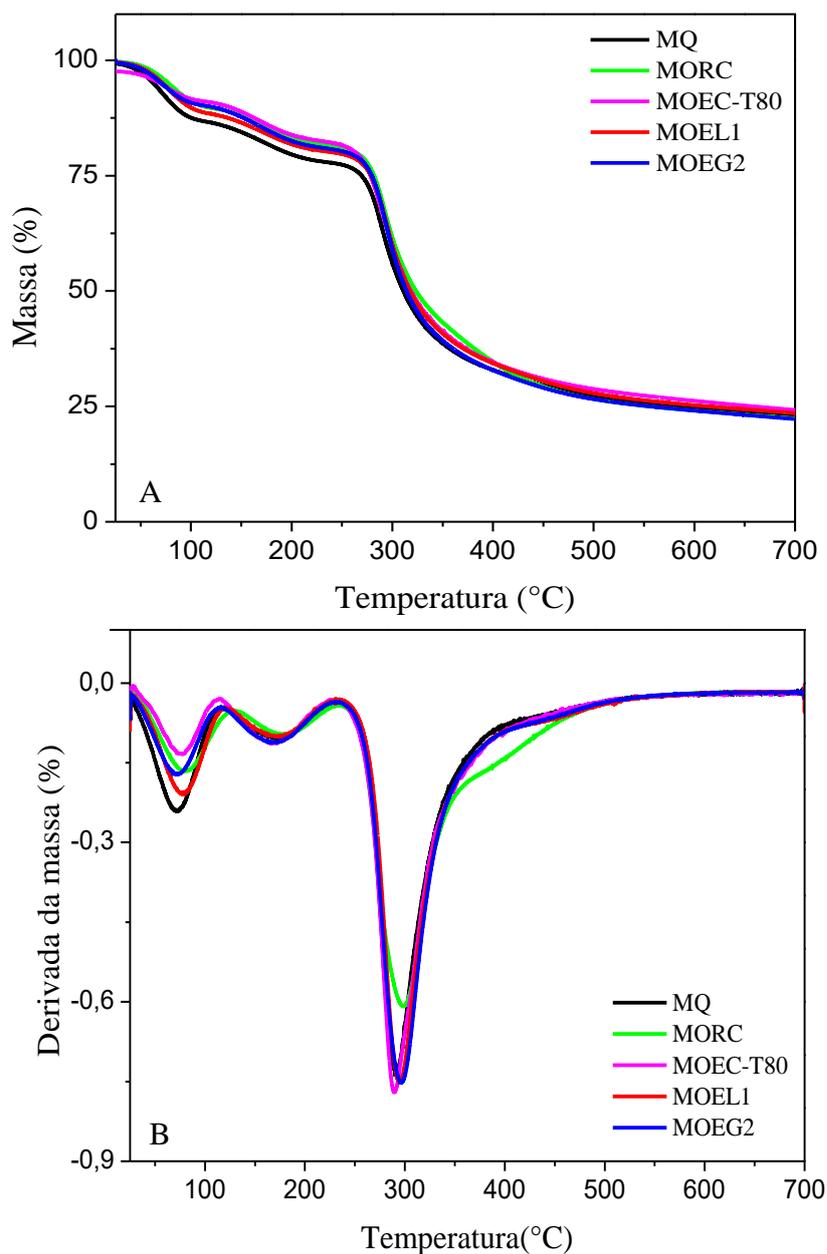
Figura 22 - Curvas termogravimétricas da quitosana comercial (Qt), do óleo resina de copaíba (OR) e dos óleos essenciais de copaíba (OEC), lemongrass (OEL) e gerânio (OEG): A) TGA; B) DTG.



Os óleos essenciais de gêranio, lemongrass e de copaíba, apresentaram comportamentos térmicos razoavelmente similares, com temperaturas de pico de 163 °C, 168 °C e 186 °C, respectivamente, representando a temperatura de máxima volatilização. Enquanto que a quitosana comercial e o óleo resina de copaíba apresentam dois eventos térmicos, que estão descritos na tabela 5.

Para cada um dos óleos encapsulados, uma amostra de micropartícula foi selecionada para avaliação quanto à estabilidade térmica, por análise termogravimétrica, como mostra a Figura 23, na qual estão representadas as curvas de TGAs e suas respectivas derivadas.

Figura 23 - Curvas termogravimétricas das micropartículas: A) TGA; B) DTG.



MQ: micropartícula de quitosana sem bioativo; MORC: micropartícula de quitosana contendo óleo resina de copaíba; MOEC-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba na presença de Tween-80; MOEL1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:10); MOEG2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:5).

A partir das curvas apresentadas, observa-se que as micropartículas tiveram comportamento térmico similares, com pequenos deslocamentos das temperaturas de pico. Os eventos térmicos ocorridos para cada micropartícula, também estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Análise termogravimétrica para a quitosana, os óleos e para as micropartículas.

Amostra	Evento	Tonset (°C)	Tpico (°C)	Perda de massa (%)
OEG	1	103	163	90,0
OEL	1	111	168	85,3
OEC	1	129	186	90,4
ORC	1	132	173	20
	2	382	417	71,7
Qt	1	50	75	7,9
	2	285	303	37,8
MQ	1	45	71	12
	2	127	173	8,5
	3	270	291	45,5
MORC	1	51	80	9,6
	2	135	179	8,4
	3	273	298	48
MOEC-T ₈₀	1	49	76	6,5
	2	131	170	8,34
	3	266	289	52,4
MOEG2	1	47	73	8,9
	2	128	174	9,0
	3	273	296	48,6
MOEL1	1	49	77	10,6
	2	129	174	8,6
	3	273	294	45,9

OEG: Óleo Essencial de Gerânio; OEL: Óleo Essencial de Lemongrass; OEC: Óleo Essencial de Copaíba; ORC: Óleo Resina de Copaíba; Qt: quitosana comercial; MQ: micropartícula de quitosana sem bioativo; MORC: micropartícula de quitosana contendo óleo resina de copaíba; MOEC-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba na presença de Tween-80; MOEG2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:5); MOEL1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:10).

Por ser uma mistura de componentes voláteis, os óleos essenciais apresentam eventos térmicos relacionados à perda de massa, iniciando-se em baixas temperaturas. Para os óleos essenciais de lemongrass, gerânio e de copaíba foi registrado apenas um evento térmico referente à degradação dos mesmos, nas temperaturas de 65-189 °C, 50-195 °C e 77-212 °C com perda de massa de 85%, 89% e 90%, respectivamente. Já para o óleo resina de copaíba, ocorreu um primeiro evento com 20% de perda de massa, entre 103-244 °C, relativo à evaporação dos componentes mais voláteis, enquanto que o segundo evento ocorreu entre 344-470 °C com 71,7% de perda de massa, referente à degradação da fração fixa da copaíba, esses resultados estão de acordo com dados encontrados na literatura (DEBONE *et al.*, 2019).

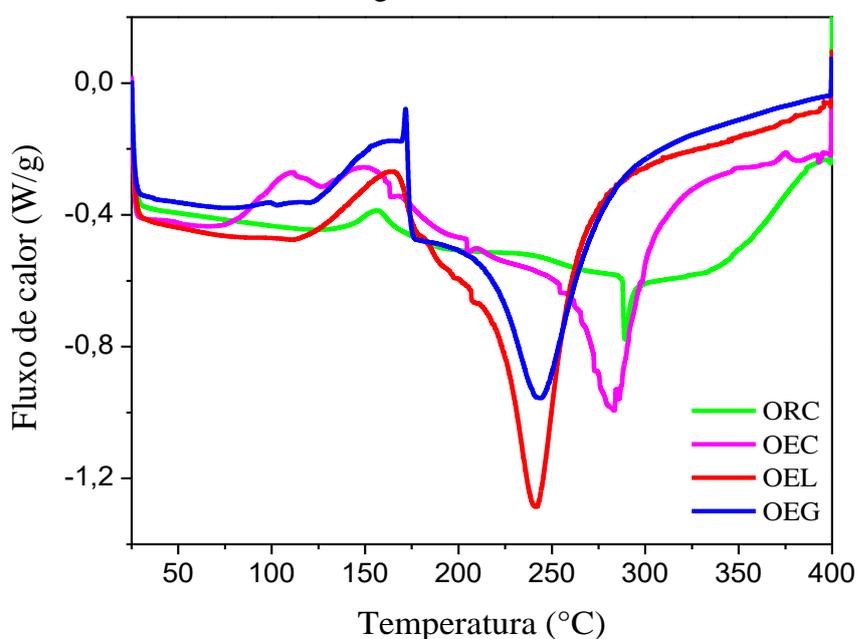
O primeiro evento térmico identificado na amostra de quitosana é descrito como uma perda de umidade, representando aproximadamente 8% de perda de massa, já o segundo evento ocorreu entre 262-330 °C, com 37,8% de perda de massa referente à degradação do polímero (SANTOS *et al.*, 2003). A micropartícula de quitosana sem a presença de óleo (MQ) apresentou três eventos térmicos, o primeiro relacionado a uma possível umidade residual da amostra e o terceiro referente à degradação da cadeia polimérica, assim como observado na quitosana comercial, porém, com uma pequena diminuição das temperaturas de pico, indicando uma menor estabilidade térmica da quitosana em forma de micropartícula. Adicionalmente, na amostra MQ ocorre um segundo evento, entre 115-224 °C com 8,5% de perda de massa, que pode ser correspondente a um primeiro estágio de decomposição da matriz polimérica, a vaporização e eliminação de produtos voláteis. As micropartículas de quitosana contendo os óleos encapsulados, também apresentaram os três eventos térmicos semelhantes à amostra MQ. A MORC apresentou um pequeno aumento nas temperaturas de pico de cada evento, em comparação com a MQ, enquanto, que as demais micropartículas apresentaram eventos térmicos em temperaturas muito próximas, como é observado nas curvas apresentadas na Figura 23. Esses resultados demonstram que a matriz polimérica é capaz de proteger os óleos encapsulados, conferindo maior estabilidade térmica. Resultados análogos também foram obtidos na literatura (WEBBER *et al.*, 2018; TRINDADE NETO *et al.*, 2005).

5.3.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Figura 24 apresenta as curvas obtidas na análise por DSC dos óleos essenciais e da resina de copaíba. Um evento endotérmico acima de 200 °C é observado em cada uma das

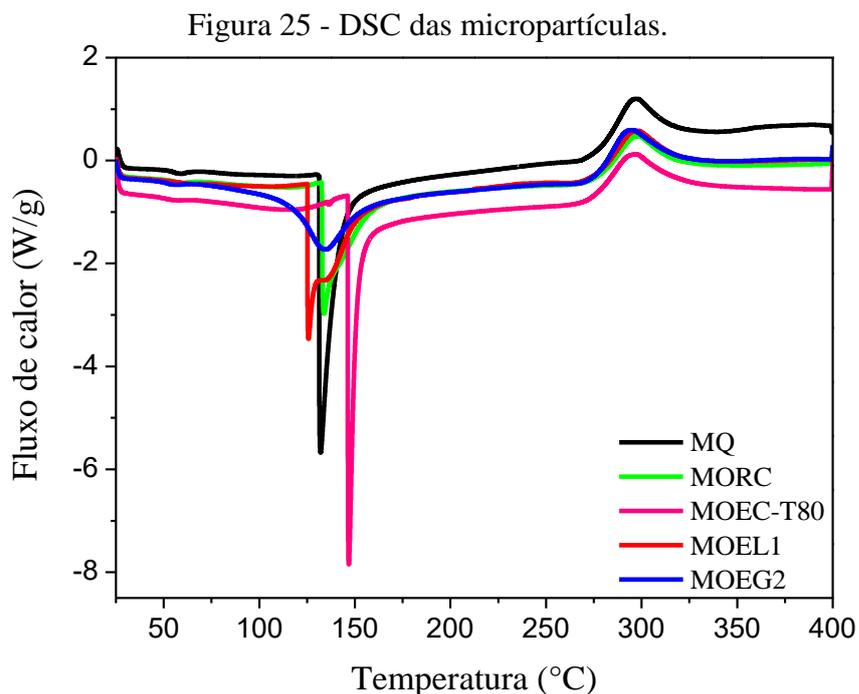
curvas, esses picos indicam a evaporação de constituintes presentes nos óleos, como os componentes majoritários, por exemplo, o β -cariofileno, o citral, o citronelol e o geraniol, que apresentam temperatura de ebulição de aproximadamente 256 °C, 228 °C, 225 °C e 230 °C, respectivamente. O primeiro evento térmico é uma transição exotérmica em aproximadamente 171 °C, 167 °C e 156 °C para o OE de gerânio, lemongrass e óleo resina de copaíba, respectivamente. Para OE de copaíba observou-se dois picos exotérmicos em 112 °C e 150 °C, os quais podem indicar processos de degradação de componentes presentes nos óleos. Os óleos essenciais são misturas complexas de diferentes compostos e a interação desses componentes pode influenciar no perfil térmico desses óleos, como observado na Figura 24.

Figura 24 - DSC do óleo resina de copaíba e dos óleos essenciais de copaíba, lemongrass e gerânio.



ORC: Óleo Resina de Copaíba; OEC: Óleo Essencial de Copaíba; OEL: Óleo Essencial de Lemongrass; OEG: Óleo Essencial de Gerânio.

As micropartículas selecionadas para análise termogravimétrica, também foram analisadas por DSC, como mostra a Figura 25.



MQ: micropartícula de quitosana sem bioativo; MORC: micropartícula de quitosana contendo óleo resina de copaíba; MOEC-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba na presença de Tween-80; MOEL1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:10); MOEG2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:5).

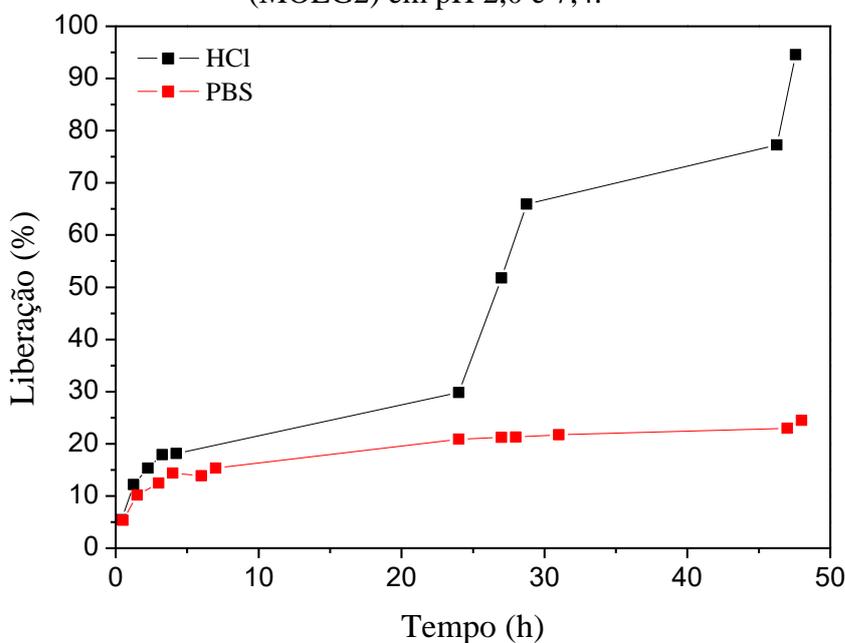
A micropartícula de quitosana sem bioativo (MQ) apresenta dois eventos térmicos, o primeiro de transição endotérmica, na temperatura de 132 °C, correspondente à evaporação da água e, o segundo evento, uma transição exotérmica na temperatura de 297,1 °C, devido a processos de decomposição da cadeia polimérica, como foi verificado na análise termogravimétrica. Esse comportamento também foi observado nas demais micropartículas carregadas com o bioativo (dois eventos térmicos), sendo o pico exotérmico (decomposição da cadeia polimérica) em torno de 297 °C para todas as amostras, com exceção da MOEG2 (294,5 °C). As amostras MORC e MOEG2 apresentaram o evento endotérmico em 134 °C, ou seja, próximo ao da amostra MQ, já a micropartícula MOEC-T₈₀ teve um pico de transição endotérmica na temperatura de 146,8 °C, enquanto que a MOEL1 apresentou a menor temperatura de pico endotérmico (125,7 °C). Todos estes picos endotérmicos estão relacionados à evaporação de água presente nas micropartículas e os deslocamentos observados podem ser associados à interação do polímero com a água, devido à presença de grupos hidrofílicos, que pode aumentar a força de retenção da água na cadeia polimérica e, conseqüentemente, aumentar a temperatura necessária para ocorrência da evaporação das moléculas de água. Essas diferenças nos picos endotérmicos podem estar relacionadas à

interação de cada óleo com a matriz polimérica, influenciando de forma distinta essa interação entre o polímero e a água (PAULA *et al.*, 2011; TRINDADE NETO *et al.*, 2005). Segundo Feyzioglu e Tornuk (2016), a ausência de picos relativos ao ativo, indica que o mesmo foi efetivamente incorporado.

5.4 Perfil de liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados por um período de 48h, sendo a liberação quantificada por espectrofotômetro. A Figura 26 apresenta a quantidade de óleo liberado em relação ao tempo para a micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio na proporção de 1:5 (MOEG2). A liberação *in vitro* das demais micropartículas não apresentaram resultados satisfatórios, obtendo-se a ocorrência de erros na quantificação de óleo liberado, mesmo após a modificação de alguns parâmetros, como a quantidade de micropartícula utilizada na análise, temperatura e agitação. Estes problemas podem estar relacionados ao baixo teor de óleo encapsulado nas micropartículas, dificultando, assim, a avaliação da liberação do óleo encapsulado através do método escolhido.

Figura 26 - Perfil de liberação da micropartícula com OE de gerânio na proporção 1:5 (MOEG2) em pH 2,0 e 7,4.



A micropartícula com óleo essencial de gerânio apresentou comportamento semelhante nos dois meios, durante as primeiras horas de liberação. Após 4h do início do

experimento em PBS e em HCl, cerca de 14% e 18% de óleo foram liberados, respectivamente. Na solução salina tamponada (PBS), apenas 20% do OE havia sido liberado da micropartícula no tempo de 24h, essa liberação manteve-se lenta, alcançando o máximo de 24% (aproximadamente 7,95 $\mu\text{g/mL}$) de óleo liberado, após um período de 48h. Em meio ácido, aproximadamente 30% de OE foram liberados, no tempo de 24h, observando-se posteriormente, um aumento na velocidade de liberação, obtendo-se um total de 94% de óleo liberado (aproximadamente 30,7 $\mu\text{g/mL}$) no período de 48h. Esses resultados mostram que o meio ácido favorece a liberação do óleo presente na micropartícula, o que pode estar associado à protonação de grupos amino livres na cadeia de quitosana, provocando repulsão iônica e melhorando o intumescimento e dissolução parcial das partículas no meio. Esse comportamento é indício favorável à eficiência da micropartícula no meio intracelular, indicando uma boa liberação do bioativo no ambiente ácido dos lisossomos, bem como vacúolo parasitóforo (HASHEMINEJAD *et al.*, 2019; KUNJACHAN *et al.*, 2011; SHETTA *et al.*, 2019).

Os dados obtidos foram ajustados aos modelos cinéticos (ANEXO B) e os coeficientes de correlação são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Coeficientes de correlação dos modelos cinéticos de liberação.

Meio de liberação	Coeficientes de correlação (R^2)			
	Ordem zero	Primeira ordem	Higuchi	Korsmeyer – Peppas
HCl	0,9324	0,8588	0,8909	0,9450
				$n = 0,5348$ $k_p = 0,0927$
PBS	0,8251	0,6475	0,9334	0,9491
				$n = 0,2902$ $k_p = 0,0823$

Para a micropartícula em meio ácido, o modelo matemático mais apropriado ao ajuste foi Korsmeyer-Peppas e de ordem zero, já em meio neutro (PBS) destaca-se o modelo de Korsmeyer-Peppas seguido pelo de Higuchi. O modelo de ordem zero apresenta uma taxa de liberação constante, sendo considerado o perfil de liberação ideal, o perfil de liberação em meio ácido, mostra em alguns momentos uma taxa relativamente constante. O modelo de Higuchi é relacionado com a primeira lei de Fick, ou seja, difusão em estado estacionário ou pseudoestacionário, para sistemas em que o fármaco encontra-se uniformemente disperso por toda a matriz. Pela curva de liberação em meio neutro (Figura 26), após as 24h de

experimento, o aumento da concentração de óleo no meio é muito pouco, mostrando assim, uma concentração praticamente constante em relação ao tempo.

O modelo matemático de Korsmeyer-Peppas foi o que descreveu melhor as curvas experimentais para os dois meios de liberação. Para matrizes de geometria esférica, o parâmetro “n” da equação de Korsmeyer-Peppas, quando é $\leq 0,43$ indica um perfil de liberação por processo de difusão, para $n = 0,85$ indica o relaxamento (erosão) do polímero, enquanto que “n” com valor entre 0,43 e 0,85 indica um mecanismo de transporte não-Fickiano, correspondente a um comportamento anômalo, ocorrendo ambos os processos de difusão e relaxamento (KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011; SHETTA *et al.*, 2019).

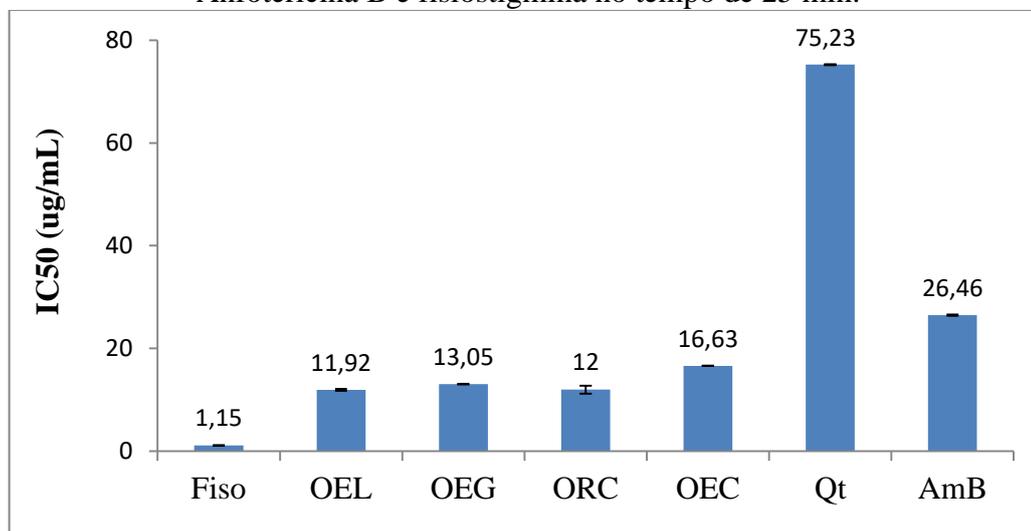
Assim, pelos resultados obtidos na Tabela 6, pode-se dizer que a liberação dessa amostra de micropartícula em meio PBS, é controlada principalmente por mecanismo de difusão, enquanto que em meio ácido ocorre um transporte não-Fickiano, com processos de difusão do óleo e o relaxamento ou erosão da matriz polimérica. De acordo com a constante cinética (k_p), observa-se uma velocidade de liberação maior em meio ácido do que em PBS, como é mostrado na Figura 26. Portanto, a partir desses resultados, observa-se que a matriz de quitosana confere proteção ao bioativo, permitindo uma liberação lenta, à medida que a matriz é degradada, sendo essa liberação favorecida pelo meio em que a partícula se encontra.

5.5 Avaliação da atividade biológica das micropartículas e dos óleos essenciais

5.5.1 Atividade de inibição da acetilcolinesterase

As amostras de micropartículas produzidas e os óleos utilizados foram analisadas quanto a atividade de inibição da AChE e os resultados estão apresentados nas Figuras 27 a 29.

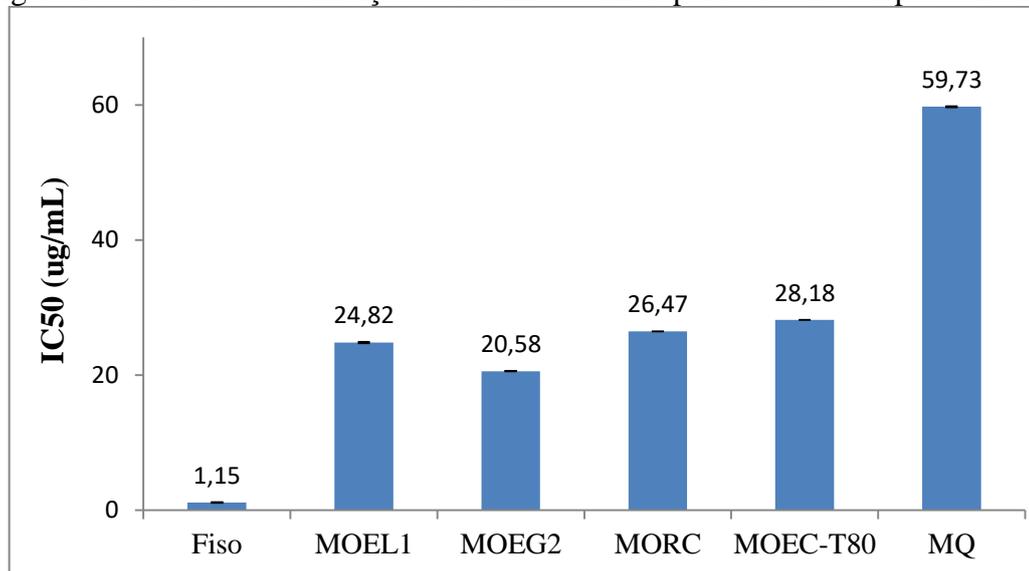
Figura 27 - Atividade de inibição da AChE dos óleos, da quitosana comercial e da Anfotericina B e fisostigmina no tempo de 25 min.



Fiso: Fisostigmina; OEL: Óleo Essencial de Lemongrass; OEG: Óleo Essencial de Gerânio; ORC: Óleo Resina de Copaíba; OEC: Óleo Essencial de Copaíba; Qt: quitosana comercial; AmB: Anfotericina B.

A fisostigmina é um anticolinesterásico, atualmente utilizado no tratamento para glaucoma, servindo como padrão positivo neste teste. Já a Anfotericina B, é um antibiótico, utilizado como fármaco de segunda escolha no tratamento da leishmaniose, tendo como mecanismo de ação as ligações feitas com ésteres presentes na membrana plasmática da *Leishmania*. Os resultados obtidos acima mostram que a Anfotericina B, juntamente com os óleos apresentaram boa atividade de inibição da AChE, enquanto que a quitosana comercial apresentou atividade de inibição pouco significativa, em comparação com a fisostigmina. A diferença na concentração inibitória média do óleo resina de copaíba e do OE de lemongrass não foram significativas, de acordo com a análise de variância (ANOVA) por comparação pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). A boa atividade de inibição da AChE obtida com os óleos, pode estar associada a grande quantidade de monoterpenos em suas composições, como mostraram as análises de CG-EM. Esses metabólitos naturais normalmente apresentam alta inibição da AChE, juntamente com os alcalóides, sendo inibidores reversíveis (MACHADO *et al.*, 2016). Os resultados obtidos são comparáveis aos citados na literatura, apresentando atividade melhor que, por exemplo, o óleo de manjerona (*Origanum majorana L.*) com IC₅₀ de 150,33 µg/mL (HAJLAOUI *et al.*, 2016) e o extrato da *Anthocleista vogelii* com IC₅₀ 698,62 µg/mL (AJAYI *et al.*, 2019).

Figura 28 - Atividade de inibição da AChE das micropartículas no tempo de 25 min.

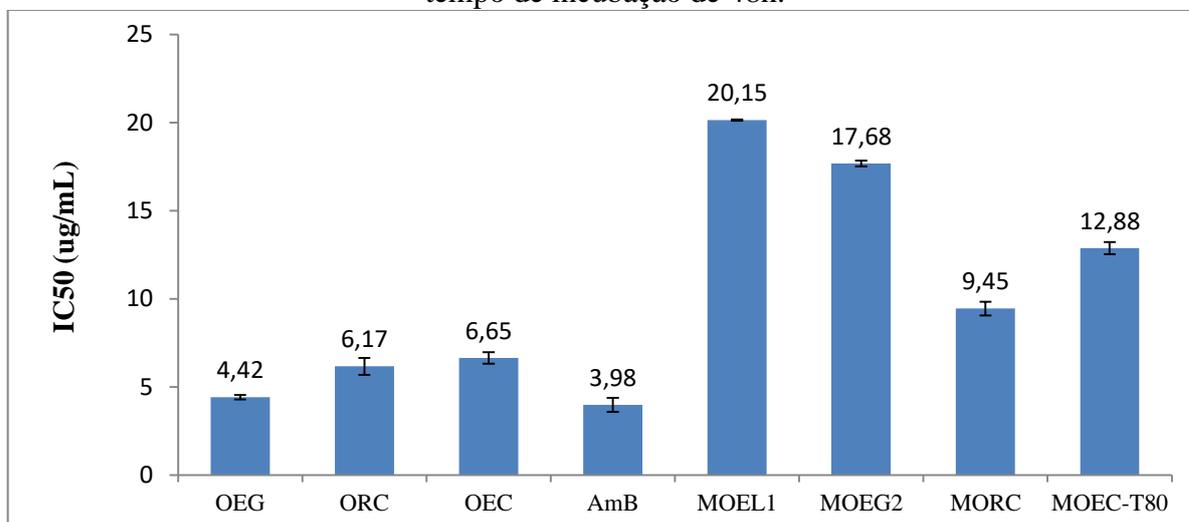


Fiso: Fisostigmina; MOEL1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:10); MOEG2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:5); MORC: micropartícula de quitosana contendo óleo resina de copaíba; MOEC-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba na presença de Tween-80; MQ: micropartícula de quitosana sem bioativo.

A quitosana em forma de micropartícula (MQ) apresentou uma atividade de inibição da AChE, significativamente melhor que a quitosana comercial, assim como as micropartículas com os óleos encapsulados, apresentaram melhor atividade em relação a micropartícula de quitosana sem OE (MQ), sendo esses dados comparados por análise de variância pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A atividade inibitória das micropartículas foi medida em relação à quantidade de bioativo presente nas amostras de micropartículas, sendo essa quantidade igual à usada nos testes dos óleos não encapsulados, ou seja, uma solução inicial de aproximadamente 2 mg/mL de óleo encapsulado nas micropartículas foi diluída por diluição seriada. As micropartículas carregadas com o bioativo e a anfotericina B apresentaram valores de IC₅₀ próximos, a amostra MOEG2 e a MOEL1 mostraram maior atividade de inibição, em relação às demais micropartículas. Entretanto, a atividade de inibição dos óleos encapsulados (Figura 28) foi menor que a obtida pelos óleos livres (Figura 27), indicando que os bioativos estão realmente protegidos dentro da matriz polimérica. O pH básico do meio utilizado neste teste e o curto tempo de incubação das micropartículas na presença da enzima, podem ter conduzido a uma baixa liberação do óleo encapsulado, resultando em uma menor atividade. Portanto, um novo teste de inibição da AChE foi realizado por um período de 48h de incubação da enzima com as micropartículas e o resultado

comparado com o óleo não encapsulado, incubado com a enzima durante o mesmo período, como é apresentado na Figura 29.

Figura 29 - Atividade de inibição da AChE das micropartículas, óleos e Anfotericina B no tempo de incubação de 48h.



A incubação da enzima em contato com as amostras durante 48h, revela que os óleos e a AmB sustentaram a atividade de inibição da AChE, melhorando o valor de IC₅₀ em comparação ao tempo padrão de 25 min, provavelmente a ação combinada dos vários constituintes dos óleos, permitiram a ação inibitória após esse período de tempo prolongado. A incubação das micropartículas com a AChE por 48 horas, permitiu uma maior liberação dos óleos para o meio e, portanto, a atividade de inibição da enzima melhorou significativamente. A micropartícula do óleo resina de copaíba apresentou o melhor resultado, equiparando-se a inibição obtida para os óleos não encapsulados, evidenciando que os óleos estão encapsulados nas micropartículas, que conferem a proteção do bioativo, permitindo uma liberação mais lenta de acordo com o meio em que se encontram, mantendo a atividade requerida.

5.5.2 Toxicidade em *Artemia salina*

Os ensaios da *Artemia salina* foram realizados em triplicata para cada concentração de amostra utilizada, e então, a concentração letal média (CL₅₀) foi calculada, sendo consideradas não tóxicas as amostras com CL₅₀ acima de 1.000 µg/mL e a alta toxicidade para CL₅₀ abaixo de 100 µg/mL (KARCHESY *et al.*, 2016; BEZERRA *et al.*, 2017; MEYER *et al.*, 1982). Os resultados toxicológicos da quitosana, dos óleos e das micropartículas, em relação à *Artemia salina* estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Toxicidade das amostras frente à *Artemia salina*.

Amostra	CL ₅₀ (µg/mL)	CL ₅₀ (µg/mL)	Toxicidade
		(Em relação ao TE óleo)	
Qt	*	-	Nenhuma
OEC	80,77	-	Alta
OEG	55,04	-	Alta
OEL	900,7	-	Baixa
ORC	537,1	-	Baixa
MQ	900,7	-	Baixa
MOEC-T ₈₀	595,2	-	Baixa
MOEG2	560,8	900,8	Baixa
MOEL1	*	894,7	Nenhuma/Baixa
MORC	897,9	897,9	Baixa
Controle	*	-	Nenhuma

(*) Não calculado, porque não apresentou toxicidade; (-) Não realizado; Qt: quitosana comercial; OEC: Óleo Essencial de Copaíba; OEG: Óleo Essencial de Gerânio; OEL: Óleo Essencial de Lemongrass; ORC: Óleo Resina de Copaíba; MQ: micropartícula de quitosana sem bioativo; MOEC-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba na presença de Tween-80; MOEG2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:5); MOEL1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:10); MORC: micropartícula de quitosana contendo óleo resina de copaíba.

O óleo essencial de lemongrass e o óleo resina de copaíba apresentaram baixa toxicidade para a *Artemia salina*, enquanto que os óleos essenciais de copaíba e de gerânio apresentaram alta toxicidade, com CL₅₀ abaixo de 100 µg/mL, podendo ser considerados compostos com potencial bioatividade antileishmania, como observado nos testes de inibição da acetilcolinesterase. Radulović *et al.* (2015) relataram que ésteres isolados do óleo essencial de *Achillea falcata L.* com maior toxicidade frente a *Artemia salina* apresentaram maior atividade inibitória da acetilcolinesterase.

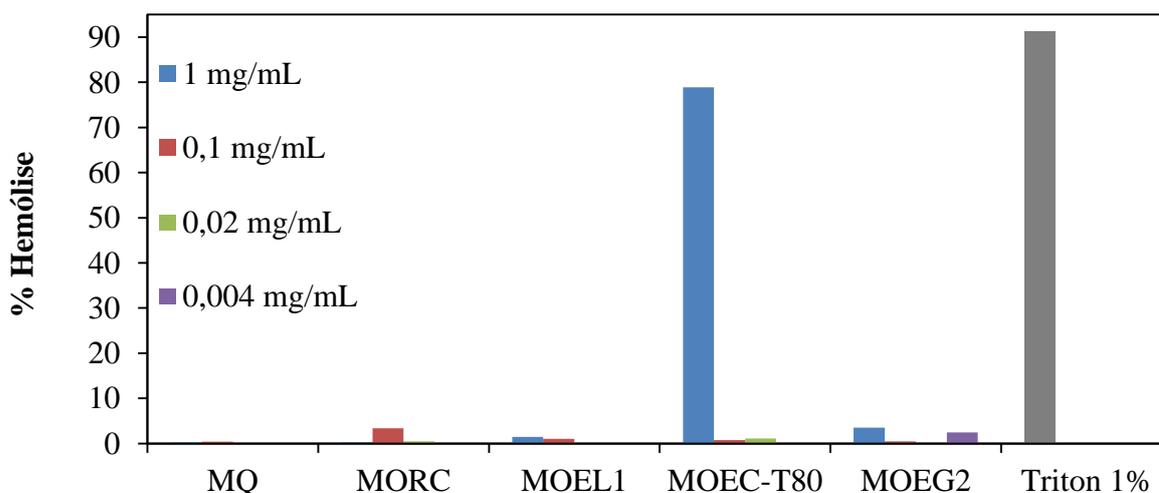
Para as micropartículas, dois experimentos foram realizados, como mostra a Tabela 7. Para o primeiro foram preparadas concentrações de 1.000 µg/mL a 1 µg/mL de micropartículas, e para o segundo, as concentrações preparadas de 1.000 µg/mL a 1 µg/mL foram em relação ao teor de óleo encapsulado. Portanto, nesse segundo experimento uma maior quantidade de micropartícula foi utilizada, para efeito de comparação ao óleo não encapsulado. Em ambos os testes, todas as micropartículas apresentaram de baixa a nenhuma

toxicidade, indicando que pouco óleo foi liberado durante o teste, mesmo após o período de 24h, provavelmente devido ao pH do meio de ensaio, não permitindo uma liberação mais efetiva do óleo encapsulado. Resultados similares também foram relatados por Pinto (2018), em que o nanoencapsulamento do óleo essencial de gengibre diminui a toxicidade do OE frente à *Artemia salina*. Esse resultado pode indicar uma menor bioatividade das micropartículas em relação ao óleo puro, como foi observado no teste de inibição da acetilcolinesterase.

5.5.3 Hemólise

A lise (destruição) das hemácias (glóbulos vermelhos) resulta na liberação da hemoglobina, esse processo chamado de hemólise, pode ocorrer quando as células sanguíneas entram em contato com um material, devido à composição química, a forma e a carga do mesmo. Por isso, a avaliação da hemocompatibilidade de materiais utilizados para entrega de fármacos (ativos) é muito importante. O material pode ser considerado não hemolítico quando o percentual de hemólise for inferior a 2%, ligeiramente hemolítico entre 2-5% e hemolítico quando apresentar percentual acima de 5% de hemólise (DHANKA; SHETTY; SRIVASTAVA, 2018; NEUN; ILINSKAYA; DOBROVOLSKAIA, 2018). Assim, as micropartículas foram testadas quanto à propriedade hemolítica, com concentrações variando de 4 µg/mL a 1.000 µg/mL, conforme mostra a Figura 30.

Figura 30 - Estudo de hemocompatibilidade das micropartículas.



MQ: micropartícula de quitosana sem bioativo; MORC: micropartícula de quitosana contendo óleo resina de copaíba; MOEL1: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de lemongrass (1:10); MOEC-T₈₀: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de copaíba na presença de Tween-80; MOEG2: micropartícula de quitosana contendo óleo essencial de gerânio (1:5).

As micropartículas de quitosana (MQ) e a MOEL1 apresentaram de zero a menos de 1,5% de hemólise, sendo consideradas não hemolíticas nas concentrações testadas. As micropartículas MORC e MOEG2 apresentaram até 3,5% de hemólise, enquanto que a MOEC-T₈₀ apresentou hemólise < 2% nas concentrações baixo de 0,1 mg/mL e na concentração mais elevada (1,0 mg/mL) em torno de 79% de hemólise, o que pode estar relacionado a uma maior citotoxicidade do óleo essencial de copaíba as células sanguíneas. Portanto, os resultados indicam que as micropartículas produzidas são hemocompatíveis na faixa de concentrações testadas, com exceção da MOEC-T₈₀ na concentração de 1,0 mg/mL, sugerindo uma viabilidade dessas micropartículas em aplicações farmacêuticas.

6 DISCUSSÃO GERAL

A proposta deste trabalho de pesquisa consistiu no desenvolvimento de sistemas simples de carreadores de bioativos para aplicações farmacêuticas, por isso, micropartículas a base de quitosana contendo óleos essenciais foram produzidas por *spray drying*.

O desenvolvimento da matriz de quitosana teve como objetivo a proteção do bioativo contra o meio externo, visando aumentar sua estabilidade, a fim de melhorar a eficiência das atividades biológica dos óleos, mantendo a liberação por um tempo mais prolongado, evitando a necessidade de várias dosagens, além de reduzir uma possível toxicidade. O método por *spray drying* foi escolhido devido à obtenção de micropartículas secas, que apresentam maior estabilidade, ao baixo custo em relação a outros processos de secagem, a flexibilidade do processo, a possibilidade de aumento de escala, além desse método não exigir o uso de solventes orgânicos, dessa forma, não necessita de etapas de purificação. A preferência pela quitosana como a matriz polimérica do sistema foi devido algumas vantagens como a biocompatibilidade, a biodegradabilidade, por apresentar atividade antibacteriana e conferir características importantes ao sistema como: carga superficial positiva, além de ser um bom estimulador de células do sistema imunológico, como os macrófagos, mostrando efeito imunoterapêutico contra parasitas, como a *Leishmania*, que pode ser considerada uma potencial aplicação farmacêutica para as micropartículas desenvolvidas (ESTEVINHO *et al.*, 2013; HOSEINI *et al.*, 2016; KUNJACHAN *et al.*, 2011).

Os óleos estudados foram selecionados com base na atividade biológica presente na literatura. O OE de gerânio apresenta atividade inseticida e antifúngica, o OE de lemongrass, também apresenta atividade antifúngica, antimicrobiana e antitumoral, seu constituinte principal é o citral, que tem atividade contra as formas promastigotas da *Leishmania chagasi* e atividade antiproliferativa em formas amastigotas e promastigotas da *Leishmania amazonensis*, provocando alterações morfológicas e estruturais nas formas promastigotas (SANTIN *et al.*, 2009; BRITO, 2013). O óleo de copaíba apresenta atividade anti-inflamatória, antiviral e analgésica, o β -cariofileno, seu principal constituinte, também apresenta atividade antitumoral, além disso, vários estudos mostram a atividade leishmanicida desse óleo, Santos *et al.* (2008) relatam que os óleos de copaíba de diferentes espécies mostram atividade contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Rondon *et al.* (2012) mostraram a eficácia do óleo-resina de *Copaifera reticulata* sobre as formas

promastigotas e amastigotas de *Leishmania chagasi* em testes *in vitro*, nos quais também evidenciam a ausência de citotoxicidade do óleo de copaíba.

Diferentes formulações de micropartículas foram preparadas, a fim de avaliar a influência da proporção (1:10 e 1:5) de massa de polímero para massa de óleo adicionadas na mistura, em relação a eficiência (EE) e o teor de encapsulamento (TE), assim como formulações na proporção de 1:10 foram preparadas com a adição de Tween-80 na tentativa de melhorar o teor de óleo encapsulado. No geral a EE e TE das micropartículas foram baixos, com exceção da MORC e MOEG2 que tiveram uma eficiência considerável (58,6 e 58,5%, respectivamente), essa última apresentando a maior quantidade de óleo encapsulado. Esses resultados podem ter sido influenciados por parâmetros do processo, bem como pelo método de secagem utilizado, portanto, um estudo da variação do tempo e da velocidade de agitação, além do resfriamento do sistema pode ser necessário, assim como é válido a comparação com outros métodos de encapsulamento e secagem, como, por exemplo, a liofilização, ou a combinação da gelificação iônica com o processo de secagem. A adição do Tween-80 aumentou a EE e o TE, como esperado.

O MEV revela micropartículas com forma esférica, e tamanho médio entre 2-3 μm , que segundo a literatura, pode ser favorável a administrações sistêmicas e a fagocitose das micropartículas. O potencial zeta, em meio aquoso, apresentou carga positiva, o que pode facilitar a absorção das micropartículas por membrana celular, que possui carga negativa (DOROUD; RAFATI, 2012; KUNJACHAN *et al.*, 2011). A partir dos gráficos de FTIR é possível dizer que a matriz de quitosana interage fisicamente com os óleos, pois não houve evidências de picos característicos dos mesmos, com exceção da micropartícula com óleo resina de copaíba, mostrando uma interação mais forte com a quitosana em relação aos demais óleos. Pelas análises térmicas é possível verificar uma boa estabilidade das micropartículas, evidenciando que a matriz polimérica proporciona maior proteção térmica aos óleos, bem como, os deslocamentos nos picos endotérmicos apresentados no DSC podem indicar o encapsulamento dos óleos, devido às interações que os diferentes constituintes podem exercer com a quitosana. A liberação do OE de gerânio da micropartícula (MOEG2) pode ser favorecida em meio ácido, devido à protonação dos grupos amino da quitosana, provocando o intumescimento e parcial dissolução da matriz polimérica, esse comportamento é propício à liberação do bioativo nos lisossomos, podendo dessa forma, aumentar a eficácia do composto (HASHEMINEJAD *et al.*, 2019; KUNJACHAN *et al.*, 2011; SHETTA *et al.*, 2019)

Tanto os óleos não encapsulados quanto as micropartículas apresentaram atividade de inibição da acetilcolinesterase, com destaque para os óleos de copaíba e de gerânio e suas respectivas micropartículas testadas. Nos testes de toxicidade frente à *Artemia salina*, novamente os OE de gerânio e de copaíba ficaram em destaque, mostrando alta toxicidade aguda, que pode ser relacionada com a atividade antibacteriana, antifúngica e inseticida desses óleos, que também evidenciaram hemocompatibilidade, com exceção da micropartícula com OE de copaíba na concentração mais elevada (1,0 mg/mL).

Portanto, entre as formulações produzidas e os óleos testados, os melhores resultados foram obtidos pelo OE de gerânio e sua micropartícula na proporção de 1:5 (MOEG2).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Micropartículas de quitosana contendo óleos essenciais foram produzidas com e sem a presença de surfactante (Tween-80) por *spray drying*. As micropartículas de quitosana que apresentaram maior eficiência de encapsulamento, acima de 50%, foram a do óleo essencial de gerânio e do óleo resina de copaíba, mostrando uma boa interação com a matriz polimérica e bioatividade.

Em geral, os óleos e micropartículas apresentaram boa atividade de inibição da acetilcolinesterase, aumentando o potencial inibitório com o teste no período de tempo mais prolongado. No teste de toxicidade para a *Artemia salina*, as micropartículas apresentaram baixa toxicidade (CL_{50} acima de 890 $\mu\text{g/mL}$) para o óleo encapsulado, enquanto os OEs de gerânio e de copaíba tiveram uma alta toxicidade (CL_{50} abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$), esse teste pode servir como avaliação preliminar, indicando que esses óleos podem apresentar atividade antileishmania ou antitumoral. A quitosana não apresentou atividade para os testes realizados, mas as micropartículas de quitosana sem e com os óleos encapsulados, apresentaram hemocompatibilidade em concentrações até 0,1 mg/mL.

Os resultados demonstram que as micropartículas de quitosana produzidas por *spray drying* são capazes de encapsular e proteger os óleos essenciais, conferindo maior estabilidade térmica, permitindo uma liberação mais lenta, sendo, portanto, uma opção de encapsulamento de bioativos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se:

- a) Modificações de parâmetros como: tempo, velocidade de agitação e ajuste de proporções de óleo essencial, polímero e surfactantes, com objetivo de produzir partículas menores e com uma melhor eficiência de encapsulamento.
- b) Resfriamento do sistema durante o processo de produção da emulsão.
- c) Adição de agentes reticulantes e utilização de outro método de secagem, como a liofilização, para efeito de comparação de tamanho de partículas e teor de encapsulamento.
- d) Teste de citotoxicidade *in vitro* e teste contra *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, M. P. **Atividade leishmanicida in vitro de frações de *Spondias mombin* e *Musa paradisiaca* sobre *Leishmania chagasi***. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.
- AGNOLIN, C. A.; OLIVO, C. J.; PARRA, C. L. C. Efeito do óleo de capim limão (*Cymbopogon flexuosus* Stapf) no controle do carrapato dos bovinos. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2014.
Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000100011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 janeiro 2019.
- AJAYI, O. S. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitor from *Anthocleista vogelii* leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 503-509, 2019.
- AMARANTE, C. B. *et al.* Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- ARAÚJO, C. R. M; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Rev. Virtual Quim.**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.
- ASTM F756-13, **Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials**. ASTM Int, West Conshohocken, PA, 2013.
- ASTM E2524-08, **Standard test method for analysis of hemolytic properties of nanoparticles**. ASTM Int, West Conshohocken, PA, 2013.
- BALTI, M. A. *et al.* Lab-scale extraction of essential oils from Tunisian lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 124, p. 164-173, 2018.
- BARBOSA, P. C. S. **Padronização de óleos de *Copaifera multijuga* Hayne por meio de técnicas cromatográficas**. 2012. 157 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.
- BERWIG, E. **Preparação e caracterização de filmes de Poliuretano com potencial aplicação na liberação controlada de fármacos**. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- BEZERRA, J. W. A. *et al.* Chemical composition and toxicological evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (LAMIACEAE) in *Drosophila melanogaster* and *Artemia salina*. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 437-442, 2017.
- BLANCO, M. A. **Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico AH PLUS™**. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

BRITO, A. M. G. **Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon Citratus* (DC) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral**. 2013. 106 f. Tese (Doutor em Biotecnologia) – RENORBIO, Ponto Focal, Aracaju, 2013.

BUGNICOURT, L.; LADAVIÈRE, C. Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 60, p. 1-17, 2016.

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

CARLI, R. B. G. **Desenvolvimento e avaliação biológica de sistemas micro e nanoparticulados contendo extrato das cascas de *Rapanea ferrugínea* Mez.(Primulaceae)**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2017.

CARMEN, G.; HANCU, G. Antimicrobial and antifungal activity of *Pelargonium roseum* Essential Oils. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 4, n. 2, p. 511-514, 2014.
doi:10.5681/apb.2014.075

CHO, M. *et al.* The antitumor effects of geraniol: Modulation of cancer hallmark pathways (Review). **Int J Oncol**, v. 48, n. 5, p. 1772-1782, 2016.

CRUCHO, C. I.C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 771-784, 2017.

DEBONE, H. S. *et al.* Chitosan/Copaiba oleoresin films for wound dressing application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, p. 146-152, 2019.

DEUS, R. J. A; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 01-07, 2011.
Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722011000100001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 janeiro 2019.

DIMA, C. The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of *Coriandrum sativum* L. essential oil from chitosan/alginate/inulin microcapsules. **Food Chemistry**, v. 195, p. 39-48, 2016.

DOROUD, D.; RAFATI, S. Leishmaniasis: focus on the design of nanoparticulate vaccine delivery systems. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, n. 1, p. 69, 2012.

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

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, issue 1-2, p. 675-691, 2017.

ESTEVINHO, B. N. *et al.* Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. **Food Science & Technology**, v. 31, p. 138-155, 2013.

FANGUEIRO, J. F. P. **Desenvolvimento e formulação de nanopartículas lipídicas mucoadesivas**. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

Disponível em: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3547/3/T_JoanaFangueiro.pdf>. Acesso em: 12 dezembro 2017.

FEYZIOGLU, G. C.; TORNUK, F. Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis L.*) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 104-110, 2016.

GALLACCI, M.; CORDELLINI, S. Fármacos Colinérgicos e Anticolinérgicos. *In*: DeLUCIA, R. (Org.). **Farmacologia Integrada: uso racional de medicamentos**. 5 ed. São Paulo: Clube de Autores, 2016. cap. 18, p. 151-158.

Disponível em: <<https://bit.ly/2MU70gt>>. Acesso em: 20 outubro 2019.

GANESAN, P.; NARAYANASAMY, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid microparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, p. 37-56, 2017.

GARCIA, L. G. S. *et al.* Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, p. 662-669, 2018.

GHARSALLAOUI, A. *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Res.Int.**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GRIGORAS, A. G. Polymer-lipid hybrid systems used as carriers for insulin delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, issue 8, p. 2425-2437, 2017.

HAJLAOUI, H. *et al.* Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana L.* essential oil. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 86-94, 2016.

HAN, X.; PARKER, T. L. Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) essential oil demonstrated anti-inflammatory effect in pre-inflamed human dermal fibroblasts. **Biochimie Open**, v. 4, p. 107-111, 2017.

HARMS, M.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Solid lipid nanoparticles for drug delivery. **J. Drug del. Sci. Tech.**, v. 21, issue 1, p. 89-99, 2011.

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

- HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F.; SAFARI, M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 275, p. 113-122, 2019.
- HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.
- HOSEINI, M. H. M. *et al.* Immunotherapeutic effects of chitin in comparison with chitosan against *Leishmania major* infection. **Parasitology International**, v. 65, p. 99-104, 2016.
- KARCHESY, Y. M. *et al.* Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. **Springerplus**, v. 5, n. 510, 2016.
- 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, 2011.
- KORSMEYER, R. W.; GURNY R.; DOELKER, B.; PEPPAS N. A. Mechanism of solute release from hydrophilic polymers. **Int. J. Pharm.**, v. 15, p. 25-35, 1983.
- KOZIARA, J.M. *et al.* Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors. **J. Control. Release**, v. 99, issue 2, p. 259-269, 2004.
- KUMAR, L. R. G. *et al.* Evaluation of chitosan as a wall material for microencapsulation of squalene by spray drying: Characterization and oxidative stability studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1986-1995, 2017.
- KUNJACHAN, S. *et al.* Chitosan-based macrophage-mediated drug targeting for the treatment of experimental visceral leishmaniasis. **J. Microencapsul.**, v. 28, p. 301-310, 2011.
- LAO, L. L. *et al.* Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, p. 28-41, 2011.
- LI, Xiang *et al.* Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: the Büchi nano spray dryer B-90. **J. Control. Release**, v. 147, issue 2, p. 304-310, 2010.
- LU, J. *et al.* Graphene oxide in the marine environment: Toxicity to *Artemia salina* with and without the presence of Phe and Cd²⁺. **Chemosphere**, v. 211, p. 390-396, 2018.
- MACHADO, L. P. *et al.* Evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity of Brazilian red macroalgae organic extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 6, p. 657-662, 2015.
- MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, p. 1-37, 2009.
- MARTINAC, A. *et al.* Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 291, p. 69-77, 2005.

MARTINS, G. V. Estudo químico e avaliação das atividades antioxidante, anti-acetilcolinesterase e antileishmanial de extratos de *Jatropha gossypifolia* L. (Pião Roxo). **Rev. Virtual Quim.**, v. 10, n. 1, p. 21-36, 2018.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MEYER, B.N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIRA, F. *et al.* Terapêutica médica actual no Glaucoma Crónico de Ângulo Aberto Primário – Revisão. **Oftalmologia**, v. 34, p. 445-452, 2010.

MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M.; HOSSEINI, S. M. Chitosan nanoparticles loaded with *Cinnamomum zeylanicum* essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 110, p. 203-213, 2015.

MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M.; HOSSEINI, S. M. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 28, p. 73-80, 2015.

MOTA, W. M. *et al.* Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 14, n. 4, p. 624-628, 2012.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 121-128, 2002.

MUXIKA, A. *et al.* Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **Int. J. Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1358-1368, 2017.

NATRAJAN, D. *et al.* Formulation of essential oil-loaded chitosan-alginate nanocapsules. **Journal of food and drug analysis**, v. 23, p. 560-568, 2015.

NEUN, B.W.; ILINSKAYA, A. N.; DOBROVOLSKAIA, M. A. Updated method for in vitro analysis of nanoparticle hemolytic properties. **Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery, Methods in Molecular Biology**, v. 1682, 2018. DOI 10.1007/978-1-4939-7352-1_9.

NGUYEN, T.V. *et al.* Preparation of chitosan nanoparticles by TPP ionic gelation combined with spray drying, and the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and a chitosan nanoparticle–amoxicillin complex. **Res Chem Intermed**, v. 43, p. 3527-3537, 2017.

OLIVEIRA, E. A. S. **Farmacologia do sistema nervoso autônomo parassimpático: Fármacos agonistas colinérgicos; Fármacos antagonistas colinérgicos**, 2008. Disponível em: <http://www.gruponitro.com.br/atendimento-a-profissionais/%23/pdfs/artigos/farmacologia/farmacologia_do_sistema_nervoso_autonomo_p-arassimpatico.pdf>. Acesso em: 20 outubro 2019.

OLIVEIRA, E. F. **Matrizes de gomas regionais para o encapsulamento do óleo essencial de *Lippia sidoides***. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

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

OLIVEIRA, E. R. **Toxicidade do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* e do citral para *Spodoptera frugiperda* e suas atividades colinesterásicas in vitro**. 2015. 71 f. Dissertação (mestrado acadêmico) – UFLA, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

PEIXOTO, A. C. B. **Funcionalização de nanopartículas poliméricas para liberação de medicamentos sítio-dirigida**. 2013. 173 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/publique/media/diss_ana_peixoto.pdf>. Acesso em: 12 dezembro 2017.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.
Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722009000400016&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 12 dezembro 2017.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, issue 7, p. 641-678, 2009.

PINTO, C. G. **Desenvolvimento, caracterização, estudos de estabilidade, genotoxicidade, citotoxicidade e ecotoxicidade de sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de gengibre ou trans-anetol**. 2018. 109 f. Tese (Doutorado em Nanociências) – Universidade Franciscana de Santa Maria, Santa Maria, 2018.

PINTO, N. O. F. **Desenvolvimento de nanoformulações do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham**. 2014. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

PULIDO, S. A. *et al.* Insights into the phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthetic pathways in *Leishmania* parasites and characterization of a choline kinase from *Leishmania infantum*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 213, p. 45-54, 2017.

RADULOVIĆA, N. S. *et al.* Toxic essential oils. Part IV: The essential oil of *Achillea falcata* L. as a source of biologically/pharmacologically active trans-sabinyl esters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 80, p. 114-129, 2015.

RAJAEI, A. *et al.* A coating based on clove essential oils encapsulated by chitosan-myristic acid nanogel efficiently enhanced the shelf-life of beef cutlets. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 14, p. 137-145, 2017.

RAMOS, I. M. F. C. **Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para liberação de fármaco no sistema nervoso central**. 2018. 241 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

RAVINDRA, N. S.; KULKARNI, R. N. Essential oil yield and quality in rose-scented geranium: Variation among clones and plant parts. **Scientia Horticulturae**, v. 184, p. 31-35, 2015.

RONDON, F. C. M. *et al.* *In vitro* efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. **Rev. Bras. Parasitol, Vet.**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 185-191, 2012.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612012000300002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 12 dezembro 2017.

SAÉNZ, C. *et al.* Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus indica*). **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 616-622, 2009.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.095>.

SALAZAR, M. J. C. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando à liberação de fármacos**. 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

SANTOS, A. O. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonenses*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, issue 2, p. 204-208, 2008.

SANTOS, D. Y. A. C. **Botânica aplicada: metabólitos secundários na interação planta-ambiente**. 2015. 124 f. Texto para obtenção de título (livre-docente) – Departamento de botânica, Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SANTOS, J. E. *et al.* Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v. 13, n. 4, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282003000400009>> Acesso em: 12 fevereiro 2019.

SANTOS, R. R.; ANDRADE, M.; SILVA, A. S. Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 78-84, 2017.

SHARMA, P. R. *et al.* Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, issues 2-3, p. 160-168, 2009.

SHETTA, A.; KEGERE, J.; MAMDOUH, W. Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, *in-vitro* release, antioxidant and antibacterial activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 731-742, 2019.

- SILVA, A. A. S. *et al.* Estudo fitoquímico e atividades biológicas do limãozinho (*Zanthoxylum syncarpum* Tull.). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, p. 37-53, 2014.
- SILVA, A. A. S. *et al.* Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida, anticolinesterásica e antioxidante de extratos de *Annona glabra* L. (araticum panã). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 36, n. 2, p. 189-194, 2015.
- SILVA, L. E. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon flexuosus* essential oils. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 40, 2018.
- SOUZA, A. V. *et al.* Aplicação da secagem por spray drying para a produção de extratos vegetais secos. **Revista científica UNILAGO**, v. 1, n. 1, 2013.
- SPAGNOL, C. M. *et al.* Release and permeation profiles of spray-dried chitosan microparticles containing caffeic acid. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 410-415, 2018.
- STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial. 67 f.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) – PGETEMA, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- TABARI, M. A. *et al.* Toxicity of β -citronellol, geraniol and linalool from *Pelargonium roseum* essential oil against the West Nile and filariasis vector *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Research in Veterinary Science**, v. 114, p. 36-40, 2017.
- TOBOUTI, P. L. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 93-99, 2017.
- TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.
- TRINDADE NETO, C. G. *et al.* Thermal analysis of chitosan based networks. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 97-103, 2005.
- VENTURA, A. L. M. *et al.* Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Ver. Psiq. Clín.**, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.
- VILA-NOVA, N. S. *et al.* Different susceptibilities of *Leishmania spp.* promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corosolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 334-338, 2013.
- VILA-NOVA, N. S. *et al.* Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium loribundum*, native plants from Caatinga biome. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 32, n. 11, p. 1164-1168, 2012.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Clima Temperado, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Pelotas-RS, 2010.

WEBBER, V. *et al.* Preparation and characterization of microparticles of β -cyclodextrin/glutathione and chitosan/glutathione obtained by spray-drying. **Food Research International**, v. 105, p. 432-439, 2018.

APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Figura 31 - Curva de calibração dos OE de gerânio (214,5 nm) e lemongrass (229nm) em etanol.

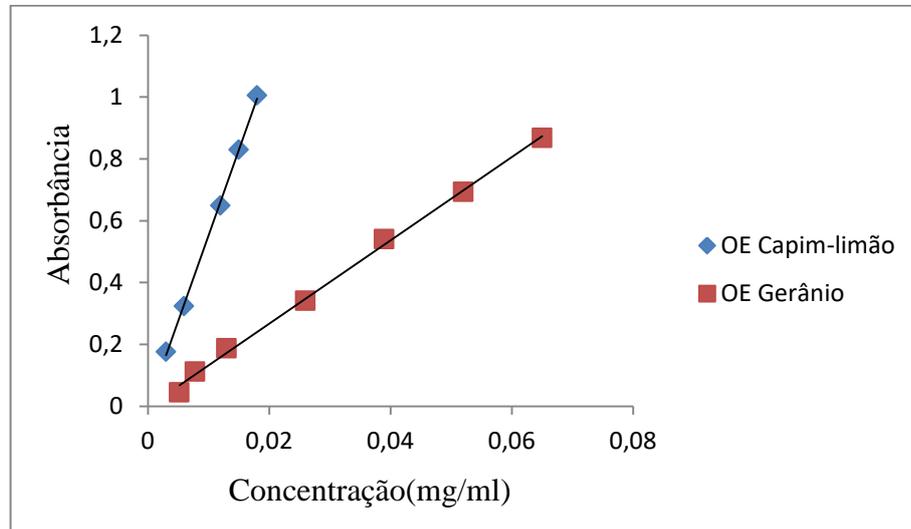


Figura 32 - Curva de calibração do óleo resina (229nm) e do óleo essencial de copaíba (219nm) em etanol.

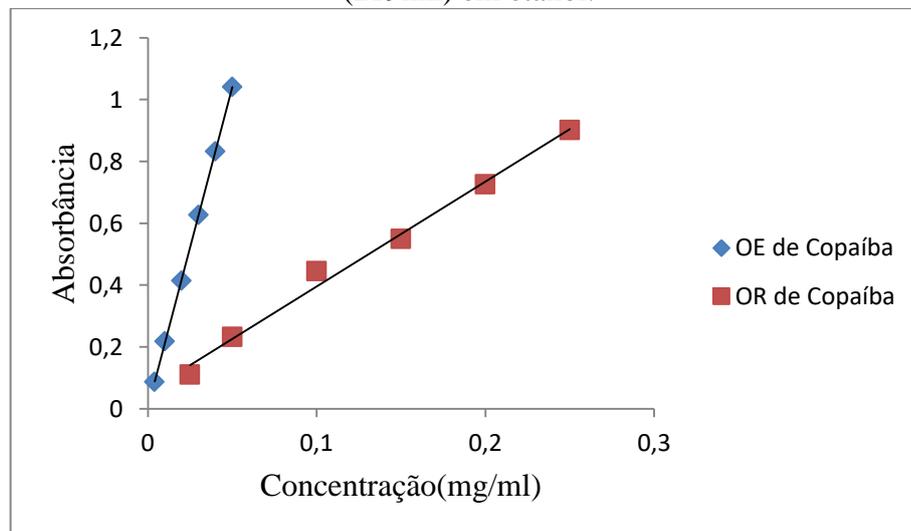


Figura 33 - Curva de calibração dos OE de Gerânio (205 nm) em PBS e 10% (v/v) de Etanol (95% PA).

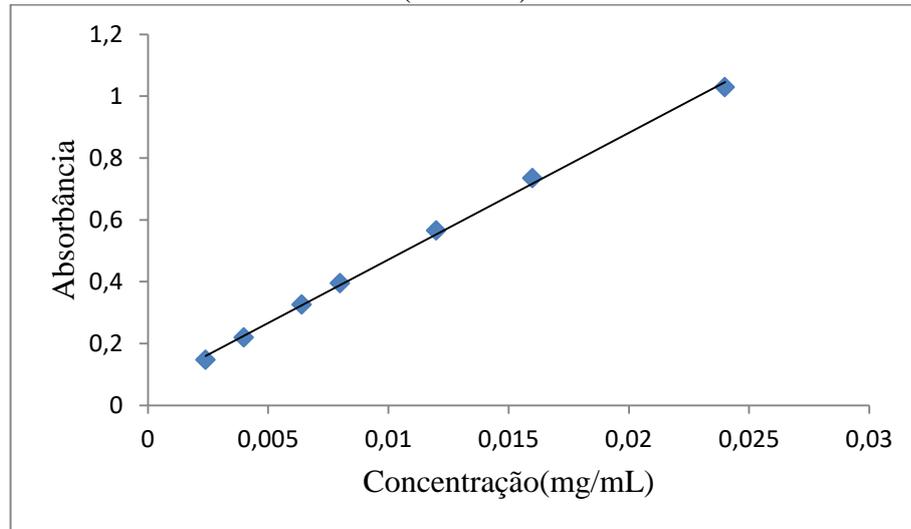
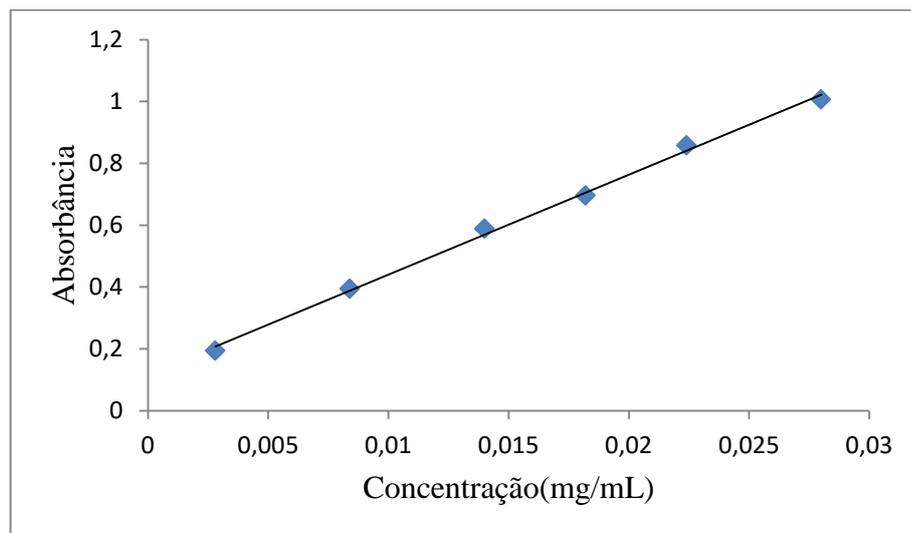


Figura 34 - Curva de calibração dos OE de Gerânio (203,5 nm) em HCl e 10% (v/v) de Etanol (95% PA).



APÊNDICE B - MODELOS CINÉTICOS APLICADOS

Figura 35 - Modelo cinético de ordem zero.

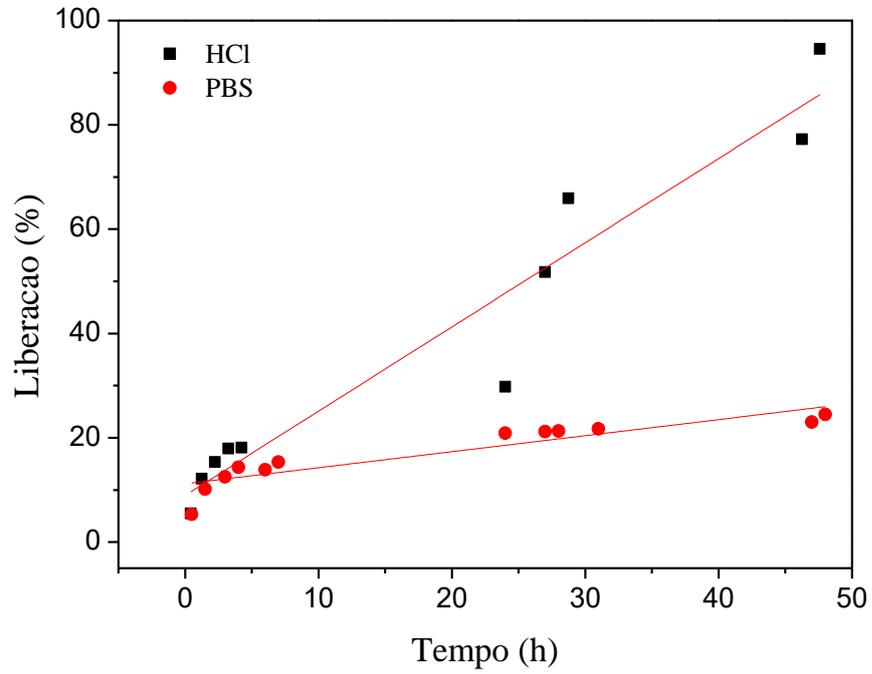


Figura 36 - Modelo cinético de primeira ordem.

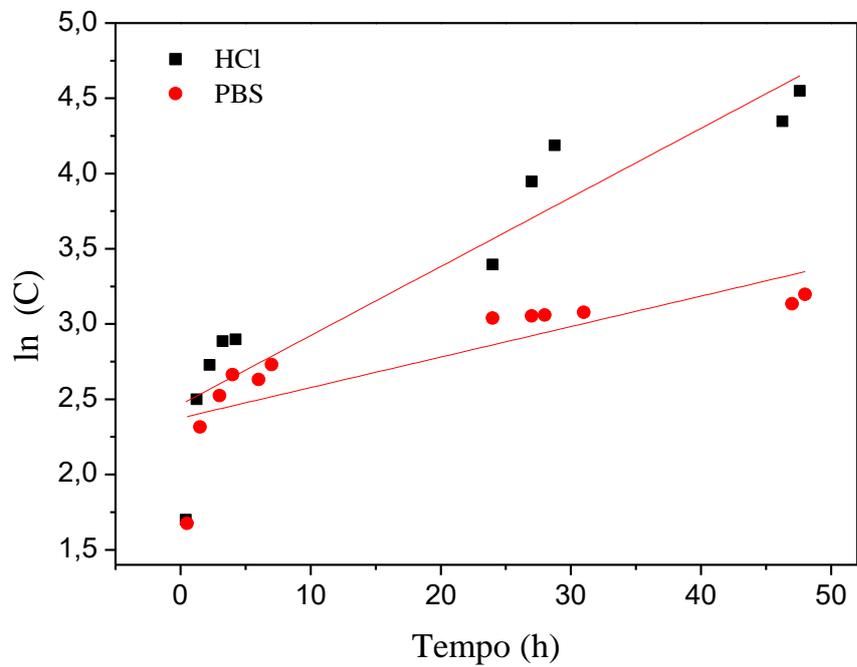


Figura 37 - Modelo cinético de Higuchi.

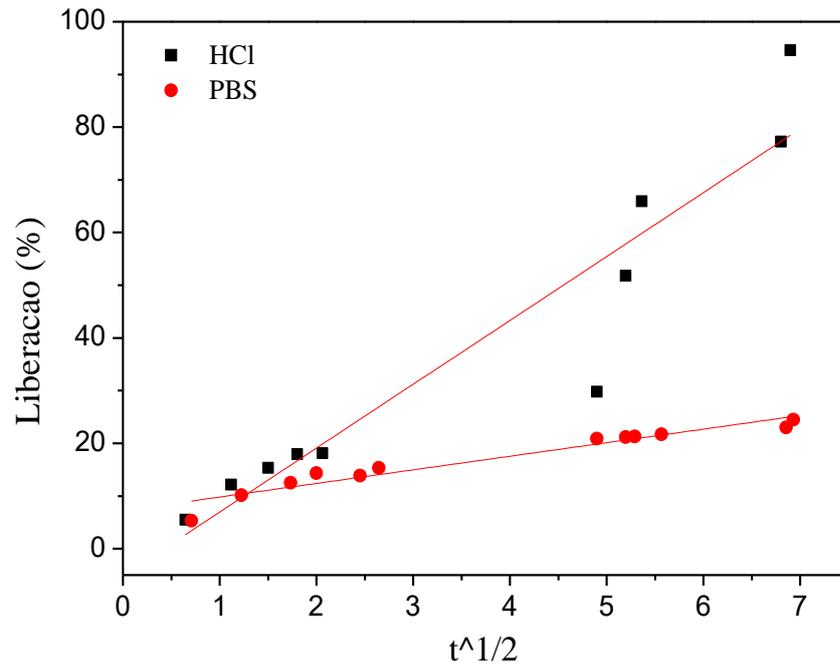


Figura 38 - Modelo cinético de Korsmeyer-Peppas.

