

Elisa Balbi Pinto Marques

**NANOENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO
EM MATRIZES LIPÍDICAS**

Trabalho de Conclusão no Curso em
Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal de Santa
Catarina.
Orientador: Prof.^a Dr.^a Claudia Sayer
Coorientador: Msc. Alessandra
Cristina de Meneses

Florianópolis
2017

Elisa Balbi Pinto Marques

**NANOENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO
EM MATRIZES LIPÍDICAS**

Este trabalho foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheira de Alimentos e aprovado em sua forma final pelo Trabalho de Conclusão de Curso

Florianópolis, 5 de dezembro de 2017.

Prof. Dr. Marcelo Lanza
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Claudia Sayer
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira
Membro titular
Universidade Federal de Santa Catarina

Me. Em Eng.^a. Química Daniela Bresolin
Membro titular
Doutoranda em Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida;

Aos meus pais, Eduardo e Andréa, pelo exemplo de integridade e amor;

À minha irmã, Clarice, pelo apoio incondicional e pela amizade;

Ao meu namorado, Henrique, pelo carinho e por estar sempre me apoiando;

Às minhas amigas, pelo companheirismo;

À minha coorientadora, Alessandra, pela notável dedicação em me ensinar e conduzir durante este estudo;

E à minha orientadora, Professora Claudia, pelo apoio dado ao longo de todo o processo.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) pela análise de TEM, à Central de Análises da Engenharia Química e Engenharia de Alimentos pela análise do DSC e ao Laboratório de Controle de Processos de Polimerização (LCP) pelas demais análises.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi encapsular óleo de cravo através da técnica de emulsificação a quente/ultrassonicação utilizando Cera de Carnaúba (CC) e Cera de Abelha (CA) como material matriz para formação de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). O óleo de cravo possui várias propriedades, como anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e potencial larvicida. Algumas características das nanopartículas formadas foram avaliadas, como o diâmetro médio, eficiência de encapsulação e propriedades térmicas e químicas. Notou-se que quanto maior a quantidade de cera, maior foi o diâmetro de partícula médio (Dp), tanto para CC quanto para CA, variando de 121 a 1489 nm. Para ambas as matrizes lipídicas, a estabilidade foi mantida após 15 dias de estocagem à temperatura ambiente. No entanto, as NLS de CA apresentaram valores menores de Dp e de índice de polidispersão quando comparado às NLS produzidas a partir da CC e uma maior homogeneidade mesmo com variação da formulação. Além disso, foi possível incorporar maiores quantidades de óleo de cravo nas formulações contendo CA. A porcentagem de eficiência de encapsulação do óleo de cravo nas NLS de CC ficou entre $58,3 \pm 0,2$ e $60,0 \pm 2,2$ no primeiro dia e $59,0 \pm 0,6$ e $61,2 \pm 3,4$ após estocagem durante 15 dias. Já a porcentagem de eficiência de encapsulação de óleo de cravo nas NLS de CA, ficou entre $62,6 \pm 0,1$ e $66,2 \pm 0,5$ para o primeiro dia e $62,6 \pm 0,1$ e $66,2 \pm 0,4$ após 15 dias de estocagem. Estes valores foram obtidos em amostras com diferentes massas de óleo de cravo em todas as formulações e mesmo assim a eficiência de encapsulação ficou próxima em todos os experimentos. Já o ponto de fusão das amostras apresentou uma pequena redução se comparado às ceras puras. Essa diferença na temperatura de fusão pode ser atribuída a presença do lipídio líquido crodamol, que pode ser responsável por aumentar a quantidade de imperfeições na rede cristalina da cera requerendo menos calor para que ocorra a fusão completa das nanopartículas. A morfologia das NLS formadas também foi analisada e as nanopartículas formadas por CA obtiveram formato esférico, enquanto as formadas por CC obtiveram formato oval. Os resultados obtidos apontam que o método utilizado é viável para a encapsulação de óleo de cravo e, possivelmente, outros óleos essenciais.

Palavras-chave: Encapsulação; Cera de Carnaúba; Cera de Abelha; Emulsificação a quente/ultrassonicação; Nanopartículas Lipídicas Sólidas; Óleo essencial de Cravo.

ABSTRACT

The objective of this work was to encapsulate clove oil using the hot emulsion/ultrasonication technique, using Carnauba Wax (CW) and Beeswax (BW) as matrix materials to form solid lipid nanoparticles (SLN). The clove oil has several properties as anti-inflammatory, anti-bacterial, anti-fungal and larvicidal potential. Some characteristics of the created nanoparticles were evaluated, such as the average particle diameter, encapsulation efficiency and thermo-chemical properties. It was observed that with an increase in wax content on organic phase there was an increase in the mean particle diameter obtained of the SLN, for both waxes used. However, all formulations presented average diameter in the range between 121 to 1489 nm. For both lipid matrices, the stability was maintained after 15 days of storage at room temperature. However, the BW SLN had lower values of D_p and PdI when compared to the SLN produced with CW and greater homogeneity even with variations in the formulation. In addition, greater amounts of clove oil could be incorporated into formulations containing BW. The percentage of clove oil encapsulation efficiency in CW SLN was between $58,3 \pm 0,2$ and $60,0 \pm 2,2$ on the first day and $59,0 \pm 0,6$ and $61,2 \pm 3,4$ after storage for 15 days. On the other hand, the percentage of clove oil encapsulation in BW SLN was between $62,6 \pm 0,1$ and $66,2 \pm 0,5$ for the first day and $62,6 \pm 0,1$ and $66,2 \pm 0,4$ after 15 days of storage. These values were obtained in samples with different masses of clove oil and yet the encapsulation efficiency was similar for all experiments. The melting point of the samples presented a small reduction when compared to pure waxes. This difference in melting temperatures could be attributed to the presence of the liquid lipid crodamol in the formulations, which may be responsible for increasing the amount of imperfections at the crystalline network of the wax, requiring less heat to fully melt the nanoparticles. The morphology of the formed SLN was also analysed, and the nanoparticles formed with BW presented a spherical shape, while those formed by CW showed an oval shape. The results indicate that the method used is feasible for the encapsulation of clove oil and possibly other essential oils.

Keywords: Encapsulation; Carnauba wax; Beeswax; Hot emulsification/ultrasonication; Solid Lipid Nanoparticles; Clove oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do eugenol.....	22
Figura 2 – Ilustração esquemática de diferentes morfologias obtidas após encapsulação de compostos: (a) matriz sólida; (b) casca núcleo (reservatório); (c) multi-parede; (d) multi-nucelada; (e) bicamada fosfolipídica; (f) inclusão molecular.	25
Figura 3 – Esquema simplificado de uma NLS.	27
Figura 4 – Esquema da produção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas de Cera de Carnaúba.....	38
Figura 5 – Espectros obtidos por FTIR para o óleo de cravo puro (a), CA5 (b), CA9 (c), CC4 (d) e CC10 (e).....	49
Figura 6 – Curvas de DSC mostrando o comportamento de fusão para as amostras contendo cera de carnaúba: (a) CC4 e (b) CC10.....	50
Figura 7 – Curvas de DSC mostrando o comportamento de fusão para as amostras contendo cera de abelha: (a) CA5 e (b) CA9.	51
Figura 8 – Micrografias obtidas por TEM das amostras de nanopartículas: (a) CC4, (b) CC10, (c) CA5 e (d) CA9.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulações das fases orgânica e aquosa das NLS de Cera de Carnaúba.	36
Tabela 2 – Formulações das fases orgânica e aquosa das NLS de Cera de Abelha.	37
Tabela 3 – Diâmetro médio (Dp) e Índice de polidispersão (PDI) das NLS formadas a partir de cera de carnaúba referente ao 1º dia de produção e após 15 dias de estocagem à temperatura ambiente.	42
Tabela 4 – Diâmetro médio (Dp) e Índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas formadas a partir de cera de abelha referente ao 1º dia de produção e após 15 dias de estocagem à temperatura ambiente.	45
Tabela 5 – Eficiência de encapsulação do óleo de cravo nas nanopartículas de cera de carnaúba (CC) e cera de abelha (CA) referente ao 1º dia e após 15 dias de estocagem à temperatura ambiente.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BW – Beeswax
CA – Cera de Abelha
CC – Cera de Carnaúba
CW – Carnauba Wax
Dp – Diâmetro de Partícula
EC – Estrato Córneo
EE – Eficiência de Encapsulação
FPS – Fator de Proteção Solar
NLS – Nanopartículas Lipídicas Sólidas
SLN – Solid Lipid Nanoparticles
OC – Óleo de Cravo
PAT – Perda de Água Transepidermica
PdI – Índice de Polidispersão
 T_f – Temperatura de fusão
UV – Ultravioleta
VLN – Veículos Lipídicos Nanoestruturados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS GERAIS	20
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS ATIVIDADES	21
2.1.1	Óleo essencial de cravo	22
2.2	ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS HIDROFÓBICOS EM MATRIZ LIPÍDICA	24
2.3	PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS ATRAVÉS DE EMULSIFICAÇÃO	26
2.4	CERA DE CARNAÚBA	28
2.5	CERA DE ABELHA	30
2.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS REFERENTES AO ESTADO DA ARTE.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	MATERIAL	34
3.2	PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA E CERA DE CARNAÚBA CARREGADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO	35
3.3	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS	38
3.3.1	Diâmetro e morfologia das nanopartículas	38
3.3.2	Determinação da eficiência de encapsulação	39
3.3.3	Análise química	40
3.3.4	Análise térmica	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	DIÂMETRO DE PARTÍCULA E ESTABILIDADE.....	41
4.2	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	46
4.3	ANÁLISE QUÍMICA	48
4.4	ANÁLISE TÉRMICA (DSC)	50

4.5	MORFOLOGIA.....	52
5	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os consumidores buscam cada vez mais o consumo de alimentos saudáveis e naturais a fim de obter maior bem-estar e saúde. Porém, ao contrário dos alimentos industrializados, os compostos bioativos presentes nos produtos naturais são facilmente degradados, sendo que a sua estabilidade depende de vários fatores que podem agir isoladamente ou em conjunto, tais como: pH, luz, exposição ao oxigênio, calor, temperatura (MOLINA, 2014).

Na produção dos alimentos, deve haver preocupação constante nas etapas de industrialização e de distribuição com a manutenção das suas características, e além disso outro cuidado essencial é quanto à biodisponibilidade dos mesmos no organismo humano após serem consumidos (MOLINA, 2014).

Alguns dos compostos bioativos de maior interesse em alimentos são os probióticos, minerais, aromas, vitaminas, fitoesteróis, luteína, ácidos graxos, licopeno e antioxidantes (CHAMPAGNE et al., 2007). Outros compostos bioativos que possuem ampla utilização em alimentos e cosméticos desde a antiguidade são os óleos essenciais. Extraídos de frutas e plantas diversas, esses óleos são empregados como aromatizantes, antioxidantes e conservantes, inclusive devido à sua atividade antimicrobiana e anticarcinogênica (MENESES, 2016; RIBES et al., 2016).

Uma vez que os óleos essenciais e os aromas são de origem natural, suas propriedades benéficas como antioxidante e antimicrobiana, podem ser aproveitadas em alimentos, garantindo a segurança alimentar. Entretanto é desejável que a adição de ingredientes bioativos e aromáticos não interfira nas propriedades sensoriais – na cor ou no sabor – dos alimentos, e a indústria alimentícia normalmente trabalha no sentido de prevenir tais efeitos. Desta maneira, a encapsulação pode contribuir para mascarar as características indesejáveis desses quando adicionados aos alimentos e, ao mesmo tempo, manter as características bioativas dos compostos (CHAMPAGNE et al., 2007).

Existem alguns desafios tecnológicos para a adição desses compostos hidrofóbicos em alimentos, que em sua maioria são ricos em água. A encapsulação pode ser útil para preservar e dar estabilidade a esses compostos no alimento e, ao mesmo tempo, possibilitar a sua liberação controlada na matriz e principalmente na fase aquosa dos alimentos onde os microrganismos habitam, prevenindo assim, a oxidação e proliferação de microrganismos.

Visto isso, a nanoencapsulação pode ser uma boa alternativa para incorporação de óleos essenciais, protegendo esses compostos de possíveis degradações e perdas por volatilização e/ou contato com outros compostos. As nanopartículas lipídicas ganham destaque nesse sentido, uma vez que sua simplicidade de produção e alta afinidade pelos compostos a serem encapsulados, devido a sua natureza hidrofóbica, facilitam o processo de produção e incorporação de óleos essenciais em sua matriz. Dentre outras vantagens da nanoencapsulação, como aumento da área de contato e possibilidade de solubilização desses sistemas em meios aquosos, a incorporação de óleos essenciais em nanocarreadores ainda permite a obtenção de um perfil de liberação controlado, mantendo sua atividade por diferentes períodos de tempo.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o processo de encapsulação de óleo de cravo em nanopartículas lipídicas sólidas em diferentes matrizes lipídicas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Encapsular óleo de cravo em nanopartículas de cera de abelha.
- Encapsular óleo de cravo em nanopartículas de cera de carnaúba.
- Caracterizar as nanopartículas carregadas com óleo de cravo quanto ao diâmetro de partículas e índice de polidispersão, eficiência de encapsulação, estabilidade sob armazenamento.
- Caracterizar as nanopartículas formadas quanto à morfologia das partículas, comportamento térmico e análise química.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão da literatura disponível acerca dos assuntos pertinentes neste trabalho. Primeiramente, é introduzida uma abordagem geral sobre o óleo essencial do cravo da Índia, seus principais compostos, sua atividade antimicrobiana e antioxidante. Em seguida, são apresentadas informações sobre métodos de encapsulação de compostos hidrofóbicos em matrizes hidrofóbicas, com foco na técnica produção de nanopartículas lipídicas sólidas através de emulsificação, incluindo recentes pesquisas realizadas com ceras de abelha e de carnaúba.

2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS ATIVIDADES

Os óleos essenciais são encontrados em estruturas secretoras especiais localizadas nos tecidos ou na superfície das plantas (tricomas), como flores, brotos, sementes, cascas, folhas, ervas, madeiras, frutas e raízes. Estes óleos são líquidos oleosos voláteis aromáticos responsáveis pelo odor do vegetal, solúveis em solventes orgânicos e instáveis em presença de luz, oxigênio, calor e metais. Além disso, são misturas complexas por conter dezenas ou até centenas de compostos diferentes, e ao mesmo tempo simples pois os componentes principais presentes são de natureza terpênica, que estão associados ou não a outros componentes (ésteres, alcoóis, aldeídos, cetonas, fenóis, etc.) (SÁ, 2013; SILVA, 2014; ZIZOVIC, 2007). Há vários métodos para extração de óleos essenciais, sendo uns dos principais a hidrodestilação, ultrassom, extração com solventes orgânicos (Sohxlet), maceração e extração supercrítica (SÁ, 2013; SILVA, 2014).

A importância e a ampla gama de aplicações dos óleos essenciais em alimentos, medicamentos e cosméticos, aliados ao fato de que o Brasil, assim como Irã, Índia, Paquistão, Turquia, Jordânia e México, possuem uma flora diversificada e uma rica tradição no uso de plantas medicinais para aplicação antibacteriana, demonstram a importância de estudos que buscam tornar mais seguros e eficazes os métodos de aproveitamento desses óleos (BAJALAN et al., 2014).

Vários estudos comprovaram a eficiência dos óleos essenciais principalmente quanto ao seu poder antimicrobiano, como o óleo de cravo que, conforme apresentado nos estudos de Teixeira et al. (2012), inibiu o crescimento dos microrganismos *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella typhimurium* e *Shewanella*

putrefaciens. Neste mesmo estudo, o óleo de cravo reduziu em 50% a atividade dos radicais de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), comprovando alto poder antioxidante.

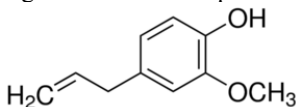
No estudo realizado por Bajalan et al. (2014), o óleo de carvalho mostrou efeito antimicrobiano principalmente sobre o *S. aureus* e, além disso, o ácido gálico presente neste extrato possui atividade antifúngica, antiviral e tem poder antioxidante. Também o óleo essencial de erva doce foi eficaz na inibição e no controle de bactérias, especialmente *Proteus vulgaris*, podendo ser aproveitado como um agente antimicrobiano natural conforme demonstrado nas pesquisas de Pirbalouti et al. (2013).

2.1.1 Óleo essencial de cravo

O cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) é uma especiaria aromática não perecível de grande valor nos mercados mundiais, sendo cultivada desde os tempos antigos na Índia, Madagascar, Sri Lanka e sul da China sendo a maior produção mundial na Indonésia. O cravo possui diversos fins, sendo alguns deles utilizados na medicina popular, aromas alimentares, conservação de alimentos, fragrâncias e produtos farmacêuticos (MAEDA et al., 2010; MENESES, 2016).

A obtenção do óleo essencial de cravo é geralmente feita por destilação a vapor, hidrodestilação ou extração por solvente das flores, caules e folhas da árvore de cravo. O composto majoritário presente no óleo do cravo, entre 80 e 95%, é o eugenol (2-metoxi-4-(2-propenil) fenol). O eugenol foi utilizado na odontologia por décadas como analgésico e possui outras propriedades como anti-inflamatória, anti-bacteriana, anti-fúngica e potencial larvicida, entre outras (GUENETTE et al., 2007; MENESES, 2016).

Figura 1 – Estrutura química do eugenol



Fonte: Pereira (2007).

O eugenol presente no óleo-de-cravo, assim como outros fenóis, possui um excelente efeito antimicrobiano contra uma vasta gama de microrganismos, como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes*. O principal mecanismo de ação do eugenol é a ruptura da membrana citoplasmática,

que aumenta a sua permeabilidade não-específica. Esta hiperpermeabilidade é seguida por um vazamento de íons e extensa perda de outros conteúdos celulares, incluindo as proteínas intracelulares e, em última instância, resulta em morte celular (DEVI et al., 2010).

Nos estudos de Sá (2013) através dos métodos de índice de acidez para as amostras armazenadas por 15 dias em estufa a 60°C (Teste de Schaal), foi verificado aumento da vida útil do óleo de soja devido a atividade antioxidante do óleo de cravo. Além disso, verificou-se que o potencial antioxidante dos extratos de cravo-da-índia obtido por extração supercrítica e ultrassom, utilizando etanol como solvente, é comparável a eficiência do antioxidante sintético BHT, o que possibilita substituir os antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais, podendo ser substituído no óleo de soja refinado.

No estudo do Devi et al. (2010), comprovou-se o efeito antimicrobiano do Eugenol inativando a *Salmonella typhi* dentro de 60 minutos, resultando na inibição completa do organismo. O modo de ação do eugenol foi analisado pelo ensaio de cristal violeta, sendo possível constatar o aumento da permeabilidade da membrana com o uso do eugenol. Além disso, o tratamento com eugenol na sua Concentração Mínima Inibitória (0,0125%) e Concentração Bacteriana Mínima (0,025%) reduziu a viabilidade e resultou na inibição completa do microrganismo. O eugenol inativou a *Salmonella typhi* dentro de 60 min de exposição. Além disso, a partir de espectroscopia FT-IR foi possível constatar deformação de macromoléculas na membrana, após tratamento com eugenol.

Porém, a característica lipofílica e volátil dos óleos essenciais dificulta a sua incorporação em produtos alimentares (MENESES, 2016). Aqui, mais uma vez, confirma-se a importância dos estudos sobre encapsulação como solução potencial e vantajosa para a incorporação de componentes bioativos aos alimentos. Nos últimos anos, tem-se observado um progresso notável nas técnicas de nanoencapsulação, com resultados práticos que permitem aumentar a eficácia desses compostos e os benefícios dos alimentos, e, ao mesmo tempo, preservando a segurança alimentar.

2.2 ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS HIDROFÓBICOS EM MATRIZ LIPÍDICA

Na indústria alimentícia, a encapsulação de componentes lipofílicos, tais como ômega 3, insulina, carotenoides, vitaminas lipossolúveis, fitoesteróis, óleos essenciais e nutracêuticos, tem contribuído para o desenvolvimento de alimentos funcionais e para o aumento da segurança e da garantia dos alimentos. Uma forma de otimizar a biodisponibilidade de componentes lipofílicos é envolvê-los em diferentes sistemas de disponibilização. As pesquisas que investigam sistemas de liberação controlada atingiram um clímax nos últimos anos, levando a resultados notáveis tanto no campo de materiais utilizados como veículos quanto nos métodos e técnicas de encapsulação dos componentes bioativos (DIMA et al., 2015).

Por outro lado, os biocomponentes lipofílicos representam um desafio real aos pesquisadores das áreas de alimentos e medicamentos, pois apresentam baixa solubilidade em água e não se consegue incluí-los com facilidade nas aquosas dos alimentos e medicamentos (DIMA *et al.*, 2015).

O interesse cada vez maior na adição de ingredientes funcionais aos alimentos, devido aos benefícios que trazem à saúde, faz com que a indústria alimentícia busque formas eficazes de atender esta demanda do mercado (CHAMPAGNE et al., 2007). Dessa forma, o processo de encapsulação de compostos hidrofóbicos em alimentos pode ser aplicado por uma diversidade de motivos, tais como:

(i) para proteger o material central da degradação pela redução de sua reatividade com o ambiente externo – luz, humidade, oxigênio e outros compostos presentes no alimento que poderiam reagir indesejavelmente, aumentando a durabilidade e a conservação (CHAMPAGNE et al., 2007; FANG et al., 2010);

(ii) para reduzir a evaporação ou a taxa de transferência do material central com o ambiente externo (FANG et al., 2010);

(iii) para modificar as características físicas do material original e permitir sua manipulação facilitada (FANG et al., 2010);

(iv) para controlar a liberação do material central aos poucos ou através de um tempo predefinido (FANG et al., 2010);

(v) para mascarar um sabor ou gosto indesejável do material central, ou para preservar cor, sabor e textura, se desejáveis (FANG et al., 2010; CHAMPAGNE et al., 2007);

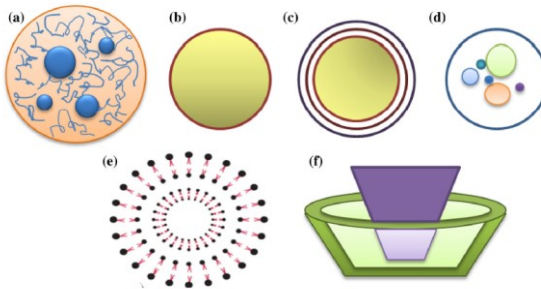
(vi) para diluir o material central quando apenas pequenas quantidades são necessárias, mantendo uma dispersão uniforme no material diluente (FANG et al., 2010);

(vii) para ajudar a separar os componentes de uma mistura que iriam de outra forma reagir entre si (FANG et al., 2010).

Para a escolha do agente encapsulante, deve-se atentar para a não reatividade com o material a ser encapsulado, além de buscar o processo mais adequado para a formação da partícula ou cápsula, para quando possível, controlar o mecanismo de liberação. A liberação dos compostos bioativos vai depender, além do tipo de agente encapsulante, da variação da temperatura e do pH, da solubilidade do meio, da degradação, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva e gradiente (ROSSAN, 2011).

Os materiais encapsulados podem ser puros ou misturas, e são também denominados como material coberto, material central, ativos, enchimento, fase interna ou carga. De outro lado, os materiais de cobertura (ou de embalagem) são conhecidos por material de cobrimento, material de matriz, material de parede, cápsula, membrana, veículo ou casca, e podem ser feitos de açúcares, gomas, proteínas, polissacarídeos naturais ou modificados, lipídeos e polímeros naturais ou sintéticos. Seus diferentes formatos em diferentes sistemas são influenciados pelas tecnologias empregadas e pelos materiais de conteúdo e de cobrimento dos quais as cápsulas são feitas (FANG et al., 2010). Algumas das possíveis morfologias de encapsulados estão representados na Figura 2 abaixo.

Figura 2 – Ilustração esquemática de diferentes morfologias obtidas após encapsulação de compostos: (a) matriz sólida; (b) casca núcleo (reservatório); (c) multi-parede; (d) multi-nucleada; (e) bicamada fosfolipídica; (f) inclusão molecular.



Fonte: Dordevic et al. (2015).

Dependendo das características do composto bioativo em questão e suas aplicações, opta-se pela técnica de encapsulação mais conveniente dentre as várias que existem (MOLINA, 2014). Para isso, deve-se levar em consideração: tamanho de partículas requerido, propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, aplicação do produto final, mecanismos desejados de liberação, escala de produção e custo (ROSSAN, 2011).

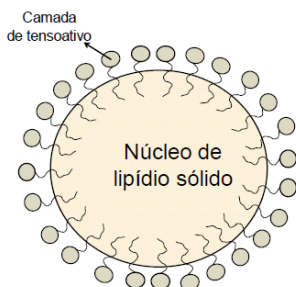
Levando em consideração a encapsulação de óleos essenciais é importante ressaltar a sua elevada afinidade por materiais de matriz hidrofóbicos, como os lipídios, e as partículas lipídicas sólidas (NLS) podem ser utilizadas, com tamanhos de partícula variando entre tamanho nano e micro. Essas NLS têm sido empregadas como sistemas de encapsulação baseada em óleos, ácido graxos, triacilglicerídeos, ceras, entre outros, para a liberação de medicamentos e compostos bioativos, especialmente para compostos lipofílicos, mas compostos hidrofílicos também podem ser incorporados, dependendo da técnica utilizada.

Os componentes que compõe a matriz lipídica destas NLS estão geralmente envolvidos nos vários processos metabólicos que ocorrem no corpo humano, sendo que alguns desses componentes são sintetizados pelo próprio corpo, o que facilita aplicação desses compostos como material de matriz para incorporação de compostos bioativos e medicamentos que podem ser ingeridos ou injetados via venal (DIMA et al., 2015).

2.3 PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS ATRAVÉS DE EMULSIFICAÇÃO

As NLS, foram derivadas das emulsões o/w, onde foi realizada a troca de um lipídio líquido (óleo) por um lipídio sólido ou mistura de lipídios sólidos à temperatura ambiente, com núcleo hidrofóbico. O diâmetro da partícula pode variar de nanométrico (de 20 a 200 nm), submicrométrica (200 a 1000 nm) ou micrométrica (1 a 5 μm). A Figura 3 mostra o esquema simplificado de uma NLS, sendo que no núcleo de lipídio sólido é incorporado o composto hidrofóbico a ser encapsulado (ROSSAN, 2011; MOLINA, 2014).

Figura 3 – Esquema simplificado de uma NLS.



Fonte: Molina (2014).

Para sua formação, a técnica de emulsificação pode ser empregada, onde é realizada a fusão do lipídio com incorporação do composto a ser encapsulado, seguida da formação de uma emulsão grosseira a quente em uma solução aquosa de surfactante (mantendo a temperatura de fusão) e aplicação de elevada energia (emulsificação) para redução dos diâmetros de partícula (MENESES, 2016).

Algumas vantagens desse tipo de encapsulamento são possuir o composto bioativo na matriz lipídica sólida, menor mobilidade comparado com matrizes líquidas, permitir a liberação controlada no sítio desejado, alto grau de biodegradabilidade, biocompatibilidade, matriz lipídica composta por lipídios biocompatíveis que diminuem o perigo de toxicidade aguda e crônica, proteção de substâncias sensíveis a degradação química, controle de liberação dos compostos ativos, facilidade de escalonamento de produção, baixo custo, além de não necessitar de solventes orgânicos (ROSSAN, 2011; MOLINA, 2014).

Nos estudos realizados por Garg e Singh (2011) foram preparadas NLS carregadas com eugenol utilizando matriz com um (ácido esteárico) ou dois lipídios (ácido esteárico e triglicerídeo caprílico). O tamanho de partículas mudou significativamente ao longo do período de 90 dias, indicando a estabilidade de eugenol carregado nas nanopartículas lipídicas. O presente estudo também revela mais de 90% de eficiência de encapsulação nas NLS, protegendo o eugenol do processo oxidativo. Além disso, na análise antifúngica in vitro foi verificada atividade antifúngica do eugenol não foi afetada após o encapsulamento. Outro resultado, nos estudos in vivo realizados utilizando um modelo de candidíase oral em ratos imunossuprimidos mostrou o eugenol quando incorporado nas nanopartículas lipídicas teve uma melhor eficácia terapêutica na ação antifúngica, em relação ao eugenol administrado de

forma livre. Portanto, o tratamento com o eugenol carregado em NLS pode ser promissor na terapia alternativa no tratamento antifúngico.

2.4 CERA DE CARNAÚBA

As ceras naturais são consideradas matrizes lipídicas de grande potencial para a produção de NLS de administração tópica, em função da baixa toxicidade e biocompatibilidade, sendo bem toleradas pela pele além de melhoras em sua aparência, aumentar a elasticidade e ainda possuir uma função de barreira física, podendo ser empregados em formulações farmacêuticas e cosméticas. As substâncias utilizadas para obter as NLS incluem triglicerídeos, glicerídeos, ácidos graxos como, por exemplo, o ácido esteárico, palmitato de cetila e as ceras naturais como a cera de carnaúba, manteiga de cacau e cera de abelha (LACERDA, 2009).

A cera de carnaúba é oriunda da palmeira da carnaúba (*Copernicia prunifera*), árvore natural da região nordeste do Brasil e exclusivamente produzida no país, principalmente no estado do Piauí, Ceará, Maranhão e Rio Grande do Norte (CARVALHO et al., 2017; CARVALHO, 2005). A cera de carnaúba consiste num complexo de misturas de alto peso molecular: ésteres de ácido e hidroxiácidos. Essa cera é descrita como um sólido plástico, sendo uma das mais duras e de maior ponto de fusão entre as ceras naturais (ponto de fusão de 81 a 86°C). Sua aplicabilidade vai desde a indústria farmacêutica como polidor para drágeas, a produtos cosméticos como batons e na indústria alimentícia como agente desmoldante para panificação, dentre outros (LACERDA, 2009; NESSEEM, 2011; VILLALOBOS-HERNÁNDEZ et al., 2005).

Há três classificações da cera de carnaúba (tipos 1, 3 e 4), conforme explicado a seguir:

- Tipo 1 ou *Prime yellow*: possui coloração amarelo-claro e é produzida a partir do pó extraído do “olho” da palmeira. Esta cera de carnaúba possui baixo índice de acidez, com reduzido percentual de impurezas, além de tornar-se incolor durante o processo de fusão ($T_f = 82,6^\circ\text{C}$), o que permite ser utilizada na fabricação de cosméticos e no recobrimento de produtos alimentícios (LACERDA, 2009).

- Tipo 3 ou *Light Fatty Grey*: possui coloração castanho ou amarelada e é produzida a partir da clarificação da cera obtida do pó denominado “palha”. Quando comparada à cera de carnaúba tipo 1, o Tipo 3 possui um ponto de fusão discretamente mais baixo ($T_f = 81,4^\circ\text{C}$), índice de acidez mais elevado, menor solubilidade à maioria dos solventes utilizados e cor mais escura, porém baixo preço, representando a maior

demanda de utilização pelas indústrias nacionais e estrangeiras (LACERDA, 2009).

- Tipo 4 ou *Fatty Grey*: possui coloração na sua tonalidade natural, marrom-escuro ou marrom-esverdeado, tendendo a negro. Assim como o Tipo 3 é produzida a partir do pó extraído da “palha”, porém sem sofrer o processo de clarificação, mantendo os mesmos parâmetros físico-químicos, com $T_f = 82,5^\circ\text{C}$, alterando apenas a cor. Sua utilização é restringida a processos que a cor não possa interferir, devido à sua cor mais escura, muitas vezes sendo aplicada em usos menos sofisticados, como polidores para piso (LACERDA, 2009).

Embora haja diferenças entre os tipos de cera, não há variação da estrutura química entre os três tipos, sugerindo uma mesma estrutura cristalina (LACERDA, 2009).

Alguns estudos vêm avaliando a cera de carnaúba como veículo para incorporação de fármacos e compostos hidrofóbicos. No estudo realizado por Kheradmandnia et al. (2010) o fármaco cetoprofeno foi encapsulado em NLS preparadas a partir de uma mistura de cera de abelha e cera de carnaúba utilizando Tween 80 e lecitina como emulsionantes. Foram investigadas as características das nanopartículas obtidas com várias composições lipídicas e surfactante. Os resultados obtidos indicaram uma eficiência elevada de encapsulação de 97% mostrando que as NLS tiveram a capacidade de incorporar o cetoprofeno, um fármaco pouco solúvel em água. Além disso, termogramas diferenciais de calorimetria de varredura e análise cromatográfica líquida de alta eficiência indicaram a estabilidade de nanopartículas com liberação de fármaco insignificante após 45 dias de armazenamento, indicando boa estabilidade. Verificou-se também que as nanopartículas com maior conteúdo de cera de abelha no núcleo liberaram o fármaco mais rapidamente em relação aquelas que possuíam mais cera de carnaúba em sua estrutura. Embora a eficiência de aprisionamento após 0 e 45 dias não apresentaram qualquer efeito significativo na estabilidade física e difusão das moléculas de fármaco a partir das NLS para o meio, a hipótese permanece que, com maior tempo de armazenamento, a reorganização dos cristais da estrutura cristalina nas nanopartículas com mais carnaúba pode ocorrer gradualmente e, assim, a capacidade das partículas de reter o fármaco irá diminuir, com consequente expulsão do fármaco. A liberação de fármacos a partir de nanopartículas com mais conteúdo de cera de abelha foi mais rápido devido à maior taxa de degradação, hidrofiliabilidade e menor cristalinidade da estrutura de cera de abelha.

Nos estudos realizados por Villalobos-Hernández et al. (2005) caracterizou-se sistemas de suporte para protetores solares inorgânicos

com base em uma matriz composta de cera de carnaúba e oleato de decila. Atenuadores de radiação ultravioleta como sulfato de bário, carbonato de estrôncio e dióxido de titânio foram testados. As matrizes lipídicas foram utilizadas como cápsulas ou como veículos que acompanham os pigmentos em dispersões aquosas. Os resultados mostraram um aumento significativo no FPS (Fator de Proteção Solar) até aproximadamente 50 após o encapsulamento do dióxido de titânio. O encapsulamento dos compostos inorgânicos reforçou o FPS intrínseco dessas substâncias, sendo que o dióxido de titânio foi particularmente beneficiado por este processo em virtude da sua capacidade de absorção de UV. A mistura da matriz de lipídio utilizada afetou positivamente a viscosidade dos sistemas dando às formulações uma melhor fixação depois de ser aplicado em placas para a medição FPS. De acordo com os valores de potencial zeta, a estabilidade da formulação foi favorecida em todos os casos pela utilização de matrizes de contendo cera e óleo.

O estudo realizado por Madureira et al., (2015) teve como objetivo produzir NLS estáveis usando cera de carnaúba como matriz lipídica, para entrega de ácido rosmarínico. Assim, foram testadas diferentes concentrações de cera (0,5, 1 e 1,5% m/v) e porcentagens de surfactante (1, 2 e 3% v/v). As propriedades físicas, a morfologia da superfície e as eficiências encapsulação foram estudadas no momento da produção e após 28 dias no armazenamento. Os resultados indicaram que nenhum ácido rosmarínico foi liberado pelas partículas neste período, indicando boa compatibilidade entre este polifenol e o núcleo ceroso da NLS. As propriedades térmicas e a natureza das interações químicas entre a cera e o ácido rosmarínico também foram avaliadas. As partículas apresentaram tamanhos de partícula médios entre 35-927 nm e potencial zeta entre -38 a 40 mW, mostrando alta estabilidade, sem risco de agregação devido à repulsão elétrica das NLS, além disso, foram obtidas altas eficiências de incorporação de ácido rosmarínico ~99%. As análises de FTIR provaram a associação de ácido rosmarínico à matriz lipídica, e ainda, os autores verificaram que em baixas concentrações de lipídio e alto concentração de surfactante conduziram a NLS com menor diâmetro. Os valores de intervalo ótimos para obter as características desejáveis para incorporação em um alimento funcional sugerem formulações contendo 1,0 e 1,5% (m/v) de lipídios e 2% (v/v) de surfactante.

2.5 CERA DE ABELHA

A cera de abelha (*Apis mellifera*) é um produto totalmente natural, resultado do processo fisiológico produzido dentro da colmeia pelas

glândulas das abelhas cerígenas. A produção desde lipídio ocorre pelo metabolismo das abelhas ao engolirem e digerirem o mel, transformando o alimento em gordura e, em 24 horas, produzem a cera. Inicialmente a cera é líquida ao ser expelida pelas glândulas e se solidifica somente quando entra em contato com a temperatura ambiente. As funções para as abelhas na produção da cera são: para a construção dos favos; para operculação, que é o processo pelo qual as abelhas fecham os alvéolos (de cria e de mel) com uma fina camada de cera; depósito de alimento e desenvolvimento da prole (SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2011).

Este produto natural obtido a partir do favo de mel contém hidrocarbonetos, álcoois, ácidos livres, ésteres e outros compostos, sendo sólido à temperatura ambiente e com ponto de fusão de ~65°C, além de ser insolúvel em água (NGUYEN et al., 2012; SOUZA et al., 2017).

O uso de cera de abelha data da antiguidade e desempenhou um papel importante nesta época em tecnologia, nos campos simbólico e artístico, e na preparação de produtos cosméticos ou medicinais. Além disso, esse lipídio também foi usado por sua hidrofobia, sua plasticidade e suas propriedades curativas. Tradicionalmente, essa cera tem sido utilizada como espessante e umectante na fabricação de pomadas, cremes, batons, e outras formulações de cosméticos. Curiosamente, a cera possui propriedades antimicrobianas, bem como propriedades de proteção solar, com um comprimento de onda absorvente de 220 a 400 nm e um pico máximo absorvente a 292 nm (REGERT, 2001; NGUYEN et al., 2012; SOUZA et al., 2017). Nos povos indígenas do Brasil a cera de abelha é muito difundida na mitologia e em rituais, além de ser utilizada em vários produtos destacam-se na confecção de velas, uso em colagem, vedação (calafetar) e artesanato em geral (SAMPAIO, 2009).

Devido à alta hidrofobicidade e excelente resistência à umidade, a cera de abelha é uma candidata favorável para o desenvolvimento de nanosistemas para aplicações tópicas uma vez que permanece intacta após a incorporação em um creme o/w, combinando as vantagens dos cremes tradicionais ou outra formulação dermatológica (SOUZA et al., 2017).

Nos estudos realizados por Souza et al., (2017) foram preparadas nanopartículas à base de cera de abelha usando a técnica de microemulsão com fusão a quente, incorporada a uma formulação de gel-creme, sem adição de qualquer ingrediente ativo. A formulação foi capaz de diminuir simultaneamente a Perda de Água Transepidérmica (PAT) e aumentar o valor do teor de água do Estrato Córneo (EC) até 28 dias após o tratamento, o que auxilia na proteção da pele em relação as irritações ambientais, irradiação do sol e infecções bacterianas, uma vez que o estrato córneo impede a PAT. Em conclusão, as novas nanopartículas à

base de cera de abelha mostraram potencial de recuperação de barreiras e abre a perspectiva de seu uso comercial como novos ativos naturais ainda inexplorados no campo da dermatologia e cosméticos para o tratamento de doenças de pele com função de barreira da pele danificada.

Considerando sua alta disponibilidade e relativo baixo custo industrial, novas formas de aplicação da cera de abelha se tornam interessantes. Além disso, nos últimos anos, houve um crescente interesse em sistemas naturais de lipídios para produtos dermatológicos devido as suas propriedades físicas, biodegradabilidade e biocompatibilidade com a pele (SOUZA, 2017).

Nos estudos realizados por Attmma et al. (2006) caracterizou-se misturas de cera de abelha e óleo de teobroma com o objetivo de aplicar suas misturas em sistemas de liberação de fármacos tais como NLS e Veículos Lipídicos Nanoestruturados (VLN). Com base nos resultados obtidos, formulações contendo 50% m/m e 75% m/m de óleo de teobroma podem ser aplicados na formulação de NLS e VLN, uma vez que essas matrizes lipídicas possuem características cristalinas que favorecem esses sistemas de administração de fármacos.

2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS REFERENTES AO ESTADO DA ARTE

Baseado no exposto nesta revisão da literatura, faltam pesquisas na área alimentícia referente à encapsulação de óleos essenciais em nanopartículas lipídicas sólidas, tendo como principal vantagem a liberação controlada, que pode auxiliar tanto para aplicações diretas sobre superfície de alimentos, como frutas e verduras, além de também poder ser aplicado na fabricação de embalagens funcionais. Com isso as ceras naturais são ótimas alternativas como suporte para óleos essenciais, devido à afinidade da matriz lipídica, e ainda, sendo possível a produção de nanopartículas lipídicas sólidas naturais com atividades biológicas e antioxidantes ativas, visando futuras aplicações como conservante para a indústria alimentícia.

Baseado nestas considerações, as seguintes seções do presente trabalho de conclusão de curso apresentam os resultados obtidos referente à encapsulação do óleo essencial de cravo em nanopartículas lipídicas de cera de abelha e cera de carnaúba, para posterior aplicação frente a microrganismos de relevância na indústria de alimentos e avaliação da atividade antioxidante.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Neste trabalho, utilizou-se os seguintes reagentes: água destilada; cera de carnaúba e cera de abelha (GC Ceras Indústria e Comércio); surfactante Tween 80 (Sigma-Aldrich); co-estabilizador crodamol GTCC (Alpha Química, Brasil); óleo de cravo com 92% de eugenol (Ferquima indústria e comércio, Brasil).

3.2 PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA E CERA DE CARNAÚBA CARREGADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO

As NLS de cera de carnaúba (CC) e cera de abelha (CA) foram produzidas via emulsificação a quente/ultrassonicação. Inicialmente as fases orgânica e aquosa foram preparadas separadamente. Na fase orgânica adicionou-se a cera (lipídio sólido), o lipídio líquido crodamol e o óleo de cravo nas proporções indicadas nas Tabelas 1 e 2. Em seguida, fez-se a fusão da cera a 10 °C acima do seu ponto de fusão, com auxílio de placa de aquecimento controle de temperatura e agitador magnético. Na fase aquosa o surfactante Tween 80 foi dissolvido em 10 mL de água destilada com auxílio de agitação magnética a quente sob a mesma temperatura utilizada para fundir a fase orgânica.

Após a fusão completa da cera, a fase aquosa foi adicionada à fase orgânica, e então foi realizada uma pré-emulsificação à quente através de agitação magnética de aproximadamente 400 rpm com banho maria para manter adequadamente a temperatura, durante aproximadamente 20 minutos. Em seguida, a pré-emulsão foi submetida à alta energia, com auxílio de uma sonda de Ultrassom (Fischer Scientific, Ultrasonic Dismembrator modelo 500, 400 W) em regime pulsado por 1 minuto (30 s on 10 s off) em amplitude de 50% para redução do tamanho de partícula para a faixa nanométrica. Após isto, resfriou-se a solução durante 5 minutos sob agitação de 400 rpm em 90 mL de água destilada a 4°C, neste procedimento as nanogotas formadas foram completamente ressolidificadas para formação das nanopartículas. Totalizando um volume final de 100 mL de solução de NLS.

O esquema simplificado para o preparo das NLS está representado na Figura 4.

Tabela 1 – Formulações das fases orgânica e aquosa das NLS de Cera de Carnaúba.

Experimento	<i>Fase aquosa</i>		<i>Fase orgânica</i>		
	Água (mL)	Surfactante Tween 80 (g)	Cera (g)	Crodamol (g)	OC (g)
CC1	10	0,3	1	-	-
CC2	10	0,3	2	-	-
CC3	10	0,3	3	-	-
CC4	10	0,3	0,9	0,1	-
CC5	10	0,3	1,8	0,2	-
CC6	10	0,3	2,7	0,3	-
CC7	10	0,3	1,8	0,1	0,1
CC8	10	0,3	1,8	0,05	0,15
CC9	10	0,3	0,9	0,075	0,025
CC10	10	0,3	0,9	0,05	0,05

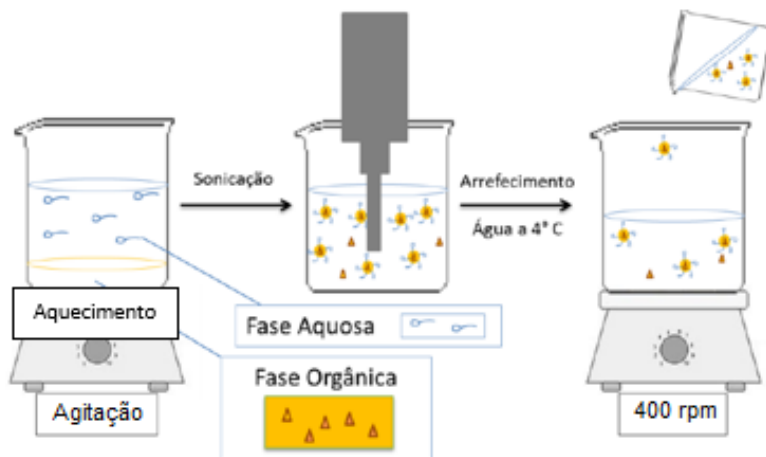
Fonte: Autor (2017).

Tabela 2 – Formulações das fases orgânica e aquosa das NLS de Cera de Abelha.

Experimento	<i>Fase aquosa</i>		<i>Fase orgânica</i>		
	Água (mL)	Surfactante Tween 80 (g)	Cera (g)	Crodamol (g)	OC (g)
CA1	10	0,3	1	-	-
CA2	10	0,3	2	-	-
CA3	10	0,3	3	-	-
CA4	10	0,3	0,9	0,1	-
CA5	10	0,3	1,8	0,2	-
CA6	10	0,3	2,7	0,3	-
CA7	10	0,3	1,8	0,1	0,1
CA8	10	0,3	1,8	0,05	0,15
CA9	10	0,3	1,8	0,02	0,18

Fonte: Autor (2017).

Figura 4 – Esquema da produção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas de Cera de Carnaúba.



Fonte: Adaptado de Meneses (2016).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

3.3.1 Diâmetro e morfologia das nanopartículas

Para determinação do diâmetro médio em relação a intensidade das partículas (D_p) e Índice de Polidispersão (PdI) utilizou-se o equipamento Nanosizer Nano S (Malvern Instruments). Para isso, colocou-se aproximadamente 2mL da solução da NLS obtida em uma cubeta de vidro e fez-se a leitura em 633 nm com um ângulo de 173° em uma temperatura de 25°C , através da técnica de espalhamento de luz dinâmica (*Dynamic Light Scattering technique - DLS*).

A caracterização da morfologia das partículas foi realizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) usando um JEM-1011 (100 kV). As amostras de NLS foram diluídas em água destilada até 0,1% de sólidos, em seguida, uma gota de cada amostra foi colocada em uma grade revestida de carbono e mantida sob condição ambiente por 24 horas para evaporação da água.

As análises para obter o D_p e PdI foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos de Polimerização (LCP), situado no

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. As análises de morfologia das nanopartículas foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação

Para a determinação da Eficiência de Encapsulação (EE), inicialmente, colocou-se 2 mL da solução de NLS em um filtro com corte molecular nominal de 100 kDa (Amicon® Ultra, Millipore) e centrifugou-se por 15 min a 10.000 rpm. Retirou-se uma alíquota de 100 µL do filtrado e transferiu-se para um eppendorf de 2 mL. Em seguida, adicionou-se 1900 µL de álcool etílico a fim de obter a diluição de 1:20. A solução foi colocada em uma cubeta de quartzo e analisada em um Espectrofotômetro UV-VIS (Hitachi) no comprimento de onda 280 nm, no qual o eugenol é absorvido no UV. Através dessa solução foi possível calcular a quantidade de óleo livre na solução, ou seja, o óleo não encapsulado, através da equação da reta do óleo de cravo em etanol previamente determinada por Meneses (2016).

Após a determinação da quantidade de óleo de cravo não encapsulado, foi determinada a EE, que relaciona a quantidade de composto livre com o total de composto que foi adicionado inicialmente. A EE em porcentagem do óleo de cravo nas nanopartículas foi calculada utilizando a Equação 1:

$$EE\% = \frac{(C_{inicial} - C_{livre})}{C_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Sendo $C_{inicial}$ igual à quantidade inicial (µg) de óleo de cravo adicionada na fase orgânica e C_{livre} a quantidade (µg) de óleo de cravo não encapsulado, ou seja, o óleo livre.

As análises de EE do óleo de cravo nas nanopartículas de cera de abelha e carnaúba foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos de Polimerização (LCP), situado no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.3.3 Análise química

Inicialmente, as soluções de NLS foram secas em estufa a 60°C até evaporação total da água presente. Os espectros de absorção das amostras secas foram obtidos através da técnica Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) num espectrômetro Shimadzu (IRPrestige-21) utilizando a técnica da pastilha de KBr à qual foi adicionada aproximadamente 0,2% de amostra. Os espectros das amostras foram tomados na região de comprimento de onda compreendido entre 4000 e 400 cm^{-1} com 32 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

A análise foi realizada no Laboratório de Controle de Processos de Polimerização (LCP), situado no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.3.4 Análise térmica

Inicialmente, as soluções de NLS foram secas em estufa a 60°C até evaporação total da água presente. Então, o comportamento térmico das amostras secas foi analisado usando um DSC 4000 Perkin Elmer, sob atmosfera inerte (20 mL/min), de -60 a 150 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. O histórico térmico foi removido anteriormente à análise, com uma taxa de aquecimento de 20 °C/min e uma taxa de resfriamento de -20 °C/min. Os pontos de fusão foram obtidos da segunda etapa de aquecimento.

As análises foram realizadas na Central de Análises da Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, situado no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DIÂMETRO DE PARTÍCULA E ESTABILIDADE

Observa-se pelos resultados da Tabela 3 que o diâmetro médio de partícula para as formulações que utilizaram a cera de carnaúba ficou entre $121,3 \pm 0,4$ nm e $1489,0 \pm 11,5$ nm e o PdI de $0,082 \pm 0,01$ a $0,517 \pm 0,019$ no dia de produção.

Nas amostras CC1, CC2 e CC3 não havia crodamol, nem óleo de cravo, sendo possível notar que quanto maior a quantidade de cera, maior foi o diâmetro de partícula. Já nas amostras CC4, CC5 e CC6 foi adicionado 10% de crodamol (em relação à massa de cera), mantendo a mesma massa final da fase orgânica dos experimentos CC1, CC2 e CC3, respectivamente. Notou-se que com a adição desse lipídio líquido o Dp diminuiu, além de diminuir o PdI, indicando que a presença de crodamol foi positiva para a obtenção de nanopartículas com menor tamanho e maior homogeneidade. Com isso, os experimentos CC4 e CC5, que obtiveram os menores Dp e PdI, foram os selecionados para incorporação do óleo de cravo na formulação.

Após a incorporação de óleo de cravo nas formulações CC7 e CC8 foi possível visualizar um aumento no Dp, em relação à formulação CC5 (com mesma massa de cera), possivelmente devido à redução da massa de crodamol e adição de óleo de cravo. Enquanto que, as formulações CC9 e CC10 se mantiveram com um baixo Dp e PdI, quando comparado a formulação CC4 (com mesma massa de cera), mesmo reduzindo a massa de crodamol do sistema.

A estabilidade das formulações contendo óleo de cravo foram avaliadas quanto ao Dp e PdI das nanopartículas após 15 dias de estocagem à temperatura ambiente. Nota-se que não houve mudança significativa no Dp e PdI, indicando que as NLS de cera de carnaúba carregadas com óleo de cravo são estáveis dentro desse período e condições de estocagem.

Tabela 3 – Diâmetro médio (Dp) e Índice de polidispersão (PDI) das NLS formadas a partir de cera de carnaúba referente ao 1º dia de produção e após 15 dias de estocagem à temperatura ambiente.

Experimento	<i>Resultados dia 1</i>		<i>Resultados dia 15</i>	
	Dp (nm) ± DV	PdI ± DV	Dp (nm) ± DV	PdI ± DV
CC1	177,5 ± 0,7	0,268 ± 0,009	-	-
CC2	613,1 ± 4,6	0,311 ± 0,021	-	-
CC3	1489 ± 11,5	0,188 ± 0,019	-	-
CC4	121,3 ± 0,4	0,082 ± 0,01	-	-
CC5	303,1 ± 5,0	0,278 ± 0,006	-	-
CC6	513,4 ± 81,9	0,59 ± 0,078	-	-
CC7	522,6 ± 17,1	0,517 ± 0,019	556,1 ± 4,9	0,55 ± 0,023
CC8	571,2 ± 12,5	0,463 ± 0,033	539,8 ± 23,2	0,444 ± 0,065
CC9	125,9 ± 0,5	0,114 ± 0,018	127,6 ± 1,1	0,111 ± 0,001
CC10	150 ± 1,6	0,19 ± 0,002	146,4 ± 0,8	0,177 ± 0,006

Fonte: Autor (2017).

A Tabela 4 mostra os resultados encontrados de Dp e PdI para as formulações de cera de abelha. Nota-se que o Dp variou de 227,2 a 443,1 e o PdI de 0,08 a 0,165 nas análises feitas no 1º dia. Nas amostras CA1, CA2 e CA3 nas quais haviam apenas cera de abelha na fase orgânica, sendo aumentado 100% do valor de cera entre cada uma respectivamente, nota-se que o maior Dp foi encontrado para o experimento com mais cera (CA3) e valores próximos de Dp e PdI para as amostras CA1 e CA2.

Foi adicionado 10% de lipídio líquido (crodamol) em relação a massa total da fase orgânica nas amostras CA4, CA5 e CA6, obtendo a mesma massa final das amostras CA1, CA2 e CA3, respectivamente. Os resultados indicaram que para as formulações de cera de abelha, o crodamol desempenhou um papel similar, mas menos significativo, ao encontrado para as nanopartículas de cera de carnaúba, havendo uma pequena redução do Dp e do PdI. No entanto, a formulação CA5, com menor Dp e PdI foi selecionada para incorporação de óleo de cravo em diferentes concentrações.

Nas amostras CA7, CA8 e CA9 manteve-se a mesma quantidade de cera, e foi variado apenas a quantidade de crodamol e óleo de cravo entre elas, mantendo a mesma massa final da fase orgânica. Foi possível observar que quanto maior a massa de óleo de cravo e menor quantidade de crodamol nas formulações, houve um leve aumento no Dp, com pouca variação do PdI. Indicando que a formulação foi adequada para incorporação de diferentes massas de óleo de cravo.

Quanto à estabilidade após 15 dias de estocagem à temperatura ambiente, houve uma leve variação do Dp e PdI inicial, indicando que as formulações contendo óleo de cravo são estáveis nessas condições e período de estocagem.

Nota-se pelos valores apresentados que ambas as ceras, de abelha e de carnaúba, são adequadas para a encapsulação de óleo de cravo. No entanto, a cera de abelha apresentou valores menores de Dp e PdI quando comparado às NLS produzidas a partir da cera de carnaúba, e uma maior homogeneidade mesmo com variação da formulação. Além disso, foi possível incorporar maiores quantidades de óleo de cravo nas formulações contendo cera de abelha, uma vez que a presença de crodamol não foi tão significativa para redução do Dp (<400 nm) e PdI (<0,2).

Em um estudo realizado por Zheng et al., (2013) resultados similares foram encontrados, quando houve a adição de um lipídio (óleo) líquido na formulação. Os autores investigaram os efeitos de diferentes gorduras e óleos para a formação de NLS pelo método de ultrassonicação, utilizando o Tween 80 como surfactante. A massa total da fase lipídica

(gordura e óleo) foi mantida constante em 5% (m/m) em relação à formulação total, enquanto o teor de óleo variou, sendo que o conteúdo de óleo se refere à porcentagem de óleo líquido na matriz lipídica (gordura e óleo). Foi feita a encapsulação do ácido linoleico conjugado mantendo-se a sua quantidade em 2% em relação ao peso das amostras preparadas. Os lipídios sólidos utilizados foram: o óleo de girassol totalmente hidrogenado, o óleo de colza totalmente hidrogenado, e a mistura de óleo de palma e estearina de palma. Também foi utilizado o óleo líquido de óleo de soja e os triglicerídeos de cadeia média (60% caprílico e 40% ácidos caprínicos). O diâmetro médio final das NLS variou de 150 nm a 350 nm e foi afetado pela presença dos lipídios líquidos, sendo que o aumento de óleo líquido na formulação diminuiu o tamanho da partícula, uma vez que o óleo líquido poderia ser facilmente disperso na fase aquosa, contribuindo para a redução do tamanho das partículas.

A partir disso, pode-se explicar a redução do Dp e PdI das amostras de cera de abelha e de carnaúba na presença de 10% de crodamol. O crodamol é uma mistura de triacilglicerídeos do ácido caprílico e caprílico, líquido à temperatura ambiente. A presença desse lipídio líquido nas formulações foi capaz de reduzir a viscosidade da fase orgânica, diminuindo a resistência das partículas à ruptura durante agitação (emulsão grosseira) e sonicação (redução do tamanho de partícula para a faixa nanométrica), conseqüentemente, favorecendo a redução do Dp e PdI. Resultados similares também foram encontrados por Meneses (2016), que utilizou ácido esteárico e crodamol para formulações de NLS carregadas com óleo de cravo. Houve uma redução no Dp e PdI das nanopartículas quando o crodamol era adicionado na formulação.

Tabela 4 – Diâmetro médio (Dp) e Índice de polidispersão (PdI) das nanopartículas formadas a partir de cera de abelha referente ao 1º dia de produção e após 15 dias de estocagem à temperatura ambiente.

Experimento	<i>Resultados dia 1</i>		<i>Resultados dia 15</i>	
	Dp (nm) ± DV	PdI ± DV	Dp (nm) ± DV	PdI ± DV
CA1	324,0 ± 4,5	0,149 ± 0,009	-	-
CA2	319,6 ± 1,2	0,12 ± 0,023	-	-
CA3	443,1 ± 6,7	0,165 ± 0,038	-	-
CA4	311,7 ± 2,5	0,121 ± 0,046	-	-
CA5	227,2 ± 1,8	0,086 ± 0,019	-	-
CA6	396,3 ± 5,9	0,162 ± 0,013	-	-
CA7	272,2 ± 12,1	0,086 ± 0,010	242,2 ± 0,7	0,088 ± 0,011
CA8	341,5 ± 20,6	0,08 ± 0,021	349,5 ± 0,8	0,056 ± 0,008
CA9	367,9 ± 14,0	0,103 ± 0,038	394,3 ± 4,1	0,116 ± 0,040

Fonte: Autor (2017).

4.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A EE para as NLS de CC foi feita apenas nas amostras CC9 e CC10 pois foram as formulações que obtiveram os menores valores de Dp e Pdi após incorporação do OC, conforme apresentado na Tabela 3. Já para as NLS de CA a EE foi feita nos três experimentos que possuíam OC, pois os valores de Dp e Pdi estão relativamente próximos, conforme apresentado na Tabela 4. A quantificação de óleo de cravo encapsulado foi calculada pela relação da quantidade de óleo de cravo livre na fase aquosa, ou seja, o que não foi encapsulado, fornecendo a EE, conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Eficiência de encapsulação do óleo de cravo nas nanopartículas de cera de carnaúba (CC) e cera de abelha (CA) referente ao 1º dia e após 15 dias de estocagem à temperatura ambiente.

Experimento	EE% ± DV		Concentração de óleo de cravo na solução final de NLS (µg/mL)*
	1º dia	15º dia	
CC9	58,3 ± 0,2	59,0 ± 0,6	25
CC10	60,0 ± 2,2	61,2 ± 3,4	50
CA7	66,2 ± 0,5	66,2 ± 0,4	100
CA8	63,8 ± 0,5	64,5 ± 0,2	150
CA9	62,6 ± 0,1	62,6 ± 0,1	180

* em relação ao volume final da solução (100 mL)

Fonte: Autor (2017).

A EE do óleo de cravo foi determinada apenas para as amostras que obtiveram os Dp e PdI mais homogêneos analisados anteriormente nas Tabelas 3 e 4. Observa-se pelos dados da Tabela 5 que a porcentagem de EE do óleo de cravo nas NLS de cera de carnaúba ficou em torno de $58,3 \pm 0,2$ e $60,0 \pm 2,2$ no primeiro dia e $59,0 \pm 0,6$ e $61,2 \pm 3,4$ após estocagem durante 15 dias. Já a porcentagem de EE de óleo de cravo nas NLS de cera de abelha, ficou em torno de $62,6 \pm 0,1$ e $66,2 \pm 0,5$ para o 1º dia e $62,6 \pm 0,1$ e $66,2 \pm 0,4$ após 15 dias de estocagem. Esses resultados indicam que as nanopartículas formadas por ambas as ceras, são capazes de reter o óleo de cravo no período estudado. Além disso, nota-se que apesar de terem sido utilizadas diferentes massas de óleo de cravo em todas as formulações, a EE ficou próxima para todos os experimentos contendo o óleo essencial.

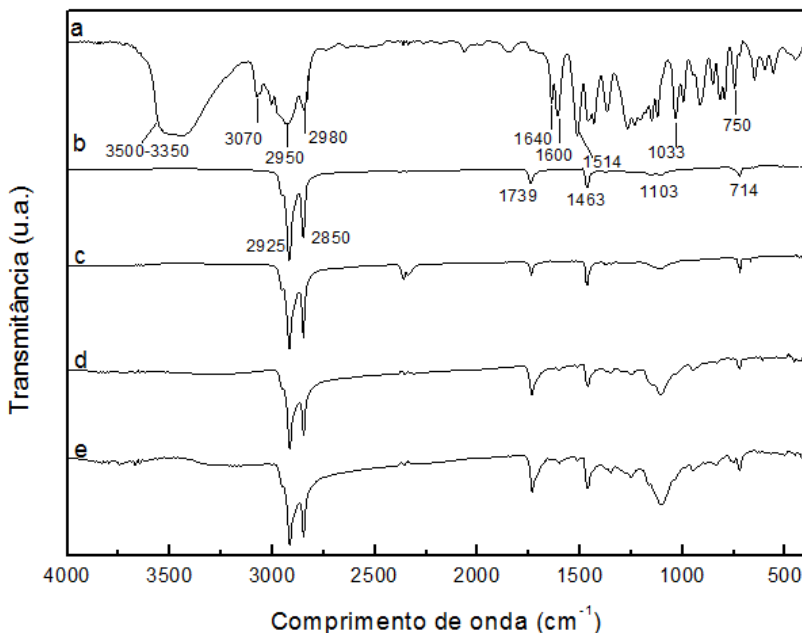
Resultados similares de EE de óleo de cravo foram encontrados nos estudos realizados por Chatterjee et al., (2013), onde o óleo de cravo rico em eugenol foi obtido a partir de brotos de dentes de cravo por extração de SC-CO₂. O óleo foi microencapsulado utilizando maltodextrina e goma arábica usando spray dryer. A microcápsula produzida obteve eficiência máxima de encapsulamento (65%), com composição de óleo de cravo, maltodextrina e goma arábica na proporção de 1: 4,8: 2,4.

4.3 ANÁLISE QUÍMICA

O óleo de cravo puro e as amostras de nanopartículas CC4 e CA5 (sem óleo de cravo) e CC10 e CA9 (com óleo de cravo) foram analisadas em espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier. Os espectros obtidos são mostrados a seguir nas Figura 5.

Na curva *a*, onde está representado o espectro do óleo de cravo puro, observam-se as seguintes bandas de absorção: a primeira banda larga referente ao estiramento O-H entre 3500 a 3350 cm⁻¹, a segunda em 3070 cm⁻¹ referente ao grupo =C-H, a terceira na região de 2950 cm⁻¹ referentes à deformação axial dos grupos CH₂ e CH₃, já em 1640 cm⁻¹ deformação axial fraca é referente ao grupo C=C do alceno. Em 1600 e 1514 cm⁻¹ deformação axial C=C do anel aromático, em 1033 cm⁻¹ banda referente ao grupo C-H aromático e em 750 cm⁻¹ deformação angular fora do plano referente ao grupo C-H do anel aromático (MENESES, 2016).

Figura 5 – Espectros obtidos por FTIR para o óleo de cravo puro (a), CA5 (b), CA9 (c), CC4 (d) e CC10 (e).



Fonte: Autor (2017).

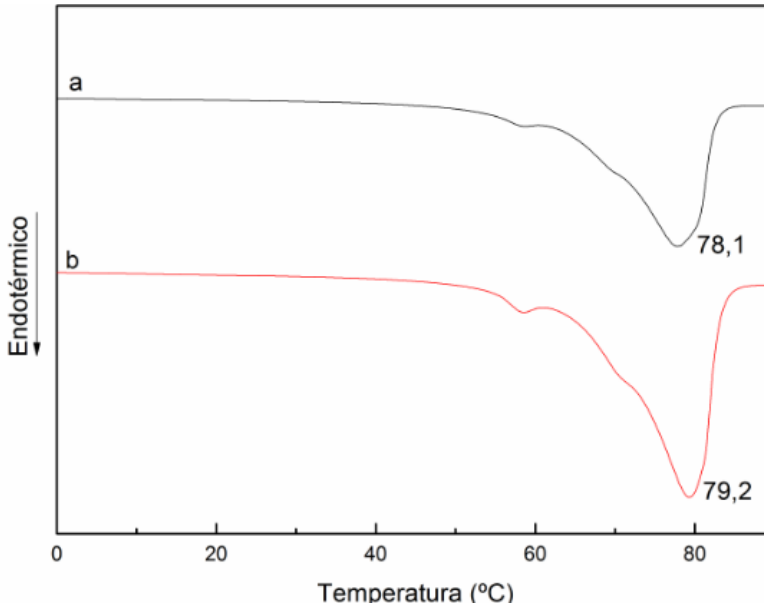
Nas curvas *b*, *c*, *d* e *e* os picos de absorção característicos das ceras de carnaúba e de abelha podem ser visualizados. Os picos nas regiões 2925 e 2850 cm^{-1} são, respectivamente, referentes à vibração simétrica e assimétrica C-H₃ e em 714 cm^{-1} referente a deformação angular assimétrica de C-H características das longas cadeias de hidrocarbonetos (CH₂)_n, indicando a presença do esqueleto carbônico. O pico na região de 1739 cm^{-1} é referente ao estiramento C=O dos grupos carboxílicos, e em 1103 cm^{-1} referente ao estiramento C-O do grupamento éster.

No entanto, não foi possível visualizar nenhum pico característico do eugenol nas curvas *c* e *e*, produzidas com cera de abelha e cera de carnaúba, respectivamente, que possuem óleo de cravo na formulação. Este comportamento provavelmente se deve ao deslocamento e sobreposição de picos do óleo sobre os picos da ceras, comportamento já reportado anteriormente (MADUREIRA et al., 2015; OLIVEIRA, PAULA E PAULA, 2014).

4.4 ANÁLISE TÉRMICA (DSC)

A análise térmica das amostras de cera de carnaúba (CC10 e CC4) e de cera de abelha (CA5 e CA9) foram realizadas por DSC e as curvas obtidas para cada amostra mostrando seus pontos de fusão estão ilustradas nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

Figura 6 – Curvas de DSC mostrando o comportamento de fusão para as amostras contendo cera de carnaúba: (a) CC4 e (b) CC10.

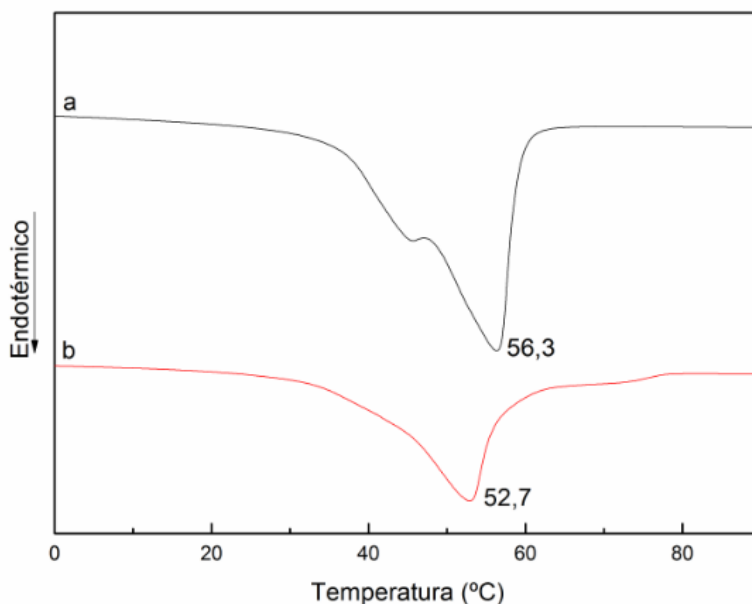


Fonte: Autor (2017).

Nota-se pelas curvas de DSC apresentadas na Figura 6 que o comportamento de fusão das nanopartículas de cera de carnaúba se manteve homogêneo, com pontos de fusão próximos para ambas as amostras CC10 e CC4. É possível visualizar um ombro à esquerda do pico de fusão de ambas as amostras, indicando uma pré-fusão da parte menos cristalina seguida pela fusão da fase altamente cristalina. No entanto, sabe-se que a cera de carnaúba pura possui um ponto de fusão de ~ 85 °C, com isso é possível visualizar que as amostras CC4, formada por cera e crodamol, e CC10, formada por cera, crodamol e óleo de cravo, obtiveram uma pequena redução do ponto de fusão, se comparadas à cera de

carnaúba pura. Essa diferença na temperatura de fusão pode ser atribuída a presença do lipídio líquido crodamol que pode ser responsável por aumentar a quantidade de imperfeições na rede cristalina da cera requerendo menos calor para que ocorra a fusão completa das nanopartículas (MENESES, 2016).

Figura 7 – Curvas de DSC mostrando o comportamento de fusão para as amostras contendo cera de abelha: (a) CA5 e (b) CA9.



Fonte: Autor (2017).

A cera de abelha pura possui um ponto de fusão de ~ 65 °C e como é possível visualizar da Figura 7, as NLS de cera de abelha também apresentaram uma redução no ponto de fusão, em relação a cera pura. Resultado similar ao encontrado para a NLS de cera de carnaúba, e novamente, o crodamol presente em alta quantidade na amostra CA5 (curva a) pode ser responsável por essa modificação na temperatura de fusão. Ainda, é possível visualizar o ombro à esquerda do pico de fusão apenas para a curva a, que contém apenas cera de abelha e crodamol, indicando uma pré-fusão da parte menos cristalina seguida pela fusão da

fase altamente cristalina, sugerindo que o crodamol está reduzindo a cristalinidade da mistura.

Enquanto a curva *b*, correspondente à amostra CA9, que contém cera de abelha, crodamol e óleo de cravo, apresentou apenas um único pico de fusão homogêneo. Essa diferença no comportamento de fusão pode ser atribuída às diferentes massas de crodamol adicionadas a cada uma das formulações, enquanto a amostra CA5 (curva *a*) possui 10% de crodamol (relacionado a massa de cera), a amostra CA9 (curva *b*) possui apenas 1% de crodamol. No entanto, uma grande quantidade de óleo essencial de cravo foi incorporada na amostra CA9 ~18% (relacionado à massa de cera), que neste caso pode ter contribuído para a redução do ponto de fusão da amostra.

4.5 MORFOLOGIA

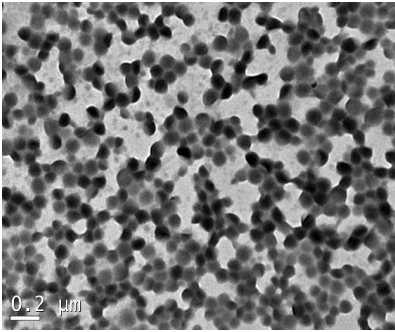
A morfologia das nanopartículas obtidas a partir das formulações CC4 e CC10, para a cera de carnaúba, e CA5 e CA9 para a cera de abelha foram avaliadas a partir de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). As micrografias obtidas estão apresentadas na Figura 8.

As nanopartículas de cera de carnaúba obtiveram formato esférico e como é possível visualizar, a amostra CC4 (Figura 8a) manteve as nanopartículas com um diâmetro de ~100 nm e uma boa homogeneidade, enquanto que a amostra CC10 (Figura 8b) obteve nanopartículas variando o diâmetro entre 80 e 200 nm com uma maior heterogeneidade de diâmetros. Resultados que corroboram com os valores de *D_p* e *PdI* visualizados por DLS (Tabela 3).

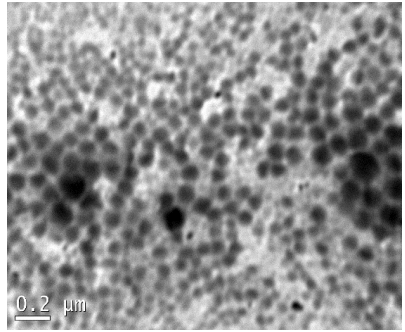
Já as nanopartículas de cera de abelha obtiveram um formato esférico a oval, como é possível visualizar nas Figuras 8c e 8d. Os diâmetros de partícula tiveram uma maior variação, em relação as nanopartículas de cera de carnaúba, ambas as amostras CA5 e CA9 tiveram diâmetros variando entre 200 e 600 nm, aproximadamente, com uma maior heterogeneidade de diâmetros. Esses resultados também corroboram com os valores de *D_p* e *PdI* visualizados por DLS (Tabela 4).

Figura 8 – Micrografias obtidas por TEM das amostras de nanopartículas: (a) CC4, (b) CC10, (c) CA5 e (d) CA9.

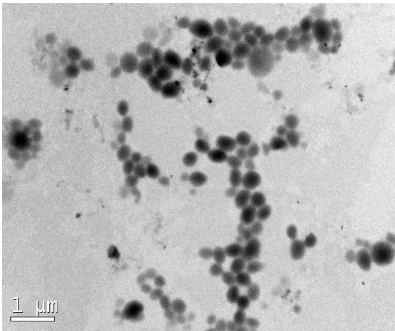
a



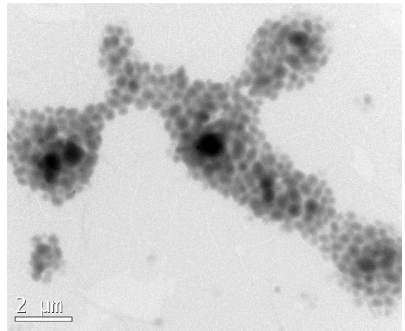
b.



c



d



Fonte: Autor (2017).

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com óleo de cravo em várias concentrações distintas foram produzidas via emulsificação à quente seguida de ultrassonicação e caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, eficiência de encapsulação, propriedades químicas e propriedades térmicas.

Várias formulações foram preparadas variando a concentração de cera de abelha ou carnaúba, crodamol e óleo de cravo. Observou-se um diâmetro médio de partícula na faixa nanométrica para todas as formulações exceto na que possuía apenas a cera de carnaúba em sua fase orgânica e em maior concentração (3 gramas), morfologia esférica a oval e estabilidade garantida após 15 dias de estocagem à temperatura ambiente. Além disso, a cera de abelha apresentou valores menores de diâmetro médio de partícula e índice de polidispersão quando comparado às nanopartículas lipídicas sólidas produzidas a partir da cera de carnaúba, bem como uma maior homogeneidade mesmo com variação da formulação. A quantidade de cera e de crodamol adicionada na fase orgânica apresentou impacto direto no diâmetro médio de partícula e no índice de polidispersão, e no comportamento térmico das nanopartículas.

Tanto as nanopartículas de cera de carnaúba quanto as de cera de abelha se apresentaram eficientes na incorporação de óleo de cravo com eficiência de encapsulação variando entre 58 e 66%. Estes valores foram obtidos em amostras com diferentes massas de óleo de cravo nas formulações, sendo que as nanopartículas de cera de abelha foram mais eficazes para incorporar uma maior massa de óleo de cravo.

A caracterização térmica das nanopartículas indicou um ponto de fusão reduzido comparado às ceras puras, redução atribuída à presença do lipídio líquido crodamol, que pode ser responsável por aumentar a quantidade de imperfeições na rede cristalina da cera requerendo menos calor para que ocorra a fusão completa das nanopartículas.

Os resultados obtidos apontam que o método e as ceras utilizadas são viáveis para a produção de nanopartículas lipídicas sólidas e para a encapsulação de óleo de cravo e, possivelmente, outros óleos essenciais.

REFERÊNCIAS

- ATTAMA, A.A.; SCHICKE, B.C.; MULLER-GOYMANN, C.C. **Further characterization of theobroma oil–beeswax admixtures as lipid matrices for improved drug delivery systems.** v. 64, p. 294–306, 2006.
- BAJALAN, I.; JAVADIAN, M.; ZARINKOOB, S.; DALVAND, H. **Antibacterial activity of the extract of oak (*Quercus persica*) fruits.** Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences, v. 3, p. 62-65, 2014.
- CARVALHO, J.N.F.; GOMES, J.M.A. **Dinâmica econômica do Sistema agroindustrial da cera de carnaúba no Piauí.** IGEPEC, TOLEDO, v. 21, n.1, p. 48-65, 2017.
- CARVALHO, F.P.A. **Eco-eficiência na produção de pó e cera de carnaúba no município decampo maior (pi).** Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Núcleo de Referência em Ciências Ambientais do Trópico Ecotonal do Nordeste (TROPEN), Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2005.
- CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER, P. **Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods.** Current Opinion in Biotechnology n. 18, p. 184–190, 2007.
- CHATTERJEE, C.; BHATTACHARJEE, P. **Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: Shelf-life and frying stability of soybean oil.** Journal of Food Engineering, n. 117, p. 545-550, 2013.
- DEVI, K.P.; NISHA, S.A.; SAKTHIVEL, S.; PANDIAN, S.K. **Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane.** Journal of Ethnopharmacology, v.130, p.107-115, 2010.
- DIMA, S.; DIMA, C.; IORDACHESCU G. **Encapsulation of functional lipophilic food and drug biocomponents.** Food Eng, n. 7, p. 417-438, 2015.

DORĐEVIĆ, V.; BALANČ, B.; BELŠČAKCVITANOVIĆ, A.; LEVIĆ, S., TRIFKOVIĆ, K.; KALUŠEVIĆ, A.; KOSTIĆ, I.; KOMES, D.; BUGARSKI, B.; NEDOVIĆ, V. **Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds.** *Food Engineering Reviews*, v. 7, p.452–490, 2015.

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

GARG, A.; SINGH, S. **Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers.** *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, v. 87, n. 2, p. 280–8, 2011.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. **Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 114, p. 392-397, 2014.

GUENETTE, S. A.; RODD, A.; MARIER, J. F.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. **Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats.** *European Journal of Pharmacology*, v. 562, p. 60–67, 2007.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. **Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts.** *Journal of Applied Microbiology*, n. 86, p. 989-990, 1999.

KHERADMANDNIA, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; NOSRATI, M.; ATYABI, F. **Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, n. 6, p. 753 – 759, 2010.

LACERDA, S. P.; **Carreador lipídico nanoestruturado à base de cera de carnaúba: desenvolvimento, caracterização e uso na encapsulação de benzofenona-3.** *Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências de Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.*

LEDRA, C. G. A. **Preparação de ésteres de aroma catalisada por lipass imobilizadas em filme de amido de batata**. Relatório parcial da disciplina de estágio supervisionado II (QMC 5512), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MACHADO, T. O. **Synthesis of Poly (thioether-ester) nanoparticles derived from renewable resources via thiol-ene polymerization in miniemulsion**. 2015. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

MADUREIRA, A. R.; CAMPOS, D. A.; FONTE, O.; NUNES, S.; REIS, F.; GOMES, A. M.; SARMENTO, B.; PINTADO, M. M. **Characterization of solid lipid nanoparticles produced with carnauba wax for rosmarinic acid oral delivery**. RSC Advances, v. 5, p. 22665–22673, 2015.

MAEDA, J. A.; BOVI, M. L. A.; BOVI, O. A.; DO LAGO, A. A. **Craveiro-da-índia: características físicas das sementes e seus efeitos na germinação e desenvolvimento vegetativo**. Bragantia, Campinas, v. 49, n. 1, p. 23-36, 2010.

MENESES, A. C. **Encapsulação de óleo de cravo em nanopartículas lipídicas e poliméricas em sistema livre de solvente**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MOLINA, C. V.; **Beta-caroteno encapsulado em micropartículas lipídicas sólidas: avaliação tecnológica e sensorial da incorporação em iogurte**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2014.

NESSEEM, D. **Formulation of sunscreens with enhancement sun protection factor response based on solid lipid nanoparticles**. International Journal of Cosmetic Science, v.33, p.70-79, 2011.

NGUYEN, H. M.; HWANG, I.; PARK, J.; PARK, H. **Photoprotection for deltamethrin using chitosan-coated beeswax solid lipid nanoparticles.** Society of Chemical Industry, 2012.

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

PEREIRA, T. **Microencapsulação do óleo eugenol pelo método de spray drying.** TCC (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Curso de Química. Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PIRBALOUTI, A. G.; HOSSAYNI, I.; SHIMARDI, H. A. **Essential oil variation, antioxidant and antibacterial activity of mountain fennel (*Zaravschanica membranacea* (Boiss.) M. Pimen).** Industrial Crops and Products, n. 50, p. 443– 448, 2013.

PRIYANKA, K.; SATHALI, A. H. **Preparation and Evaluation of Montelukast Sodium Loaded Solid Lipid Nanoparticles.** J. Young Pharmacists, v. 4, n. 3, p. 129- 137, 2012.

REGERT, M.; COLINART, S.; DEGRAND, L.; DECAVALLAS, O. **Chemical alteration and use of beeswax through Time: accelerated ageing tests and analysis of Archaeological samples from various Environmental contexts.** Archaeometry, v.43, n. 4, p.549-569, 2001.

RIBES, S.; FUENTES, A.; TALENS, P.; BARAT, J. M. **Use of oil-in-water emulsions to control fungal deterioration of strawberry jams.** Food Chemistry, n. 211, p. 92–99, 2016.

ROSSAN, M. R. **Preparação e caracterização de micro e nanopartículas lipídicas sólidas para aplicação em cosméticos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Área de Concentração Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos Campinas, 2011.

SÁ, A. G. A. **Determinação da atividade antioxidante dos óleos essenciais de canela (*Cinnamomum cassia*) e cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*) para aplicação no aumento da vida útil de óleo de soja.**

Trabalho de Conclusão de Curso em Graduação de Engenharia de Alimentos –Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

SAMPAIO, J.A.; CASTRO, M.S.; SILVA, F.O. **Uso da cera de abelhas pelos índios pankararé no raso da Catarina, Bahia, Brasil.** Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro, v. 67, n.1-2, p.3-12, 2009.

SILVA, M.C; AQUINO, I.S; ABRAMSON, C.I; SANTOS, J.W. **Use of drones (*Apis mellifera* L.) in the detection of adulterated beeswax.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 37, n.6, p. 501-503, 2000.

SILVA, M.J.A. **Lipozyme tl im como catalisador na síntese de acetato de eugenila via acetilação do óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) em sistema livre de solvente.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

SILVA, R.M.V.; SOUZA, D.N. **A Model for the Characterization and Selection of Beeswaxes for use as base Substitute Tissue in Photon Teletherapy.** International Journal of Mathematical, Computational, Physical, Electrical and Computer Engineering, v. 5, n. 8, 2011.

SOUZA, C.; FREITAS, A. P.; CAMPOS, P. M. B. G. **Topical Formulation Containing Beeswax-Based Nanoparticles Improved In Vivo Skin Barrier Function.** American Association of Pharmaceutical Scientists, 2017.

TEIXEIRA, B.; MARQUESA, A.; RAMOSA, C.; NENGC, N. R.; NOGUEIRAC, J. M.F.; SARAIVAB, J. A.; NUNESA; M.L. **Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils.** Industrial Crops and Products, n. 43, p. 587–595, 2012.

VILLALOBOS-HERNÁNDEZ, J.R.; MÜLLER-GOYMAN, C.C. **Novel nanoparticulate carrier system based on carnauba wax and decyl oleate for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous**

media. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 60, p.113-122, 2005.

ZHENG, M.; FALKEBORG, M.; ZHENG, Y.; YANG, T.; XU, X. **Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core.** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, n. 430, p. 76-84, 2013.

ZIZOVIC, I.; STAMENIĆ, M.; ORLOVIĆ, A.; SKALA, D. **Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: mathematical modelling on the micro-scale.** Journal of Supercritical Fluids, v.39, p.338-346, 2007.