



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Tatiane Michele Popiolski

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO  
ÓLEOS ESSENCIAIS ANTIBACTERIANOS PARA ADSORÇÃO  
EM FIBRAS TÊXTEIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Polímeros  
Orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

Florianópolis

2016



Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da  
Universidade Federal de Santa Catarina

Popiolski, Tatiane Michele Popiolski

Desenvolvimento de nanopartículas contendo óleos  
essenciais antibacterianos para adsorção em fibras têxteis  
/ Tatiane Michele Popiolski Popiolski ; orientador, Valdir  
Soldi Soldi - Florianópolis, SC, 2016.

141 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Engenharia de Materiais.

Inclui referências

1. Ciência e Engenharia de Materiais. 2. Copolímeros em  
bloco. 3. Nanopartículas. 4. Óleos essenciais. 5. Atividade  
antibacteriana. I. Soldi, Valdir Soldi. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Engenharia de Materiais. III. Título.



Tatiane Michele Popiolski


**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS  
CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS  
ANTIBACTERIANOS PARA ADSORÇÃO EM  
FIBRAS TÊXTEIS**

Essa tese de doutorado foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina.

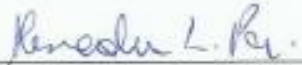
Florianópolis, 31 de outubro de 2016.


Prof. Dr. Guilherme Mariz de Oliveira Barra  
Coordenador do Curso


**Banca Examinadora:**

  
Prof. Dr. Valdir Soldi,  
Orientador  
Universidade Federal de  
Santa Catarina - UFSC

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Marcia Margarete Meier,  
Universidade do Estado de Santa  
Catarina - UDESC

  
Prof. Dr. Alexandre L. Parize,  
Universidade Federal de  
Santa Catarina - UFSC

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Irene Kulkamp,  
Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul - UFRGS

  
Prof. Dr. Ismael C. Belletini,  
Universidade Federal de  
Santa Catarina - UFSC

  
Prof. Dr. Guilherme M. de Oliveira Barra  
Universidade Federal de Santa  
Catarina - UFSC



Dedico este trabalho aos meus pais, que me deram todo o suporte emocional, psicológico e financeiro para que eu não desistisse e chegasse ao fim.





## AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a Deus por estar sempre presente.

Ao orientador Prof. Dr. Valdir Soldi, pela oportunidade, confiança, orientação e paciência, proporcionando-me liberdade e independência na realização deste trabalho.

Ao Dr. Redouane Borsali que me recebeu em Grenoble, agradeço pela orientação e apoio durante minha estadia na França.

Aos pesquisadores e funcionários do CERMAV Cyrille Rochas pelas discussões de DLS, ao Jean-Luck Puteaux por toda colaboração nas micrografias de MET, ao Frederic Dubreuil pela ajuda em todo meu trabalho e com as imagens de AFM e em especial Djamila Ouhab, Armelle Roncin e demais colegas do Cermav, pela amizade e apoio.

Aos professores da banca examinadora, pelo tempo dedicado à análise deste trabalho.

À minha família pelo carinho, compreensão, por me fazerem acreditar que sou capaz e pelo constante incentivo.

Aos colegas do grupo Polimat, Sílvia, Idejan, Mauro, Karol e Chico, e todos que, mesmo não citados, colaboraram direta e indiretamente para que fosse possível a realização e conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos de Florianópolis, Léia, Luciane, Ale e meus amigos brasileiros que tive o prazer de conviver na França, Lívia, Soraia, Josi, Luis e Zezo, pela força e amizade.

À UFSC e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais e aos professores e funcionários por terem possibilitado minha formação acadêmica.

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro no país e no exterior.

Meu muito obrigada.



“São fúteis e cheias de erros as ciências que não  
nasceram da experimentação, mãe de todo  
conhecimento.”

(Leonardo da Vinci)



## RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados antibacterianos, visando à aplicação na indústria calçadista. Dois diferentes sistemas de nanopartículas a base de copolímeros em bloco foram desenvolvidos pela técnica da nanoprecipitação: nanopartículas de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> e de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>, contendo óleo essencial de lavanda, óleo essencial de eucalipto e também uma blenda de óleos. Ambos, os sistemas coloidais apresentaram formas esféricas. Estudos de espalhamento de luz dinâmico mostraram raios hidrodinâmicos de aproximadamente 75 nm para as nanopartículas de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub>, e de cerca de 25 nm para as nanopartículas de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>. As soluções de nanopartículas de PEO-*b*-PLA contendo óleo essencial de lavanda e com a mistura de óleos apresentaram valores de eficiência de encapsulação de 70-80%. As nanopartículas também foram caracterizadas por análise de monitoramento de nanopartículas (NTA) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A impregnação das nanopartículas contendo óleos essenciais nos têxteis ocorreu por imersão individual de cada amostra em 1 mL de solução, até total absorção do líquido. A adsorção das nanopartículas nos têxteis mostrou boa estabilidade, visto que a adsorção mostrou-se eficiente mesmo após cerca de 60 dias, mantendo as nanopartículas incorporadas nos têxteis, mesmo com a ação da umidade e temperatura. As nanopartículas contendo a blenda de óleos essenciais, para os dois sistemas estudados, demonstraram atividade antibacteriana contra as bactérias *Staphylococcus Aureus*, indicando seu potencial como agente antibacteriano. Assim, os resultados obtidos indicam que os sistemas desenvolvidos para os têxteis estudados contendo nanopartículas, oferecem uma nova estratégia para a liberação controlada e atividade antibacteriana de óleos essenciais e apresentam potenciais aplicações na indústria calçadista.

**Palavras-chave:** Copolímeros em bloco; Nanopartículas; Óleos essenciais; Atividade antibacteriana; Espalhamento de luz dinâmico; Análise de monitoramento de partículas; Indústria calçadista.



## ABSTRACT

This manuscript describes the development of antibacterial nanostructured systems aimed at application in the footwear industry. Two different nanoparticle systems based on block copolymers were developed by the nanoprecipitation technique: nanoparticles of PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> and PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>, containing lavender essential oil, eucalyptus essential oil and a blending of essential oils. Both colloidal systems have spherical shape. Dynamic light scattering studies showed hydrodynamic radius around 75 nm to nanoparticles PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> and about 25 nm for nanoparticles PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>. The solutions of PEO-*b*-PLA nanoparticles containing lavender essential oil and the blending showed encapsulation efficiency values of 70-80%. The nanoparticles were also characterized by nanoparticle tracking analysis (NTA) and transmission electronic microscopy (MET). The impregnation of nanoparticles containing essential oils in the textiles was performed by individual immersion of each sample in 1 mL of solution, until total absorption of the liquid. The adsorption of the nanoparticles in the textiles showed good stability, since the adsorption was efficient even after about 60 days, keeping the nanoparticles incorporated in the textiles, even with the action of humidity and temperature. Nanoparticles containing the blending of essential oils, for the two studied systems, demonstrated antibacterial activity against *Staphylococcus Aureus*, indicating its potential as an antibacterial agent. The results indicate that the systems developed for the studied textiles containing nanoparticles offer a new strategy for the controlled release and antibacterial activity of essential oils, suggesting a potential application in the footwear industry.

**Keywords:** Block copolymers; nanoparticles; essential oils; antibacterial activity; dynamic light scattering; nanoparticle tracking analysis; Footwear industry.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de estruturas moleculares (a) lineares, (b) ramificadas, (c) com ligações cruzadas, (d) em rede (tridimensional). .....	34
Figura 2: Formação de micelas poliméricas em meio aquoso. ....	35
Figura 3: Representação esquemática das principais morfologias que podem ser formadas a partir de um copolímero em bloco em solução: micela, micela cilíndrica, vesícula e túbulos ramificados. ....	36
Figura 4: Micelas obtidas a partir de copolímeros dibloco como veículos de liberação em água. ....	36
Figura 5: Esquema da polimerização aniônica do PEO- <i>b</i> -PLA. ....	38
Figura 6: Esquema ilustrativo de diferentes processos de encapsulação de compostos aromatizantes. ....	41
Figura 7: Incorporação de princípio ativo em micelas com núcleo hidrofóbico. ....	42
Figura 8: Estrutura química do linalol. ....	45
Figura 9: Estrutura química do componente majoritário do óleo de eucalipto, o 1,8-cineol. ....	45
Figura 10: Imagem ilustrativa do entrelaçamento do tecido plano. ....	47
Figura 11: Imagem ilustrativa do entrelaçamento do tecido não tecido. ....	48
Figura 12: Esquema ilustrativo de têxtil contendo nanopartículas. ....	49
Figura 13: Esquema do processo para formação das nanopartículas sem óleo. ....	62
Figura 14: Esquema do processo para formação das nanopartículas contendo agentes ativos. ....	63

Figura 15: Figura ilustrativa do método de ultracentrifugação. ....	69
Figura 16: Ilustração da diálise .....	70
Figura 17: Foto ilustrativa da aparência das soluções: A e C antes da formação das micelas; B e D após a formação das micelas e encapsulação do agente ativo. ....	78
Figura 18: Função de correlação medida por DLS a 90°, 60° e 120° e distribuição dos tempos de relaxação obtido num ângulo de 90° para: PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> (A); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> com óleo de lavanda (B); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> com óleo de eucalipto (C); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> com a Blenda (D).....	82
Figura 19: Função de correlação medida por DLS a 90°, 60° e 120° e distribuição dos tempos de relaxação obtido num ângulo de 90° para: PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> (A); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> com LO (B); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> com EO (C); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> com a Blenda (D). ....	83
Figura 20: Dependência da frequência de relaxação (1/τ) do quadrado do modulo do vector de onda (q <sup>2</sup> ) das soluções aquosas de PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> (A); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> com LO (B); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> com EO (C); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> com a BD (D); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> (E); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> com LO (F); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> com EO (G); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> com a BD (H).....	85
Figura 21: Imagens de MET para as amostras: PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> (A); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> com LO (B); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> com EO (C); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> com a BD (D).....	88
Figura 22: Histogramas das imagens de MET para as amostras: PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> (A); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> com LO (B); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> com BD (C); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> com a EO (D).....	89
Figura 23: Imagens de MET para as amostras: PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> (A); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> com LO (B); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> com EO (C); PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> com a BD (D). ....	90

Figura 24: Histogramas das imagens de MET para as amostras: PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> (A); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com LO (B); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com BD (C); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com a EO (D). ..... 91

Figura 25: Gráficos de  $\ln I$  versus quadrado do modulo do vector de onda ( $q^2$ ) das soluções aquosas de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> (A); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com LO (B); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com EO (C); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com a BD (D); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> (E); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com LO (F); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com EO (G); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com a BD (H). ..... 93

Figura 26: Potencial zeta: (A) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub>; (B) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>. ..... 96

Figura 27: Distribuição de tamanho a partir de medições NTA com o vídeo NTA correspondente e o tamanho gráfico 3D: A) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub>; B) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com LO; C) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com EO; D) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com BD. .... 100

Figura 28: Porcentagem de liberação do agente ativo das nanopartículas: (A) Óleo de lavanda; (B) Blenda de óleos; (C) Óleo de eucalipto. .... 105

Figura 29: a) Fotografia digital do tecido A; b) imagem de MO (0,75 de magnificação) do tecido A; c) e d): Fotografia digital e imagem de MO (0,75 de magnificação) do tecido B. .... 108

Figura 30: Imagens de MEV para o tecido “branco” (A); e o tecido contendo as nanopartículas (B). ..... 109

Figura 31: Perfil de liberação do agente ativo das nanopartículas. .... 110



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Procedimentos preliminares utilizados para definição do processo de preparação das nanopartículas. ....	79
Tabela 2: Raio hidrodinâmico determinado por DLS. ....	84
Tabela 3: Raio hidrodinâmico real determinado pela dependência angular por DLS. ....	86
Tabela 4: Diâmetro determinado por MET e seus respectivos desvios padrão. ....	92
Tabela 5: Valores de $\rho$ e a morfologia das partículas. ....	94
Tabela 6: Raio de giração ( $R_g$ ) determinado por SLS, raio hidrodinâmico ( $R_H$ ) determinado por DLS e grau de anisotropia. ....	95
Tabela 7: Raio hidrodinâmico determinado por DLS (Goniômetro) e NanoSizer, e seus respectivos IP. ....	98
Tabela 8: Valores das médias dos raios hidrodinâmicos determinados por NTA. ....	101
Tabela 9: Eficiência de encapsulação e quantificação de óleo essencial das soluções de nanopartículas. ....	102
Tabela 10: Porcentagens de redução para os testes de atividade antibacteriana. ....	112



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – porcentagem  
 $\theta$  – ângulo de espalhamento  
 $\lambda$  – comprimento de onda  
> – maior  
° – graus  
°C – graus Celsius  
 $\mu\text{m}$  – micrômetros  
 $\mu\text{m}^2$  – micrômetro quadrado  
 $A(t)$  – distribuições de tempos de relaxação  
AATCC – American Association of Textile Chemists and Colorists  
 $b$  – bloco  
BD – blenda de óleos essenciais  
 $C(q, t)$  – funções de autocorrelação  
CCD – câmera de carga acoplada  
cm – centímetros  
 $\text{cm}^2$  – centímetro quadrado  
cP – centipoise  
Da – Dalton  
DLS – espalhamento de luz dinâmico  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
EE – eficiência de encapsulação  
EO – óleo de eucalipto  
 $g^{(2)}-1$  – função de correlação  
h – horas  
I - intensidade de espalhamento  
IBTeC - Instituto Brasileiro de Tecnologia do Couro, Calçado e Artefatos  
IP – índice de polidispersividade  
ISO – *International Organization for Standardization*  
 $\text{J K}^{-1}$  – joule por kelvin  
K – Kelvin  
kDa – Kilo Dalton  
kHz – kilohertz  
kV – quilovolts  
LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica  
LO – óleo essencial de lavanda  
MET – microscopia eletrônica de transmissão  
MEV – microscopia eletrônica de varredura

mg – miligramas  
mg mL<sup>-1</sup> – miligramas por mililitros  
min – minutos  
mL – mililitros  
mL h<sup>-1</sup> – mililitros por hora  
mm – milímetros  
MO – microscópio óptico  
MPa – Mega Pascal  
mV – milivolts  
mW – miliWatts  
N m<sup>-1</sup> – Newton por metro  
NBR – Norma Brasileira  
nm – nanômetros  
NPs – nanopartículas  
nS – nanosiemens  
NS – NanoSizer  
NTA – análise de monitoramento de nanopartículas  
PCL – poli(caprolactona)  
PEG – poli(etileno glicol)  
PEO – poli(óxido de etileno)  
PEO-*b*-PLA - poli(óxido de etileno)-*b*- poli(ácido láctico)  
PLA – poli(ácido láctico)  
PLGA – poli(ácido láctico-co-glicólico)  
Polimat – Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos  
q – vetor de onda  
q<sup>2</sup> – módulo do vetor de onda  
Rg – raio de giro  
R<sub>H</sub> – raio hidrodinâmico  
rpm – rotação por minuto  
s – segundos  
SLS – espalhamento de luz estático  
T – temperatura  
UV-Vis – Ultra Violeta – visível  
w/v – massa/volume  
ρ – grau de anisotropia  
Γ – frequência de relaxação  
η – índice de refração  
μg mL<sup>-1</sup> – microgramas por mililitros  
μL – microlitros  
ζ – potencial zeta



## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 .....	65
Equação 2 .....	65
Equação 3 .....	65
Equação 4 .....	66
Equação 5 .....	67
Equação 6 .....	67
Equação 7 .....	69
Equação 8 .....	73
Equação 9 .....	73
Equação 10 .....	73



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
1.1 OBJETIVOS.....	29
1.1.1 Objetivo Geral .....	29
1.1.2 Objetivos Específicos.....	30
<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>31</b>
2.1 NANOTECNOLOGIA.....	33
2.2 POLÍMEROS .....	34
2.3 COPOLÍMEROS EM BLOCO .....	35
<b>2.3.1 Poli(óxido de etileno)-<i>b</i>-poli(ácido lático) .....</b>	<b>37</b>
2.4 ENCAPSULAÇÃO DE AGENTES ATIVOS EM NANOPARTÍCULAS.....	40
2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	43
<b>2.5.1 Óleo Essencial de Lavanda .....</b>	<b>44</b>
<b>2.5.2 Óleo de Eucalipto.....</b>	<b>45</b>
2.6 INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS EM TÊXTEIS .....	46
<b>2.6.1 Materiais Têxteis .....</b>	<b>46</b>
2.6.1.1 Naturais .....	46
2.6.1.2 Químicos .....	46
2.6.1.2.1 Sintéticos .....	46
2.6.1.2.2 Artificiais.....	47
<b>2.6.2 Incorporação de Nanopartículas em Têxteis.....</b>	<b>48</b>
2.7 LIBERAÇÃO DE AGENTES ATIVOS DE NANOPARTÍCULAS ADSORVIDAS EM MATRIZES.....	52
2.8 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	52
<b>2.8.1 Microrganismos .....</b>	<b>54</b>
2.8.1.1 Bactéria <i>Staphylococcus Aureus</i> .....	55
<b>CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
3.1 MATERIAIS .....	61
3.2 METODOLOGIA PARA PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	61
3.3 ENCAPSULAÇÃO DE AGENTES ATIVOS EM NANOPARTÍCULAS.....	63
3.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	64
<b>3.4.1 Espalhamento de Luz Estático e Dinâmico .....</b>	<b>64</b>
<b>3.4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....</b>	<b>66</b>
<b>3.4.3 Medidas de Potencial Zeta .....</b>	<b>67</b>
<b>3.4.4 Análise de Rastreamento de Nanopartículas.....</b>	<b>67</b>

<b>3.4.5</b>	<b>Espectroscopia de UV-Vis.....</b>	<b>68</b>
3.4.5.1	Eficiência de Encapsulação.....	68
3.4.5.2	Curva de Calibração para Determinação da Concentração de Óleo Essencial.....	70
3.4.5.3	Avaliação do Perfil de Liberação dos Agentes Ativos a partir das Nanopartículas.....	70
<b>3.5</b>	<b>INCORPORAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS EM FIBRAS TÊXTEIS.....</b>	<b>71</b>
<b>3.6</b>	<b>AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS EM FIBRAS TÊXTEIS.....</b>	<b>71</b>
<b>3.7</b>	<b>ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS TÊXTEIS.....</b>	<b>72</b>
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>		<b>75</b>
4.1	FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	77
4.2	ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO.....	81
4.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	87
4.4	ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO.....	92
4.5	NANOSIZER.....	95
4.6	ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS.....	99
4.7	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	102
<b>4.7.1</b>	<b>Construção da Curva de Calibração.....</b>	<b>104</b>
4.8	ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	104
<b>5</b>	<b>ADSORÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS EM FIBRAS TÊXTEIS.....</b>	<b>107</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO.....	109
<b>5.1.1</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura.....</b>	<b>109</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Ensaio de Liberação <i>in vitro</i> dos Agentes Ativos das Nanopartículas em Materiais Têxteis.....</b>	<b>110</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Atividade Antibacteriana.....</b>	<b>111</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>		<b>117</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>		<b>119</b>
<b>ANEXO A – Norma AATCC 100-2004.....</b>		<b>137</b>

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**



## 1. INTRODUÇÃO

O interesse no estudo da auto-associação em escala nanométrica de sistemas de copolímeros em bloco vem crescendo, sendo atualmente um dos principais temas pesquisados no campo da nanotecnologia. Em função da rápida expansão e desenvolvimento significativo de novos sistemas obtidos via auto-associação macromolecular, é possível prever que a próxima geração de nanopartículas a base de copolímeros crescerá ainda mais em importância [1].

O desenvolvimento de nanopartículas tem se caracterizado como uma estratégia promissora para diversas aplicações e entre estas, a incorporação, transporte e liberação de princípios ativos (por exemplo fármacos, essências, óleos, etc.), tem sido foco de estudo de um grande número de pesquisadores [2, 3, 4, 5]. Geralmente, nanopartículas que incluem nanopartículas e nanoesferas podem ser obtidas a partir de sistemas de origem tanto natural (p. ex. polímero biodegradável), como sintética.

Trabalhos recentes tem destacado o uso da técnica de auto-associação para formação de nanopartículas a partir de polímeros e copolímeros em bloco com total controle da morfologia, que é um fator considerado importante em sistemas de incorporação e liberação de agentes ativos. Por exemplo, Otsuka e seus colaboradores (2010) sintetizaram um copolímero em bloco híbrido contendo em sua estrutura um sacarídeo e um polímero sintético poli(N-isopropilacrilamida) ( $N_3$ -PNIPAM<sub>n</sub>), um sistema viável para o desenvolvimento de nanopartículas via auto-associação em água [6]. Com o mesmo objetivo, Dal Bó e colaboradores (2011) sintetizaram sistemas anfífilicos a partir de carboidratos, que posteriormente foram submetidos a um processo de auto-associação em água para obtenção de nanopartículas (micelas) com diâmetro médio de 10 nm [7, 8].

O poli(ácido láctico) (PLA) é um poliéster biodegradável e biocompatível, amplamente utilizado em aplicações relacionadas com a área de medicina [9]. PLA e seus copolímeros têm sido utilizados para o desenvolvimento de nanopartículas para entrega de fármacos [10, 11]. O poli(óxido de etileno) (PEO) é também um polímero atóxico. Com essas características um dos sistemas mais interessantes é o copolímero em bloco composto de PLA-*b*-PEO, o qual é capaz de formar

nanopartículas termodinamicamente estáveis, através de um processo de auto-associação [12, 13].

Estudos anteriores demonstraram o potencial promissor do uso de nanopartículas com copolímeros de PEO-*b*-PLA. Por exemplo, Dai e Lim (2015) demonstraram a viabilidade da encapsulação do pó da semente de mostarda em nanopartículas de PLA-*b*-PEO, para aplicação antibacteriana [14].

Copolímeros aleatórios e em bloco de poli(ácido láctico) com o poli(ácido glicólico),  $\epsilon$ -caprolactona e poli (etileno glicol) são geralmente utilizados para encapsulação e liberação de fármacos [15].

Geralmente, óleos essenciais são substâncias voláteis, sensíveis ao oxigênio, luz, umidade e calor. Estas características especiais poderiam diminuir a sua aplicabilidade no uso de cosméticos, alimentos, produtos farmacêuticos e indústrias. Assim, a encapsulação e, em particular, a nanoencapsulação, é um dos métodos mais eficazes para a veiculação de substâncias ativas, sendo uma abordagem viável e eficiente para aumentar a sua estabilidade física e protegendo-os de interações com fatores ambientais, tais como, o pH, o oxigênio, luz e umidade [16,17,18]. Por exemplo, a encapsulação do eugenol e carvacrol em micelas nanométricas para a solubilização na fase aquosa também resultou em atividade antibacteriana contra duas bactérias patogênicas [19].

A encapsulação da mistura de terpenos extraída de *Melaleuca alternifolia* e D-limoneno, foi utilizada como um método para melhorar a segurança e qualidade dos alimentos através da adição de conservantes naturais, a fim de aumentar e manter a atividade antibacteriana dos compostos encapsulados. As formulações foram testadas em sucos de frutas, a fim de avaliar a destruição de microrganismos inoculados e o prolongamento da vida de prateleira contra a alteração dos parâmetros de qualidade [17].

Considerando os aspectos acima mencionados, no presente estudo, o primeiro objetivo foi a preparação e caracterização de nanopartículas obtidas a partir da auto-associação de sistemas de copolímeros em blocos, a partir do poli(óxido de etileno)-*b*-poli(ácido láctico) (PEO-*b*-PLA), utilizando a técnica de nanoprecipitação sob condições controladas para encapsular moléculas ativas (óleos essenciais com propriedades antibacterianas). O segundo objetivo foi a adsorção das nanopartículas previamente preparadas, em fibras têxteis. Os materiais desenvolvidos foram caracterizados usando as técnicas de



espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS), bem como técnicas de imagem como microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de força atômica (AFM).

Estes parâmetros foram estudados e avaliados quanto ao favorecimento e tempo de liberação dos agentes ativos presentes nas nanopartículas. A utilização de óleos essenciais, que possam ser liberados por processos como umidade, calor ou cisalhamento, tem como principal objetivo minimizar o desconforto e o mau cheiro causado pela presença de bactérias associadas ao suor, como ocorre, por exemplo, em calçados devido ao aumento excessivo do calor interno e outros problemas advindos do longo tempo de uso. A utilização de óleos essenciais substituem as nanopartículas de prata que possuem atividade bactericida, porém, podem causar bioacumulação no organismo, trazendo riscos a saúde.

Do ponto de vista tecnológico, objetivou-se obter um sistema de liberação nanoestruturado que apresente estabilidade e atenda os requisitos de liberação controlada, visando a aplicação em componentes do calçado (fibras têxteis) favorecendo dessa forma as empresas calçadistas.

Esta tese de doutorado foi dividida em quatro capítulos principais. No Capítulo I, foi abordada a introdução e bem como os objetivos desse estudo. O Capítulo II apresenta os aspectos teóricos relativos à técnica de preparação das nanopartículas, encapsulamento e liberação de óleos essenciais, bem como a adsorção das nanopartículas em diferentes fibras têxteis. Os procedimentos experimentais que foram aplicados durante o desenvolvimento do presente estudo, e as técnicas de caracterização selecionadas, foram descritos no Capítulo III. Os resultados e as discussões foram apresentados no Capítulo IV e a seguir são apresentadas as conclusões e as referências utilizadas para a elaboração desta Tese.

### 1.1 OBJETIVOS

#### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver nanopartículas a partir de copolímeros em bloco, estudar a incorporação e liberação de agentes ativos (óleos essenciais com atividade antibacteriana) e avaliar a

adsorção das nanopartículas previamente preparadas em fibras têxteis, visando a aplicação em componentes do calçado.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Preparar nanopartículas via auto-associação a partir de copolímeros em blocos de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> e PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>;
- ✓ Encapsular óleos essenciais com atividade antibacteriana nas nanopartículas, entre eles: óleo essencial de lavanda, óleo de eucalipto e uma blenda de óleos essenciais;
- ✓ Caracterizar as nanopartículas quanto ao tamanho de partícula, morfologia e potencial zeta;
- ✓ Investigar o perfil de liberação do agente ativo das nanopartículas;
- ✓ Adsorver as nanopartículas previamente preparadas em diferentes fibras têxteis;
- ✓ Avaliar o perfil de liberação dos óleos essenciais das nanopartículas após adsorção nas fibras têxteis em termos da potencial aplicação como componente do calçado, considerando a influência da umidade e calor no nanocompósito preparado.
- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos têxteis contendo as nanopartículas previamente preparadas.

## **CAPÍTULO 2**

### **REVISÃO DA LITERATURA**



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 NANOTECNOLOGIA

As perspectivas em nanociência têm levado a um crescente número de iniciativas na área. Tais iniciativas refletem o caráter estratégico da nanociência para o avanço do conhecimento e potencialidades de seu grande impacto social ao longo dos anos e décadas futuras.

O impacto da nanociência na sociedade reflete-se nos avanços recentes das tecnologias de comunicação, fibras ópticas e telefonia celular avançada. Mais recentemente, avanços em nanomateriais e materiais nanoestruturados permitiram o desenvolvimento de novos tipos de lasers, como no exemplo do laser azul, assim como aumento nas densidades e capacidades de dispositivos de armazenamento de dados digitais [20].

As nanopartículas são conhecidas por apresentarem uma alta relação entre a área e o volume. Por conta disso, a interação das nanopartículas com o meio passa a ser mais efetiva produzindo economia de material e aumento de eficiência nos processos industriais.

A nanotecnologia gerou alguns novos desafios como, por exemplo, o desenvolvimento de importantes processos de síntese de nanoestruturas que tem como base substâncias inorgânicas e orgânicas [21].

O interesse de inúmeros grupos de pesquisa pela nanotecnologia é devido ao seu enorme potencial de aplicação nos mais variados setores industriais e ao impacto que seus resultados podem representar para o desenvolvimento tecnológico e econômico. Neste contexto, existe uma infinidade de áreas onde a nanotecnologia pode oferecer uma contribuição significativa, algumas das quais já possuem produtos sendo comercializados. O Brasil tem procurado não ficar fora desta corrida e desde 2001, o governo começou um esforço conjunto nesta área, conhecido como Iniciativa Brasileira em Nanotecnologia, formando uma rede de pesquisa cooperativa neste tema, que conta com a participação de mais de uma centena de instituições de pesquisa e de ensino em todo o País, as quais, por sua vez, têm expandido suas fronteiras para se integrar no estabelecimento de parcerias com institutos e grupos de excelência em nanotecnologia nos Estados Unidos, na Europa, China, América Latina e no Japão [22].

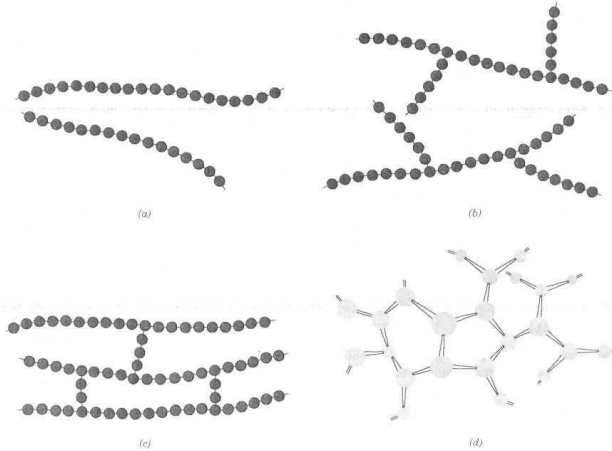
Conforme a aplicação pretendida, diferentes tipos de nanopartículas têm sido utilizadas, com variações na morfologia ou nas suas propriedades físicas, térmicas e/ou mecânicas [23].

## 2.2 POLÍMEROS

De acordo com Kalpakjian [24], a palavra polímero foi usada pela primeira vez em 1866, com os primeiros polímeros sendo compostos de material natural orgânico derivado de animais e vegetais, sendo que o primeiro polímero orgânico sintético o fenol-formaldeído, foi desenvolvido em 1906. Já a palavra, plástico, foi utilizada pela primeira vez em 1909 e tem origem da palavra grega, *plastikos*, que significa “capaz de ser moldado e conformado”.

Uma propriedade importante dos polímeros é sua massa molar, que pode ser definida pela soma das massas de seus monômeros. Quando consideramos a interação entre essas cadeias, podemos classificar os polímeros quanto a sua estrutura molecular. A Figura 1 mostra os tipos de estrutura de uma molécula polimérica, na qual cada esfera representa um mero [25].

Figura 1: Representação esquemática de estruturas moleculares (a) lineares, (b) ramificadas, (c) com ligações cruzadas, (d) em rede (tridimensional).



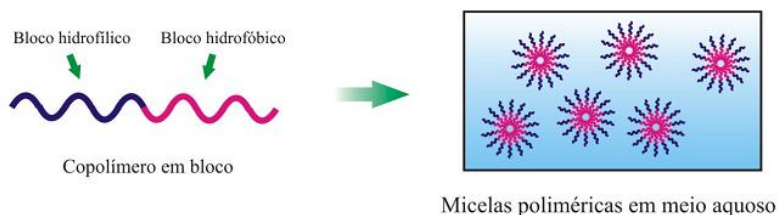
FONTE: CALLISTER, W. D. [25].

### 2.3 COPOLÍMEROS EM BLOCO

O processo de auto-associação de copolímeros em bloco em solução tem sido de grande interesse para aplicações nanotecnológicas.

No processo de formação de micelas em água, o bloco hidrofílico é orientado para a fase contínua, formando o revestimento da nanopartícula enquanto que a parte hidrofóbica, protegida do meio externo, forma o núcleo (Figura 2). O núcleo hidrofóbico serve como um micro ambiente ideal para a encapsulação e liberação de princípios ativos de caráter hidrofóbico, enquanto que o bloco em contato com o solvente serve como uma interface estabilizante entre o núcleo hidrofóbico e o meio externo [26, 27, 28].

Figura 2: Formação de micelas poliméricas em meio aquoso.



FONTE: PORTO (2011) [103].

As propriedades das nanopartículas em geral são afetadas pela cinética da reação. O tamanho e número de agregações destas nanopartículas são dependentes da concentração dos reagentes, e podem mudar com estímulos externos (temperatura, pH, força iônica, umidade, entre outros) ou com a composição do copolímero (fração de volume de cada bloco) e a ordem em que os reagentes são adicionados à solução [29].

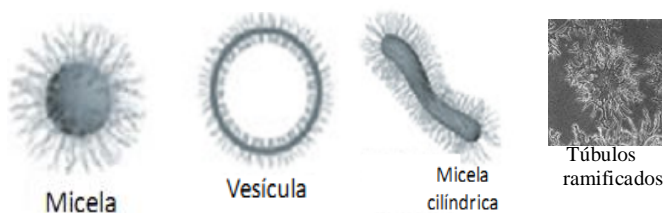
A capacidade de se auto-organizar dos copolímeros em bloco possibilita a obtenção de nanoestruturas com uma grande variedade de morfologias, tais como micelas, cilindros, vesículas, túbulos ramificados, nanoesferas, nanopartículas e polymersomes [30], quando dissolvido em um chamado solvente "seletivo", isto é, um solvente que é termodinamicamente bom para um bloco e pobre para o outro [31].

Tem sido demonstrado, que vários parâmetros tais como a temperatura, composição do copolímero, concentração ou preparação da

amostra, podem ser modificados e controlados de modo a adaptar a morfologia micelar [32, 33].

Na Figura 3 são representadas algumas morfologias que podem ser formadas.

Figura 3: Representação esquemática das principais morfologias que podem ser formadas a partir de um copolímero em bloco em solução: micela, micela cilíndrica, vesícula e túbulos ramificados.



FONTE: Adaptado da referência FORSTER, S. (2002) [34].

A Figura 4 ilustra como exemplo o processo de formação de micelas a partir de copolímeros dibloco como veículos de liberação em água. O estudo foi realizado com a ajuda de espalhamento de luz, microscopia eletrônica e fluorescência [35].

Figura 4: Micelas obtidas a partir de copolímeros dibloco como veículos de liberação em água.



FONTE: GIACOMELLI, C. (2006) [35].



As nanopartículas formadas por copolímeros apresentam propriedades que melhoram sua estabilidade.

As nanopartículas são preparadas via auto-associação por uma etapa de nanoprecipitação de uma maneira reprodutível e previsível, tornando-se potencialmente adequadas para produção em larga escala [33].

A capacidade de carga micelar é decisiva para aplicações práticas de nanopartículas. Idealmente, os parâmetros de solubilidade dos copolímeros em bloco devem ser idênticos, a fim de atingir alta capacidade de carregamento em micelas. Em outras palavras, em termos de compatibilidade físico-química, as moléculas ativas devem coincidir com o espaço de carga. Para tanto é preciso avaliar as interações específicas entre funções químicas presentes nos agentes ativos hidrofóbicos e o núcleo de formação [36].

### 2.3.1 Poli(óxido de etileno-*b*-lático)

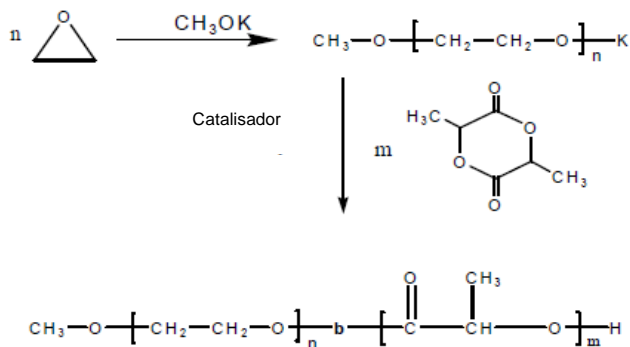
Poli(ácido lático) (PLA) é um poliéster relativamente hidrofóbico, instável em condições úmidas e biodegradável a subprodutos atóxicos (ácido lático, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O) [37]. É um polímero amplamente empregado na preparação de nanopartículas devido a suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade [10]. Através da modificação química do PLA com poli(óxido de etileno), (PEO), um copolímero anfifílico é formado, o qual é mais susceptível a degradar por hidrólise. Este copolímero de PLA-*b*-PEO também apresenta propriedade auto-associativa em meio aquoso, ou seja, formação de suspensões coloidais (dispersões de sólidos com tamanho de micro/nanopartículas em líquidos) termodinamicamente estáveis [12, 13, 38, 39, 40].

Devido às características e propriedades mencionadas, o PLA e seus copolímeros têm sido utilizados na medicina, por exemplo, na engenharia de tecidos para a restauração de tecidos deficientes e também no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para a liberação controlada de fármacos [10, 11].

O copolímero dibloco de poli(óxido de etileno-*b*-lático) é preparado por polimerização aniônica de óxido de etileno e polimerização por coordenação de ácido lático com octoato de estanho como catalisador.

A Figura 5 apresenta o esquema da reação do copolímero dibloco de PEO-*b*-PLA.

Figura 5: Esquema da polimerização aniônica do PEO-*b*-PLA.



FONTE: Adaptado de Ficha Técnica [41].

O poli (óxido de etileno) (PEO) também é um polímero não tóxico. No entanto, em grandes quantidades o PEO não é biodegradável, o que limita seu uso para a área da saúde e afins.

Jie e colaboradores (2005) utilizaram os copolímeros de PEO-*b*-PLA para comparar e avaliar as diferenças na cinética de liberação do fármaco paclitaxel com base na forma geométrica dos copolímeros. A cinética de liberação do fármaco foi comparada entre copolímeros di e tri-bloco, lineares e ramificados na forma de estrela. A degradação de PLA em forma de estrela pode apresentar um raio hidrodinâmico menor e menor viscosidade da solução, quando em comparação com polímeros lineares com a mesma massa molar e a mesma composição, o que pode resultar em uma melhor liberação do fármaco. Os autores mostraram que o perfil de liberação do fármaco encapsulado em PEO-*b*-PLA pode ser controlado ao longo de duas semanas [42].

Trabalhos como o de Ahmed e Discher (2004) reportam a liberação controlada de doxorubicina incorporada em vesículas obtidas a partir de copolímeros dibloco hidrolisáveis de poli(etileno glicol) e poli(ácido láctico) (PEG-*b*-PLA) e poli(etileno glicol) e poli(caprolactona) (PEG-*b*-PCL) [43]. Os resultados mostraram que as taxas de liberação do encapsulado (doxorubicina) das vesículas

hidrolisáveis, foram aceleradas com o aumento da proporção de PEG, porém, retardadas com uma cadeia química mais hidrofóbica como a do PCL. As taxas de liberação também aumentaram linearmente com a razão molar de copolímero degradável misturado com membranas de um copolímero em bloco não-degradável, por exemplo, poli(óxido de etileno/poli(butadieno)) (PEG-*b*-PBD). A média de tempo dos testes de liberação refletiu um processo que pode ser quantificado, onde as vesículas se desintegram lentamente ou permanecem intactas, mantendo o seu encapsulado. A análise do perfil de liberação mostrou o comportamento de copolímeros anfifílicos para a liberação controlada de fármacos [43].

Em outro estudo, Xiao e colaboradores (2010) usando diferentes composições e métodos de preparação de PEG-PLA, prepararam várias formas de nanopartículas, incluindo nanomicelas, *polymersomes*, nanoesferas, nanopartículas, para aplicação na indústria farmacêutica [44].

Buscando melhorar a solubilidade aquosa e a instabilidade após a administração intravenosa da camptotecina, melhorando a eficiência terapêutica, Neckel e Senna (2005) encapsularam o fármaco em nanopartículas de ácido poli(D,L-lático) (PLA) e copolímeros diblocos de PLA-PEG, obtendo uma eficiência de encapsulação na faixa de 76-97% [10].

Riley e colaboradores (2001) sintetizaram uma série de copolímeros em bloco com base em um bloco fixo de PEG (5 kDa) e um segmento de PLA variável (2-110 kDa) e a partir destes copolímeros preparam nanopartículas esféricas em meio aquoso. Os autores estudaram a estrutura *core-shell* destas nanopartículas, bem como a influência da massa molar do bloco de PLA sobre o tamanho e número de agregação de micelas, para aplicação na incorporação e liberação de fármacos [45].

Copolímeros em bloco com a presença de polissacarídeos, por exemplo, poli(óxido de etileno)/quitosana, também tem sido sintetizados. A quitosana (quitina desacetilada) é um polissacarídeo natural que contém grupos amino primários e é conhecida por ser insolúvel em água devido as suas fortes ligações de hidrogênio intermoleculares. Ouchi e colaboradores (1998) prepararam PEG enxertado com quitosana (PEG-g-quitosana), através da modificação química da quitosana em solução aquosa. As propriedades da solução de (PEG-g-quitosana) diferem dependendo da quantidade de PEG (grau de

introdução) em solução aquosa, e foram estudados através de medidas de espectroscopia de UV-Vis e espalhamento de luz dinâmico (DLS) [46].

De maneira geral, é conhecido que copolímeros em bloco constituídos por segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos podem formar estruturas micelares com um núcleo hidrofóbico e uma camada externa hidrofílica em meio aquoso. Estas micelas poliméricas têm sido propostas como veículos de transporte de agentes ativos pouco solúveis em água.

### 2.4 ENCAPSULAÇÃO DE AGENTES ATIVOS EM NANOPARTÍCULAS

A encapsulação é a técnica pela qual um material ou uma mistura de materiais é revestido ou aprisionado dentro de outro material ou sistema. O material revestido é chamado agente ativo ou núcleo, e o material de revestimento é chamado material de parede ou encapsulante [47].

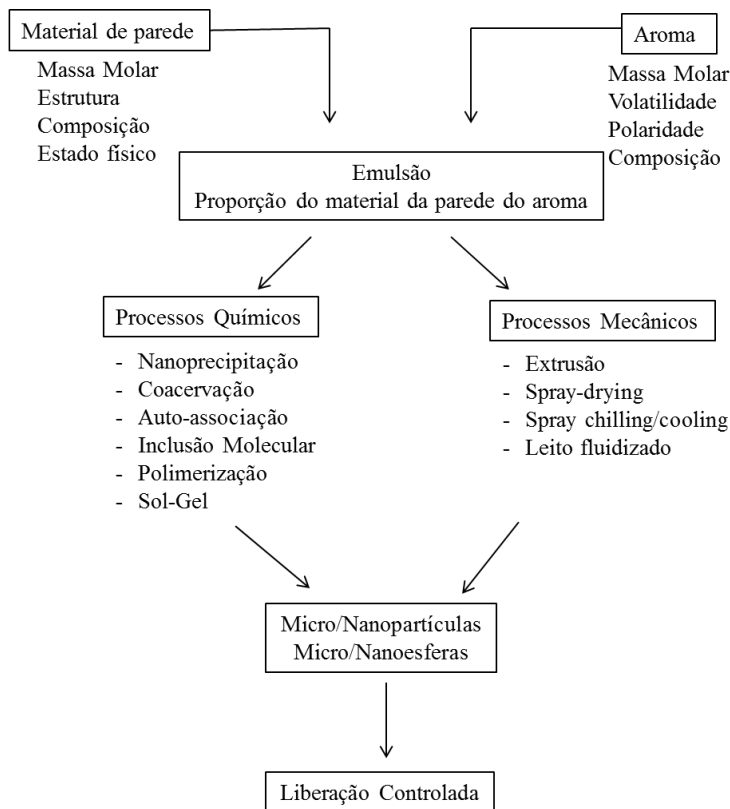
O desenvolvimento de produtos de micro e nanoencapsulação iniciou-se em 1950 com a pesquisa em revestimentos sensíveis a pressão para a produção de papel para cópia sem carbono [48]. Atualmente a tecnologia de encapsulação está bem desenvolvida e aceita dentro da área farmacêutica, química, cosmética, de alimentos e indústrias de impressão [49, 50].

O sistema de encapsulação requer uma compreensão físico-química dos mecanismos pelos quais os compostos são encapsulados e liberados, pois a retenção no núcleo é regulada por fatores relacionados com a natureza química, massa molar, funcionalidade química, polaridade e volatilidade relativa, de acordo com as propriedades do material de parede e de sua natureza, bem como os parâmetros da tecnologia de encapsulação [50]. Após esse estudo escolhe-se a técnica de encapsulamento apropriada para a amostra.

São diversos os métodos que podem ser utilizados para encapsulação de agentes ativos em nanopartículas, como visto no esquema abaixo (Figura 6). Entre estes, destacam-se os métodos químicos como a perda de solvente, separação de fases, coacervação, polimerização, precipitação, nanoencapsulação, lipossomas e pelo método Sol-gel [51].

No esquema da Figura 6, são apresentados diferentes processos de encapsulação utilizados para formação de micro/nanopartículas de compostos aromatizantes.

Figura 6: Esquema ilustrativo de diferentes processos de encapsulação de compostos aromatizantes.



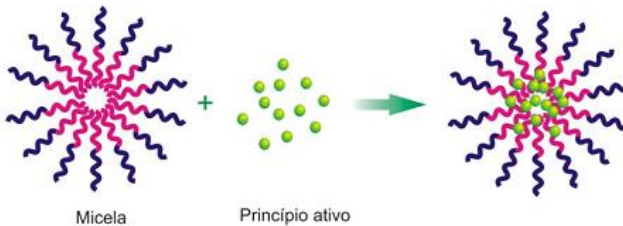
FONTE: Adaptado da referência MADENE, A.(2006) [50].

Dentre os métodos de encapsulação, a auto-associação é um processo viável para sintetizar nanopartículas auto-organizadas, com formatos esféricos estáveis com estruturas porosas de topologia hexagonal e cúbica, bem como estruturas em camadas (estrutura

vesicular). Este é um processo simples que também pode ser modificado para a formação de filmes finos ordenados [52]. A técnica de auto-associação tem sido utilizada principalmente para a incorporação e transporte de fármacos [3, 36].

A Figura 7 representa esquematicamente a incorporação de um princípio ativo em micelas com núcleo hidrofóbico.

Figura 7: Incorporação de princípio ativo em micelas com núcleo hidrofóbico.



FONTE: Adaptado da referência TORCHILIN, V. P.(2007) [53].

Uma estratégia promissora para nanoencapsulação é utilizar macromoléculas que contenham em sua superfície cadeias de polímeros anfífilicos. Isto pode ser feito pela utilização de copolímeros em bloco como, por exemplo, poli(óxido de etileno) (PEO) e poli (ácido láctico) (PLA), PEO-*b*-PLA, em que a porção hidrofóbica (PLA), forma o núcleo enquanto que a porção hidrofílica forma a cobertura (camada externa) [54].

Uma aplicação destes sistemas é a utilização de nanopartículas sólidas que encapsulem agentes ativos para serem direcionadas mais facilmente ao alvo desejado. Os polissacarídeos têm sido utilizados como componentes da camada externa da nanopartícula favorecendo dessa forma a biodegradabilidade e biocompatibilidade do material [55].

Com o objetivo de elucidar a incorporação e reduzir a perda de agentes ativos e, portanto, minimizar os custos de fabricação, Govender e colaboradores (2000) incorporaram o fármaco hidrocloridrato de procaína, em nanopartículas de PLA-*b*-PEG e avaliaram as características físico-químicas destes sistemas em termos de tamanho, de superfície, de carga e morfologia. Os resultados desse estudo mostraram que a morfologia destes sistemas mantiveram-se inalteradas,

tanto a baixas como em altas cargas do agente ativo. Os autores também testaram a encapsulação do fármaco com ajuda de um agente de complexação, o poli(ácido aspártico), com o objetivo de aumentar a eficiência de encapsulação, o que foi avaliado por espectroscopia de UV-Vis, com base em uma amostra de referência de PLA-PEG livre, e demonstraram que não se obteve melhoria no processo [56].

Neste trabalho serão utilizados os óleos essenciais como agentes ativos. Geralmente, óleos essenciais são substâncias voláteis, sensíveis ao oxigênio, luz, umidade e calor. Estas características especiais poderiam diminuir a sua aplicabilidade no uso de cosméticos, alimentos, produtos farmacêuticos e indústrias. Assim, a encapsulação é um dos métodos mais eficientes para a formulação de óleos ativos e várias investigações têm sido desenvolvidos neste aspecto [17, 57]. O encapsulamento de óleos essenciais tem como objetivo retardar a volatilização e proteger o composto bioativo das interações não desejadas com o meio externo [58].

### 2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são compostos aromáticos voláteis obtidos por um processo físico específico. São extraídos de plantas ou ervas aromáticas por processos de destilação, compressão de frutos ou extração com o uso de solventes. Geralmente são altamente complexos; segundo a ISO (1997), óleos essenciais são misturas complexas, contendo várias dezenas ou mesmo algumas centenas de substâncias com composição química variada [59].

A aplicação dos óleos essenciais pelo homem vem de tempos antes de Cristo. Civilizações japonesas, chinesas e egípcias usavam como incenso, embalsamamento para mortos e como matéria prima para perfumes. Nos tempos atuais, os óleos essenciais podem ser de origem artificial ou natural e possuem aplicação em diversas áreas, sendo constituinte primário ou secundário da indústria de perfumes, medicamentos, indústria química, como combustíveis, conservantes, inseticida, entre outros [60].

Os óleos essenciais são formados por estruturas de terpenos, sesquiterpenos, fenólicos, fenilpropanóicos, alifáticos não terpenos, heterocíclicos; e funções químicas de álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos, ésteres, óxidos, acetatos e etc. Essa composição complexa explica, em parte, porque um determinado óleo pode agir contra fungos

e bactérias e, ao mesmo tempo, atuar como calmante e antidepressivo [61].

Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, e são derivados de unidades de isopreno. Os compostos terpênicos que formam a estrutura-base de óleos essenciais são os monoterpenos, presentes em cerca de 90% dos óleos, que são divididos em três subgrupos: acíclicos (ex. linalol), monocíclicos ( $\alpha$ -terpineol) e bicíclicos ( $\alpha$ -pineno, cânfora, etc.); e os sesquiterpenos que podem ser cíclicos ou ramificados [61].

O mecanismo dos efeitos inibidores do crescimento de microrganismos por nanopartículas ainda não foi bem compreendido. Mas a característica que mais influencia a atividade antibacteriana de extratos naturais é a sua elevada hidrofobicidade, que permite-lhes atravessar membranas bacterianas e de atuar diretamente sobre eles, provocando a perda de íons e a redução do potencial da membrana, e danos a proteínas e lipídeos presentes na célula bacteriana, causando a morte da célula [62].

### 2.5.1 Óleo Essencial de Lavanda

O óleo essencial de lavanda (LO) ou *Lavandula angustifolia* é o mais versátil e utilizado na medicina, cosmetologia e perfumaria, de todos os óleos essenciais. Tem propriedades antifúngicas e antibacterianas e atua como um sedativo, antisséptico e analgésico [63, 64]. É um líquido extraído através da destilação das flores da lavanda. Além de produzir um aroma bastante agradável, o óleo de lavanda conta com uma longa lista de propriedades que ajudam a melhorar a saúde, favorecem o bem-estar corporal e mental e melhoram a qualidade de vida. O óleo essencial de lavanda acalma os nervos, relaxa os músculos, é antidepressivo, alivia tensão muscular, facilita o sono, é antisséptico, antibacteriano e promove a digestão. Por inibir bactérias que podem causar infecções, é utilizado contra acne, além de outras aplicações [65].

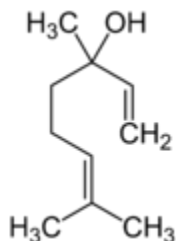
O termo lavanda vem do latim "lavare", significa lavar, pois a planta era utilizada pelos romanos para lavar roupa, tomar banho, aromatizar ambientes e como produto curativo (indicado para insônia, calmante, relaxante, dores, etc.).

A composição do óleo de lavanda é baseada em linalol e acetato de linalol, mas também inclui outros componentes como  $\alpha$ -pineno,



limoneno, 1,8-cineol, cis e trans ocimeno, 3-octanose, cânfora, cariofileno, terpinen-4-ol e acetato de lavanda. Podemos observar a estrutura do componente majoritário, o linalol, na Figura 8 [66].

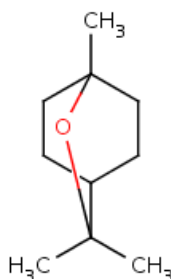
Figura 8: Estrutura química do linalol.



### 2.5.2 Óleo de Eucalipto

O óleo de eucalipto (EO) também denominado como *Eucalyptus globulus*, nativo da Austrália, é extraído da folha de eucalipto. O óleo essencial de eucalipto é um líquido ligeiramente amarelado. Seu constituinte principal é o eucalyptol, ou 1,8-cineol (Figura 9), com porcentagens que podem variar de 70 a 85%. Tem-se ainda, 15% de  $\alpha$ -pineno, 5% de pinocarveol, 2% de sesquiterpenos, 1 a 2% de aldeído isovalérico e vestígios de álcool amílico [67].

Figura 9: Estrutura química do componente majoritário do óleo de eucalipto, o 1,8-cineol.



No Brasil as primeiras destilações de óleo de eucalipto ocorreram em 1941 e 1942, em caráter experimental e em 1946, a produção já chegava a 12 toneladas.

O óleo de eucalipto está entre a lista de óleos essenciais que tem efeitos antibacterianos e propriedades anti-inflamatórias e analgésicas [67, 68].

## 2.6 INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS EM TÊXTEIS

### 2.6.1 Materiais Têxteis

O têxtil é um material à base de fios de fibra natural ou sintética, utilizado na fabricação de roupas e calçados, toalhas, panos para limpeza, uso medicinal como faixas e curativos, entre diversos outros.

Os têxteis podem ser classificados pelo seu tipo, naturais ou químicos (sintético ou artificial). As definições são apresentadas a seguir:

#### 2.6.1.1 Naturais

Os tecidos naturais, considerados básicos e clássicos, podem ter três origens, a origem animal (lã e seda); a origem mineral (amianto); e a origem vegetal (algodão, juta, cânhamo, linho e sisal).

#### 2.6.1.2 Químicos

##### 2.6.1.2.1 Sintéticos

Os tecidos sintéticos são fibras produzidas pelo homem, usando como matéria prima, produtos químicos da indústria petroquímica. As mais conhecidas são o poliéster, a poliamida, o acrílico, o polipropileno e o poliuretano elastomérico (Elastano), além das Aramididas (Kevlar e Nomex) [69].

### 2.6.1.2.2 Artificiais

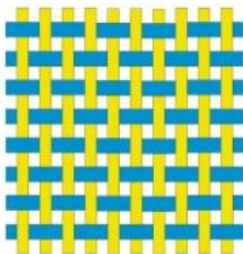
Os tecidos artificiais provêm de: fibras celulósicas, tais como acetatos e viscose e fibras proteicas, procedentes de matérias como o milho e óleos vegetais. Imitam perfeitamente a seda, e incluem tecidos como o algodão [70].

Além desta classificação, são divididos em tecidos produzidos em teares e os tecidos não tecidos. Os tecidos produzidos em teares geralmente consistem de dois conjuntos de fios, os quais são entrelaçados perpendicularmente uns em relação aos outros. Os fios que estão dispostos ao longo do comprimento do tecido se denominam urdume e os fios que estão dispostos na largura do tecido são denominados trama, sendo projetados de acordo com a utilidade final desse material [71].

Sua resistência, espessura, porosidade e durabilidade podem variar e dependem da estrutura do entrelaçamento, do espaçamento entre os fios (número de fios por  $\text{cm}^2$ ) e a fibra utilizada para produzir os fios. Estes tecidos são mais resistentes e tem maior estabilidade que qualquer outro tecido têxtil que não foi produzido através do entrelaçamento dos fios de urdume e trama [69].

O tecido de tear mais utilizado é o tecido plano, onde o fio de trama se entrelaça alternadamente com o fio de urdume, sendo assim, em um dado momento o fio de trama passará por cima do fio de urdume e no momento seguinte o fio de trama passará por baixo (Figura 10).

Figura 10: Imagem ilustrativa do entrelaçamento do tecido plano.



A diferença entre os tecidos planos e os não tecidos encontra-se basicamente na forma em que sua estrutura é produzida. Os não tecidos

não tem a necessidade da produção de fios, um véu de fibras é formado utilizando-se equipamento e consolidados por métodos mecânicos, químicos ou térmicos [71].

Segundo a NBR 13370 [72], um não tecido é definido como: uma estrutura plana, flexível e porosa constituída de véu ou manta de fibras ou filamentos, orientados direcionalmente ou aleatoriamente, e conformados por processo químico (adesão), mecânico (fricção) e/ou térmico (coesão) ou pelas combinações desses. Uma ilustração é mostrada na Figura 11.

Figura 11: Imagem ilustrativa do entrelaçamento do tecido não tecido.



### **2.6.2 Incorporação de Nanopartículas em Têxteis**

A nanotecnologia dá novas características às fibras, fios e tecidos. O processo da encapsulação protege os ativos da oxidação e volatilização, proporcionando sensações e fragrâncias no momento desejado através do sistema de liberação gradativo que é acionado pela fricção [73].

As nanopartículas tem um grande potencial comercial para a indústria têxtil, pois podem proporcionar uma elevada durabilidade dos tecidos, além de conferir propriedades de interesse. Além disso, um revestimento de nanopartículas em tecidos não afeta a sua respirabilidade ou sua sensação ao toque [73].

A Figura 12 apresenta uma ilustração de um têxtil contendo nanopartículas.

Figura 12: Esquema ilustrativo de têxtil contendo nanopartículas.



FONTE: <http://www.nanovetores.com.br/> [74].

O uso de tecidos antibacterianos na fabricação de roupas esportivas é muito comum, já que são materiais que passam por condições extremas de uso, como excesso de suor, sujeira e ciclos de lavagem acima das roupas de uso cotidiano. As bactérias e fungos contidos em nosso suor se desenvolvem rapidamente, criando colônias que por sua vez formam um biofilme.

Nas primeiras utilizações da roupa, a simples lavagem em máquina é suficiente para devolver ao tecido a característica de limpo. Após alguns ciclos de uso, quando o biofilme começou a se instalar, o mau odor permanece mesmo após uma lavagem severa, não sendo suficiente para remover o biofilme por completo. Para aumentar a vida útil de roupas e materiais esportivos, a melhor solução é a incorporação de agentes antibacterianos, evitando assim a formação de biofilmes [75].

Um dos métodos mais simples estudados para a incorporação das nanopartículas em tecidos é método da adsorção. Este processo consiste em tratar o substrato (no caso o tecido) com nanopartículas sob condições controladas [76].

Neste contexto, a indústria calçadista também busca se modernizar e atualizar suas tecnologias. Algumas empresas como a *Reebok* e a *Ferracini* vêm desenvolvendo a tecnologia *Play Dry* [77, 78], a qual acelera a evaporação da umidade produzida pelo corpo combinando dois processos: dispersão e canalização. A dispersão utiliza

fibras hidrofílicas na parte interna para atrair a umidade e fibras hidrofóbicas que dispersam o suor acelerando a evaporação. E a canalização utiliza fibras cruzadas como meio de saída para a umidade, permitindo uma evaporação mais rápida.

Balasubramanian e colaboradores (2014) desenvolveram nanofibras de poliacrilonitrila (PAN) com óleo essencial de lavanda pelo método *electrospinnig*. Essas nanofibras de PAN/óleo essencial de lavanda podem ser usadas como um material antibacteriano com liberação controlada, promissor em vários campos, como na biomédica, em têxteis e em tratamento de água [79].

Um grupo de pesquisadores da Universidade de Cornell dos Estados Unidos desenvolveram roupas *High-tech*, as quais possuem propriedades antibacterianas e autolimpantes. A sua estratégia consiste em carregar positivamente as fibras de algodão usando amônia e reações à base de epóxi, induzindo a ionização positiva, e mergulhando o algodão carregado positivamente em uma solução de nanopartículas de prata (ou de paládio) carregada negativamente resulta na atração eletrostática entre as nanopartículas e as fibras de algodão. As nanopartículas carregadas eletrostaticamente criam um escudo protetor em torno das fibras de algodão, formando assim um produto com propriedades antibacterianas e autolimpante.

A prata incorporada a fibra de algodão também reduz a necessidade de lavar a roupa, uma vez que destrói as bactérias e o pequeno tamanho das partículas evita a sujidade e as manchas, resultando num revestimento com a capacidade de oxidar a poluição atmosférica [80].

Nanopartículas de prata em meio líquido, com baixo diâmetro, são totalmente miscíveis em água, podendo ser aplicadas em palmilhas de calçados para a produção de solados seguros e inodoros. As mesmas também podem ser incorporadas na sola interior ou no forro do calçado, proporcionando assim propriedades antibacterianas ao material. Algumas empresas como a *Reinste Nano Ventures* [81] da Índia em parceria com a *Silanotex* da Alemanha vêm trabalhando com a incorporação destas nanopartículas de prata em fibras sintéticas, a fim de evitar a proliferação de germes patogênicos [82].

Um material de duas fases em que uma delas está dispersa em nível nanométrico, por exemplo, uma matriz polimérica reforçada com nanopartículas, pode ser chamada de nanocompósito. Uma partícula nanométrica possui pelo menos uma de suas dimensões na ordem de

nanômetros. A relação entre as dimensões da partícula (comprimento *versus* largura) é denominada relação de aspecto, sendo que, quanto maior for essa relação, melhor será seu efeito sobre o nanocompósito. Outros fatores também são importantes, tais como, a concentração e a homogeneidade da distribuição da partícula na matriz em estudo [83].

Uma abordagem desejável de incorporação de nanopartículas em matrizes poliméricas envolveria a combinação de matrizes poliméricas pré-fabricadas juntamente com nanopartículas pré-sintetizadas, o que proporcionaria um completo controle de ambos e com potencial para a geração de uma grande variedade de materiais compósitos. Corbierre e seus colaboradores (2001) avaliaram a incorporação de nanopartículas de ouro em matrizes poliméricas pelo método de imersão da matriz em solução de nanopartículas, o que pode gerar algumas dificuldades. No caso de Corbierre, as nanopartículas de ouro formavam agregados nas matrizes testadas, formadas por poliestireno e poli(dimetilsiloxano). Seus estudos comprovaram que para ultrapassar estas dificuldades, era necessário alterar o revestimento das nanopartículas tornando-as compatíveis com a matriz do polímero. As nanopartículas foram analisadas por espectroscopia de UV-Vis e microscopia eletrônica de transmissão (MET) [84, 85].

Outro método de incorporação de nanopartículas em matrizes é via polimerização *in situ* na qual ocorre a agregação e precipitação das nanopartículas na matriz polimérica [86]. Neste caso, as nanopartículas são adicionadas ao monômero líquido e posteriormente inicia-se a polimerização através do uso de calor, iniciador ou catalisador. Esta estratégia de preparação de nanocompósitos faz uso das técnicas de síntese de polímeros como polimerização em suspensão, polimerização em emulsão e polimerização em massa [87].

Corbierre e colaboradores (2001 e 2005) avaliaram também a polimerização *in situ*. Os autores prepararam previamente nanopartículas de ouro e as incorporaram em matrizes de poliestireno e poli(dimetilsiloxano), por polimerização. Seus resultados foram avaliados por espectroscopia de UV-Vis e MET, o que mostrou uma dispersão uniforme em toda amostra [84, 85].

A vantagem principal da impregnação direta da nanopartícula na matriz reside na simplicidade do método e no possível controle ao longo do processo tanto das nanopartículas como da matriz polimérica, em oposição às preparações por polimerização *in situ*.

## 2.7 LIBERAÇÃO DE AGENTES ATIVOS DE NANOPARTÍCULAS ADSORVIDAS EM MATRIZES

Assim como a incorporação de nanopartículas em matrizes, a liberação de agentes ativos incorporados nas nanopartículas também tem sido estudada. O principal foco é o desenvolvimento de nanopartículas funcionalizadas adequadas para a liberação controlada de agentes ativos [88]. Neste contexto, o objetivo é avaliar as propriedades que afetam o comportamento da liberação do agente ativo, entre elas: a hidrofobicidade do material, tamanho da partícula e seu revestimento. Budhian e colaboradores (2008) adaptaram o perfil de liberação *in vitro* do fármaco haloperidol de característica hidrofóbica a partir de um processo de encapsulação em nanopartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) e poli(ácido láctico) PLGA/PLA [89].

Nas matrizes insolúveis, denominadas matrizes hidrofóbicas, ou polímeros insolúveis em água (nesse caso, também denominadas matrizes inertes), o agente ativo é liberado essencialmente por difusão. Nas matrizes hidrofílicas, a liberação é regulada pelos processos de intumescimento, difusão e erosão [90]. O agente ativo é liberado por difusão através da membrana de revestimento, que pode ser microporosa ou não apresentar poros. Quando uma membrana não-porosa é utilizada, a liberação é governada pela difusão da substância ativa através do polímero e, assim, pode ser modulada pela seleção de um polímero no qual a liberação apresente a difusividade adequada. No caso de membranas microporosas, a difusão do agente ativo no meio que estiver preenchendo os poros determinará o processo de liberação [90].

Os estudos de liberação *in vitro* são definidos considerando a composição da nanopartícula e o tipo de agente ativo a ser liberado. Entre as técnicas mais comumente usadas, neste projeto em particular foram desenvolvidas metodologias para espectroscopia UV-VIS.

## 2.8 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As principais funções dos agentes antibacterianos são as de inibir a transferência e o alastramento do contato com os microrganismos patogênicos e como consequência reduzir o odor causado pela degradação microbiana e evitar a perda das características das fibras [91].



Pode-se dividir os agentes bactericidas em dois grupos, os que eliminam e os que inibem os microrganismos.

No grupo que não elimina e apenas inibem os microrganismos estão os chamados agentes bacteriostáticos que são produtos com a função de impedir a proliferação dos microrganismos. Um bacteriostático impede a multiplicação das bactérias, mas não as elimina; esses agentes são, em sua maioria, inibidores de síntese proteica e atuam por ligação reversível aos ribossomos. Um exemplo é o álcool etílico que usamos no cotidiano para limpar superfícies e desinfetar as mãos [92].

Já o grupo que elimina os microrganismos é dividido em duas categorias: os bactericidas e os bacteriolíticos [93].

Os bactericidas são substâncias que eliminam de forma direta os microrganismos, inibindo enzimas que desempenham um papel fundamental para que a célula bacteriana permaneça viva, mas não necessariamente destroem a bactéria.

Os bacteriolíticos são substâncias que além de eliminar as bactérias impedindo sua proliferação e crescimento, destroem sua parede celular provocando a perda de material interno. Um exemplo é a penicilina, um antibiótico natural produzido pelo fungo *Penicillium chrysogenum*. Primeiro antibiótico utilizado com sucesso [92, 93].

De um modo amplo, dentre os agentes antibacterianos, existem os saneantes que são preparações destinadas à higienização, desinfecção ou desinfestação, encontrados nas prateleiras dos supermercados ou no processo de sanitização das indústrias de alimentos, p. ex. os inseticidas, raticidas, detergentes e desinfetantes. E os antissépticos que se referem a tudo o que for utilizado no sentido de degradar ou inibir a proliferação de microrganismos presentes na superfície da pele e mucosas, reduzindo o risco de infecção por bactérias ou germes. São normalmente encontrados em farmácias; um exemplo é o antisséptico bucal.

Alguns dos antibacterianos mais eficientes usados atualmente foram desenvolvidos com o avanço da nanotecnologia e levam na composição as nanopartículas [93].

Balakumaran e colaboradores trataram tecidos de algodão com nanopartículas de prata, e seus resultados apresentaram excelente atividade antibacteriana contra todos os testes patogênicos, considerando que, os tecidos não tratados não mostraram qualquer atividade. A redução de mais de 93% do número de colônias bacterianas foi registrado contra todos os patógenos testados [94].

Têm-se duas formas de atuação dos produtos antibacterianos. Aqueles denominados não migrantes se fixam ao substrato ou superfície e eliminam os microrganismos quando estes entram em contato com o agente antibacteriano, nesse caso, não apresentam um halo de inibição e eliminam o crescimento de superbactérias. Já os antibacterianos denominados migrantes se espalham por toda a superfície podendo ser um inconveniente dependendo do tipo de aplicação, assim, formam um halo de inibição mostrando que os microrganismos daquela região foram eliminados [95].

### 2.8.1 Microrganismos

Os microrganismos dividem-se em patogênicos e não patogênicos.

Dentre microrganismos não patogênicos, temos os inofensivos e os benéficos. Microrganismos deteriorantes fazem parte da microbiota natural de alimentos como produtos lácteos inócuos ao consumo e se desenvolvem pela grande disponibilidade de nutrientes e água no meio. Em baixa concentração, geralmente eles são inofensivos ao ser humano. Condições de armazenamento e transporte inadequados comprometem a vida útil destes alimentos, acarretando no desenvolvimento desses microrganismos através de mofo, gerando odores e alterações de textura (por exemplo, amolecimento) [96].

Dentre os microrganismos benéficos, a penicilina revolucionou a medicina com suas propriedades antibacterianas, doenças como a sífilis e pneumonia bacteriana, que antes eram devastadoras, podem ser tratadas de forma rápida e eficaz. Além disso, muitos outros fungos e bactérias são utilizados na produção de queijos, pães, vinhos e cervejas, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* [96].

Microrganismos patogênicos são aqueles capazes de produzir doenças infecciosas em seus hospedeiros nas condições favoráveis à sua sobrevivência, multiplicação e produção de compostos tóxicos, e podem ser transmitidos por alimentos contaminados ou pelo ar. Não somente os seres humanos são afetados, mas sabe-se que todos os animais podem ter infecções provenientes da exposição a um agente patogênico [96].

As doenças desse tipo em animais de corte, por exemplo, diminuem sua fome e disposição, causando morte prematura e tornando sua carne indisponível para consumo. Dentre as espécies e subespécies

da famosa *Salmonella spp.*, há aquelas que causam doenças mortais em galinhas, como as *Salmonella enterica* e em humanos (com mais de 2500 sorotipos, em sua maioria patogênicos), causando salmoneloses de diferentes sintomas e detectadas por diferentes técnicas microbiológicas em granjas e laboratórios [96].

Recentemente, estudos estão sendo conduzidos para caracterizar e diferenciar a resistência de bactérias patogênicas e não patogênicas com uma necessidade de tornar mais preciso o diagnóstico de doenças, no controle da produção de alimentos para garantir a biossegurança e para identificar esses agentes e mitigar seu alastramento.

Para controle e inativação de microrganismos deteriorantes e patogênicos, os antibacterianos tem atividade comprovada, podendo ser incorporado em diferentes materiais, desacelerando o crescimento de bactérias em superfícies como plásticos, têxteis e cerâmicas.

As nanopartículas de prata apresentam propriedades extraordinárias quando em escala nanométrica. Seu mecanismo de atuação, somado aos benefícios da escala nano, faz com que pequenas concentrações da substância atinjam alta eficiência, inibindo o crescimento de cerca de 99% das bactérias e fungos que entrariam em contato com os objetos do nosso dia a dia [97]. As nanopartículas de prata tem atividade bactericida, combatem as bactérias atingindo seu DNA e impedindo sua reprodução, eliminando a formação de colônias de superbactérias. Por outro lado, estudos vêm sendo feitos, pois as nanopartículas de prata podem causar bioacumulação no organismo, trazendo riscos a saúde [98].

### 2.8.1.1 Bactéria *Staphylococcus Aureus*

Dentre as bactérias oportunistas e frequentemente associadas a infecções adquiridas na comunidade, em ambiente hospitalar e em roupas e calçados, encontra-se o *Staphylococcus aureus*.

*Staphylococcus* ou estafilococos são um gênero de bactérias gram-positivas e um dos mais comuns patógenos do ser humano [99]. Essa bactéria é considerada pelos médicos um problema, já que, além de provocar infecções, costumam ser encontradas na pele de até 15% dos seres humanos. É comum termos em nosso organismo, como pele, boca, nariz, intestino e no trato urinário, colônias de bactérias que não nos causam doenças, mas é importante frisar que essas bactérias não causam doenças somente enquanto permanecem restritas a esses locais, pois as

colônias são verdadeiros reservatórios de bactérias prontas para invadir o corpo todas as vezes que o sistema imunológico estiver fragilizado [100].

São microrganismos anaeróbicos facultativos, vivem em meios aeróbios, mas podem facultativamente, viver em meios anaeróbios, por intermédio da fermentação. De todo modo, seu crescimento é mais rápido em meios aeróbios. Não possuem flagelo, portanto sendo incapazes de se locomover autonomamente. Sua faixa de temperatura ótima para crescimento situa-se entre 30 e 37 °C, a mesma do corpo humano [99].

A toxina formada por esse microrganismo não é destruída pelo cozimento dos alimentos; uma vez formada no alimento esse pode causar intoxicação mesmo após o processo, embora o microrganismo seja destruído. A doença se caracteriza basicamente por vômitos intensos que se iniciam cerca de 2h após a ingestão de alimentos com a toxina e duram algumas horas, mas em pessoas vulneráveis pode causar consequências mais graves [101].

Considerando o estudo realizado, este trabalho visa desenvolver um sistema de liberação nanoestruturado com estabilidade para liberação controlada, visando à aplicação em fibras têxteis utilizadas como componentes da indústria calçadista com ausência de efeitos tóxicos, tanto para o fabricante como para o consumidor, que não tragam riscos à saúde, que sejam compatíveis com outros acabamentos, com fácil aplicação e compatibilidade com os processos têxteis mais comuns.

Além das vantagens para saúde e higiene, o material gerará proteção ao próprio tecido contra a degradação, controle de manchas originárias do crescimento bacteriano, sensação de frescor sempre presente no têxtil, eliminação dos cheiros provocados pelos microrganismos e aumento do tempo de vida do produto devido ao controle do crescimento microbiano.

No decorrer do trabalho foi realizada pesquisa de patentes, sendo encontrados trabalhos similares com palmilhas perfumadas, antissépticas e descartáveis; palmilhas com substância microencapsulada, cujo núcleo pode ser bactericida, perfumante, desodorante, anti-transpirante e/ou outros, utilizando como mecanismo de ativação das microcápsulas a pressão e a fricção do pé na palmilha que, durante o caminhar, causa a ruptura das paredes das cápsulas de

maneira progressiva, liberando gradualmente a referida substância; roupa íntima de absorção com camadas impregnadas com o bactericida *phillantus*, descartável, para uso de pessoas que sofrem de incontinência urinária. Patente de tapete higiênico descartável, absorvente, desodorizante e bactericida, com o núcleo absorvente aditivado com gel, desodorizante, bactericida e forrado de material poroso, para a passagem de líquidos. Tecidos autolimpantes e auto-esterilizantes à base de nanopartículas de prata com propriedades bactericidas/bacteriostáticas e polímeros (poli(vinil álcool)). Patente para calçado com fins terapêuticos que consiste de uma palmilha fabricada com poliuretano, que é absorvente, transpirante e tratado com bactericidas e fungicidas. Disposto na face inferior onde há um não tecido impregnado de uma mistura de platina, titânio e alumínio, que permite emissão de ondas eletromagnéticas semelhantes aos raios infravermelho longo emitidos pela luz solar. Toda essa pesquisa gerou uma motivação para o desenvolvimento deste trabalho.



## **CAPÍTULO 3**

### **MATERIAIS E MÉTODOS**





### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

Para realização do trabalho foram utilizados os seguintes materiais:

O copolímero dibloco poli(óxido de etileno)-*b*-poli(ácido láctico) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub>. E o copolímero dibloco poli(óxido de etileno)-*b*-poli(ácido láctico) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>, fornecidos pela Polymer Source<sup>TM</sup>.

Os agentes ativos utilizados foram o óleo de lavanda fornecido pelo Sigma Aldrich®, proveniente da *Lavandula angustifolia* L., chamado nesse trabalho de LO; o óleo de eucalipto também fornecido pela Sigma Aldrich®, chamado de EO; e uma blenda de óleos essenciais (BD) fornecida pela empresa NanoVetores de Florianópolis-SC.

Esta blenda é composta de uma mistura de óleos de lavanda, melaleuca, tomilho, cravo, cedro e capim limão.

Como solvente foi utilizado Acetona P.A fornecida pelo Group Carlo Erba Reagents e água de Milli-Q (purificada num sistema de purificação de água Milli-Q; Billerica, MA, EUA).

Também foram utilizados têxteis fornecidos pela empresa Dublauto de Novo Hamburgo-RS. Entre os têxteis cedidos, foi utilizado como tecido, uma sarja branca 100% algodão, utilizada pela empresa para calçados esportivos, femininos, masculinos e para calçados funcionais, e um não tecido 100% poliéster costurado para base de laminados sintéticos e para reforços e entretelas de calçados.

#### 3.2 METODOLOGIA PARA PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação, semelhante à utilizada por Fessi e colaboradores [102]. A técnica consiste na dissolução do copolímero em um solvente termodinamicamente bom para os dois blocos, em nosso caso, a acetona, sob agitação constante, a temperatura ambiente, seguida de adição lenta e progressiva de um solvente seletivo para um dos blocos (água de Milli-Q) [103], onde o bloco solvofóbico se organiza minimizando o contato com o solvente, favorecendo assim, dependendo das condições

experimentais, a formação de nanoestruturas bem definidas em escala nanométrica.

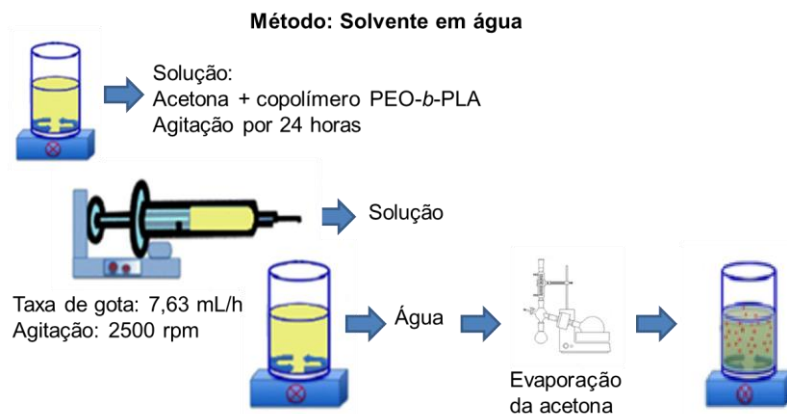
A eliminação do solvente orgânico foi realizada por evaporação sob pressão reduzida em um rotavapor da marca Janke & Kunkel IKA Labortechnik.

A taxa de adição do solvente seletivo e a velocidade de agitação magnética foram cuidadosamente estabelecidas após diversos experimentos, a fim de promover a formação de estruturas bem definidas, homogêneas, na ausência de agregados, ou seja, com um baixo índice de polidispersividade [103].

O esquema ilustrativo deste procedimento é apresentado na Figura 13. Onde o copolímero na concentração de 40 mg mL<sup>-1</sup> foi dissolvido em solvente orgânico (2 mL de acetona). Esta solução foi então gotejada (2 mL da solução de copolímero) a uma taxa constante de 7,63 mL h<sup>-1</sup> em 4 mL da solução aquosa (água pura) sob agitação magnética de 2500 rpm. O solvente orgânico foi eliminado por evaporação em rotavapor sob vácuo.

Para evitar a aglomeração das nanopartículas todas as amostras foram aferidas a 10 mL.

Figura 13: Esquema do processo para formação das nanopartículas sem óleo.



FONTE: Adaptado de DHANDAYUTHAPANI, B.(2012) [104].

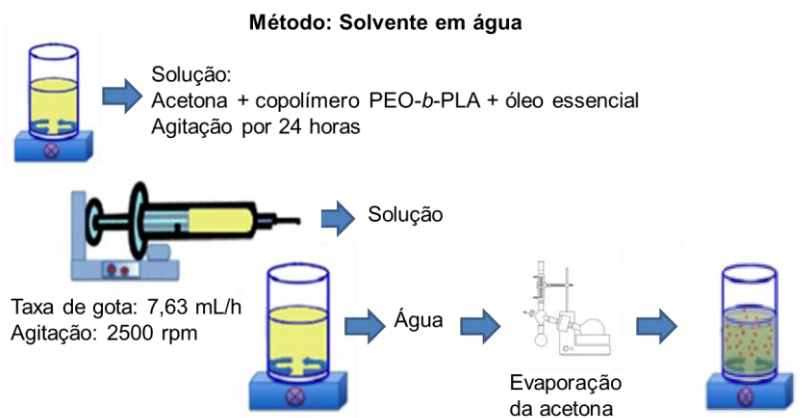
### 3.3 ENCAPSULAÇÃO DE AGENTES ATIVOS EM NANOPARTÍCULAS

A encapsulação do agente ativo foi realizada pelo mesmo método de nanoprecipitação descrito na Seção 3.2.

A encapsulação do agente ativo foi realizada durante a formação das nanopartículas poliméricas pela adição de água milli-Q à solução contendo copolímero/agente ativo em solvente apropriado, sob agitação controlada. Durante a adição de água, as partes hidrofóbicas do copolímero se associam de maneira a minimizar o contato com água, e o agente ativo é segregado no domínio polimérico mais favorável, o bloco hidrofóbico. Após a adição de água a solução foi mantida sob agitação e em seguida água em excesso foi adicionada. Foi realizada a evaporação do solvente orgânico sob pressão reduzida.

O esquema ilustrativo do procedimento de encapsulação do agente ativo é apresentado na Figura 14.

Figura 14: Esquema do processo para formação das nanopartículas contendo agentes ativos.



FONTE: Adaptado de DHANDAYUTHAPANI, B.(2012) [104].

Onde o óleo essencial na concentração de 4  $\mu\text{L}$  é adicionado com o copolímero na concentração de 40  $\text{mg mL}^{-1}$  e dissolvido em solvente

orgânico (2 mL de acetona). Esta solução foi então gotejada (2 mL da solução de copolímero) a uma taxa constante de  $7,63 \text{ mL h}^{-1}$  em 4 mL da solução aquosa (água pura) sob agitação magnética de 2500 rpm. O solvente orgânico foi eliminado por evaporação em rotavapor sob vácuo.

Para evitar a aglomeração das nanopartículas todas as amostras foram aferidas a 10 mL.

### 3.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

#### 3.4.1 Espalhamento de Luz Estático e Dinâmico

O espalhamento de luz possui duas abordagens diferenciadas. No Espalhamento de Luz Estático (SLS), a intensidade da luz espalhada é coletada em função do ângulo de espalhamento. No Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), a correlação da intensidade da luz espalhada é obtida em função do tempo, para um dado ângulo fixo. As duas análises fornecem informações complementares a respeito dos sistemas estudados.

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi utilizada para analisar a forma das nanopartículas, o número de agregação e interações entre as nanopartículas e correlacioná-las com as dimensões das mesmas em solução aquosa, através de flutuações temporais na luz espalhada que geram informações a respeito da dinâmica das partículas em solução [105].

As análises foram realizadas utilizando um goniômetro ALV/CG6-8F equipado com um laser de hélio-néon vermelho ( $\lambda=632,8 \text{ nm}$ ), operando a uma potência de 35 mW e um dispositivo de correlação digital ALV/LSE-5004, com um tempo de amostragem inicial de 125 nS. O ângulo de dispersão acessível do equipamento varia de 12 a 155°.

Para esta análise, as amostras foram filtradas com filtro de acetato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$ , e medidas em células cilíndricas de 10 mm de diâmetro, imersas em um banho de tolueno com temperatura regulada a 25 °C. Os fótons espalhados foram detectados por um diodo sensível. Neste estudo, o módulo de dispersão é o vector  $q$  e é denotado igual a equação 1, que segue.

$$q = \frac{4 \pi \eta}{\lambda} \operatorname{sen} \left( \frac{\theta}{2} \right) \quad (1)$$

Em que  $\eta$  representa o índice de refração de água pura,  $\theta$  é o ângulo de dispersão e  $\lambda$  designa o comprimento de onda.

Todas as amostras foram sistematicamente estudadas a  $90^\circ$ ,  $60^\circ$  e  $120^\circ$ . Cada experiência foi realizada durante 300s e as amostras também foram estudadas em diferentes ângulos de espalhamento variando de  $40^\circ$  até  $140^\circ$  com aumento escalonado de  $10^\circ$ . A intensidade de espalhamento foi corrigida tendo em conta as contribuições do solvente (água) e o tolueno (padrão), bem como a alteração do volume de dispersão, com o ângulo de detecção. As distribuições de tempos de relaxação,  $A(t)$ , foram obtidos por meio do método CONTIN [106, 107] aplicadas às funções de autocorrelação,  $C(q, t)$  [108].

O raio hidrodinâmico ( $R_H$ ) (ou diâmetro  $2R_H$ ) foi determinado usando a equação de Stokes-Einstein (equação 2).

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (2)$$

Onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann (em  $J K^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura (em K),  $D$  é o coeficiente de difusão e  $\eta$  é a viscosidade do meio (água pura), neste caso, ( $\eta = 0,89$  cP a  $25^\circ C$ ).

O raio de giro ( $R_g$ ) foi calculado a partir da parte elástica ( $I(q)$ ), da intensidade de dispersão utilizando a aproximação de Guinier (equação 3).

$$\ln I = \ln I_0 - \frac{1}{3} q^2 R_g^2 \quad (3)$$

Onde  $I$  é a intensidade da dispersão e  $I_0$  representa a intensidade de dispersão em  $q = 0$ .

A relação entre  $R_g$ , obtido do SLS da equação de Guinier, e o  $R_H$ , obtido do DLS da equação de Stokes-Einstein, obtemos o grau de anisotropia ( $\rho$ ), como representada pela equação 4.

$$\rho = \frac{R_g}{R_H} \quad (4)$$

Espalhamento de luz estático (SLS) e dinâmico são técnicas largamente utilizadas no estudo de partículas em solução, como polímeros, proteínas, micelas, vesículas e várias outras moléculas. Combinando as técnicas de DLS e SLS, foi possível fazer deduções concernentes à forma das micelas, ao número de agregação e interações entre as micelas. Portanto, a técnica de espalhamento de luz dinâmico foi utilizada para analisar este movimento e correlacioná-lo com as dimensões das nanopartículas em solução aquosa, através de flutuações temporais na luz espalhada que geram informações a respeito da dinâmica das partículas em solução [105].

### 3.4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A morfologia das nanopartículas foi avaliada através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) em um microscópio CM200 Philips (FEI Company, Hillsboro, EUA) operado a 80 kV, com a finalidade de verificar a morfologia e a estrutura das nanopartículas. As amostras foram diluídas 10 vezes em água de Milli-Q e foram depositadas 7  $\mu\text{L}$  de amostra sobre grids de cobre revestidas com carbono e antes da secagem completa adicionou-se 7  $\mu\text{L}$  da solução de acetato de uranila 2% (w/v) corando negativamente as amostras. Depois de alguns minutos, o excesso de líquido foi retirado com papel filtro e a grid foi deixada a secar.

As imagens foram gravadas em filmes Kodak SO163, e os negativos foram digitalizados off-line usando uma câmera Kodak Mega Plus CCD.

As micrografias obtidas foram tratadas no software *Image Tool for Windows* para analisar o diâmetro das nanopartículas, contando com cerca de 400-500 contagens por amostra.

### 3.4.3 Medidas de Potencial Zeta

O potencial zeta foi determinado por anemometria de Doppler a laser utilizando um Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, RU). As soluções foram colocadas na célula de eletroforese onde foi estabelecido um potencial de  $\pm 150$  mV.

Os valores de mobilidade eletroforética ( $v_E$ ) foram convertidos em  $\zeta$  (mV) utilizando a relação de Smoluchowski, num campo elétrico de  $150 \text{ V cm}^{-1}$ , conforme a equação de Henry (equação 5),

$$\zeta = \frac{3 \eta v_E}{2 \varepsilon f(Ka)} \quad (5)$$

Sendo  $\eta$  o índice de refração,  $\varepsilon$  a constante dielétrica e  $f(Ka)$  a função de Henry, que foi calculada como utilizando a aproximação de Smoluchowski, (equação 6).

$$v_E = 4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r \frac{\zeta}{6\pi\mu} (1 + \kappa r) \quad (6)$$

Onde  $\varepsilon_0$  e  $\varepsilon_r$  são, a constante dielétrica relativa e a permissividade elétrica de um vácuo,  $\mu$  é a viscosidade da solução,  $r$  é o raio da partícula e  $\kappa = (2n_0z^2e^2 / \varepsilon_r\varepsilon_0k_B T)^{1/2}$  é o parâmetro de Debye-Hückel,  $n_0$  é a concentração iônica em massa,  $z$  é a valência do íon,  $e$  é a carga de um elétron,  $k_B$  é a constante de Boltzmann e  $T$  é a temperatura absoluta.

### 3.4.4 Análise de Rastreamento de Nanopartículas

Para análise do rastreamento de nanopartículas (NTA) os experimentos foram realizados utilizando um microscópio digital Sistema LM10 (NanoSight, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, RU). As amostras foram filtradas através de um filtro de acetato de celulose de  $0,45 \mu\text{m}$  e introduzidas na câmara por uma seringa.

As imagens de vídeo de movimento das partículas em movimento browniano foram analisadas pelo software analítico NTA versão 2.1. As

medidas foram feitas à Temperatura ambiente e cada vídeo clipe foi capturado ao longo de 60s.

### 3.4.5 Espectroscopia de UV-Vis

Esta técnica foi utilizada para a caracterização das propriedades ópticas, onde foram estudados os espectros de absorvância das nanopartículas contendo óleos essenciais.

Foi utilizada uma micro-cubeta de absorção de quartzo, com caminho óptico de 1 mm e volume de 350  $\mu\text{L}$ , fornecida pela Hellma<sup>®</sup>.

A absorvância dos óleos encapsulados nas nanopartículas foi analisada nos comprimentos de onda de 210 e 220 nm [109, 110] utilizando um espectrofotômetro de feixe duplo (CARY 5000 da Varian), que trabalha na faixa de 300-800 nm. Todas as amostras analisadas por espectroscopia foram diluídas em água/acetona (1:1), considerando essa mistura como o branco.

Pelos resultados obtidos com a técnica foi possível calcular a eficiência de encapsulação e a quantidade de agente ativo liberado.

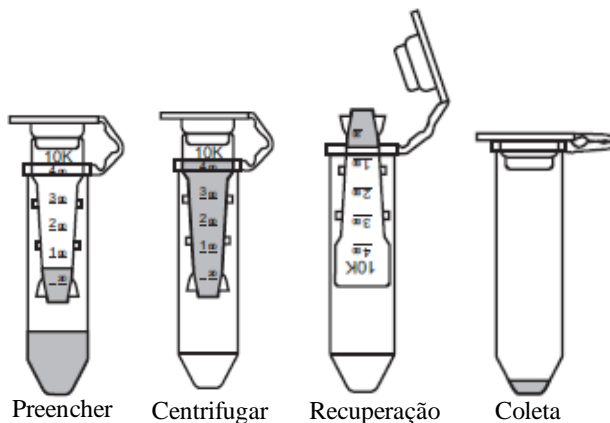
#### 3.4.5.1 Eficiência de Encapsulação

A porcentagem de óleo essencial associado às nanopartículas foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação.

As amostras de nanopartículas contendo óleo essencial foram centrifugadas em filtros de ultrafiltração Amicon<sup>®</sup> Ultra-0.5 com volume máximo de amostra de 500  $\mu\text{L}$ , constituídos de celulose regenerada com poro de exclusão molecular de 30.000 Da ou 30.000 NMWL (Limite Nominal de Massa Molar) (Microcon – Millipore<sup>®</sup>), à 10000 rpm durante 30 minutos, sendo o filtrado analisado por Espectroscopia de UV-Vis, nos comprimentos de onda de 210 e 220 nm. O volume típico do coletado é de 15-20  $\mu\text{L}$  [111]. O coletado foi diluído em água/acetona (1:1) para leitura. A Figura 15 ilustra o processo.



Figura 15: Figura ilustrativa do método de ultracentrifugação.



FONTE: Adaptado de Guia de usuário; Amicon® Ultra-0.5 [111].

A taxa de associação foi determinada pela diferença entre a quantificação da concentração do agente ativo no filtrado e a concentração total (100%) do mesmo, presente na solução de nanopartículas, conforme a equação 7 [112, 113].

$$EE\% = \frac{C_T - C_F}{C_T} * 100 \quad (7)$$

Onde  $C_T$  é a concentração total teórica e  $C_F$  é a concentração do filtrado.

O teor de agente ativo foi expresso em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A taxa de recuperação (%) de cada amostra foi calculada como sendo a diferença percentual entre a quantidade inicialmente adicionada e aquela encontrada nas soluções.

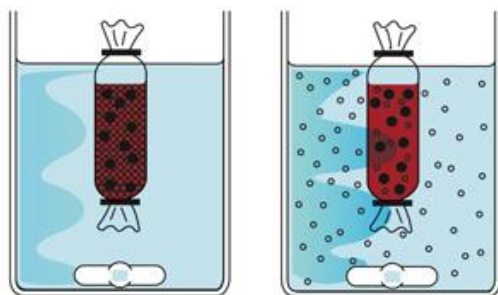
### 3.4.5.2 Curva de Calibração para Determinação da Concentração de Óleo Essencial

Para construção das curvas de calibração foram preparadas seis soluções de cada óleo essencial em concentrações na ordem crescente, iguais a 0,2 a 0,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em balões volumétricos de 5  $\text{cm}^3$ . Em seguida, as leituras foram realizadas à temperatura de 25 °C. A partir dos valores de absorvância, foram obtidas as áreas no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 210 nm. As absorvâncias médias, correspondentes a três determinações para cada diluição, foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), no eixo das abscissas, para a obtenção da equação da reta.

### 3.4.5.3 Avaliação do Perfil de Liberação dos Agentes Ativos a partir das Nanopartículas

A análise do perfil de liberação do agente ativo associado às nanopartículas foi realizada através de diálise (Figura 16). Um sistema composto por dois compartimentos, sendo um compartimento doador (1 mL (solução)) e outro acceptor (100 mL, (água/acetona 1:1)) separados por uma membrana de celulose com poros de exclusão molecular de 3500 Daltons, fornecida pela Spectra/Por®, e mantidos sob agitação magnética e a temperatura de 37 °C [114].

Figura 16: Ilustração da diálise



Alíquotas de 1 mL foram retiradas do compartimento acceptor em intervalos de 2 a 1800 min, e quantificados por Espectroscopia de UV-Vis, nos comprimentos de onda de 210 e 220 nm [109]. Após cada alíquota retirada o volume do compartimento acceptor foi preenchido com o acceptor (água) para que se mantivesse constante.

### 3.5 INCORPORAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS EM FIBRAS TÊXTEIS

Os têxteis utilizados foram dois: como tecido, uma sarja branca 100% algodão, chamada de tecido A, e um não tecido composto de 100% poliéster costurado, chamado de tecido B.

As nanopartículas contendo óleos essenciais foram adsorvidas aos têxteis por imersão dos tecidos na solução contendo as nanopartículas.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS EM FIBRAS TÊXTEIS

Para os testes de análise do perfil de liberação do agente ativo encapsulado às nanopartículas adsorvidas aos têxteis, os mesmos foram devidamente cortados em partes de 1,0 cm<sup>2</sup>. Estes foram imersos por 1 hora nas soluções de nanopartículas com o objetivo de adsorver as nanopartículas com o agente ativo por difusão.

A análise do perfil de liberação do agente ativo encapsulado às nanopartículas adsorvidas aos têxteis foi avaliado durante a ação da temperatura e do tempo. Os pequenos cortes de têxtil foram mantidos em estufa a 37 °C ( $\pm 2$ ), durante 58 dias. Cada amostra avaliada foi embebida em 1 mL de solvente orgânico (acetona) e após 10 minutos de ultrasonificação, as soluções de lavagem foram avaliadas por Espectroscopia de UV-Vis, a 210 e 220 nm [115, 116], em um espectrofotômetro de feixe duplo, modelo CARY 5000 – Varian, do Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos (Polimat) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Todas as amostras analisadas por espectroscopia foram diluídas em acetona, considerando-a como o branco.

### 3.7 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS TÊXTEIS

Foram utilizadas amostras de têxteis circulares de  $4,8 \pm 0,1$  cm de diâmetro, para uma quantidade de tecido que absorve  $1,0 \pm 0,1$  mL do inóculo.

A quantidade de tecido que absorveu o  $1,0 \pm 0,1$  mL de inóculo e não deixou nenhum líquido livre no frasco, foi de, 2 amostras de têxteis circulares de 4,8 cm.

Todos os têxteis foram previamente esterilizados em autoclave.

Este método de ensaio proporciona um método de análise quantitativa para a avaliação do grau de atividade antibacteriana. A atividade bactericida nos tecidos tratados com as nanopartículas com óleo essencial e não tratados (tecido sem nanopartículas), foi avaliada conforme a norma técnica *AATCC Test Method 100-2004* [117].

A avaliação de materiais têxteis com acabamentos antibacterianos é determinada pelo grau de atividade antibacteriana que se obtém no uso de tais materiais. A avaliação está associada apenas a atividade bacteriostática (inibição da multiplicação), sendo considerada aceitável quando um processo qualitativo que demonstre claramente a atividade antibacteriana em contraste com a falta de tal atividade em uma amostra não tratada (sem o agente antibacteriano incorporado). No entanto, se a atividade bactericida é intencional ou implícita, a avaliação quantitativa é necessária. A avaliação quantitativa também fornece uma imagem mais clara para possíveis usos desses materiais têxteis após tratamento.

As amostras são inoculadas com as bactérias de teste. Foi utilizada a bactéria *Staphylococcus aureus*, número 6538, organismo gram positivo. Após a incubação, as bactérias são eluídas a partir das amostras por agitação em quantidades conhecidas de solução neutralizante. O número de bactérias presentes nesse líquido é determinado, e a porcentagem de redução por amostra tratada é calculada.

Em seguida a inoculação com a bactéria teste, adiciona-se  $1,0 \pm 0,1$  mL de uma diluição apropriada do caldo de cultura do organismo de teste de modo que a recuperação a partir de amostras de tecido em tempo de contato "0" mostrem a contagem de  $1-2 \times 10^5$  organismos. Após adicionado o inóculo, adiciona-se  $100 \pm 1$  mL de solução neutralizante para cada amostra. É utilizado caldo ágar como neutralizante do crescimento das bactérias.

Foram feitas diluições  $10^0$ ,  $10^1$  e  $10^2$  em série nas placas em nutriente de ágar. Também foram incubados frascos adicionais contendo as amostras a  $37 \pm 2$  °C durante 24h. Após a incubação, repete-se o processo de adicionar 100 mL de solução neutralizante e posteriores diluições em placas e então incuba-se todas as placas durante 48h a  $37 \pm 2$  °C.

No tempo “0” e nas placas de 24h foram realizadas as contagens bacterianas com o número de colônias de bactérias por amostra.

O cálculo da redução percentual de bactérias pelos tratamentos por amostra é realizado com base nas seguintes equações.

$$R = \frac{100 (B - A)}{B} \quad (8)$$

Onde R é a % de redução; A é o número de bactérias contadas nas amostras tratadas, inoculadas no frasco incubado durante o período de contato desejado (24h) e B é o número de bactérias contadas nas amostras de ensaio tratadas inoculadas no frasco imediatamente após a inoculação (tempo de contato "0").

$$R = \frac{100 (C - A)}{C} \quad (9)$$

Onde, C é o número de bactérias contadas nas amostras de amostra de controle não tratadas inoculadas no frasco imediatamente após a inoculação (tempo de contato "0").

Se B e C não são semelhantes, o número maior deve ser usado. Se B e C não são significativamente diferentes, deve ser feita uma média dos dois valores “D”. A equação a ser utilizada acaba por ser a mesma:

$$R = \frac{100 (D - A)}{D} \quad (10)$$

Onde D é  $(B + C)/2$

O parâmetro “R” que é a porcentagem de redução bacteriana, fornece dados relativamente a quantidade de microrganismos que o

têxtil antimicrobiano destruiu tendo em conta o desempenho da amostra controle.

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto Brasileiro de Tecnologia do Couro, Calçado e Artefatos (*IBTeC*) de Novo Hamburgo -RS.

## **CAPÍTULO 4**

### **RESULTADOS E DISCUSSÕES**





## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

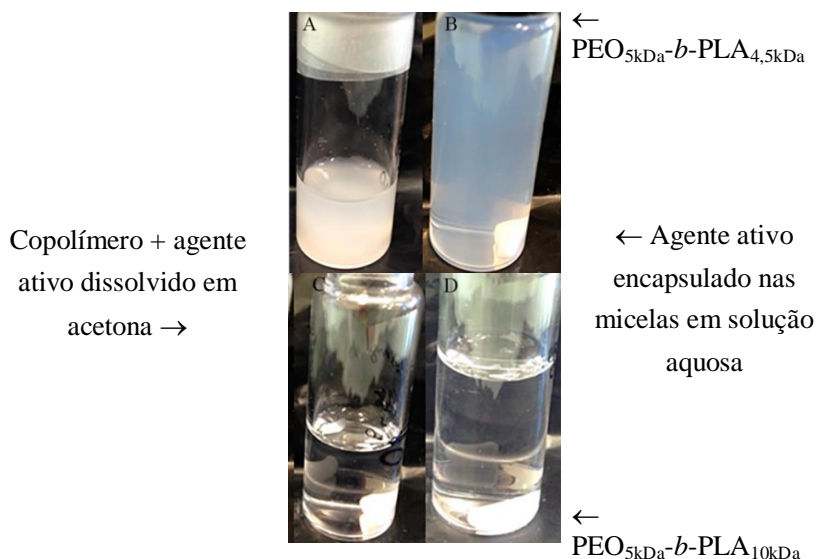
As nanopartículas à base de copolímeros em bloco, PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> e PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>, foram preparadas com sucesso através do método de nanoprecipitação, como descrito na Seção 3.2 e 3.3.

No processo de formação de micelas em água, o bloco hidrofílico (PEO) é orientado para a formação do revestimento da nanopartícula (camada externa) enquanto que a parte hidrofóbica, o PLA, é protegida do meio externo, formando o núcleo. Esse núcleo hidrofóbico serviu como um micro ambiente ideal para a encapsulação de agentes ativos de caráter hidrofóbico, enquanto que o bloco em contato com o solvente serviu como uma interface estabilizante entre o núcleo hidrofóbico e o meio externo.

Na Figura 17, são apresentadas as imagens das soluções: A e C referem-se as imagens antes da formação das micelas, enquanto B e D representa as imagens obtidas após a formação das micelas e a encapsulação do agente ativo, sendo que as imagens A e B correspondem ao copolímero PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> e as imagens C e D ao sistema de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>.

A formação de nanopartículas pode ser influenciada por diversos fatores, tais como a concentração de polímero, tempo e velocidade de agitação, concentração do agente ativo, entre outros. Desta forma, as condições experimentais foram cuidadosamente estabelecidas a fim de se obter nanoestruturas com diâmetro médio baixo e baixo índice de polidispersividade. Estas características foram principalmente acompanhadas por medidas de DLS, que fornecem informações relevantes, como tamanho das partículas em solução, presença de agregados, polidispersão e estabilidade.

Figura 17: Foto ilustrativa da aparência das soluções: A e C antes da formação das micelas; B e D após a formação das micelas e encapsulação do agente ativo.



Tal como Riley e colaboradores (2001) em nosso trabalho foram preparadas nanopartículas esféricas em meio aquoso. Riley e colaboradores sintetizaram uma série de copolímeros em bloco com base em um bloco fixo de PEG (5 kDa) e um segmento de PLA variável (2-110 kDa) e com estes copolímeros auto montados preparam nanopartículas esféricas em meio aquoso e estudaram sua estrutura e a influência da massa molar do bloco de PLA sobre o tamanho e número de agregação de micelas, para aplicação em entrega de fármacos [45].

No presente estudo, para a otimização do processo foram realizados vários testes preliminares, que são apresentados na Tabela 1. Para todos os ensaios foi realizada a nanoprecipitação considerando dois procedimentos: água gotejada na solução e solução gotejada em água.

Após avaliação dos resultados, optou-se pelo processo de nanoprecipitação da solução gotejada em água, pois quando a água era gotejada na solução, havia a formação de precipitado quase que imediatamente dificultando o controle do processo e resultando em raios

hidrodinâmicos muito elevados, sugerindo a formação de grandes aglomerados e uma baixa estabilidade da solução.

Tabela 1: Procedimentos preliminares utilizados para definição do processo de preparação das nanopartículas.

Amostras	Conc. do copolímero (mg mL <sup>-1</sup> )	Agente ativo (%)	Agitação (rpm)	Gota a gota (mL h <sup>-1</sup> )
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	4	-	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	4	-	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,7kDa</sub>	4	-	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	2	-	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	2	-	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,7kDa</sub>	2	-	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	8	-	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	8	-	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,7kDa</sub>	8	-	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	0,8	-	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	0,8	-	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	4	10	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	4	10	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	6	10	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	6	10	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	4	100	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	4	100	750	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	4	100	1100	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	4	100	1100	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	4	100	2200	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	4	100	2200	5,08
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	4	100	2200	7,63
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	4	100	2200	7,63
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	4	5	2500	9,91
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	4	5	2500	9,91
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	4	5	2200	3,05
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	4	5	2200	3,05

PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	2	5	2200	3,05
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	2	5	2200	3,05
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	4	10	2500	7,63
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	4	10	2500	7,63
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	2	10	2500	7,63
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	2	10	2500	7,63
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	4	20	2500	7,63
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	4	20	2500	7,63
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	2	20	2500	7,63
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	2	20	2500	7,63

Para ambos os sistemas estudados, as melhores condições para as nanopartículas estáveis e sem precipitação foram: concentração de copolímero de 4 mg mL<sup>-1</sup>; adição de 7,63 mL h<sup>-1</sup> de solução; 10% de óleo essencial para a solução de copolímero (w/v); velocidade de agitação de 2500 rpm; e acetona como solvente orgânico. Sob estas condições, as nanopartículas foram estáveis durante ±23 dias.

Os resultados apresentaram-se melhores com alta rotação e elevada velocidade de gotejamento. Quando em baixa rotação e baixa velocidade de gotejamento observou-se a formação de micropartículas e alta polidispersão. Bem como, com o aumento da concentração de copolímero e/ou agente ativo, gerou a formação de precipitados.

De acordo com as fichas técnicas do fabricante, o copolímero estudado é solúvel em clorofórmio, tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida e tolueno; e forma precipitados em etanol, éter e hexano [41, 118]. Inicialmente foram realizados testes em THF, mas a opção pela acetona mostrou-se mais favorável. A escolha da acetona como solvente orgânico se deu com base em trabalhos anteriores que demonstram a solubilidade do PEO e do PLA individualmente em acetona, bem como a mesma, é utilizada na purificação do copolímero em questão [119, 120].

Com essas condições, as nanopartículas mantiveram-se estáveis, sem formação de precipitado, sem a formação de agregados, e com tamanho nanoparticulado.

## 4.2 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

Para determinar a distribuição do tamanho e polidispersividade das nanopartículas, estudamos a dependência angular da intensidade de espalhamento de luz das soluções de nanopartículas de PEO-*b*-PLA. Uma vez que as nanopartículas em solução estão em constante movimento, as flutuações da intensidade da luz espalhada estão diretamente relacionadas ao movimento browniano. Portanto a técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) foi utilizada para analisar este movimento e correlacioná-lo com as dimensões das nanopartículas em solução aquosa, através de flutuações temporais na luz espalhada que geram informações a respeito da dinâmica das partículas em solução [105].

Após o tratamento, a função de correlação ( $g^{(2)}-1$ ), utilizando a análise CONTIN, para as amostras com velocidade de homogeneização de 2500 rpm e com velocidade de gotejamento de  $7,63 \text{ mL h}^{-1}$  e filtradas com filtro de acetato de celulose de  $0,45 \mu\text{m}$ , medida nos ângulos de  $60^\circ$ ,  $90^\circ$  e  $120^\circ$  de espalhamento e distribuição dos tempos de relaxação medido no ângulo de  $90^\circ$  são apresentados na Figura 15 e 16.

A distribuição do tempo de relaxação obtido a partir de PEO-*b*-PLA auto-montados em diferentes massas molares de copolímero mostrou a presença de duas populações micelares para as amostras de nanopartículas sem encapsulado (Figuras 18A e 19A), onde a primeira corresponde a pequenas micelas enquanto que a segunda população corresponde provavelmente as vesículas ou agregados micelares irregulares, formados por interações dinâmicas entre as cadeias do copolímero.

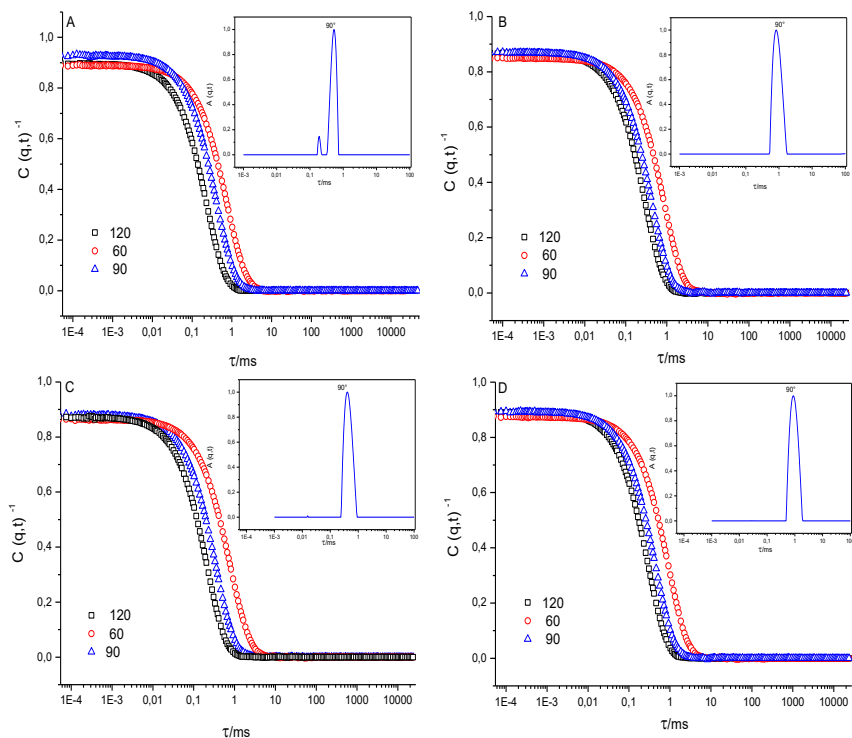
A natureza dinâmica de tais interações foi confirmada, uma vez que não foram detectados os agregados micelares após a filtração com um filtro de acetato de celulose com tamanho de poro de  $0,45 \mu\text{m}$ . O fato de o segundo pico, ter uma área de superfície maior do que a do primeiro pico indica que a quantidade de tamanhos das nanopartículas presentes não são os mesmos, ou seja, há uma polidispersão da amostra.

O  $R_H$  foi obtido através do gráfico de  $\Gamma$  versus  $q^2$  calculado usando a relação de Stokes-Einstein (Equação 2, encontrada na Seção 3.4.1).

Os gráficos da Figura 18 e 19 mostram a variação típica da frequência angular  $\Gamma$  medida como uma função de  $q^2$ .

Os gráficos indicam um comportamento difusivo do espalhamento das partículas e a existência de objetos esféricos para os dois sistemas estudados, tanto para micelas sem encapsulado ou com a presença de agente ativo. Portanto, o  $R_H$  pode ser corretamente calculado usando a relação de Stokes-Einstein.

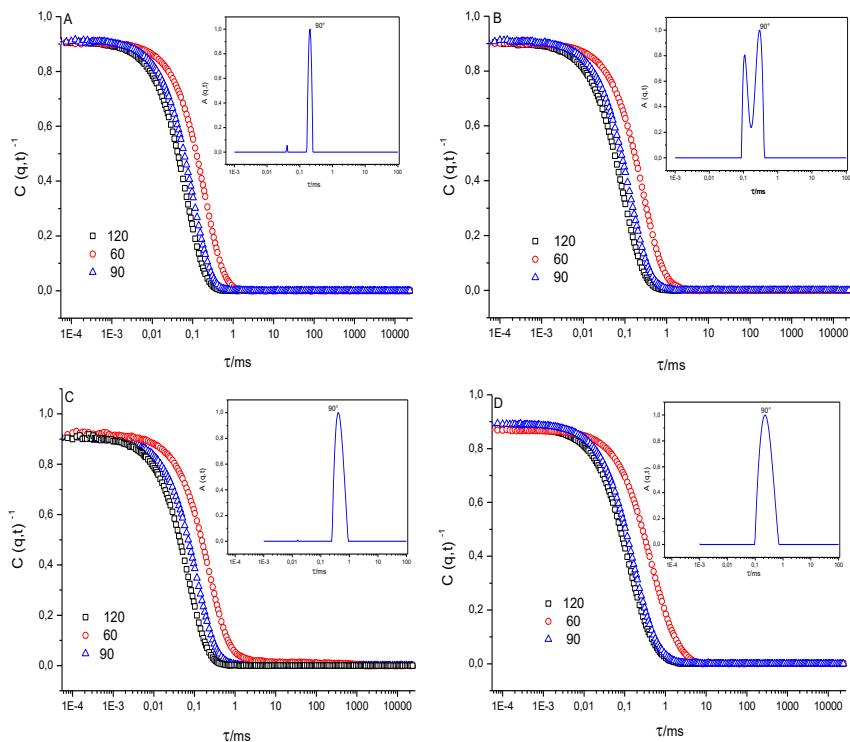
Figura 18: Função de correlação medida por DLS a  $90^\circ$ ,  $60^\circ$  e  $120^\circ$  e distribuição dos tempos de relaxação obtido num ângulo de  $90^\circ$  para: PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> (A); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com óleo de lavanda (B); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com óleo de eucalipto (C); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com a Blenda (D).



Observa-se que as micelas sem óleo do sistema de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> (Figura 18A) tem raios hidrodinâmicos de 77 nm e 13 nm. Na presença de 10% de óleo de lavanda (LO), (Fig. 18B) o raio

hidrodinâmico aumentou para 97 nm, bem como para amostra  $\text{PEO}_{5\text{kDa}}-b\text{-PLA}_{4,5\text{kDa}}$  contendo 10% da blenda de óleos essenciais (BD), (Fig. 18D) que apresentou  $R_H$  de 92 nm, demonstrando claramente a influência da presença do componente oleoso sobre o diâmetro da partícula, assim como reportado por Schaffazick e colaboradores (2002) [121]. A amostra  $\text{PEO}_{5\text{kDa}}-b\text{-PLA}_{4,5\text{kDa}}$  contendo 10% de óleo essencial de eucalipto (EO), (Fig. 18C) apresentou  $R_H$  de 77 nm.

Figura 19: Função de correlação medida por DLS a  $90^\circ$ ,  $60^\circ$  e  $120^\circ$  e distribuição dos tempos de relaxação obtido num ângulo de  $90^\circ$  para:  $\text{PEO}_{5\text{kDa}}-b\text{-PLA}_{10\text{kDa}}$  (A);  $\text{PEO}_{5\text{kDa}}-b\text{-PLA}_{10\text{kDa}}$  com LO (B);  $\text{PEO}_{5\text{kDa}}-b\text{-PLA}_{10\text{kDa}}$  com EO (C);  $\text{PEO}_{5\text{kDa}}-b\text{-PLA}_{10\text{kDa}}$  com a Blenda (D).



Analisando a Figura 19, para o sistema  $\text{PEO}_{5\text{kDa}}-b\text{-PLA}_{10\text{kDa}}$ , que apresentou duas populações para o sistema vazio e com a presença do

óleo de lavanda, os valores foram de 19 nm e 4 nm para as micelas sem óleo, (Fig. 19A). Com 10% de LO, (Fig. 19B) o raio hidrodinâmico aumentou para 24 nm e 10 nm, respectivamente. Para amostra PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> contendo a BD, (Fig. 19D) o R<sub>H</sub> de 22,7 nm e para a amostra de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> contendo óleo essencial de eucalipto o R<sub>H</sub> foi de 19 nm.

As amostras de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>, as quais apresentaram os menores raios hidrodinâmicos, mostraram-se translúcidas (Figura 17), assim como apresentado por Schaffazick e colaboradores (2002) e suas soluções de nanoesferas de Eudragit S90 e PCL [121], podendo-se também evidenciar claramente o reflexo azulado, quando há a dispersão da luz pelas partículas coloidais em solução, decorrente do movimento browniano das nanopartículas em solução (efeito Tyndall) [122].

É importante observar que a intensidade de dispersão da luz é proporcional à concentração das nanopartículas multiplicado por sua massa molar, de acordo com o conceito de dispersão de Rayleigh para partículas esféricas, por isso o DLS é muito mais sensível à presença de agregados de maior dimensão do que as pequenas nanopartículas micelares [45].

Os raios hidrodinâmicos para os dois sistemas estudados, apresentados nas Figuras 18 e 19, determinados através da equação de Stokes-Einstein, são mostrados na Tabela 2 para uma melhor visualização e comparação dos resultados.

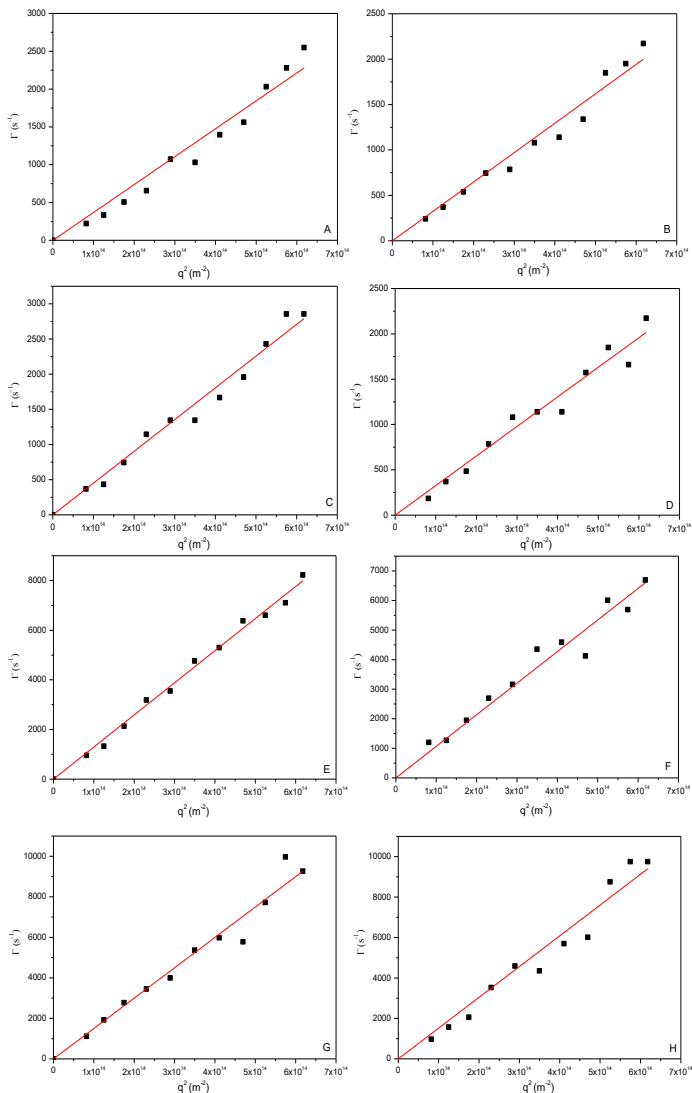
Tabela 2: Raio hidrodinâmico determinado por DLS.

Copolímero	R <sub>H</sub>					
	NP sem óleo		NP com 10% de LO		NP com 10% de EO	NP com 10% de BD
	R <sub>H1</sub>	R <sub>H2</sub>	R <sub>H1</sub>	R <sub>H2</sub>	R <sub>H</sub>	R <sub>H</sub>
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	13	77	-	97	77	92
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	4	19	10	24	19	22,7

A Figura 20 apresenta os gráficos da dependência da frequência de relaxação (1/τ) do quadrado do modulo do vector de onda (q<sup>2</sup>) medido nos ângulos de 40 até 140°.



Figura 20: Dependência da frequência de relaxação ( $1/\tau$ ) do quadrado do módulo do vector de onda ( $q^2$ ) das soluções aquosas de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> (A); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com LO (B); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com EO (C); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com a BD (D); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> (E); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com LO (F); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com EO (G); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com a BD (H).



Pelos resultados de DLS apresentados, podemos observar o acréscimo no tamanho das nanopartículas com a presença do agente ativo, e uma distribuição bimodal para os copolímeros sem a presença de agente ativo. Esse comportamento é um indicativo de que o processo de encapsulação foi eficiente. Observa-se que as amostras com a presença de agente ativo indicam que há uma leve dependência angular no espalhamento da solução; isto é um indicativo de partículas grandes e/ou sistema polidisperso.

Com base na dependência da frequência de relaxação ( $1/\tau$ ) do quadrado do modulo do vector de onda ( $q^2$ ) medido nos ângulos de 40 até 140°, foi calculado o raio hidrodinâmico real para os dois sistemas estudados, apresentados nas Figuras 20, são mostrados na Tabela 3:

Tabela 3: Raio hidrodinâmico real determinado pela dependência angular por DLS.

Copolímero	$R_H$			
	NP sem óleo	NP com 10% de LO	NP com 10% de EO	NP com 10% de BD
	$R_H$	$R_H$	$R_H$	$R_H$
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	61,34	75,42	53,81	74,81
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	16,51	22,85	16,20	19,65

No entanto, para o óleo de eucalipto, observamos uma pequena diminuição no  $R_H$ , indicando uma possível dificuldade de encapsulamento do óleo nestes sistemas, o que é confirmado pelos baixos valores de encapsulação e baixa taxa de recuperação a serem discutidos na seção 4.7, sugerindo que são sistemas saturados de óleo. Segundo a literatura, a natureza do óleo utilizado como núcleo têm grande influência na formação das nanopartículas. Os resultados podem ser atribuídos às diferenças de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial das entre as substâncias empregadas [112].

A única diferença dos dois copolímeros PEO-*b*-PLA é o teor hidrofóbico em relação ao teor hidrofílico. Normalmente, as nanopartículas formadas a partir de copolímeros anfifílicos devem ser pequenas e ter uma distribuição estreita. Neste trabalho, estas nanopartículas são maiores em comparação com micelas normais,

quando a massa molar de PEO torna-se maior em relação ao PLA, em concordância com Hu e colaboradores (2003) que observou que os valores de concentração micelar crítica (CMC) aumentam com o aumento da massa molar de PEG. Estes resultados indicaram que quanto maior o segmento hidrofóbico, mais fácil a formação de nanopartículas micelares, em meio aquoso [123].

O aumento do teor de PLA na composição do copolímero gera uma diminuição do tamanho de partícula. Podemos considerar duas grandes possibilidades para esta situação: (1) formam-se pequenas nanopartículas que se agregam para formar grandes aglomerados, como explicado por Renliang Xu [124], no caso do PEO<sub>5K</sub>-*b*-PLA<sub>4.5K</sub>; (2) o PEO quando em solução aquosa pode formar grandes complexos termodinamicamente reversíveis, formando um conjunto de cadeias de PEO e não nanopartículas, por isso do aumento do tamanho. Portanto, as nanopartículas em água com longas cadeias de PEO, como uma camada exterior, tem uma tendência para formar agregados maiores.

Estes resultados estão em boa concordância com outros trabalhos, que sugerem que o comprimento e o caráter hidrofóbico do bloco formando o núcleo determinam as dimensões das micelas e, conseqüentemente, a eficiência de encapsulação, perfil de liberação, de biodisponibilidade e de biodistribuição do sistema de transporte [35, 125, 126, 127].

A tendência de nossos resultados está de acordo com a conclusão de Xu (1991) de que o grau de associação das micelas aumenta quando aumenta a massa molar do copolímero ou quando aumenta o teor do polímero hidrofóbico [124], em nosso caso, o PLA.

O espalhamento de luz representa uma técnica experimental importante no estudo das características estruturais de nanopartículas em solução.

### 4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

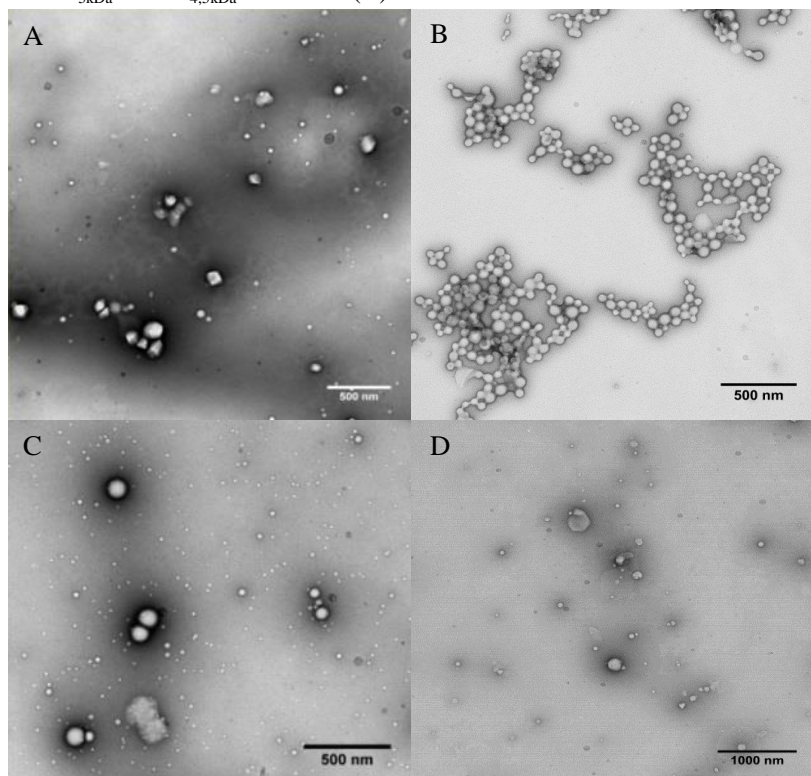
A análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada com o objetivo de confirmar o tamanho, como realizado por espalhamento de luz, uma vez que de acordo com a literatura é aconselhável que se utilize mais de um tipo de metodologia para a determinação do tamanho de partículas [128], bem como analisar a morfologia das nanopartículas de PEO-*b*-PLA. A análise foi realizada considerando um aumento de 20.000x e os resultados foram comparados

com os dados obtidos por DLS. As micrografias são apresentadas nas Figuras 17 e 18.

Para ambos os sistemas estudados, foram obtidas nanopartículas esféricas. Comportamento semelhante foi apresentado por Jie e colaboradores (2005) que obtiveram nanopartículas esféricas em meio aquoso, a partir do PEO-PLA [42]. Neckel e Senna (2005) também obtiveram nanopartículas esféricas com a encapsulação de camptotecina em PLA e copolímeros de PLA-PEG [10].

Segundo a literatura é aconselhado que pelo menos um dos métodos de caracterização seja baseado em microscopia para que seja verificada a presença de agregados ou outras formas de instabilidade nas soluções coloidais [129].

Figura 21: Imagens de MET para as amostras: PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> (A); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com LO (B); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com EO (C); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com a BD (D).

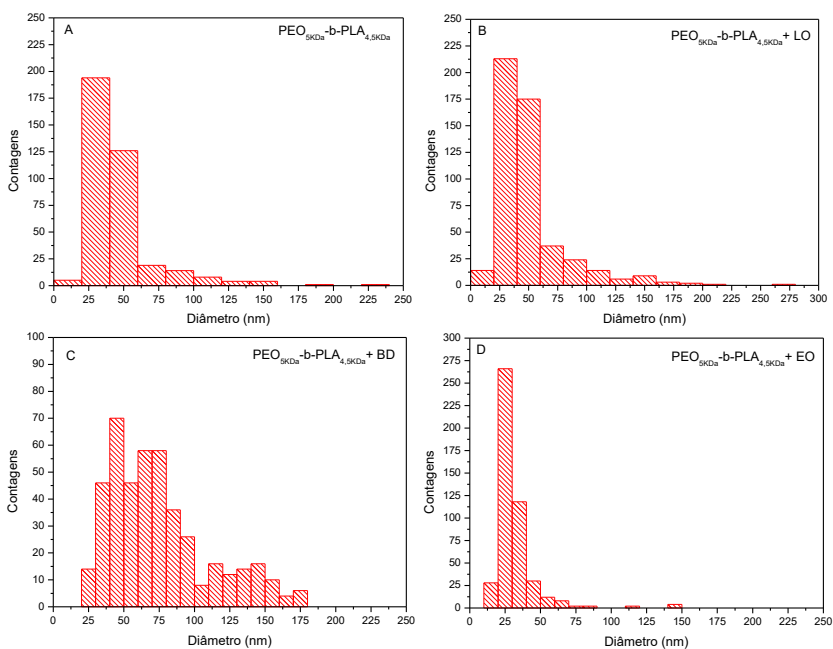


As micrografias de MET, de forma semelhante aos resultados de DLS, também mostraram um aumento do raio médio das nanopartículas quando há a encapsulação do agente ativo.

As nanopartículas obtidas com o copolímero PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub>, observadas na Figura 21, mostraram diâmetros médios de 50 nm para micelas sem óleo (21A) e 75 nm com 10% BD (21D), respectivamente.

Na Figura 22 é apresentado os histogramas das contagens das nanopartículas das imagens de MET, realizadas pelo software *Image Tool*, que apresenta os valores de diâmetro.

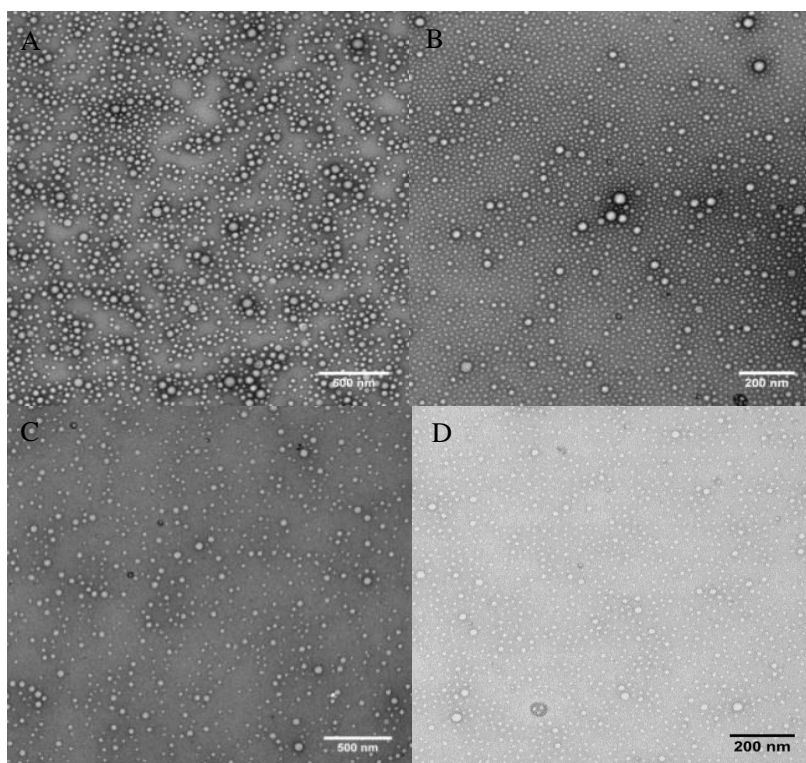
Figura 22: Histogramas das imagens de MET para as amostras: PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> (A); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com LO (B); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com BD (C); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com a EO (D).



As micrografias de MET mostraram comportamento semelhante quando comparado aos resultados de DLS, porém apresentaram

tamanhos menores para as nanopartículas em comparação com a técnica de DLS. As diferenças que podem ser observadas entre as duas técnicas estão relacionadas ao processo de desidratação, uma vez que para análises de microscopia foi necessária a secagem do solvente e para o espalhamento de luz as medidas foram feitas em solução, no qual é avaliado o tamanho aparente das nanopartículas, considerando a sua camada de hidratação/solvatação [130].

Figura 23: Imagens de MET para as amostras: PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> (A); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com LO (B); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com EO (C); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com a BD (D).

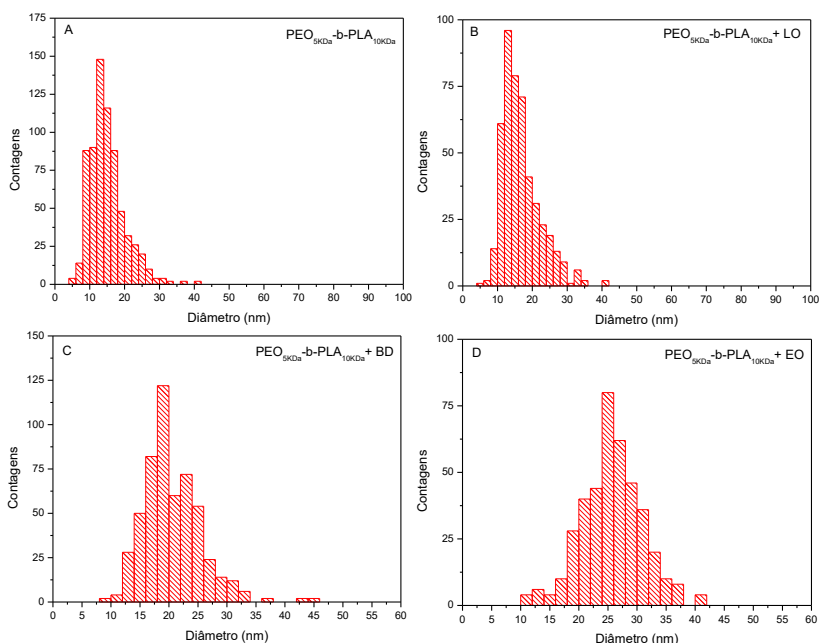


Com a condição de menor massa de PLA (Figura 22), observou-se grandes vazios sobre as grids indicando que a solução de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-

PLA<sub>4,5kDa</sub> não pôde cobrir a totalidade da superfície das grids, podendo haver copolímero disperso, ou seja, não associado na forma de nanopartículas. Com o aumento da massa molar de PLA, (PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>), a solução pôde cobrir toda a superfície das grids, uniformemente, como podemos observar na Figura 23.

A Figura 24 apresenta os histogramas das contagens das nanopartículas das imagens de MET, com os diâmetros para as amostras de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>.

Figura 24: Histogramas das imagens de MET para as amostras: PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> (A); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com LO (B); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com BD (C); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com a EO (D).



Na Tabela 4 podemos observar o resumo dos histogramas, resultados obtidos a partir das contagens das nanopartículas das imagens de MET.

Tabela 4: Diâmetro determinado por MET e seus respectivos desvios padrão.

Amostra	Diâmetro							
	NP	$\sigma$	NP	$\sigma$	NP	$\sigma$	NP	$\sigma$
	sem óleo		com LO		com EO		com BD	
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	38	0,96	39	0,62	28	0,33	58	2,8
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	14	0,27	15	0,30	25	0,29	20	0,36

A coloração negativa de acetato de uranila 2% foi utilizada sobre as nanopartículas propiciando uma maior exibição das micelas e das estruturas muito finas.

Apesar da diminuição de tamanhos apresentada por essa técnica, os resultados apresentam similaridade com o DLS. Pela Tabela 3, observa-se que para a amostra PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com encapsulação do óleo de eucalipto, ocorreu uma leve diminuição de tamanho em relação à nanopartícula sem óleo, corroborando com os resultados apresentados por DLS, e indicando que a natureza do óleo utilizado como núcleo, neste caso o eucalipto, teve grande influência na formação das nanopartículas.

#### 4.4 ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO

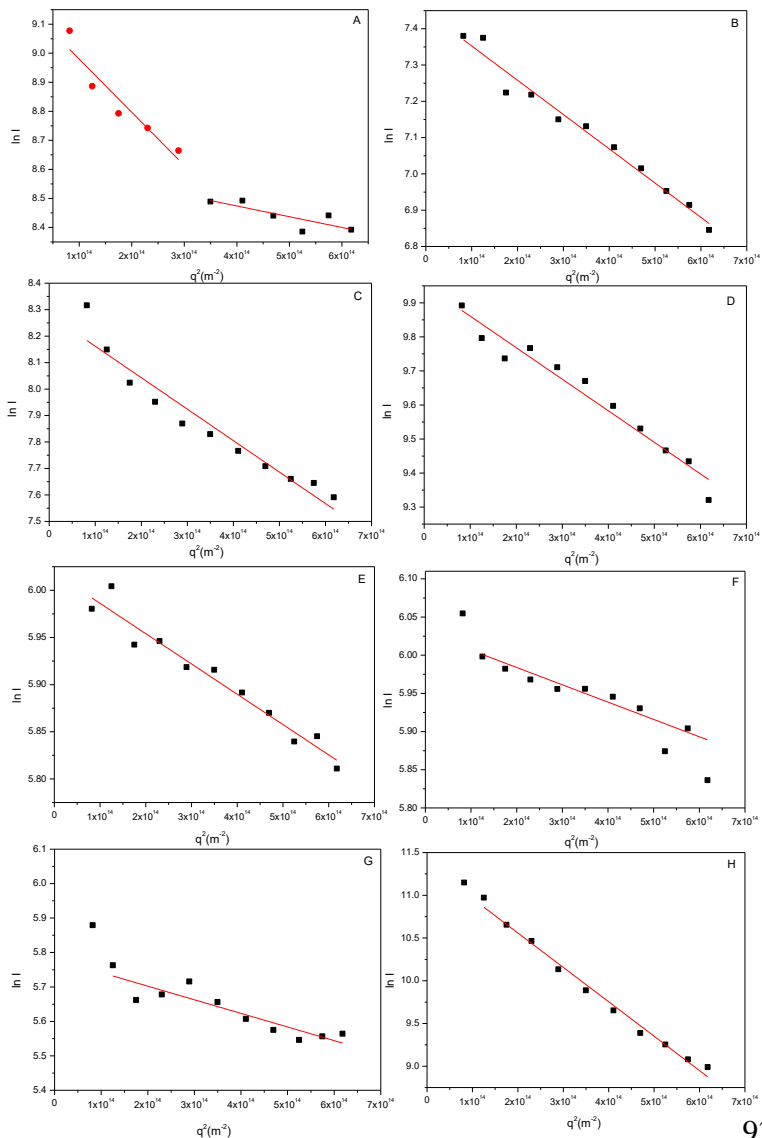
Para os sistemas em investigação os valores de  $R_g$  foram determinados a partir de um gráfico de  $\ln I$  versus  $q^2$ .

A Figura 25, apresenta os gráficos de  $R_g$  para as amostras de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> e PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> filtradas com filtro de acetato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$ , cujo valor foi calculado com base na lei de Guinier, a partir do coeficiente angular da reta utilizando a Equação 3 (Seção 3.4.1). Esta aproximação é bastante utilizada para a determinação de  $R_g$  de partículas, sendo válida apenas quando  $qR_g < 1$ .

A razão entre  $R_g$  e  $R_H$  fornece o grau de anisotropia ( $\rho$ ), que estima a morfologia das nanopartículas.



Figura 25: Gráficos de  $\ln I$  versus quadrado do módulo do vector de onda ( $q^2$ ) das soluções aquosas de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> (A); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com LO (B); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com EO (C); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com a BD (D); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> (E); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com LO (F); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com EO (G); PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com a BD (H).



Para as amostras de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> observa-se, a partir do gráfico (Figura 25A) duas inclinações, correspondentes a diferentes valores de R<sub>g</sub> (74 nm e 43 nm), para um valor de R<sub>H</sub> de 62 nm, fornecendo valores de  $\rho = 1,19$  e  $0,70$ , respectivamente, que estão relacionadas a morfologia micelar (vesículas e esferas homogêneas) segundo a Tabela 5, adaptada de Burchard [131].

A Tabela 5 mostra os valores de  $\rho$  calculados teoricamente para as morfologias mais frequentemente encontradas.

Tabela 5: Valores de  $\rho$  e a morfologia das partículas.

Morfologia	$\rho$
Esfera homogênea ( <i>hard</i> )	0,778
Esfera ( <i>soft</i> )	0,977
Vesícula	> 1,0
Polímero envelado monodisperso	1,5 a 1,7
Polímero envelado polidisperso	> 1,7

FONTE: (adaptado de Burchard) [131].

Para as amostras PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com a presença do óleo de lavanda (Fig. 25B) observa-se um R<sub>g</sub> de 53 nm que resultou num grau de anisotropia de  $0,70$ , bem como para a amostra com a presença da blenda de óleos, confirmando a formação de esferas homogêneas (Figura 25D). A amostra PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com EO, resultou num  $\rho$  de  $0,92$ , correspondente a esferas (*soft*).

As amostras com PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>, nas mesmas condições experimentais, apresentaram comportamento semelhante quando observa-se as imagens de MET, porém segundo o SLS, os resultados sugerem a formação de vesículas e até mesmo polímero envelado, segundo análise da Tabela 6 em comparação a Tabela 5.

Os valores R<sub>g</sub>, R<sub>H</sub> e os respectivos graus de anisotropia encontrados para os sistemas estudados estão resumidos na Tabela 6.

Os resultados mostrados na Tabela 6 indicam uma clara tendência para o aumento da dimensão das nanopartículas com a diminuição da massa molar do bloco de PLA.

Tabela 6: Raio de giração ( $R_g$ ) determinado por SLS, raio hidrodinâmico ( $R_H$ ) determinado por DLS e grau de anisotropia.

Amostras	$R_g$ (nm)	$R_H$ (nm)	$\rho$
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	74 e 43	62	1,19 e 0,70
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> + LO	53	76	0,70
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> + EO	50	54	0,92
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> + BD	54	75	0,72
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	20	17	1,17
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> + LO	26	23	1,13
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> + EO	25	16	1,56
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> + BD	16	20	0,80

A amostra com a encapsulação do óleo de eucalipto apresentaram raios hidrodinâmicos menores em relação a nanopartícula sem óleo e elevado grau de anisotropia ( $\rho$ ), para amostra (PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>), que de acordo com a Tabela 5, correspondente a polímeros enovelados. No entanto observando as micrografias de transmissão apresentadas anteriormente na seção 4.3, observa-se claramente a presença de micelas esféricas. Esse resultado com elevado  $\rho$  deve-se a ausência de uma correlação linear perfeita em toda a faixa angular, sendo isto um indicativo de sistemas polidispersos em solução e dificultando a conclusão dos resultados. Como apresentado, p. ex. na Figura 25G.

Pelos resultados apresentados na Tabela 6 pode-se avaliar o efeito do agente ativo nas características das nanopartículas, observa-se que o raio hidrodinâmico aumenta para as nanopartículas contendo agente ativo, sugerindo mais uma vez que o agente ativo foi eficientemente encapsulado. Com exceção do óleo de eucalipto que apresentou raios hidrodinâmicos menores que os encontrados para as nanopartículas sem óleo.

#### 4.5 NANOSIZER

A estabilidade das soluções de nanopartículas também foi avaliada por meio de medições do potencial zeta, por um equipamento denominado NanoSizer.

O potencial zeta ( $\zeta$ ) é um parâmetro que pode influenciar na estabilidade das partículas em solução com base na repulsão

eletrostática e a sua medição também fornece informações sobre o bloco dominante na superfície da partícula.

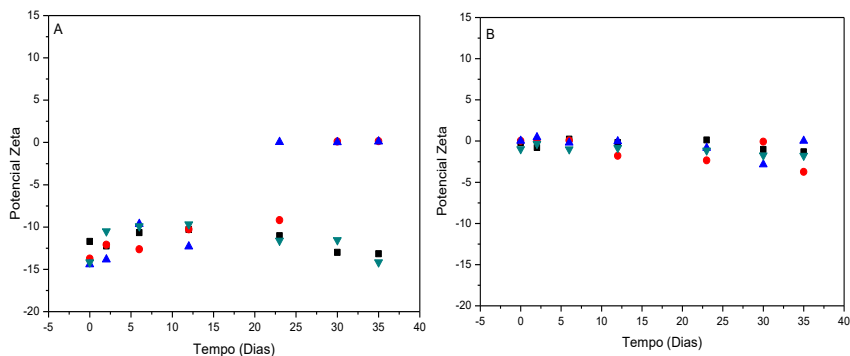
Em geral, os parâmetros tais como o tamanho das nanopartículas, índice de polidispersibilidade e potencial zeta estão relacionados com a estabilidade da solução.

O potencial zeta pode ser afetado pelos componentes da formulação, tais como pH, concentração dos componentes, força iônica do meio, entre outros [112, 132].

Independentemente do método de preparação os produtos são obtidos como soluções coloidais aquosas. Entretanto, durante o tempo de armazenamento, pode ocorrer a agregação das nanopartículas no meio, resultando na formação de precipitados. Além disso, podem ocorrer problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas presentes na formulação [112].

A Figura 26 apresenta o potencial zeta avaliado durante 35 dias.

Figura 26: Potencial zeta: (A) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub>; (B) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>; (■) Nanopartícula sem óleo; (▼) Óleo de eucalipto; (▲) Óleo de lavanda; (●) Blenda de óleos.



Na Figura 26B podemos observar que o  $\zeta$  das nanopartículas tende a zero para o copolímero PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>, confirmando a presença de PEO (monômero não iônico de óxido de etileno) na superfície das nanopartículas. Mudanças significativas não foram observadas ao longo de um período de  $\pm 23$  dias. Após este período, tanto polidispersividade e tamanho de nanopartículas aumentaram, sugerindo a formação de agregados devido a instabilidade da solução.

Para as amostras de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> (Figura 26A) os valores de  $\zeta$  variaram de -13 a 0 mV. Esta redução no potencial zeta pode levar ao fenômeno de fusão e agregação das nanopartículas, o que pode explicar o aumento do tamanho e do índice de polidispersividade destas amostras com o passar do tempo, esse comportamento está provavelmente associado ao mascaramento de grupamentos carboxílicos terminais do PLA pelo PEO [10].

Os baixos valores de potencial zeta dos copolímeros (próximos a zero) justificam a sua tendência de formar agregados em solução.

Os resultados de  $\zeta$  mostraram que as nanopartículas contendo óleo essencial apresentaram basicamente a mesma carga superficial que as nanopartículas sem óleo, indicando que não há presença de moléculas do óleo essencial adsorvidas na superfície das partículas [133].

O diâmetro das nanopartículas também pôde ser avaliado pelo NanoSizer. Considerando que o equipamento é um instrumento que também utiliza o espalhamento de luz, mas é incapaz de ponderar a dependência angular e que faz medida somente em um único ângulo fixo. O instrumento opera medindo a luz espalhada somente em um ângulo  $\theta=173^\circ$  e utiliza uma aproximação conhecida como “*back scattering*”. Esta aproximação é parcialmente válida para sistemas monodispersos e, em sistemas polidispersos, tende a superestimar o valor do raio hidrodinâmico, dada a maior contribuição de partículas grandes na intensidade de espalhamento neste ângulo [134].

Para a amostra de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub>, as nanopartículas sem óleo apresentaram um diâmetro de 158 nm e IP de 0,27. Na presença de 10% de óleo essencial de lavanda o diâmetro foi 157 nm com um IP de 0,34. Ao mesmo tempo, diâmetros de 140 nm e 184 nm foram determinados para nanopartículas de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> na presença de óleo de eucalipto e blenda de óleos, respectivamente.

Para nanopartículas sem óleo do copolímero PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> diâmetro de 53 nm e IP de 0,30 foram observados. Na presença de 10% de óleo essencial de lavanda, um diâmetro de 56 nm e IP de 0,32 foram determinados. Para nanopartículas de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com óleo de eucalipto e blenda, diâmetros de 39 nm (IP=0,46) e 85 nm, IP de 0,47, foram obtidos.

O diâmetro das nanopartículas determinados por NanoSizer foram comparados com os obtidos a partir do DLS. Os resultados mostrados na Tabela 7 indicam uma boa similaridade e uma clara

tendência para o aumento do tamanho das partículas com o aumento da massa molar do bloco de PEO em relação ao peso de PLA, bem como com a presença do agente ativo.

Como observado por DLS, houve uma distribuição bimodal para as nanopartículas PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> com óleo de lavanda, sugerindo a formação de agregados no presente sistema e/ou uma alta polidispersão. O índice de polidispersividade aumentou ligeiramente com a presença de óleo de lavanda, 0,27 para 0,34 e 0,30 para 0,32, para os sistemas PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> e PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>, respectivamente.

Tabela 7: Raio hidrodinâmico determinado por DLS (Goniômetro) e NanoSizer, e seus respectivos IP.

Amostras	R <sub>H</sub> (nm) DLS	R <sub>H</sub> (nm) NS*	IP (média)	IP i – f**
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	62	79	0,27	0,27-0,51
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> + LO	76	78	0,34	0,22-0,48
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> + EO	54	70	0,26	0,26-0,31
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> + BD	75	92	0,30	0,26-0,30
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	17	26	0,30	0,26-0,37
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> + LO	23	28	0,32	0,28-0,40
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> + EO	16	19	0,46	0,25-0,66
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub> + BD	20	42	0,47	0,25-0,52

\* O tamanho das partículas foi determinado como o diâmetro médio das partículas calculadas a partir da intensidade da luz difusa (tamanho médio Z) utilizando a versão de software Zetasizer 7.01.

\*\* inicial: 0 dias e final: 35 dias.

Os resultados indicam que o tamanho e o índice de polidispersividade das nanopartículas de PEO-*b*-PLA com e sem óleo essencial são consistentes com soluções coloidais [135].

O índice de polidispersividade, calculado pelo equipamento, reflete a homogeneidade na distribuição do diâmetro das nanopartículas na amostra (Tabela 7) e, normalmente, valores próximos de 0,2 para soluções coloidais indicam sistemas monodispersos ou com uma faixa estreita de tamanho, são considerados bons indicadores de estabilidade [10, 136, 137]. Neste trabalho, apesar de se observar baixos valores de  $\zeta$ , o índice de polidispersividade ficou próximo de 0,25 para todos os

sistemas estudados nos primeiros dias avaliados, e conforme o passar dos dias, o IP foi aumentando gradativamente. A Tabela 7 apresenta os valores iniciais e finais (com 35 dias) para os IPs, o que sugere uma boa estabilidade sob as condições de preparação, considerando que inicialmente todos os valores mantiveram-se na faixa de 0,22-0,28.

A estabilidade das soluções de nanopartículas formadas por PEO-*b*-PLA, é regida por um mecanismo de estabilização estérica, onde as cadeias do copolímero dibloco ligadas à superfície das nanopartículas, os blocos de PEO hidrofílicos e disponíveis externamente solvavam em meio aquoso produzindo uma barreira estérica [138, 139].

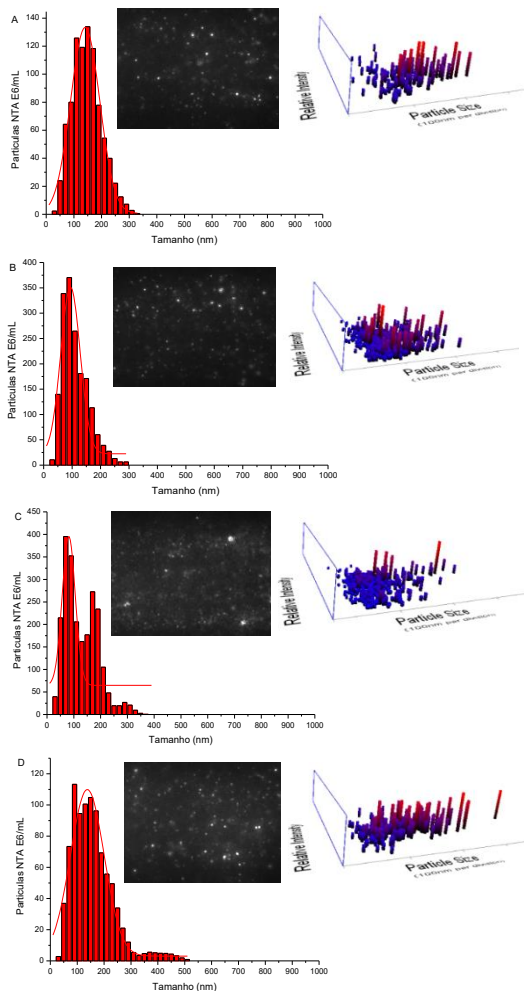
O espalhamento de luz representa uma técnica experimental importante no estudo das características estruturais de nanopartículas em solução. Os resultados obtidos através da técnica NanoSizer corroboram com resultados de raios hidrodinâmicos encontrados por DLS (resultados apresentados na Seção 4.2).

### 4.6 ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS

A fim de confirmar os resultados obtidos utilizando DLS que sugere a produção das nanopartículas com uma distribuição com baixa polidispersão, as amostras foram analisadas através da técnica de Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) [124]. É uma técnica baseada na microscopia de iluminação a laser, que permite a análise em tempo real do movimento Browniano das nanopartículas utilizando um dispositivo de câmera de carga acoplada (CCD). As nanopartículas em meio líquido são visualizadas e rastreadas individualmente por um software de análise de imagem que deduz o coeficiente de difusão de cada uma das partículas e permite a determinação do seu raio hidrodinâmico [140]. Este método de análise é considerado complementar a dispersão dinâmica da luz, uma vez que fornece o diâmetro médio em número.

A distribuição de tamanhos das nanopartículas com os correspondentes quadros de vídeo e gráficos tridimensionais para as amostras com o copolímero PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub>, são mostrados na Figura 27.

Figura 27: Distribuição de tamanho a partir de medições NTA com o vídeo NTA correspondente e o tamanho gráfico 3D: A) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub>; B) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com LO; C) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com EO; D) PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> com BD.



É possível observar uma distribuição relativamente estreita para as formulações filtradas a 0,45 $\mu$ m, demonstrando uma boa concordância com os resultados de DLS.



Os diâmetros médios obtidos por NTA para as amostras de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> foram muito maiores do que aqueles obtidos por DLS, uma vez que a NTA não tem sensibilidade para nanopartículas muito pequenas, e em função desta deficiência da técnica, os resultados foram desconsiderados e não serão apresentados. Segundo o fabricante a sua sensibilidade é de cerca de 10 nm, mas na prática, nanopartículas menores que 50 nm fornecem dados pouco confiáveis, devido a maior contribuição de partículas maiores e/ou agregados.

A Tabela 8 apresenta os raios hidrodinâmicos médios obtidos em triplicata, por Análise de Rastreamento de Nanopartículas.

Tabela 8: Valores das médias dos raios hidrodinâmicos determinados por NTA.

Copolímero	R <sub>H</sub>		
	Médias		
	1	2	3
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	69	72	79
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> + LO	52	54	62
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> + EO	63	65	56
PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub> + BD	71	81	83

Avaliando os valores da Tabela 8, os diâmetros médios obtidos por NTA foram ligeiramente menores do que aqueles obtidos por DLS para algumas amostras. De acordo com Filipe e colaboradores [141], esta mudança pode ser explicada porque as distribuições de tamanho obtido por DLS consistem de distribuições de massa, ao passo que as obtidas por NTA são distribuições numéricas. Além disso, as distribuições de tamanho obtidas por NTA são tamanhos maiores em relação ao DLS, devido à elevada contribuição de algumas partículas de grandes dimensões para a dispersão global [124].

Os gráficos tridimensionais de tamanho *versus* intensidade em função da concentração, resultaram em uma concentração de nanopartículas de  $11,05 \times 10^8$  partículas mL<sup>-1</sup> para as nanopartículas sem óleo. Para as nanopartículas contendo LO uma concentração de  $16,60 \times 10^8$  partículas mL<sup>-1</sup> que equivale a cerca de 127 partículas por quadrado observado. Levando em consideração que em uma análise de NTA de 60s são analisados 25 quadrados por segundo. Para as nanopartículas contendo EO observou-se uma concentração de  $23,01 \times 10^8$  partículas mL<sup>-1</sup> equivalente a cerca de 142 partículas por quadrado

observado. E para as nanopartículas contendo BD,  $9,82 \times 10^8$  partículas  $\text{mL}^{-1}$ .

Para a amostra de  $\text{PEO}_{5\text{kDa}}\text{-}b\text{-PLA}_{10\text{kDa}}$ , a qual não foi exposto os resultados, as concentrações ficaram em torno de  $11,65 \times 10^8$  partículas  $\text{mL}^{-1}$  para as nanopartículas sem óleo, cerca de 79 partículas/quadrado.  $6,49 \times 10^8$  partículas  $\text{mL}^{-1}$  para o sistema  $\text{PEO}_{5\text{kDa}}\text{-}b\text{-PLA}_{10\text{kDa}} + \text{LO}$ ;  $7,05 \times 10^8$  partículas  $\text{mL}^{-1}$  para o sistema  $\text{PEO}_{5\text{kDa}}\text{-}b\text{-PLA}_{10\text{kDa}} + \text{BD}$  e  $7,62 \times 10^8$  partículas  $\text{mL}^{-1}$  para o sistema  $\text{PEO}_{5\text{kDa}}\text{-}b\text{-PLA}_{10\text{kDa}} + \text{EO}$ .

Com esses resultados podemos concluir que a técnica realmente não foi eficiente para o sistema  $\text{PEO}_{5\text{kDa}}\text{-}b\text{-PLA}_{10\text{kDa}}$ , pois ao observar as micrografias, podemos ver muitas micelas presentes. O que confirma a falta de sensibilidade para pequenas nanopartículas.

#### 4.7 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A porcentagem de óleo essencial encapsulado nas nanopartículas foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação. Sendo o filtrado quantificado por Espectroscopia de UV-VIS.

A taxa de associação foi determinada pela diferença entre a quantificação da concentração do agente ativo no filtrado e a concentração total (100%) do mesmo, presente na solução de nanopartículas, conforme a Equação 7, da Seção 3.4.5.1 [112, 113].

A taxa de recuperação (%) de cada amostra foi calculada como sendo a diferença percentual entre a quantidade inicialmente adicionada e aquela encontrada nas soluções. Os dados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Eficiência de encapsulação e quantificação de óleo essencial das soluções de nanopartículas.

Amostras	EE (%)	Taxa de Recuperação (%)
$\text{PEO}_{5\text{kDa}}\text{-}b\text{-PLA}_{4,5\text{kDa}} + \text{LO}$	73	85
$\text{PEO}_{5\text{kDa}}\text{-}b\text{-PLA}_{10\text{kDa}} + \text{LO}$	75	93
$\text{PEO}_{5\text{kDa}}\text{-}b\text{-PLA}_{4,5\text{kDa}} + \text{EO}$	44	17
$\text{PEO}_{5\text{kDa}}\text{-}b\text{-PLA}_{10\text{kDa}} + \text{EO}$	79	22
$\text{PEO}_{5\text{kDa}}\text{-}b\text{-PLA}_{4,5\text{kDa}} + \text{BD}$	70	77
$\text{PEO}_{5\text{kDa}}\text{-}b\text{-PLA}_{10\text{kDa}} + \text{BD}$	74	94

Como mostrado na Tabela 9, para os dois sistemas a eficiência de encapsulação do óleo essencial de lavanda, foi de 73 e 75%. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Silva de Melo [140], que relatou um valor de EE de 73% para o encapsulamento de benzocafina em nanopartículas de PLA. Assim como Neckel e Senna (2005) que obtiveram valores de EE de 76 a 97% para encapsulação de camptotecina em PLA e copolímeros de PLA-PEG [10].

Xiao e colaboradores encapsularam óleo de lavanda em goma arábica com uma eficiência de encapsulação de 66%, com a formação de esferas de superfície lisa, sem agregação [17].

Os sistemas com a blend de óleos essenciais apresentaram resultados satisfatórios, com valores próximos a 70% de EE. Já o sistema  $PEO_{5kDa}-b-PLA_{4,5kDa}$  com o óleo essencial de eucalipto apresentou apenas 44% de EE, indicando que pouca quantidade do óleo foi encapsulado, condição esta confirmada pelo baixo valor de recuperação (17%), sugerindo que ocorreu uma saturação do sistema, ou seja, houve um excesso de óleo na formulação, resultando na diminuição da EE.

É importante salientar que esta concentração corresponde à concentração inicial de óleo na mistura copolímero/óleo. Após o processo de formação das nanopartículas que ocorre pela adição de água ao sistema seguido da evaporação do solvente orgânico, esta concentração sofre alterações.

A recuperação foi determinada como a diferença percentual da concentração experimental média e a concentração teórica de  $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  e os resultados evidenciam uma recuperação adequada para os sistemas com LO e BD.

Observamos na Tabela 8 que para o óleo de lavanda em uma concentração de  $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  as porcentagens de recuperação foram de 85 e 93% para as nanopartículas obtidas a partir do  $PEO_{5kDa}-b-PLA_{4,5kDa}$  e sistemas  $PEO_{5kDa}-b-PLA_{10kDa}$ , respectivamente. Este resultado sugere que uma quantidade muito baixa de óleo de lavanda foi localizada sobre a superfície ou parte mais externa das nanopartículas e que a maior parte do óleo foi aprisionado no núcleo das nanopartículas.

O fato das nanopartículas do sistema  $PEO_{5kDa}-b-PLA_{10kDa}$  possuírem uma camada hidrofóbica consideravelmente mais espessa do que o sistema  $PEO_{5kDa}-b-PLA_{4,5kDa}$ , pode justificar a maior taxa de recuperação para este sistema.

Um menor percentual de recuperação foi encontrado para as nanopartículas com o óleo de eucalipto (17 e 22%) o que sugere uma saturação do sistema, ou seja, muito óleo adicionado. Neste caso, a eliminação do óleo em excesso ocorreu durante a filtração das soluções, após o limite máximo de encapsulação ter sido alcançado, por isso não se observou agregações ou corpos estranhos nos resultados de microscopia e espalhamento de luz.

Valores muito baixos de taxa de recuperação são considerados indesejáveis devido à grande perda de agente ativo durante a preparação das nanopartículas, justificando assim a necessidade deste estudo de encapsulação [10].

As diferenças observadas entre o LO e BD com o EO nas nanopartículas preparadas com os dois diferentes sistemas de copolímeros pode estar relacionada à afinidade dos mesmos com o copolímero, uma vez que não é descartada a possibilidade de associação por um mecanismo de adsorção na superfície da partícula.

### 4.7.1 Construção da Curva de Calibração

A curva de calibração dos óleos foi construída segundo metodologia descrita no item 3.4.5.2, ocorrendo linearidade na faixa de concentração de 0,2 a 0,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o óleo de lavanda com coeficiente de correlação (R) de 0,9695. A equação da reta média de três curvas de calibração, determinada através da regressão linear, é  $y = 0,7994x - 0,087$ . Para a blenda o coeficiente de correlação (R) foi de 0,9836 e a equação da reta foi  $y = 0,7138x - 0,0043$ . Para o óleo de eucalipto o coeficiente de correlação (R) foi de 0,9581 e a equação da reta foi  $y = 0,5138x + 0,108$ .

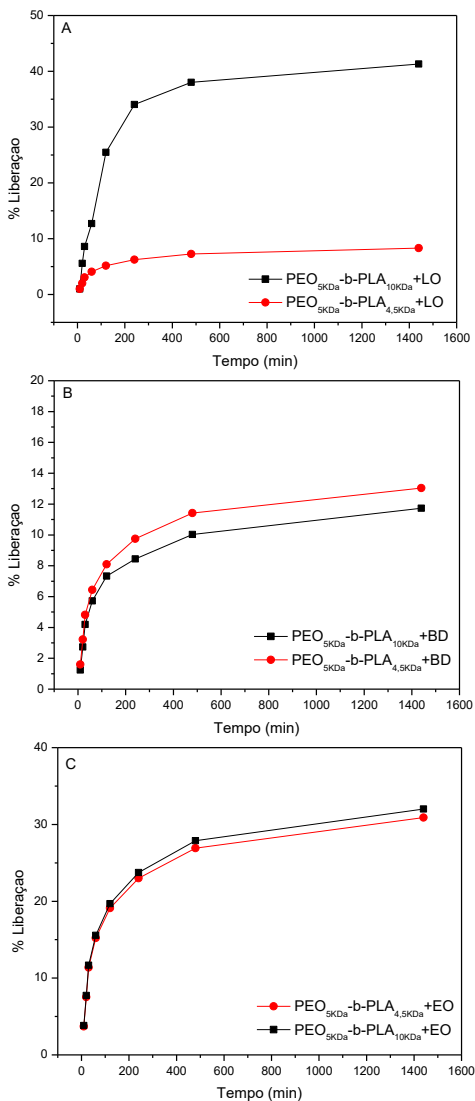
## 4.8 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A análise do perfil de liberação do agente ativo associado às nanopartículas foi realizada através de diálise. Alíquotas de 1 mL foram retiradas do compartimento acceptor em intervalos de 2 a 1440 min (24h), e quantificados por Espectroscopia de UV-Vis.

Os dados obtidos por análise de espectroscopia de UV-Vis foram representados como as porcentagens relativas de óleo liberadas com

base na quantidade de carga em função do tempo, e são mostrados na Figura 28.

Figura 28: Porcentagem de liberação do agente ativo das nanopartículas: (●) PEO<sub>5kDa</sub>-b-PLA<sub>4,5kDa</sub>; (■) PEO<sub>5kDa</sub>-b-PLA<sub>10kDa</sub>; (A) Óleo de lavanda; (B) Blenda de óleos; (C) Óleo de eucalipto.



Os resultados mostraram que a liberação do óleo essencial de lavanda proveniente de nanopartículas PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> (Figura 28A), foi de apenas 5% e esta percentagem permaneceu constante para um período de 24h de liberação. No entanto, um comportamento diferente foi observada para as nanopartículas com LO do copolímero PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>, em que a quantidade liberada obtida foi de cerca de 40%.

As amostras com a blenda de óleos essenciais (Figura 28B), para os dois sistemas estudados mantiveram-se com cerca de 10% de liberação durante o tempo avaliado.

Para os dois sistemas com óleo de eucalipto, observa-se cerca de 30% de liberação no tempo estudado. Analisando esse resultado em comparação aos resultados de EE e taxa de recuperação, onde a mesma apresentou baixa EE e baixa recuperação, sugerindo uma saturação para o sistema PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub>, o óleo eficientemente encapsulado teve boa liberação, cerca de 30% em 24h, mas em comparação ao teor de óleo inicial adicionado ao sistema, ocorreu perda de material devido ao baixo valor de recuperação.

No entanto, para o sistema PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> o EO apresentou quantidade satisfatória de EE e baixa recuperação. Com esses resultados, podemos considerar que foi eficaz a encapsulação do óleo de eucalipto em nanopartículas de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> mesmo ocorrendo perda de material, sugerindo que boa parte do óleo adicionado ao sistema foi encapsulado. A leve diminuição de tamanho observada por DLS deve-se a contribuição de uma maior quantidade de micelas pequenas, pois para a amostra, observou-se uma distribuição monomodal de tamanho, mas com altos valores de IP, chegando até 0,6 em 35 dias.

Como pode ser observado, a porcentagem liberada para o óleo de lavanda foi dependente da massa molar do PLA, quando aumentou a quantidade de PLA no copolímero de bloco, ocorreu uma maior liberação do óleo. Como discutido anteriormente, o tamanho das nanopartículas obtidas a partir do sistema PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> foram significativamente menores do que os obtidos a partir do copolímero PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub>. Aparentemente, este fato demonstra que as nanopartículas pequenas favoreceram o processo de difusão, aumentando conseqüentemente, a quantidade de óleo de lavanda liberado neste sistema.

Observou-se que o óleo de lavanda foi continuamente liberado, de forma semelhante à liberação de nimodipina encapsulada em nanopartículas de PCL-PLA [123].

## **5. ADSORÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS EM FIBRAS TÊXTEIS**

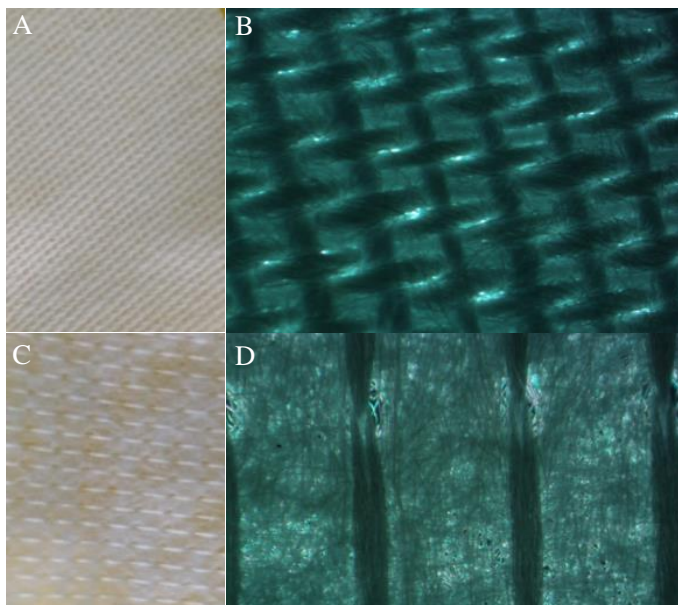
A impregnação das nanopartículas ocorreu por imersão individual de cada amostra em 1 mL de solução, até total absorção do líquido. Esse valor foi ajustado anteriormente para um grau de retenção de líquido, relativamente à massa de tecido seco próximo de 100%. Após a impregnação, as amostras foram secas à temperatura ambiente.

Na Figura 29 são apresentadas as fotografias e imagens de microscópio óptico (MO), dos respectivos tecidos estudados. As imagens 29A e 29C representam fotografias digitais, a imagem 29B mostra a imagem de MO com 0,75 de magnificação em luz polarizada (raios se propagam apenas em um plano) para o tecido A e a imagem 29D mostra a imagem de MO com 0,75 de magnificação em luz não polarizada (luz branca) para o tecido B.

Como visto na Seção 2.6.1.2.2, o tecido A pode ser chamado de tecido plano, produzido em teares, que geralmente consistem de dois conjuntos de fios, os quais são entrelaçados perpendicularmente uns em relação aos outros [69]. Já o tecido B, encaixa-se na definição da NBR 13370. É um não tecido, constituído de uma manta de fibras, dispostos aleatoriamente [72].

O tecido A é uma sarja 100% algodão, e o tecido B é um não tecido 100% poliéster costurado.

Figura 29: a) Fotografia digital do tecido A; b) imagem de MO (0,75 de magnificação) do tecido A; c) e d): Fotografia digital e imagem de MO (0,75 de magnificação) do tecido B.



Como se pôde avaliar, a incorporação de nanopartículas em matrizes poliméricas tem sido objeto de estudo para as mais variadas aplicações. Apesar de se encontrar trabalhos direcionados a matrizes com propriedades antibacterianas, há pouca informação sobre aplicação na indústria calçadista.

O Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos (Polimat) da Universidade Federal de Santa Catarina, juntamente com o Instituto Brasileiro de Tecnologia do Couro, Calçados e Artefatos (IBTeC) de Novo Hamburgo, têm desenvolvido uma colaboração para o desenvolvimento de novas nanotecnologias direcionadas a indústria calçadista.



## 5.1 CARACTERIZAÇÃO

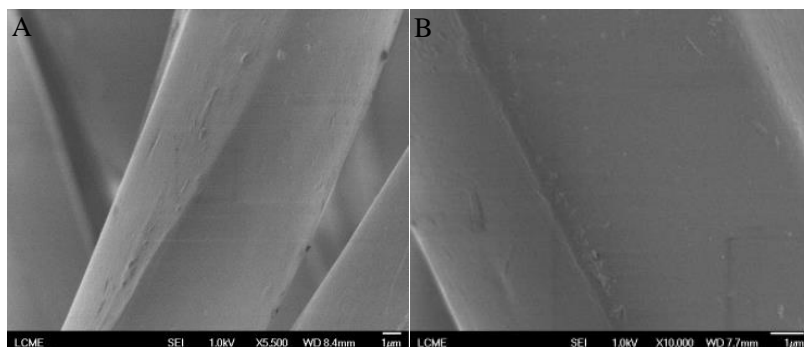
### 5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) foi realizada com o objetivo de confirmar a presença das nanopartículas nos tecidos.

A análise foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, em um microscópio JEOL JSM-6701F, com ultra alto vácuo.

A Figura 30 apresenta as micrografias de MEV-FEG do tecido sem nanopartículas com magnificação de 5.500x à esquerda e com a adsorção das nanopartículas de PEO-*b*-PLA com a blenda de óleos essenciais, com magnificação de 10.000x, à direita.

Figura 30: Imagens de MEV para o tecido “branco” (A); e o tecido contendo as nanopartículas (B).



Podem ser observadas superfícies rugosas com pequenas crostas formadas, na Fig. 30A devido a própria característica das fibras têxteis, podendo apresentar até mesmo sujeira como formas esféricas de pó e muitos agregados microparticulados. Na Fig. 30B após a adsorção de nanopartículas, também observamos crostas, e assim, a técnica tornou-se inconclusiva, pois as nanoestruturas não estão mais evidentes, não distinguimos as nanopartículas de artefatos estranhos.

A análise foi realizada com 1kV de voltagem de aceleração e mesmo assim a amostra “queimava” antes mesmo que se pudesse capturar a imagem.

### 5.1.2 Ensaio de Liberação *in vitro* dos Agentes Ativos das Nanopartículas em Materiais Têxteis

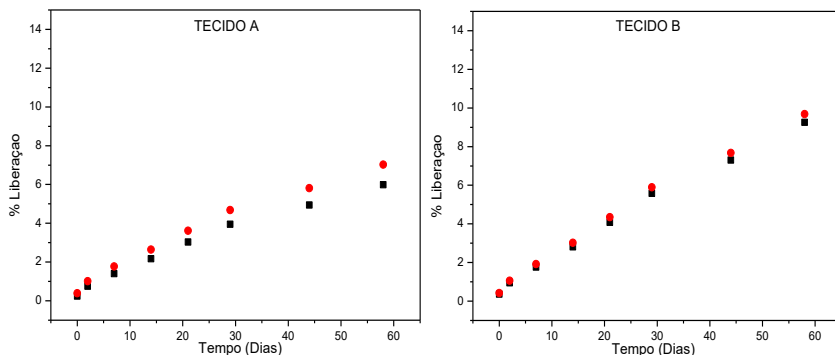
A análise do perfil de liberação do agente ativo associado às nanopartículas incorporadas aos têxteis foi realizada através de suas propriedades ópticas, com o intuito de verificar o perfil de liberação do agente ativo encapsulado, durante a ação da temperatura e do tempo. Para esta análise foi estudado somente a blenda de óleos essenciais fornecida pela empresa NanoVetores de Florianópolis - SC.

A técnica de espectroscopia de UV-Vis é muito utilizada para confirmar a presença de espécies com comprimento de onda definido, ou seja, a partir dos espectros observamos as bandas de absorção características do nosso agente ativo e com isso, é possível calcular a quantidade liberada de acordo com a intensidade de absorção.

A liberação do agente ativo foi avaliada durante 60 dias e durante este tempo, as amostras foram mantidas em uma estufa com a temperatura controlada de 37 °C ( $\pm 2$ ).

Os resultados encontrados confirmam a eficiência de liberação controlada do óleo essencial em estudo. Os resultados são apresentados na Figura 31.

Figura 31: Perfil de liberação do agente ativo das nanopartículas: (●)PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub>; (■)PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>.



Observamos que o comportamento das nanopartículas formadas pelo copolímero de menor massa, o PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> (em vermelho) apresentaram uma liberação levemente maior que em comparação ao copolímero PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> (em preto), cerca de 7 e 10%, respectivamente. Quando comparamos apenas os tecidos, observa-se que o tecido B tem uma maior eficiência de liberação em comparação ao tecido A, de 6 e 7% em 58 dias para 9 e 10%.

Como explicado anteriormente, o tecido A é constituído por fios entrelaçados perpendicularmente uns em relação aos outros, já o tecido B é constituído de uma manta de fibras, dispostos aleatoriamente; essa diferença entre os tecidos é claramente observada pelo comportamento da liberação do agente ativo apresentada na Figura 31. Por ser entrelaçado, o tecido A aprisionou mais as nanopartículas, liberando cerca de 50% menos que o tecido B nas mesmas condições experimentais.

Conforme observamos pelo gráfico a liberação do agente ativo o copolímero teve pouca influência na liberação do agente ativo quando incorporado e seco em um matriz.

Pelas análises do perfil de liberação *in vitro* realizadas em solução das mesmas nanopartículas adsorvidas nas fibras têxteis, os resultados mostraram que a liberação para as nanopartículas contendo a blenda de óleos foi de aproximadamente 10% e esta porcentagem permaneceu a mesma no período de 24h liberação, sendo assim, podemos afirmar que a adsorção das nanopartículas nos tecidos retardou a liberação do agente ativo.

### 5.1.3 Atividade Antibacteriana

Os resultados da atividade antibacteriana foram baseados no procedimento da norma técnica *AATCC Test Method 100-2004*.

As amostras foram inoculadas com as bactérias de *Staphylococcus aureus*. Adicionou-se 1,0 ±0,1 mL de caldo de cultura do organismo de teste de modo que a recuperação a partir de amostras de tecido em tempo de contato "0" mostrou a contagem de 1-2x10<sup>5</sup> organismos. Após adicionado o inóculo, adicionou-se 100 ±1 mL de solução neutralizante para cada amostra. Foi utilizado caldo ágar como neutralizante do crescimento das bactérias. Foram feitas diluições 10<sup>0</sup>, 10<sup>1</sup> e 10<sup>2</sup> em série nas placas em nutriente de ágar. Também foram incubados frascos adicionais contendo as amostras a 37 ±2 °C durante

24h. Após a incubação, repetiu-se o processo de adicionar 100 mL de solução neutralizante e posteriores diluições em placas e então incubou-se todas as placas durante 48h a  $37 \pm 2$  °C. O número de bactérias presentes foi determinado e a porcentagem de redução por amostra tratada foi calculada.

Os tecidos impregnados foram mantidos em condições conhecidas e controladas de calor e umidade. O tecido não tratado, chamado “branco” sem as nanopartículas, apresentou crescimento de bactérias em horas.

São apresentadas, na Tabela 10, as porcentagens de redução para os testes de atividade antibacteriana das amostras de PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> e PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub> contendo a blenda de óleos essenciais, após as contagens bacterianas no tempo 0h e nas placas de 24h.

Tabela 10: Porcentagens de redução para os testes de atividade antibacteriana.

Amostras	% Redução
Tecido A “branco”	-389
TA PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	0
TA PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	-7
Tecido B “branco”	-62
TB PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>4,5kDa</sub>	58
TB PEO <sub>5kDa</sub> - <i>b</i> -PLA <sub>10kDa</sub>	14

TA: tecido A

TB: tecido B

As amostras controle têm como objetivo a avaliação da atividade antibacteriana numa amostra sem agente ativo, para poder fazer uma avaliação da atividade do agente antibacteriano.

As amostras não tratadas apresentaram crescimento imediato das bactérias, são representadas pelos valores -389 e -62%, que significa que houve elevada atividade bacteriana nessas amostras.

As amostras com o tecido B (não-tecido) mostraram uma razoável performance, atingindo um valor de redução bacteriana de 58 e 14% após 24h. Já as amostras com o tecido A apresentaram baixos valores de redução bacteriana, próximos de 0%, mas os valores ficaram

acima do valor obtido pela amostra controle (não-tratada), -389%, confirmando que houve redução.

Foi observado um aumento na população bacteriana no caso das amostras não tratadas. Este é um requisito para a validação do teste segundo a norma *AATCC100*.

Este teste comprova o efeito bacteriostático esperado. O resultado pode ser relacionado com o teste de branco para ter-se uma relação de eficiência antibacteriana. A atividade bactericida dos tecidos foi avaliada pela capacidade de uma superfície antibacteriana inibir ou até mesmo eliminar o crescimento de microrganismos.

Observa-se a eficácia dos tecidos tratados com o antibacteriano a base de nanopartículas de óleos essenciais pela redução da bactéria Gram positiva, *Staphylococcus aureus*. Esses resultados podem ser comparados com o trabalho de Durán e colaboradores (2007) que obtiveram excelentes resultados na atividade bacteriostática de tecidos com impregnação de nanopartículas de prata, contra *S. aureus*, onde foi indicado 99,9% de redução da contagem de bactérias [142]. Os resultados obtidos pela empresa TNS também apresentaram eficiência de 99% para as concentrações de nanopartículas de prata incorporadas em tecidos e comparados a uma amostra branca [143].

Nossos resultados podem ser comparados aos obtidos por Zhang e colaboradores (2016) que avaliaram a atividade antibacteriana de diferentes óleos, e particularmente o óleo essencial de canela mostrou uma inibição de 79% para a bactéria Gram positiva, *Staphylococcus aureus* [144].

Pode-se observar uma maior eficiência com o tecido B, o denominado não tecido. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato do tecido A ser formado por um entrelaçamento, aprisionando com maior eficácia e talvez por mais tempo as nanopartículas contendo óleo essencial, dificultando assim a liberação e atividade do óleo essencial.

A composição de nosso óleo essencial é baseada em uma mistura de óleos de lavanda, melaleuca, tomilho, cravo, cedro e capim limão, e com base em trabalhos encontrados na literatura podemos afirmar que os óleos essenciais são efetivos no combate as bactérias. Navarro e colaboradores (2011) avaliaram o óleo essencial natural de melaleuca, que apresentou atividade antibacteriana adequada contra diferentes bactérias encontradas na pele do pé e sapatos desgastados, para ser usado como biocida natural para aplicações em calçados [145].

São encontrados poucos trabalhos relacionados com aplicações em indústrias calçadistas, mas por outro lado, há muitos estudos com óleos essenciais, direcionados para as indústrias alimentícias. Podemos citar o trabalho de Pesavento e colaboradores (2015) que avaliou a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de orégano, rosmarinus e timo contra *Staphylococcus aureus* e *Listeria* em almôndegas de carne bovina [62].

Esses resultados corroboram com a análise feita por espectroscopia de UV-Vis, pois o tecido B apresentou uma redução da atividade bacteriana e também demonstrou um melhor perfil de liberação do agente ativo, mostrando ser o sistema mais eficiente entre os estudados.

Considerando as baixas quantidades de aditivo antibacteriano utilizadas para os sistemas estudados, com a obtenção de resultados satisfatórios, pode-se afirmar que essas quantidades não afetam as características físicas de cor e textura do produto final.

**CONCLUSÕES**  
**E**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**





### Conclusões

As estratégias utilizadas e desenvolvidas foram viáveis para obtenção de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação dos copolímeros PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>4,5kDa</sub> e PEO<sub>5kDa</sub>-*b*-PLA<sub>10kDa</sub>.

Os resultados adquiridos pelas várias técnicas de análise citadas permitiram obter informação sobre as características físico-químicas e morfológicas do material nanoestruturado.

A técnica de preparação utilizada, levou à formação de nanopartículas esféricas de PEO-*b*-PLA com relativo baixo índice de polidispersividade.

O raio hidrodinâmico das nanopartículas manteve-se de 10 a 75 nm, e foi observada uma dependência do tamanho do bloco de PLA.

A eficiência de encapsulação foi determinada por espectroscopia de UV-VIS, na gama de 70-75%, para o óleo essencial de lavanda e para a blenda de óleos essenciais; a liberação *in vitro* sugeriu que o sistema polimérico utilizado neste estudo é capaz de controlar e retardar a liberação de óleo.

Considerando-se que os sistemas nanoestruturados podem encapsular agentes ativos fracamente solúveis em água, tais como óleos essenciais, pode-se concluir que as nanopartículas obtidas a partir de copolímeros de PEO-*b*-PLA foram eficazes em incorporar óleos essenciais de lavanda e bem como, a blenda utilizada fornecida pela empresa NanoVetores de SC.

Os estudos associados ao efeito antibacteriano da blenda de óleos essenciais utilizada em nanopartículas PEO-*b*-PLA demonstraram atividade antibacteriana contra as bactérias *Staphylococcus Aureus*, indicando seu potencial como agente antibacteriano.

A eficiência antimicrobiana foi confirmada pelas análises microbiológicas por metodologias internacionais (*AATCC Test Method 100-2004*) corroborando com as informações da literatura.

O beneficiamento têxtil mostrou boa estabilidade nos tecidos, visto que a impregnação mostrou-se eficiente mesmo após cerca de 60 dias, mantendo as nanopartículas incorporadas nos têxteis, mesmo com a ação da umidade e temperatura.

Pode-se concluir que o material nanoestruturado desenvolvido ficou dentro das especificações para a seleção de um produto antibacteriano, levando em consideração os seguintes fatores: controle

## Conclusões

---

efetivo do crescimento de bactérias; atividade seletiva direcionada a microrganismos indesejáveis; ausência de efeitos tóxicos, tanto para o fabricante como para o consumidor; compatibilidade com outros acabamentos têxteis; de fácil aplicação e compatibilidade com os processos têxteis mais comuns; não evaporar ao secar e suportar tratamento térmico e ter longa duração.

## Referências

---

- 1 GIACOMELLI, C.; SCHMIDT, V.; AISSOU, K.; BORSALI, R. Block copolymer systems: From single chain to self-assembled nanostructures. *Langmuir*, 26, 20, 15734-15744, 2010.
- 2 VRIGNAUD, S.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles; *Biomaterials*, 32, 8593 -8604, 2011.
- 3 ZHANG, L.; CHAN, J. M.; GU, F. X.; RHEE, J. W.; WANG, A. Z.; RADOVIC-MORENO, A. F.; ALEXIS, F.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C.; Self-assembled lipid polymer hybrid nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform; *ACS Nano*, 2, 8, 2008.
- 4 DONSI, F.; SESSA, M.; FERRARI, G.; Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods; Special Abstracts / *Journal of Biotechnology*, 150, 1, 2010.
- 5 DE AZEVEDO M. M. M.; Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos; Instituto de Química – UNICAMP, 2002.
- 6 OTSUKA, I.; FUCHISE, K.; HALILA, S.; FORT, S.; AISSOU, K.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; CHEN, Y.; NARUMI, A.; KAKUCHI, T.; BORSALI, R.; Thermoresponsive vesicular morphologies obtained by self-assemblies of hybrid oligosaccharide- block -poly (n - isopropylacrylamide) copolymer systems; *Langmuir*, 26, 4, 2325–2332, 2010.
- 7 DAL-BÓ, A. G.; LAUS, R.; MINATTI, E.; Autoassociação de misturas dos surfactantes dodecanoato de sódio (SDoD) e decanoato de sódio (SDeC) com o polímero hidrofobicamente modificado etil(hidroxi)etil celulose (EHEC); *Quim. Nova*, 34, 6, 1001-1006, 2011.
- 8 DAL-BÓ, A. G.; SOLDI, V.; GIACOMELLI, F. C.; TRAVELET, C.; JEAN, B.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; BORSALI, R.; FORT, S.; Self-assembly of amphiphilic glycoconjugates into lectin-adhesive nanoparticles; *Langmuir*, 28, 1418-1426, 2012.

- 9 DRUMOND, W.S.; WANG, S.H.; MOTHÉ, C.G.; Síntese e caracterização do copolímero poli(ácido láctico-*b*-glicol etilênico); *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 14, 2, 74-79, 2004.
- 10 NECKEL, G. L.; SENNA, E. L.; Preparação e caracterização de nanopartículas contendo camptotecina a partir do ácido poli(D,L-lático) e de copolímeros diblocos do ácido poli(D,L-lático) e polietilenoglicol; *Acta Farm. Bonaerense*, 24, 4, 504-11 2005.
- 11 LASPRILLA, A. J. R.; MARTINEZ, G. A. R.; LUNELLI, B. H.; JARDINI, A. L.; MACIEL FILHO, R. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices-A review; *Biotechnol. Adv.*, 30, 1, 321-328, 2012.
- 12 HEALD, C. R.; STOLNIK, S.; DE MATTEIS, C.; LEERMAKERS F. A. M.; Self-consistent field modelling of poly(lactic acid)–poly(ethylene glycol) particles; *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 179, 79–91, 2001.
- 13 CHORNY, M.; FISHBEIN, I.; DANENBERG, H. D.; GOLOMB, G.; Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics; *Journal of Controlled Release*, 83, 389, 2002.
- 14 DAI, R.; LIM, L.; Release of allyl isothiocyanate from mustard seed meal powder entrapped in electrospun PLA–PEO nonwovens; *Food Res. Int.* 77, 3, 467-475, 2015.
- 15 RAMOT, Y.; ZADA, M.H.; DOMB, A.J.; NYSKA, A.; Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Adv. Drug Delivery Rev.* 4, 2016.
- 16 RODRIGUEZ, J.; MARTIN, M.J.; RUIZ, M.A.; CLARES, B.; Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives; *Food Res. Int.* 14, 83, 41-59, 2016.

17 XIAO, Z.; LIU, W.; ZHU, G.; ZHOU, R.; NIU, Y.; Production and characterization of multinuclear microcapsules encapsulating lavender oil by complex coacervation; *Flavour Fragr. J.* 29, 166, 2014.

18 DONSI, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G.; Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods; *Food Sci Technol.* 44, 1908-1914, 2011.

19 GAYSINSKY, S.; DAVIDSON, P.M.; BRUCE, B.D.; WEISS, J.; Growth inhibition of escherichia coli o157: H7 and listeria monocytogenes by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles; *J. Food Prot.* 68, 12, 2559-2566, 2005.

20 DA SILVA JR, E. F.; Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Disponível em:  
<<http://www.comciencia.br/reportagens/nanotecnologia/nano13.htm>>, Acesso em: 25 jul. 2012.

21 SOHN, B. H.; COHEN, R. E.; PAPAETHYMIU, G. C. J.; Magnetic properties of iron oxide nanoclusters within microdomains of block copolymers; *Journal Magn. Magn. Mater.* 182, 216-224, 1998.

22 DURAN, N.; DE MORAIS, P. C.; MATTOSO, L. H. C.; **Nanotecnologia**: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação, São Paulo; Artliber, 208p, 2006.

23 ORIAKHI, C. O.; Polymer nanocomposition approach to advanced materials; *Journal of Chemical Education*, 77, 1138-1146, 2000.

24 KALPAKJIAN, S.; SCHIMID, S.; **Manufacturing engineering and technology**, 7ª Ed., Prentice Hall International Editions Series. Prentice Hall, 2001.

25 CALLISTER, W. D.; **Ciência e Engenharia dos Materiais**, 8ª Ed, LTC, 2015.

26 CHAN, S. C.; KUO, S. W.; LEE, H. F.; CHANG, F. C.; Synthesis and characterizations of the multiple morphologies formed by the self-assemble of the semicrystalline P4VP-*b*-PCL diblock copolymers; *Polymer*, 48, 5059-5068, 2007.

27 RIJCKEN, C. J. F.; SOGA, O.; HENNINK, W. E.; VAN NOSTRUM, C. F.; Triggered destabilisation of polymeric micelles and vesicles by changing polymers polarity: An attractive tool for drug delivery; *Journal of Controlled Release*, 120, 131-148, 2007.

28 GREF, R.; DOMBB, A.; QUELLED, P.; BLUNK, T.; MIILLERD, R. H.; VERBAVATZ, J. M.; LANGERF, R.; The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres; *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, 215-233, 1995.

29 SONG, K. C.; LEE, S. M.; PARK, T. S.; LEE, B. S.; Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method; *Korean J. Chem. Eng.* 26, 1, 153-155, 2009.

30 LETCHFORD, K.; BURT, H.; A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, 259–269, 2007.

31 SCHMIDT, V.; BORSALI, R.; GIACOMELLI, C.; Aggregation of a versatile triblock copolymer into ph-responsive cross-linkable nanostructures in both organic and aqueous media; *Langmuir*, 25, 23, 13361-13367, 2009.

32 CRISTIANO, C. M. Z.; SOLDI, V.; LI, C.; ARMES, S. P.; ROCHAS, C.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; BORSALI, R.; Thermo-responsive copolymers based on poly(*n*-isopropylacrylamide) and poly[2-(methacryloyloxy) ethyl phosphorylcholine]: Light scattering and microscopy experiments; *Macromolecular Chemistry and Physics*, 210, 1726-1733, 2009.

33 ZHANG, L.; CHAN, J. M.; GU, F. X.; RHEE, J.-W.; WANG, A. Z.; RADOVIC-MORENO, A. F.; ALEXIS, F.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C.; Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform; *ACS Nano*, 2, 8, 1696–1702, 2008.

34 FORSTER, S.; PLANTENBERG, T.; From self-organizing polymers to nanohybrid and Biomaterials; *Angewandte Chemie*, 41, 689-714, 2002.

35 GIACOMELLI, C.; LE MEN, L.; BORSALI, R.; LAI-KEE-HIM, J.; BRISSON, A.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L.; Phosphorylcholine-based ph-responsive diblock copolymer micelles as drug delivery vehicles: Light scattering, electron microscopy and fluorescence experiments; *Biomacromolecules*, 7, 3, 817-828, 2006.

36 HOUGA, C.; GIERMANSKA, J.; LECOMMANDOUX, S.; BORSALI, R.; TATON, D.; GNANOU, Y.; LE MEINS, J.F.; Micelles and polymersomes obtained by self-assembly of dextran and polystyrene based block copolymers; *Biomacromolecules*, 10, 32–40, 2009.

37 DRUMOND, W. S.; WANG, S. H.; MOTHÉ, C. G.; Síntese e caracterização do copolímero poli(ácido láctico-*b*-glicol etilênico); *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 14, 2, 74-79, 2004.

38 KIM, S. Y.; SHIN, I. G.; LEE, Y. M.; Preparation and characterization of biodegradable nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and DL-lactide block copolymer as novel drug carriers; *Journal of Controlled Release*, 56, 197, 1998.

39 TORCHILIN, V. P.; Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems; *Journal of Controlled Release*, 73, 137, 2001.

40 MATSUMOTO, J.; NAKADA, Y.; SAKURAI K.; NAKAMURA T.; TAKAHASHI, Y.; Preparation of nanoparticles consisted of poly(L-

lactide)–poly(ethylene glycol)–poly(L-lactide) and their evaluation in vitro; *International Journal of Pharmaceutics*, 185, 93, 1999.

41 Ficha técnica: Poly(ethylene oxide -b- lactide) (DL form) Sample#: P5361-EOLA (DL form). Disponível em: <<http://www.polymersource.com/>>

42 JIE, P.; VENKATRAMAN, S. S.; MIN, F.; YIN, B.; FREDDY, C.; HUAT, G. L. Micelle-like nanoparticles of star-branched PEO–PLA copolymers as chemotherapeutic carrier; *J. Controlled Release*, 110, 1, 20-33, 2005.

43 AHMED, F.; DISCHER, D. E.; Self-porating polymersomes of PEG – PLA and PEG – PCL: hydrolysis- triggered controlled release vesicles; *Journal of Controlled Release*, 96, 37 –53, 2004.

44 XIAO, R. Z.; ZENG, Z. W.; ZHOU, G. L.; WANG, J. J.; LI, F. Z.; WANG, A. M.; Recent advances in PEG-PLA block copolymer nanoparticles; *International Journal of Nanomedicine*, 26, 5, 1057–1065, 2010.

45 RILEY, T.; STOLNIK, S.; HEALD, C. R.; XIONG, C. D.; GARNETT, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S.; Physicochemical evaluation of nanoparticles assembled from poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) block copolymers as drug delivery vehicles; *Langmuir*, 17, 3168-3174, 2001.

46 OUCHI, T.; NISHIZAWA, H.; OHYA, Y.; Aggregation phenomenon of PEG-grafted chitosan in aqueous solution; *Polymer*, 39, 21, 5171-5175, 1998.

47 de AZEREDO H. M. C.; Encapsulação: Aplicação à tecnologia de alimentos; *Alim. Nutr.*, Araraquara, 16, 1, 89-97, 2005.

48 GREEN, B. K.; SCHEICHER, L.; Pressure sensitive record materials; US Patent nº 2, 217, 507, 1955.



49 HEINZEN C.; Microencapsulation solve time dependent problems for foodmakers; *European Food and Drink Review*, 3, 27–30, 2002.

50 MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S.; Flavour encapsulation and controlled release – a review; *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1–21, 2006.

51 Microencapsulation and nanomaterials; Department Chemistry and Chemical Engineering; Division Southwest Research Institute; San Antonio, Texas.

52 LU, Y.; FAN, H.; STUMP, A.; WARD, T. L.; RIEKER, T.; BRINKER, C. J.; Aerosol-assisted self-assembly of mesostructured spherical nanoparticles; *Nature*, 398, 1999.

53 TORCHILIN, V. P.; Micelar nanocarriers: pharmaceutical perspectives; *Pharmaceutical Research*, 24, 1-16, 2007.

54 KWON, G. S.; Block copolymer micelles as drug delivery systems; *Adv. Drug Delivery Rev.* 54, 2, 167-172, 2002.

55 LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P.; Polysaccharide-decorated nanoparticles; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 327–341, 2004.

56 GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S.; Defining the drug incorporation properties of PLA – PEG nanoparticles; *International Journal of Pharmaceutics*, 199, 95 – 110, 2000.

57 RODRÍGUEZ, J.; MARTÍN, M. J.; RUIZ, M. A.; CLARES, B.; Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives; *Food Res. Int.* 83, 41, 2016.

58 SOLIMAN, E. A.; EL-MOGHAZY, A. Y.; EL-DIN, M. S. M.; MASSOUD, M. A.; Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity; *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 3, 48-55, 2013.

59 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Aromatic natural raw materials – Vocabulary: ISO 9235. Genebra, 8p, 1997.

60 CINIGLIO, G.; In: Eucaliptus para a produção de óleos essenciais, Departamento de Ciências Florestais, ESALQ-USP, Piracicaba, 1993.

61 Disponível em:

<[http://www.oleosessenciais.org/category/conceitos\\_gerais/conceito\\_oleos\\_essenciais](http://www.oleosessenciais.org/category/conceitos_gerais/conceito_oleos_essenciais)> Acesso em: 13 mai. 2015.

62 PESAVENTO, G.; CALONICO, C.; BILIA, A. R.; BARNABEI, M.; CALESINI, F.; ADDONA, R.; MENCARELLI, L.; CARMAGNINI, L.; DI MARTINO, M.C.; LO NOSTRO A.; Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs; *Food Control*, 54, 188-199, 2015.

63 KIM, H. M.; CHO, S. H.; Lavender oil inhibits immediate-type allergic reaction in mice and rats; *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 221, 1999.

64 MARTÍN, Á.; VARONA, S.; NAVARRETE, A.; COCERO, M. J.; Encapsulation and co-precipitation process with supercritical fluids: Application with essential oils; *The Open Chem. Eng. J.* 4, 31, 2010.

65 VICENTE, M.; Óleo essencial de lavanda: 10 usos fantásticos para a saúde e o bem-estar; <<https://www.greenme.com.br/viver/saude-e-bem-estar/>>, 2014.

66 LYNAM, K.; SMITH, D.; Lavender Oil characterization using Agilent J&W DB-1ms ultra inert capillary GC columns; Agilent Technologies, Inc. Wilmington, EUA, 2009.

67 SALARI, M. H.; AMINE, G.; SHIRAZI, M. H.; HAFEZI, R.; MOHAMMADYPOUR, M.; Antibacterial effects of Eucalyptus globulus leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of

patients with respiratory tract disorders; *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 2, 194–196, 2006.

68 GÖBEL, H; SCHMIDT, G; SOYKA, D.; Effect of peppermint and eucalyptus oil preparations on neurophysiological and experimental algometric headache parameters. Cephalalgia; *International Journal of Headache*, 14, 3, 228–234, 1994.

69 ARAÚJO, M.; CASTRO, E. M. M., **Manual de engenharia têxtil**. Portugal, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 694, 1984.

70 Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT- CB017, Têxteis e do Vestuário.

71 FEITOR, M. C.; Efeito antibacteriano de tecidos têxteis revestidos por prata através da técnica de deposição por plasma; Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010.

72 ABNT NBR 13370: 2002, Não tecido – Terminologia.

73 WONG, Y. W. H.; YUEN, C. W. M.; LEUNG, M. Y. S.; KU, S. K. A.; LAM, H. L. I.; Selected applications of nanotechnology in textiles; *AUTEX Research Journal*, 6, 1, 1-8, 2006.

74 Ativos têxteis. Disponível em:

<<http://www.nanovetores.com.br/ativos-segmento-textil/>> Acesso em: 01 abr. 2015.

75 Mercado em alta: a revolução dos antimicrobianos. Disponível em: <<http://tnsolution.com.br/category/aplicacoes/page/3/>> Acesso em: 19 fev. 2016.

76 GULRAJANI, M. L.; GUPTA, D.; Emerging techniques for functional finishing of textiles, *Indian Journal of Fibre & Textile Research*. 36, 388-397, 2011.

77 Know Your Tech: Reebok PlayDry. Disponível em: <<http://www.complex.com/sneakers/2013/10/know-your-tech-reebok-playdry>>; Acesso em: 25 nov. 2016.

78 Sapato Social Masculino Ferracini. Disponível em: <<http://www.mundodastribos.com/sapato-social-masculino-ferracini.html>>; Acesso em: 25 nov. 2016.

79 BALASUBRAMANIAN, K.; KODAM, K. M.; Encapsulation of therapeutic lavender oil in an electrolyte assisted polyacrylonitrile nanofibres for antibacterial applications; *RSC Adv.* 4, 54892-54901, 2014.

80 Student designer and fiber scientists create a dress that prevents colds and a jacket that destroys noxious gases. Disponível em: <<http://www.news.cornell.edu/stories/May07/nanofibers.fashion.aj.html>>; Acesso em: 03 jul. 2012.

81 Disponível em: <<http://www.reinste.com/index.html>> Acesso em: 20 ago. 2012.

82 Reinste Signs Agreement with Germany-based Silanotex for Nano Silver Masterbatches. Disponível em: <<http://polymer-additives.specialchem.com/news/industry-news/reinste-signs-agreement-with-germany-based-silanotex-for-nano-silver-masterbatches>> Acesso em: 20 ago. 2012.

83 LEAVERSUCH, R; Nanocomposites broden roles in automotive. Barrier packaging; *Plastics Technology*, 47, 64-69, 2001.

84 CORBIERRE, M. K.; CAMERON, N. S.; SUTTON, M.; MOCHRIE, S. G. J.; LURIO, L. B.; RÜHM, A.; LENNOX BRUCE, R.; Polymer-stabilized gold nanoparticles and their incorporation into polymer matrices; *J. Am. Chem. Soc.* 123, 10411-10412, 2001.

85 CORBIERRE, M. K.; CAMERON, N. S.; SUTTON, M.; LAAZIRI, K.; LENNOX, R. B.; Gold nanoparticle/polymer nanocomposites:

dispersion of nanoparticles as a function of capping agent molecular weight and grafting density; *Langmuir*, 21, 6063– 6072, 2005.

86 BOURGEAT-LAMI, E.; LANG, J.; Encapsulation of Inorganic Particles by Dispersion Polymerization in Polar Media; *J. Colloid Interface Sci.*, 210, 281, 1999.

87 ESTEVES A. C. C.; TIMMONS A. B.; TRINDADE T.; Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos; *Quim. Nova*, 27, 5, 798-806, 2004.

88 SKIRTACH, A. G.; DEJUGNAT, C.; BRAUN, D.; SUSHA, A. S.; ROGACH, A. L.; PARAK, W. J.; MOIHWALD, H.; SUKHORUKOV, G. B. The role of metal nanoparticles in remote release of encapsulated materials; *Nano Letters*, 5, 7, 1371-1377, 2005.

89 BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I.; Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles; *International Journal of Pharmaceutics*, 346, 151–159, 2008.

90 PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G.; Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados; *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43, 4, 2007.

91 Têxteis com proteção microbiana, *Citeve*, 2008.

92 MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A.; **Microbiologia de Brock** - 14ª Edição; ArtMed, 2016.

93 Antimicrobianos: quais as diferenças. Disponível em: <<http://tnsolution.com.br/2015/08/12/antimicrobianos-quais-as-diferencas/>> Acesso em: 28 nov. 2016.

94 BALAKUMARAN, M. D.; RAMACHANDRAN, R.; JAGADEESWARI, S.; KALAICHELVAN, P. T.; In vitro biological

properties and characterization of nanosilver coated cotton fabrics e An application for antimicrobial textile finishing; *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, 48-55, 2016.

95 AMORIM D. M. R.; PERSON O. C.; do AMARAL P. J.; TANAKA I. I.; Resistência induzível à clindamicina entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*; *O Mundo da Saúde*, São Paulo:33(4):401-405, 2009.

96 O que são microrganismos patogênicos? Disponível em: <<http://tnsolution.com.br/category/historia/>> Acesso em: 20 fev. 2016.

97 Empresa de laminados reduz custos de insumos em 53% com a nanotecnologia TNS. Disponível em: <<http://tnsolution.com.br/category/curiosidades/page/5/>> Acesso em: 20 fev. 2016.

98 NOGUEIRA, P. F. M.; PAINO, I. M. M.; ZUCOLOTTO V.; Nanosilver: Propriedades, aplicações e impactos na saúde pública e meio ambiente; *Vigilância Sanitária em Debate*, 1, 4, 59-71, 2013.

99 MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A.; **Microbiologia médica**, 4ed. Guanabara Koogan [S.l.], 776, 2004.

100 MORAES, P. L.; Características da bactéria *Staphylococcus aureus*; Brasil Escola. Disponível em: <<http://brasilecola.uol.com.br/biologia/staphylococcus-aureus.htm>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

101 Resolução da diretoria colegiada (rdc) nº 12: regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos; *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)*, 2 de janeiro de 2001.

102 FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F.; THIES, C.; EP Pat., 0275796 B1, 1987.

103 PORTO, L. C.; Estudo de filmes finos e de nanopartículas obtidos pela auto-associação de copolímeros em bloco e sua interação com um

oligo/polissacarídeo; Tese submetida à Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

104 DHANDAYUTHAPANI, B.; POULOSE, A. C.; NAGAOKA, Y.; HASUMURA, T.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR D. S.; Biomimetic smart nanocomposite: in vitro biological evaluation of zein electrospun fluorescent nanofiber encapsulated CdS quantum dots; *Biofabrication*, 4, 2012.

105 SCHÄRTL, W.; **Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions**; Germany, Springer Laboratory, 2007.

106 PROVENCHER, S.W.; Inverse problems in polymer characterization: Direct analysis of polydispersity with photon correlation spectroscopy; *Makromol. Chem.* 180, 201-209, 1979.

107 PROVENCHER, S.W.; An eigen function expansion method for the analysis of exponential decay curves; *J. Chem. Phys.* 64, 2772, 1976.

108 DAL BÓ, A. G.; SOLDI, V.; GIACOMELLI, F. C.; TRAVELET, C.; JEAN, B.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; BORSALI, R.; FORT, S.; Self-assembly of amphiphilic glycoconjugates into lectin-adhesive nanoparticles; *Langmuir*, 28, 1418–1426, 2012.

109 SIRVAITYTE, J.; SIUGZDAITE, J.; VALEIKA, V.; Application of commercial essential oils of eucalyptus and lavender as natural preservative for leather tanning industry; *Rev. Chim. (Bucharest, Rom.)* 62, 884, 2011.

110 TUREK, C.; STINTZING, F. C.; Application of high-performance liquid chromatography diode array detection and mass spectrometry to the analysis of characteristic compounds in various essential oils; *Anal Bioanal Chem*, 400, 3109–3123, 2011.

111 Guia de usuário; Amicon® Ultra-0.5, Centrifugal Filter Devices.

112 SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; Caracterização e estabilidade físico-química de

sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos; *Quim. Nova*, 26, 726, 2003.

113 GAMISANS, F.; LACOUILONCHE, F.; CHAUVET, A.; ESPINA, M.; GARCIA, M. L.; EGEEA, M. A.; Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods ; *Int. J. Pharm.* 179, 37, 1999.

114 PAAVOLA, A.; YLIRUUSI, J.; KALSO, E.; WAHLSTRÖM, T.; ROSENBERG, P.; Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block; *Pharm. Res.* 12, 1995.

115 SIRVAITYTE, J.; SIUGZDAITE, J.; VALEIKA, V.; Application of commercial essential oils of eucalyptus and lavender as natural preservative for leather tanning industry; *Rev. Chim. (Bucharest, Rom.)* 62, 884, 2011.

116 TUREK, C.; STINTZING, F. C.; Application of high-performance liquid chromatography diode array detection and mass spectrometry to the analysis of characteristic compounds in various essential oils; *Anal Bioanal Chem*, 400, 3109–3123, 2011.

117 AATCC Test Method 100-2004

118 Ficha técnica: Poly(ethylene oxide -b- lactide) (DL form) Sample#: P8885-EOLA (DL form). Disponível em:  
<<http://www.polymersource.com/>>

119 JAHNO, Vanusca Dalosto; Síntese e caracterização do poli (L-ácido láctico) para uso como biomaterial; Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

120 JIE, P.; VENKATRAMAN, S. S.; MIN, F.; FREDDY, B. Y. C.; HUAT, G. L.; Micelle-like nanoparticles of star-branched PEO-PLA copolymers as chemotherapeutic carrier; *Journal of Controlled Release*, 110, 20– 33, 2005.

121 SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE LUCCA



FREITAS, L.; GUTERRES, S. S.; Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanopartículas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco; *Acta Farm. Bonaerense*, 21, 99, 2002.

122 ATKINS, P.; JONES, L.; **Princípios de Química**, 3<sup>a</sup>. Ed., Porto Alegre, Bookman, 2006.

123 HU, Y.; JIANG, X.; DING, Y.; ZHANG, L.; YANG, C.; ZHANG, J.; CHEN, J.; YANG, Y.; Preparation and drug release behaviors of nimodipine-loaded poly(caprolactone)-poly(ethylene oxide)-polylactide amphiphilic copolymer nanoparticles; *Biomaterials*, 24, 2395-2404, 2003.

124 XU, R.; WINNIK, M. A.; Light-scattering study of the association behavior of styrene-ethylene oxide block copolymers in aqueous solution; *Macromolecules*, 24, 87-93, 1991.

125 GIACOMELLI, C.; SCHMIDT, V.; BORSALI, R; Nanocontainers formed by self-assembly of poly(ethylene oxide)-b-poly(glycerol monomethacrylate)-drug conjugates; *Macromolecules*, 40, 2148, 2007.

126 MOUNTRICHAS, G.; MPIRI, M.; PISPAS, S.; Micelles of star block (PSPI)<sub>8</sub> and PSPI diblock copolymers (PS) polystyrene, (PI) polyisoprene: Structure and kinetics of micellization; *Macromolecules*, 38, 940-947, 2005.

127 SOO, P. L.; LOVRIC, J.; DAVIDSON, P.; MAYSINGER, D.; EISENBERG, A.; Polycaprolactone-block-poly(ethylene oxide) micelles: A nanodelivery system for 17 $\beta$ -estradiol; *Mol. Pharm.* 2, 519-527, 2005.

128 REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F.; Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles; *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2, 2, 8-21, 2006.

- 129 GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F.; Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters; *Eur J Pharm Biopharm*, 69, 1, 1-9, 2008.
- 130 MAZZARINO, L.; OTSUKA, I.; HALILA, S.; BUBNIAK, L. dos S.; MAZZUCCO, S.; SANTOS-SILVA, M. C.; LEMOS-SENNA, E.; BORSALI R.; Xyloglucan-*block*-poly( $\epsilon$ -caprolactone) copolymer nanoparticles coated with chitosan as biocompatible mucoadhesive drug delivery system.; *Macromol Biosci.* 14, 5, 709-719, 2014.
- 131 DUMITRIU, S.; **Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility**; Burchard, Cap 7 - Light Scattering from Polysaccharides; 2<sup>a</sup> Ed, Marcel Dekker, Inc., Nova York, 1998.
- 132 LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-Ph.; Polymeric nanocapsules as drug delivery systems- A review. S.T.P.; *Pharma Sci.* 9, 5, 411-418, 1999.
- 133 DETONI, C.B.; DE OLIVEIRA, D.M.; SANTO, I.E.; PEDRO, A.S.; EL-BACHA, R.; DA SILVA V. E.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B., DE MAGALHÃES CABRAL-ALBUQUERQUE, E.C.; Evaluation of thermal-oxidative stability and antiglioma activity of Zanthoxylum tingoassuiba essential oil entrapped into multi- and unilamellar liposomes; *J. Liposome Res.* 22, 1, 1-7, 2012.
- 134 FAYAD, S. J.; Obtenção e caracterização de micro e nanopartículas a base de proteína isolada de soja; Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- 135 GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F.; Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study; *International Journal of Pharmaceutics*, 113, 57-63, 1995.
- 136 Malvern Inst., Reino Unido, 2000.

137 MOSQUEIRA, V. C.; LEGRAND, P.; MORGAT, J. L.; VERT, M.; MYSIKINE, E.; GREF, R.; DEVISSAGUET, J. P.; BARRATT, G. Biodistribution of longcirculating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density; *Pharm Res.* 18, 10, 1411-1419, 2001.

138 SANTANDER-ORTEGA, M. J.; CSABA, N.; ALONSO, M. J.; ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZÁLEZ, D.; Stability and physicochemical characteristics of PLGA, PLGA: Poloxamer and PLGA: Poloxamine blend nanoparticles; *Colloids Surf., A* 296, 132, 2007.

139 MAZZARINO, L.; TRAVELET, C.; MURILLO, S. O.; OTSUKA, I.; PAINTRAND, I. P.; SENNA, E. L.; Borsali, R.; Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications; *J. Colloid Interface Sci.* 370, 58, 2012.

140 SILVA DE MELO, N. F.; GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de poli (l-lactídeo) contendo benzocaína; *Quim. Nova*, 33, 65, 2010.

141 FILIPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W.; Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates; *Pharm. Res.* 27, 796, 2010.

142 DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; DE SOUZA, G. I. H.; ALVES, O. L.; ESPOSITO E.; Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment; *J. Biomed. Nanotechnol.* 3, 2, 2007.

143 Aplicação de antimicrobianos no setor têxtil calçadista; Disponível em: < <http://tnsolution.com.br/2015/10/08/aplicacao-de-antimicrobianos-no-setor-textil-calcadista/>> Acesso em: 20 fev. 2016.

144 ZHANG, Y.; LIU, X.; WANG, Y.; JIANG, P.; YOUNG QUEK S.; Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*; *Food Control.* 59, 282-289, 2016.

145 NAVARRO, M. M. S.; GARROTE, N. C.; AÍS, F. A.; BARCELO, C. O.; Microencapsulation of melaleuca alternifolia (tea tree) oil as biocide for footwear applications; *Journal of Dispersion Science and Technology*, 32, 1722–1727, 2011.

## **ANEXO**



## AATCC Test Method 100-2004

## Antibacterial Finishes on Textile Materials: Assessment of

Developed in 1961 by AATCC Committee RA31; revised 1965, 1981, 1988 (with title change), 1993, 1999; editorially revised 1969, 1971, 1974, 1985, 2009; reaffirmed 1977, 1981, 1989, 1998, 2008; editorially revised and reaffirmed 1986, 2004.

## 1. Purpose and Scope

1.1 This test method provides a quantitative procedure for the evaluation of the degree of antibacterial activity. Assessment of antibacterial finishes on textile materials is determined by the degree of antibacterial activity intended in the use of such materials. If only bacteriostatic activity (inhibition of multiplication) is intended, a qualitative procedure which clearly demonstrates antibacterial activity as contrasted with lack of such activity by an untreated specimen may be acceptable. However, if bactericidal activity is intended or implied, quantitative evaluation is necessary. Quantitative evaluation also provides a clearer picture for possible uses of such treated textile materials.

## 2. Principle

2.1 Swatches of test and control textile materials are tested qualitatively for antibacterial activity by AATCC Method 147, Antibacterial Activity Assessment of Textile Materials: Parallel Streak Method. Those showing activity are evaluated quantitatively. Test and control swatches are inoculated with the test organisms. After incubation, the bacteria are eluted from the swatches by shaking in known amounts of neutralizing solution. The number of bacteria present in this liquid is determined, and the percentage reduction by the treated specimen is calculated.

## 3. Terminology

3.1 *activity, n.—of an antibacterial agent*, a measure of effectiveness of the agent.

3.2 *antibacterial agent, n.—(in textiles)*, any chemical which kills bacteria (bactericide) or interferes with the multiplication, growth or activity of bacteria (bacteriostat).

## 4. Safety Precautions

NOTE: These safety precautions are for information purposes only. The precautions are ancillary to the testing procedure and are not intended to be all inclusive. It is the user's responsibility to use safe and proper techniques in handling

materials in this test method. Manufacturers MUST be consulted for specific details such as material safety data sheets and other manufacturer's recommendations. All OSHA standards and rules must also be consulted and followed.

4.1 Both the qualitative and quantitative tests should be carried out by persons with training and experience in the use of bacteriological techniques. The U.S. Department of Health and Human Services publication, *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, should be consulted (see 13.1).

4.2 CAUTION: Some of the bacteria used in this test are capable of infecting humans and producing disease. Therefore, every necessary and reasonable precaution must be taken to eliminate this risk to the laboratory personnel and to personnel in the associated environment. Wear protective clothing and respiratory protection that prevent penetration by the bacteria.

4.3 Good laboratory practices should be followed. Wear safety glasses in all laboratory areas.

4.4 All chemicals should be handled with care.

4.5 An eyewash/safety shower should be located nearby for emergency use.

4.6 Sterilize all contaminated samples and test materials prior to disposal.

4.7 Exposure to chemicals used in this procedure must be controlled at or below levels set by government authorities (e.g., Occupational Safety and Health Administration's [OSHA] permissible exposure limits [PEL] as found in 29 CFR 1910.1000 of January 1, 1989). In addition, the American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) Threshold Limit Value (TLV) comprised of time weighted averages (TLV-TWA), short term exposure limits (TLV-STEL) and ceiling limits (TLV-C) are recommended as a general guide for air contaminant exposure which should be used (see 13.2).

## 5. Limitations

5.1 For a qualitative, relatively quick and easily executed method to determine residual antibacterial activity of textile materials, refer to AATCC Method 147.

## 6. Test Organisms

6.1 Test bacteria.  
6.1.1 *Staphylococcus aureus*, American Type Culture Collection No. 6538. Gram positive organism (see 13.3).  
6.1.2 *Klebsiella pneumoniae*, Ameri-

can Type Culture Collection No. 4352. Gram negative organism (see 13.3).

6.1.3 Other suitable species can also be used.

## 7. Culture Medium

7.1 Suitable broth/agar media are Nutrient, Trypticase Soy and Brain-Heart Infusion.

## Nutrient Broth:

Peptone (Bacto-peptone) 5 g  
(see 13.4)  
Beef extract (see 13.5) 3 g

Distilled water to 1000 mL

7.2 Heat to a boil to disperse ingredients. Adjust to pH 6.8 ± 0.1 with 1N sodium hydroxide (NaOH) solution. (This is not necessary if prepared, dehydrated medium is used.)

7.3 Dispense in 10 mL amounts in conventional bacteriological culture tubes (i.e., 125 × 17 mm). Plug and sterilize at 103 kPa (15 psi) for 15 min.

7.4 Nutrient agar. Add 1.5% bacteriological agar to nutrient (or appropriate) broth (see 7.1). Heat to boiling. Check pH and adjust to 7.1 ± 0.1 using NaOH solution if necessary. Dispense in 15 ± 1 mL amounts in conventional bacteriological culture tubes. Plug and sterilize at 103 kPa (15 psi) for 15 min. (May be sterilized in 1000 mL borosilicate glass flasks and petri dishes poured from this.)

7.5 Slurry Inoculum Carrier (for hydrophobic fabrics) (see 7.2 and 7.3):

Sodium Chloride 8.5 g  
Agar 3.0 g  
Distilled Water 1000 mL

## 8. Maintenance of Culture of Test Organisms

8.1 Using a 4 mm inoculating loop, transfer the culture daily in nutrient (or appropriate medium) broth for not more than two weeks. At the conclusion of two weeks, make a fresh transplant from stock culture. Incubate cultures at 37 ± 2°C (99 ± 3°F) or other optimal temperature.

8.2 Maintain stock cultures on nutrient or appropriate agar slants. Store at 5 ± 1°C (41 ± 2°F) and transfer once a month to fresh agar (see 13.6).

## 9. Qualitative Test (Screening or Presumptive Test)

9.1 For detection of bacteriostatic activity use AATCC Method 147 on a test specimen and control specimen using the organisms referred to above. For demonstration of bactericidal activity, proceed to the quantitative test described below.

### 10. Quantitative Test (Reference or Confirmatory Test)

10.1 Preparation. The following description will be in terms of fabric swatches. Textile materials not in fabric form can likewise be tested with the appropriate modification.

10.1.1 Size and shape of treated swatches: Cut circular swatches  $4.8 \pm 0.1$  cm ( $1.9 \pm 0.03$  in.) in diameter, from the test fabric (preferably with a steel die). Stack the swatches in a 250 mL wide-mouth glass jar with screw cap. The number of swatches to be used is dependent on the fiber type and fabric construction. Use that amount of fabric which will absorb the  $1.0 \pm 0.1$  mL of inoculum, and leave no free liquid in the jar. For example, 4 swatches of cotton print cloth will absorb 1 mL. The number of swatches used per jar should be reported.

10.1.2 Controls. Swatches of the same fiber type and fabric construction as test sample but containing no antibacterial finish (negative control).

10.1.3 Sterilization of samples. This is optional. The method to be used depends on the type of fiber and finish. Cotton, acetate and many manmade fibers can be sterilized in the autoclave. Wool can be sterilized by ethylene oxide or by intermittent (fractional) sterilization in flowing steam. The latter is also least damaging to certain finishes. Report method of sterilization, if used.

10.1.4 Size of inoculum per sample. Apply  $1.0 \pm 0.1$  mL of an appropriate dilution of a 24 h broth culture of the test organism so that recovery from (1) untreated control fabric swatches or (2) treated test fabric swatches at "0" contact time (plated as soon as possible after inoculation) will show counts of  $1-2 \times 10^8$  organisms. The dilution of the test organism should be made in nutrient (or appropriate) broth (see 7.1, 7.5 and 13.7).

#### 10.2 Procedure

10.2.1 Inoculation of fabrics. When using *Staphylococcus aureus*, shake a 24 h culture and let stand for 15-20 min before preparing the inoculum.\* Place the swatches separately in sterile petri dishes and use a microliter pipette to inoculate them making sure that there is even distribution of the inoculum (see 13.8). Transfer these swatches aseptically to the jar. Screw the jar tops on tightly to prevent evaporation.

10.2.2 As soon as possible after inoculation ("0" contact time), add  $100 \pm 1$  mL

of neutralizing solution to each of the jars containing the inoculated untreated control swatches, the inoculated treated test swatches and the uninoculated treated test swatches.

10.2.3 The neutralizing solution should include ingredients to neutralize the specific antibacterial fabric treatment and to take care of any pH requirements of the fabrics (from dyes, antibacterial agents, etc.). The neutralizing solution employed should be reported (see 13.9).

10.2.4 Shake the jar vigorously for one minute. Make serial dilutions with water and plate (in duplicate) on nutrient (or appropriate) agar. Dilutions of  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  are usually suitable.

10.2.5 Incubation over contact periods. Incubate additional jars containing inoculated untreated control swatches and jars containing inoculated treated test swatches at  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  ( $99 \pm 3^\circ\text{F}$ ) for 18-24 h. Similar jars may be incubated over other periods (e.g., 1 or 6 h) to provide information about the bactericidal activity of the treatment over such periods.

10.2.6 Sampling of inoculated and incubated swatches. After incubation, add  $100 \pm 1$  mL of neutralizing solution to jars containing untreated control swatches and to jars containing treated test swatches. Shake the jar vigorously for one minute. Make serial dilutions and plate (in duplicate) on nutrient (or appropriate) agar. Dilutions of  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  are usually suitable for treated test fabrics. Several different dilutions may be required for untreated control fabrics depending on the incubation period.

10.2.7 Incubate all plates for 48 h at  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  ( $99 \pm 3^\circ\text{F}$ ) or other optimal temperature.

### 11. Evaluation

11.1 Report bacterial counts as the number of bacteria per sample (swatches in jar) not as the number of bacteria per mL of neutralizing solution. Report "0" counts at  $10^1$  dilution as "less than  $10^1$ ".

11.2 Calculate percent reduction of bacteria by the specimen treatments by one of the following formulas:

$$1) \quad 100(B - A)/B = R$$

where:

R = % reduction

A = the number of bacteria recovered from the inoculated treated test specimen swatches in the jar incubated over the desired contact period

B = the number of bacteria recovered from the inoculated treated test specimen swatches in the jar immediately after inoculation (at "0" contact time)

$$2) \quad 100(C - A)/C = R$$

where:

C = the number of bacteria recovered from the inoculated untreated control specimen swatches in the jar immediately after inoculation (at "0" contact time)

If "B and C" are not similar, the larger number should be used. If "B" and "C" are not significantly different,  $(B + C)/2$  should be used as follows:

$$3) \quad 100(D - A)/D = R$$

where:

D =  $(B + C)/2$

11.3 If an untreated control is not available, use the following calculation which allows for any background organisms that might interfere with the test.

$$Bg = 100[(B - E) - (A - F)/B - E]$$

where:

A, B = (see 11.2)

E = the number of bacteria initially recovered from the uninoculated treated test sample (existing background organisms)

F = The number of bacteria recovered from the uninoculated, pre-treat test sample after incubation in the jar over the desired contact period (existing background organisms after contact period)

Bg = background organisms

11.4 For a valid test there should be: (1) "0" colonies of test organism recovered from the uninoculated treated test specimen swatches and (2) a significant increase in the numbers of bacteria recovered from the inoculated untreated control specimen swatches incubated for the specified contact time over the numbers of bacteria recovered from the inoculated untreated specimen swatches at "0" contact time (immediately after inoculation). This applies only if dilution was made in broth (see 10.1.4 and 13.7).

11.5 Report percent reduction of bacteria by the specimen treatment against each test organism.

11.6 The criterion for passing the test must be determined by the interested parties.

11.7 Report the dilution medium used.

### 12. Precision and Bias

12.1 Studies (see 13.10) indicate the following within-laboratory precision of the Standard Plate Count (SPC) Test: (a) among-analyst variation of 18% and (b) within-analyst variation of 8%.

\*Using a 1 mL pipette, pipet the inoculum carefully onto the fabric. If a strain of *Pseudomonas* that forms a pellicle is used, avoid including fragments of the pellicle in the inoculum.



## 13. Notes and References

13.1 Publication available from U.S. Department of Health and Human Services CDC/NIH-FHS Publication No. (CDC) 84-8395; web site: [www.hhs.gov](http://www.hhs.gov).

13.2 Booklet available from Publications Office, ACCIH, Kemper Woods Center 1330 Kemper Meadow Dr., Cincinnati OH 45240; tel: 513/742-2020; web site: [www.aqih.org](http://www.aqih.org).

13.3 Available from American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas VA 20108; tel: 703/365-2700; fax: 703/365-2701; web site: [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

13.4 Racto-Peptone may be obtained from Difco Laboratories, 920 Henry St., Detroit MI 48201.

13.5 Beef extract may be obtained from Baltimore Biological Laboratories, 250 Schilling Cir., Cockeysville MD 21030; Difco Laboratories (address above); or Oxoid (USA) Ltd., 9017 Red Branch Rd., Columbia MD 21045.

13.6 Consistent and accurate testing requires maintenance of a pure, uncontaminated, nonnutrient test culture. Avoid contamination by use of good sterile technique in plating and transferring. Avoid mutation by strict adherence to modify stock transfers. Check culture purity by making streak plates periodically and observing for single species-characteristic type of colonies.

13.7 The dilution of the test organism may be prepared in sterile 0.85% saline solution or suitable buffer if a steady-state culture is de-

sired during the contact period with a fabric or in the slurry inoculum carrier when hydrophobic fabrics are being tested.

13.8 A surfactant may be added to the dilution medium to enhance wetting of hydrophobic fabrics. The surfactant must be shown not to cause a reduction in bacterial numbers, by prior testing at the intended use concentration. Report the use and concentration of surfactant used.

13.9 If sterile distilled water is used in the place of a neutralizing solution, there will always be the possibility that some of the biocide will be carried over.

13.10 Preler, J. T.; Leslie, J. W.; Messer, J. W. Replicate counting errors by analysts and bacterial colony counters. *J. Food Protection*, Vol. 45, 1982, pp 238-240.