

UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE CHAPECÓ
(UNOCHAPECÓ)

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão da Inovação

THAÍS KAROLINE CARNIEL

MICROENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL GERANIOL COM
POLICAPROLACTONA

Chapecó – SC, 2019

Thaís Karoline Carniel

MICROENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL GERANIOL COM
POLICAPROLACTONA

Dissertação apresentada à Unochapecó como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Tecnologia e Gestão da Inovação.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Antônio Fiori

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Micheli Zanetti

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Francieli Dalcanton



MICROENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL GERANIOL COM POLICAPROLACTONA

THAÍS KAROLINE CARNIEL

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia e Gestão d Inovação, **APROVADA** em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Tecnologia e Gestão da Inovação da Universidade Comunitária da Região de Chapecó.

Banca examinadora:

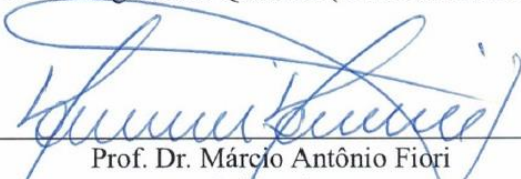
Orientador: Prof. Márcio Antônio Fiori
Dr. em Engenharia Química (UNOCHAPECÓ)

Coorientadora: Prof.^a Micheli Zanetti
Dr.^a em Engenharia Química (UNOCHAPECÓ)

Coorientadora: Prof.^a Francieli Dalcanton
Dr.^a em Engenharia de Alimentos (UNOCHAPECÓ)

Membro: Prof. Elidio Angioletto
Dr. em Ciência e Engenharia de Materiais (UNESC)

Membro: Prof. Gustavo Lopes Colpani
Dr. em Engenharia Química (UNOCHAPECÓ)



Prof. Dr. Márcio Antônio Fiori
Orientador



Prof. Dr. Luciano Luiz Silva

Coordenador do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Tecnologia e Gestão da Inovação

Chapecó - SC, 15 de março de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Roseli A. Teixeira - CRB 14/631 - Biblioteca Universitária Unochapecó

C289m Carniel, Thaís Karoline

Microencapsulação do óleo essencial geraniol com Policaprolactona/ Thaís Karoline Carniel; Prof. Dr. Márcio Antônio Fiori (Orientador)..-- Chapecó, SC, 2019.

84 f.: il. color.; 30 cm.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão da Inovação). Universidade Comunitária da Região de Chapecó, ano 2019.

Inclui bibliografias

1. Microencapsulação. 2. Geraniol. 3. Policaprolactona.
I. Fiori, Márcio Antônio. II. Título.

CDD: Ed. 23 -- 641.612

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Rosani, meu pai, Egidio, minha irmã, Kelly Cristina e a toda minha família, pelo incentivo, amor e carinho incondicionais que sempre me deram. Amo vocês!

Ao meu namorado João Carlos, por entender minha ausência, por me apoiar, por me tornar uma pessoa melhor e sempre estar ao meu lado para enfrentar os obstáculos que a vida nos proporciona.

À minha amiga Pâmela Fagundes, por estar comigo nessa jornada, pelos momentos de alegria, tristezas, pelo apoio e por nunca ter hesitado em me ajudar quando necessário.

Ao meu orientador Márcio Antônio Fiori, por todos os ensinamentos, pela confiança, pelo auxílio, e por ser um exemplo de profissional, dedicado e muito sábio.

À coorientadora Micheli Zanetti, por ser esse ser humano fantástico, exemplo de profissional, mulher e agora mãe. Pela sua competência, orientação, por sempre estar disposta em ajudar. Obrigada por sempre estar presente e fazer acontecer.

À coorientadora Francieli Dalcanton, por todo o suporte fornecido no decorrer deste trabalho, pelo incentivo, pelas palavras de apoio e por toda a sua calma.

À Ana Carolina Vivan, Lais Regina Mazon e Monique Hall, por auxiliarem no andamento dos experimentos.

À Unochapecó pela infraestrutura fornecida, ao Programa UNIEDU Pós-Graduação, pelo incentivo financeiro e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão da Inovação pelo suporte fornecido no decorrer da pesquisa.

Meu muito obrigado!

RESUMO

O setor alimentício tem aumentado sua preocupação e interesse com estudos e aplicações de compostos naturais com a função de conservar os alimentos. O uso de agentes antimicrobianos naturais, provenientes de óleos essenciais como o geraniol, tem sido uma opção atraente neste campo. O geraniol é um álcool terpênico e sua propriedade antimicrobiana potencializa sua utilização como aditivo para a indústria de alimentos. No entanto, sua utilização é limitada devido à instabilidade frente às degradações químicas, causadas por oxidação e elevadas temperaturas. Com vistas à proteção do geraniol a microencapsulação polimérica pode ser uma maneira de evitar a degradação destes compostos ativos naturais. Neste contexto, esse trabalho teve como principal objetivo microencapsular o óleo essencial geraniol com policaprolactona (PCL) e avaliar a atividade antimicrobiana. Estudos microbiológicos do geraniol e da policaprolactona foram realizados empregando-se as técnicas de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e difusão em meio sólido a partir de orifício, no caso das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e difusão em meio sólido para os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. O óleo essencial geraniol apresentou uma CIM de $3,745 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ para as bactérias com atividade antibacteriana e antifúngica para as bactérias e os fungos testados. A microencapsulação foi realizada por meio da técnica de polimerização em miniemulsão com evaporação de solvente e obteve eficiência de $95,44\% \pm 0,60$ de encapsulamento do geraniol em PCL. As microcápsulas foram obtidas com um tamanho médio de $0,1484 \mu\text{m}$ e com um índice de polidispersão de $0,122$. Os resultados de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) confirmaram a formação de cápsulas esféricas de PCL revestindo o óleo essencial, com dimensões entre 50 nm e 500 nm . A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrou que as microcápsulas liofilizadas formam aglomerados folhais constituídos por dezenas de microcápsulas. Os resultados obtidos da FTIR confirmam a encapsulação do geraniol na matriz polimérica das microcápsulas mantendo a integridade química dos compostos PCL e geraniol. A partir de análises de TGA foi possível comprovar a proteção térmica do geraniol pelo revestimento de PCL, visto que a temperatura de volatilização do óleo aumentou em $100 \text{ }^\circ\text{C}$ quando comparado ao óleo sem encapsulamento. Através da técnica de DSC observou-se que a presença do geraniol proporciona a redução de $26,5\%$ no grau de cristalinidade do revestimento de PCL. Suspensões aquosas de microcápsulas carregadas com geraniol e armazenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ apresentaram boa estabilidade ao longo de 60 dias e resultados de testes de liberação com temperatura demonstraram que esta pode ser um gatilho para liberar o composto ativo das microcápsulas. Os resultados obtidos neste estudo comprovam que o óleo essencial geraniol é um agente antibacteriano e antifúngico, sendo o mesmo um composto passível de microencapsulação, o que poderá embasar trabalhos futuros para a aplicação de um aditivo antimicrobiano na indústria.

Palavras-chave: microencapsulação, geraniol, policaprolactona, aditivo.

ABSTRACT

The food industry has increased its concern and interest with studies and applications of natural compounds with the function of food preservation. The use of natural antimicrobial agents, derived from essential oils such as geraniol, has been an attractive option in this field. Geraniol is a terpene alcohol and its antimicrobial property enhances its use as an additive for the food industry. However, their use is limited due to instability against chemical degradations, caused by oxidation and high temperatures. In view of the protection of geraniol, polymer microencapsulation may be one way of avoiding the degradation of these natural active compounds. In this context, the main objective of this work was to microencapsulate the geraniol essential oil with polycaprolactone (PCL) and to evaluate the antimicrobial activity. Microbiological studies of geraniol and polycaprolactone were carried out using Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and solid-hole diffusion techniques in the case of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria, and solid media diffusion for fungi *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. Geraniol essential oil had a MIC of $3.745 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ for bacteria with antibacterial and antifungal activity for the bacteria and fungi tested. Microencapsulation was carried out using a miniemulsion polymerization technique with solvent evaporation and obtained an efficiency of 95.44 ± 0.60 encapsulation of geraniol in PCL. The microcapsules were obtained with a mean size of $0.1444 \mu\text{m}$ and a polydispersity index of 0.122. The Transmission Electron Microscopy (TEM) results confirmed the formation of PCL spherical capsules coating the essential oil, ranging from 50 nm to 500 nm. The Scanning Electron Microscopy (SEM) technique showed that lyophilized microcapsules form foliar agglomerates composed of dozens of microcapsules. The results obtained from the FTIR confirm the encapsulation of geraniol in the polymer matrix of the microcapsules while maintaining the chemical integrity of the PCL and geraniol compounds. From the TGA analysis, it was possible to prove the thermal protection of geraniol by PCL coating, since the oil volatilization temperature increased by $100 \text{ }^\circ\text{C}$ when compared to the non-encapsulated oil. The DSC technique showed that the presence of geraniol provides a 26.5% reduction in the degree of crystallinity of the PCL coating. Aqueous suspensions of microcapsules loaded with geraniol and stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ showed good stability over 60 days and the results of temperature release tests demonstrated that this could be a trigger to release the active compound from the microcapsules. The results obtained in this study confirm that the geraniol essential oil is an antibacterial and antifungal agent, being a microencapsulation susceptible compound, which may support future work for the application of an antimicrobial additive in the industry.

Keywords: microencapsulation, geraniol, polycaprolactone, additive.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do geraniol	20
Figura 2 – Comparação do modelo celular entre os tipos de microencapsulação: (b) microcápsula e (c) microesfera.....	22
Figura 3 – Esquema representativo do processo de polimerização em miniemulsão para a obtenção de microcápsulas	24
Figura 4 – Esquema representativo para a formação de miniemulsão por ultrassom.....	24
Figura 5 – Estrutura química da policaprolactona (PCL)	25
Figura 6 – Fluxograma resumindo a estratégia para a pesquisa.....	28
Figura 7 – Microplacas para determinação da concentração inibitória mínima.....	30
Figura 8 – Procedimento para atividade antibacteriana por difusão em meio sólido a partir de orifício.....	32
Figura 9 – Procedimento para atividade antifúngica por difusão em meio sólido a partir de orifício.....	33
Figura 10 – Esquema de obtenção das microcápsulas de PCL-Geraniol	36
Figura 11 – Procedimento de teste de liberação com temperatura.....	40
Figura 12 – Testes de CIM para geraniol com concentração de inóculo de 10^8 UFC·mL ⁻¹ : (a) <i>Staphylococcus aureus</i> e (b) <i>Escherichia coli</i>	42
Figura 13 – Testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para o geraniol puro com inóculo 10^8 UFC·mL ⁻¹ : (a) <i>Staphylococcus aureus</i> e (b) <i>Escherichia coli</i>	43
Figura 14 – Testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para o polímero PCL com concentração de inóculo de 10^8 UFC·mL ⁻¹ : (a) <i>Staphylococcus aureus</i> e (b) <i>Escherichia coli</i>	44
Figura 15 – Testes de difusão em meio sólido a partir de orifício com concentração de inóculo 10^5 esporos·mL ⁻¹ : (a) <i>Candida albicans</i> – Geraniol puro; (b) <i>Aspergillus niger</i> – Geraniol puro; (c) <i>Candida albicans</i> – Padrão e (d) <i>Aspergillus niger</i> – Padrão.....	45
Figura 16 – Testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para o polímero PCL com concentração de inóculo 10^5 esporos·mL ⁻¹ : (a) <i>Candida albicans</i> e (b) <i>Aspergillus niger</i>	46
Figura 17 – Espectros característicos de UV-Vis do geraniol puro solubilizado com diferentes concentrações ($1,000 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ até $0,150 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) em diclorometano	47
Figura 18 – Curva de calibração da concentração do composto geraniol com a magnitude do pico característico do geraniol puro em 240 nm no espectro de UV-Vis.....	48

Figura 19 – Espectros de UV-Vis obtidos para o polímero PCL diluído com diferentes concentrações ($3,4738 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ até $0,3970 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em diclorometano.....	49
Figura 20 – Curva de calibração da concentração de polímero PCL com a magnitude do pico característico do PCL puro em 228 nm no espectro de UV-Vis	50
Figura 21 – Distribuição de tamanho médio de partícula (Dp) e valor Índice de polidispersão (PDI) para microcápsulas de (a) PCL sem geraniol e (b) PCL com geraniol	52
Figura 22 – Imagens de MET obtidas para microcápsulas de PCL-Geraniol, com ampliação de 15000 vezes	53
Figura 23 – Imagens de MET obtidas para microcápsulas de PCL-Geraniol: (a) ampliação de 31000 vezes e (b) ampliação de 53000 vezes.....	54
Figura 24 – Imagem de MEV-FEG obtidas para as microcápsulas de PCL sintetizadas em meio contendo geraniol, com ampliação de 2000 vezes	55
Figura 25 – Imagens de MEV-FEG obtidas para as microcápsulas de PCL sintetizadas em meio contendo geraniol: (a) ampliação de 10000 vezes e (b) 20000 vezes	56
Figura 26 – Espectro na região do infravermelho, FTIR obtidos para o PCL, geraniol e microcápsulas de PCL-Geraniol.....	57
Figura 27 – Espectro na região do infravermelho (FTIR) obtido para o PCL, geraniol e para as microcápsulas de PCL-Geraniol. Intervalo de 3800 a 2400 cm^{-1}	58
Figura 28 – Espectro na região do infravermelho (FTIR) obtido para o PCL, geraniol e para as microcápsulas de PCL-Geraniol. Intervalo de 1900 à 500 cm^{-1}	59
Figura 29 – Termograma de TGA e a diferencial do termograma de TGA para o geraniol puro	60
Figura 30 – Termograma de TGA e a diferencial do termograma de TGA para o PCL puro	61
Figura 31 – Curva de DSC obtida para o PCL puro com as curvas de aquecimento e de resfriamento	62
Figura 32 – Termograma de TGA e a diferencial do termograma de TGA para as microcápsulas de PCL-Geraniol	63
Figura 33 – (a) Termograma de DSC obtido para as microcápsulas de PCL-Geraniol com as curvas de aquecimento e de resfriamento e (b) comparação dos termogramas de DSC para o segundo aquecimento das microcápsulas de PCL-Geraniol e PCL puro.....	64
Figura 34 – Valores médios de tamanho médio de partícula para as microcápsulas de PCL-Geraniol em suspensão ao longo do tempo	66

Figura 35 – Valores do índice de polidispersão determinados para as suspensões contendo as microcápsulas de PCL-Geraniol ao longo do período de testes de 60 dias	66
Figura 36 – Valores de potencial zeta (ζ) determinados para suspensões de microcápsulas de PCL-Geraniol testadas por diferentes tempos durante o período de 60 dias.....	67
Figura 37 - Valores de pH para as suspensões de microcápsulas de PCL-Geraniol submetidas aos testes de estabilidade química pelo período de 60 dias	68
Figura 38 – Valores de percentual de geraniol encapsulado nas microcápsulas de PCL-Geraniol ao longo do período de 60 dias em suspensão.....	68
Figura 39 – Concentração de geraniol liberada com a exposição das microcápsulas de PCL-Geraniol a diferentes temperaturas e períodos de tempo	69
Figura 40 – Resultados dos testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para microcápsulas de PCL-Geraniol, sem tratamento térmico, com inóculo 10^8 UFC·mL ⁻¹ : (a) <i>Staphylococcus aureus</i> e (b) <i>Escherichia coli</i>	71
Figura 41 – Resultados dos testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para microcápsulas de PCL sem geraniol com tratamento térmico em 60 °C a 3 h, com inóculo 10^8 UFC·mL ⁻¹ : (a) <i>Staphylococcus aureus</i> e (b) <i>Escherichia coli</i>	72
Figura 42 – Resultados dos testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para as microcápsulas de PCL-Geraniol após o tratamento térmico com 60 °C a 3 h com inóculo 10^8 UFC·mL ⁻¹ : (a) <i>Staphylococcus aureus</i> e (b) <i>Escherichia coli</i>	73
Figura 43 – Resultados dos testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para microcápsulas de PCL-Geraniol sem o tratamento térmico com concentração de inóculo 10^5 esporos·mL ⁻¹ : (a) <i>Candida albicans</i> e (b) <i>Aspergillus niger</i>	74
Figura 44 – Resultados dos testes de difusão em meio sólido a partir de orifício, com tratamento térmico, para microcápsulas de PCL-Geraniol com concentração de inóculo 10^5 esporos·mL ⁻¹ : (a) <i>Candida albicans</i> e (b) <i>Aspergillus niger</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração de geraniol para cada linha da microplaca	30
Tabela 2 – Concentrações de Geraniol e de Policaprolactona utilizadas para construção do espectro de absorção em UV-Vis.....	34
Tabela 3 – Formulação utilizada para a produção das microcápsulas pelo método de polimerização em miniemulsão com evaporação de solvente.....	35
Tabela 4 – Eficiência de encapsulação (EE%), para diferentes relações mássicas de PCL e geraniol	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. gattii</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.P.	Desvio Padrão
Dp	Diâmetro de partícula
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
EE	Eficiência de Encapsulação
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NCR	<i>National Cash Register</i>
<i>P. verrucosum</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
PCL	Policaprolactona
PdI	Índice de polidispersão
ζ	Potencial zeta
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. thyphimurium</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>
TGA	Termogravimetria
TTC	<i>2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 COMPOSTO GERANIOL	20
3.2 MICROENCAPSULAÇÃO	21
3.3 ENCAPSULAÇÃO COM POLÍMERO POLICAPROLACTONA (PCL)	25
3.4 SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DO COMPOSTO ATIVO	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 MATERIAIS	28
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS GERANIOL E PCL	29
4.2.1 Avaliação antibacteriana	29
4.2.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do geraniol	29
4.2.1.2 Ensaio de difusão em meio sólido a partir de orifício	31
4.2.2 Avaliação antifúngica	32
4.2.3 Espectrofotometria de ultravioleta visível (UV-Vis)	33
4.3 OBTENÇÃO DAS MICROCAPSULAS DE PCL-GERANIOL	34
4.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL GERANIOL EM PCL	36
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCAPSULAS DE PCL-GERANIOL	37
4.5.1 Tamanho médio de partículas (Dp), índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta (ζ)	37
4.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	38
4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG)	38
4.5.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	38
4.5.5 Termogravimetria (TGA)	38

4.5.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	39
4.5.7 Estabilidade das microcápsulas de PCL-Geraniol em suspensão	39
4.5.8 Teste de liberação com temperatura	40
4.5.9 Avaliação antibacteriana das microcápsulas	41
4.5.10 Avaliação antifúngica das microcápsulas	41
4.6 TÉCNICAS DE ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS GERANIOL E PCL	42
5.1.1 Avaliação antibacteriana	42
5.1.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do geraniol (CIM)	42
5.1.1.2 Ensaio de difusão em meio sólido a partir de orifício	43
5.1.1.2.1 Geraniol	43
5.1.1.2.2 Policaprolactona (PCL)	44
5.1.2 Avaliação antifúngica	45
5.1.2.1 Geraniol	45
5.1.2.2 Policaprolactona (PCL)	46
5.1.3 Espectrofotometria de ultravioleta visível (UV-Vis)	47
5.1.3.1 Geraniol	47
5.1.3.2 Policaprolactona (PCL)	49
5.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO GERANIOL EM PCL	50
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE PCL-GERANIOL	51
5.3.1 Tamanho médio de partículas (Dp) e índice de polidispersão (PdI)	51
5.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	53
5.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG)	55
5.3.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	56
5.3.5 Termogravimetria (TGA) dos compostos puros geraniol e PCL	59

5.3.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos compostos puros geraniol e PCL	61
5.3.7 Termogravimetria (TGA) das microcápsulas.....	62
5.3.8 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) das microcápsulas PCL-Geraniol	64
5.3.9 Estabilidade das microcápsulas de PCL-Geraniol em suspensão	65
5.3.10 Teste de liberação com temperatura	69
5.3.11 Propriedade antibacteriana das microcápsulas de PCL-Geraniol.....	70
5.3.11.1 Sem tratamento térmico	70
5.3.11.2 Com tratamento térmico	71
5.3.12 Propriedade antifúngica das microcápsulas de PCL-Geraniol	73
5.3.12.1 Sem tratamento térmico	73
5.3.12.2 Com tratamento térmico	74
6 CONCLUSÃO	76
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	77
REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Estudos recentes mostram que muitos dos conservantes químicos sintéticos de alimentos são tóxicos aos seres humanos e precisam ser empregados com restrição de concentração, de acordo com as legislações vigentes. Estes indícios prejudiciais à saúde humana têm despertado cada vez mais a preocupação e o interesse de pesquisadores quanto às limitações de aplicação destes compostos e têm motivado estudos direcionados a aplicações de conservantes naturais nos alimentos (FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008; PRAKASH et al., 2015).

Porém, o uso dos conservantes sintéticos ainda é imprescindível e muito empregado pelo setor de alimentos industrializados por terem excelente eficiência na inibição do crescimento de microrganismos em produtos embalados, incluindo bactérias, vírus e fungos (JANJARASSKUL et al., 2016). O uso de conservantes se faz necessário para prolongar o tempo de armazenamento dos alimentos com a eliminação e inibição de microrganismos, sendo assim, o uso de agentes antimicrobianos naturais se torna uma opção atraente para substituir os conservantes sintéticos.

Os compostos antimicrobianos naturais estão presentes nas plantas, animais, bactérias, algas e em fungos, normalmente na forma de óleos essenciais. Estes óleos têm apresentado propriedades antimicrobianas capazes de inibir o crescimento de agentes patogênicos bacterianos e fúngicos de origem alimentar. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de plantas deve-se, normalmente, à presença de componentes fenólicos, que são efetivos contra uma grande quantidade de tipos de bactérias, além de serem efetivos contra fungos. Apesar da capacidade antifúngica e antibacteriana elevada, as substâncias fenólicas naturais apresentam um baixo efeito tóxico em seres humanos, sendo este um grande diferencial dos óleos essenciais para aplicação na conservação de alimentos (TURINA et al., 2006; XU et al., 2008; AHMAD et al., 2011).

O óleo essencial geraniol é um monoterpene encontrado em elevada concentração no óleo de palmarosa (FAHLBUSCH et al., 2003; SCHERER et al., 2009). Vários autores constataram a ação antibacteriana do geraniol contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DUARTE et al., 2005; JIROVETZ et al., 2007; CHEN; VILJOEN, 2010). Outros autores atribuíram ao geraniol ação antifúngica frente às cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Aspergillus niger*, *Penicillium verrucosum*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (YOKOMIZO; NAKAOKA-SAKITA, 2014; MARTINS; SOUZA, 2015; PEREIRA; LIMA, 2017).

Devido às propriedades antibacterianas e antifúngicas conferidas ao óleo essencial geraniol, o mesmo apresenta potencial de aplicação como aditivo para a conservação dos alimentos e também como aditivo antimicrobiano para aplicação diretamente nas embalagens ativas. Porém, os óleos essenciais são susceptíveis à termodegradação em baixas temperaturas e facilmente oxidados, além de serem voláteis em baixa temperatura. Por isso, alguns trabalhos também têm sido realizados no sentido de buscar alternativas para a sua proteção, por processos de encapsulação, por exemplo (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010; GYAWALI; IBRAHIM, 2012; HAYEK; GYAWALI; IBRAHIM, 2013).

Com o objetivo de proteger os óleos essenciais, que são muito voláteis, o encapsulamento se mostra um método interessante, pois permite encapsular substâncias, compostos ou agentes, em estado sólido, líquido ou gasoso, obtendo-se cápsulas com dimensões micrométricas ou nanométricas. O encapsulamento é um procedimento interessante e importante para aumentar a estabilidade físico-química e microbiológica de um óleo essencial. Proporciona a sua proteção de agentes físicos e químicos de degradação, além de permitir a liberação controlada da substância encapsulada (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Uma característica física importante do geraniol, e da maioria dos óleos essenciais, é a sua volatilidade em temperaturas da ordem de 35 °C, consideradas muito baixas. Em muitas condições de processo a sua aplicação em embalagens ativas acaba sendo restringida, já que os óleos essenciais podem ser instáveis frente às condições de operação de um processo de fabricação de embalagens, tanto de materiais poliméricos quanto de papel. Contudo, a proteção do óleo essencial via encapsulamento polimérico torna-se uma alternativa interessante para proteger o composto das condições de operação e das condições ambientais de um alimento. Neste sentido, alguns polímeros têm sido utilizados para o encapsulamento de compostos ativos, como os óleos essenciais. Dentre eles, a policaprolactona (PCL) tem recebido muita atenção devido à facilidade de liberação controlada de fármacos e de outras substâncias (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; TRANCOSO, 2013).

O uso de microcápsulas de PCL-Geraniol como um aditivo antimicrobiano natural, eficiente e não tóxico em embalagens torna-se uma oportunidade para o setor de polímeros e de papel, devido à busca constante por novas tecnologias para desenvolver embalagens ativas inovadoras com propriedades antimicrobianas.

Desta forma, esta dissertação apresenta como tema principal a microencapsulação do óleo essencial geraniol em policaprolactona utilizando o método de polimerização em miniemulsão com evaporação de solvente. As microcápsulas de PCL-Geraniol foram caracterizadas

empregando técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Termogravimetria (TGA), sendo que ainda, as microcápsulas de PCL-Geraniol foram submetidas a testes de liberação com temperatura seguido de Difusão em Meio Sólido para verificar a atividade antimicrobiana das microcápsulas de PCL-Geraniol.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Microencapsular o óleo essencial geraniol com policaprolactona e avaliar a atividade antimicrobiana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica do geraniol em patógenos comuns em alimentos;
- Definir e aplicar um processo de microencapsulação do geraniol com o polímero policaprolactona;
- Avaliar a estabilidade das microcápsulas de policaprolactona contendo geraniol em suspensão;
- Estudar o efeito da temperatura na liberação de geraniol das microcápsulas de policaprolactona;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica das microcápsulas de PCL-Geraniol, com e sem tratamento térmico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

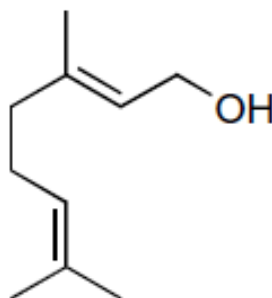
3.1 COMPOSTO GERANIOL

Os óleos essenciais são compostos químicos voláteis e aromáticos que podem ser extraídos de flores, caules, raízes, folhas ou das partes de plantas aromáticas. Estes óleos são quimicamente complexos e constituídos, normalmente, por centenas de componentes químicos, cada qual com a sua característica aromática e ação bioquímica. As principais características de um óleo essencial são a sua fragrância e as suas atividades antimicrobianas e antioxidantes. Portanto, é muito utilizado por indústrias de perfumes, indústrias de cosméticos, de aditivos naturais para aromatização de alimentos e por indústrias farmacêuticas (NAVARRETE et al., 2011; TRANCOSO, 2013).

Estes óleos são misturas complexas de terpenos, terpenos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, sendo que podem conter pequenas quantidades de diterpenos e outros componentes de acordo com a função da planta aromática. Além disso, possuem vários outros constituintes, tais como, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos com enxofre. Normalmente, numa mistura, um destes compostos apresenta-se em maior concentração, enquanto outros compostos apresentam-se em menores teores e alguns em quantidades muito pequenas, chamados de traços no óleo essencial (SIMÕES et al., 2005).

Por sua vez, o óleo geraniol (3,7-dimethyl-trans-2,6-octadien-1-ol) é um álcool acíclico pertencente à família dos monoterpenos, tem ponto de ebulição de 230 °C, peso molecular de 154,25 g·mol⁻¹ e fórmula química C₁₀H₁₈O, conforme Figura 1. Este óleo é composto por uma mistura dos isômeros trans e cis, denominados geraniol e nerol, respectivamente (FAHLBUSCH et al., 2003; CHEN; VILJOEN, 2010).

Figura 1 – Estrutura química do geraniol



Fonte: Bakkali et al., 2008.

O geraniol é um composto comercialmente importante, de coloração amarelo claro, e que é insolúvel em água, mas solúvel na maioria dos solventes orgânicos, sendo encontrado nos óleos essenciais de várias plantas aromáticas. A fonte natural mais prolífica é o óleo de palmarosa, que contém cerca de 70-85% de geraniol na sua composição (FAHLBUSCH et al., 2003; SCHERER et al., 2009; CHEN; VILJOEN, 2010).

A atividade antimicrobiana do óleo de palmarosa é atribuída ao geraniol, por estar em maior concentração no óleo. Sabe-se que o extrato de palmarosa é composto por vários outros óleos e ésteres, incluindo o acetato de geranila, o qual também é citado na literatura por possuir atividade antimicrobiana (OUSSALAH et al., 2007; SCHERER et al., 2009; GONÇALVES et al., 2012; SMITHA; VIRENDRA, 2015).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial da palmarosa (*Cymbopogon martinii*) foi constatada por Scherer e colaboradores (2009) frente a microrganismos como *S. aureus*, *E. coli*, e *S. typhimurium*. O mesmo óleo essencial teve atividade comprovada frente a *S. cerevisiae*, sendo que concentrações baixas do óleo (0,1%) inibiram completamente o crescimento das cepas (PRASHAR et al., 2003).

Através dos testes de concentração inibitória mínima (CIM), Leite e colaboradores (2015) concluíram que o óleo essencial geraniol possui atividade antifúngica contra cepas de *C. albicans*. Outros autores atribuíram ainda ao geraniol ação antifúngica frente as cepas de *C. glabrata*, *C. krusei*, *A. niger* e *P. verrucosum*, *C. neoformans* e *C. gattii* (YOKOMIZO; NAKAOKA-SAKITA, 2014; MARTINS; SOUZA, 2015; PEREIRA; LIMA, 2017).

Assim, a eficácia antimicrobiana da palmarosa frente a espécies bacterianas e fúngicas está relacionada à presença de geraniol e acetato de geraniol, compostos com elevada atividade antimicrobiana (PRASHAR et al., 2003; DUARTE et al., 2005).

3.2 MICROENCAPSULAÇÃO

Os primeiros registros de aplicação da técnica de microencapsulação datam o final dos anos de 1930, onde foi proposto desenvolver um substituto para o papel carbono e fitas de carbono. Porém o primeiro produto com material microencapsulado surgiu somente em 1954. A empresa norte-americana *National Cash Register* (NCR) foi a pioneira ao comercializar um papel de cópia sem carbono. Esse papel recebeu uma fina camada de microcápsulas de tinta, contendo solução de 2 a 6% de pigmento encapsulado em partículas com diâmetro de 1 até 10 µm. A pressão da ponta do lápis na superfície do papel rompia as microcápsulas, liberando o pigmento (SUAVE et al., 2006; VENKATESAN; MANAVALAN; VALLIAPPAN, 2009).

O conceito de microencapsulação tem como base o modelo celular (Figura 2a), no qual o núcleo é envolvido por uma membrana semipermeável que protege o citoplasma e os demais componentes do meio externo, bem como exerce as funções de controle da entrada e saída de substâncias na célula. De modo semelhante, as micropartículas obtidas por microencapsulação podem ser classificadas por dois tipos de morfologias: microcápsulas e microesferas, conforme apresentado na Figura 2(b) e 2(c) respectivamente, sendo que as mesmas possuem um tamanho entre 1 e 1000 μm (SOHAIL et al., 2011; NUNES et al., 2015).

Nas microcápsulas o sistema é do tipo reservatório, e consiste em uma camada de um agente encapsulante, geralmente um material polimérico que atua como um filme protetor, isolando e protegendo uma substância ativa. Essa membrana se desfaz sob estímulo específico, liberando a substância ativa no local ou no momento ideal. Nas microesferas o sistema é do tipo matricial, sendo constituído por uma rede macromolecular ou lipídica contínua onde a substância ativa é dispersa sob a forma de moléculas, partículas sólidas finas ou então gotículas de soluções (RICHARD; BENOIT, 2000; SOHAIL et al., 2011; NUNES et al., 2015).

Figura 2 – Comparação do modelo celular entre os tipos de microencapsulação: (b) microcápsula e (c) microesfera



Fonte: Alvim, 2010.

As microcápsulas são caracterizadas pela sua forma esférica e por apresentar aspecto sólido. No entanto, o tamanho, a forma e a estrutura das microcápsulas dependem dos materiais e processos empregados, ou seja, do agente encapsulante e do método empregado na sua produção (NUNES et al., 2015).

Os propósitos gerais da microencapsulação consistem na possibilidade de fazer um líquido comportar-se como um sólido, de modo a facilitar sua manipulação, separar materiais reativos, reduzir a toxicidade do material ativo, promover a liberação controlada do material encapsulado, reduzir volatilidade de líquidos, mascarar gosto de componentes amargos,

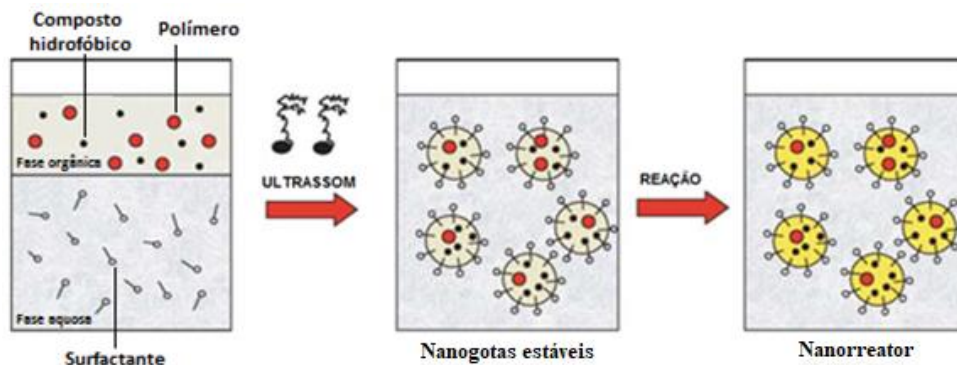
aumentar a vida de prateleira e proteger contra a luz, umidade e calor (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

A escolha do método de encapsulação depende de uma série de fatores, tais como, sensibilidade do núcleo, tamanho da microcápsula desejada, propriedades físicas e químicas do núcleo e do revestimento, das aplicações do produto final, mecanismos desejados de liberação, escala de produção e da viabilidade econômica, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química (SHAHIDI; HAN, 1993; AZEREDO, 2005).

Para a obtenção de microcápsulas, várias metodologias são aplicadas, dentre elas, polimerização em miniemulsão, polimerização em emulsão sem surfactante, emulsão de água-em-óleo-em-água, polimerização interfacial e polimerizações em microemulsão e em suspensão. Entretanto, com exceção da polimerização em miniemulsão, as demais apresentam uma série de desvantagens, tais como, uso excessivo de surfactante, estabilidade coloidal insuficiente ou ainda, procedimentos de alto custo para específicas aplicações, o que impede a diversidade de sua aplicação em diversas áreas. Já a síntese de microcápsulas via polimerização em miniemulsão apresenta como vantagens a baixa concentração de surfactante e a possibilidade de se obter o produto final em apenas uma única etapa de reação (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; STEINMACHER, 2010).

No processo de miniemulsão são geradas duas fases imiscíveis, uma formada por pequenas gotas estáveis de monômero, as quais são nucleadas e sofrem a polimerização. Classicamente, miniemulsões são dispersões aquosas de gotículas de óleo relativamente estáveis, com tamanho entre 50 e 500 nm. São preparadas por um sistema contendo óleo, água, um surfactante e um coestabilizador. Portanto, na primeira etapa do processo de polimerização em miniemulsão, gotas submicrométricas são formadas pela dispersão de um sistema contendo a fase dispersa (orgânica) e a fase contínua (aquosa). Para que ocorra essa dispersão é necessário aplicar um mecanismo de alto cisalhamento para, além de quebrar a emulsão de gotas de monômero em gotas submicrométricas, alcançar um estado estacionário obtido pelo equilíbrio da taxa de rompimento e coalescência. Na segunda etapa, estas gotas são nucleadas e polimerizadas (LANDFESTER et al., 1999; SCHORK et al., 2005). O princípio da polimerização em miniemulsão está representado na Figura 3.

Figura 3 – Esquema representativo do processo de polimerização em miniemulsão para a obtenção de microcápsulas

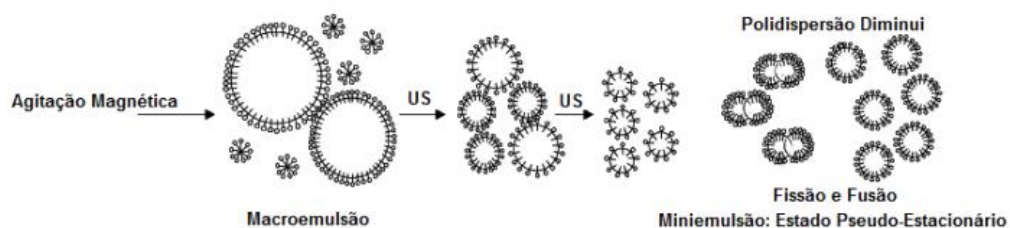


Fonte: Adaptado de Landfester, 2006.

Segundo Antonietti e Landfester (2002), as gotas de monômero são o *locus* primário da polimerização, onde cada gota se torna o meio reacional, independentes umas das outras. Já a fase contínua é um excelente meio de transporte de massa, como por exemplo, de iniciador e calor. Dessa forma, cada gota se comporta como um “nanorreator”.

Em miniemulsão de monômeros relevantes para os fins de polimerização, o tamanho da gotícula é determinado pela quantidade de monômero e água, a solubilidade do monômero e a quantidade de agente tensoativo. Além disso, verifica-se que o tamanho inicial da gota é função de um sistema operacional de agitação mecânica, sendo que as gotículas de monômero mudam muito rapidamente de tamanho, também ao longo da sonificação, a fim de atingir um estado pseudoestável. Uma vez que este estado for atingido, o tamanho da gotícula de monômero já não é uma função da quantidade de energia mecânica aplicada, assumindo que um mínimo necessário é usado. No início da homogeneização, a polidispersão das gotículas ainda é bastante elevada, mas por processos de fusão e de cisão constantes, a polidispersividade da miniemulsão atinge então, um estado estacionário, conforme pode ser visualizado no esquema representativo apresentado na Figura 4 (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002).

Figura 4 – Esquema representativo para a formação de miniemulsão por ultrassom



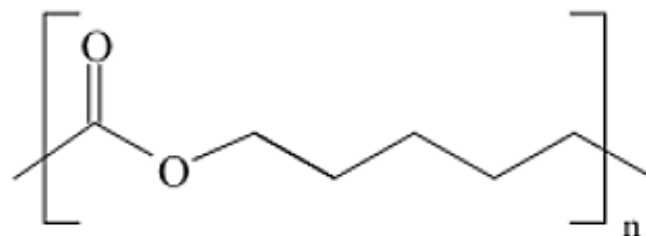
Fonte: Antonietti e Landfester, 2002.

A microencapsulação tem inúmeras aplicações, sendo amplamente aplicada no setor alimentício para a encapsulação de óleos essenciais no intuito de prevenir a oxidação e a perda de substâncias ativas voláteis e controlar a sua liberação. A aplicação dessa tecnologia estende-se à incorporação de corantes, temperos, acidulantes, vitaminas e minerais. Outras indústrias, que desenvolvem formulações com microcápsulas são as de cosméticos, pigmentos, adesivos, agentes de cura e encapsulação de células vivas, incluindo enzimas e microrganismos (SUAVE et al., 2006; COSTA et al., 2013).

3.3 ENCAPSULAÇÃO COM POLÍMERO POLICAPROLACTONA (PCL)

A poli(ϵ -caprolactona) ou somente policaprolactona (PCL), cuja estrutura química mínima está descrita na Figura 5, é um polímero sintético, semicristalino, possui baixo ponto de fusão (59-64 °C) e tem boa resistência química à água, óleo, solvente e cloro (SIRACUSA et al., 2008; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010; HUNG, 2011).

Figura 5 – Estrutura química da policaprolactona (PCL)



Fonte: Middleton; Tipton, 2000.

A PCL é um éster alifático biodegradável e possui cadeia linear, é proveniente da polimerização de matérias-primas não renováveis. É um polímero estável, permeável, possui facilidade de conformação, boa flexibilidade e degrada-se de acordo com o processo em que está sendo utilizado (HUNG, 2011; PEROGLIO et al., 2010).

Este polímero tem atraído o interesse comercial por ser mais biodegradável em comparação com outros poliésteres, apresentar boas propriedades físicas, ser relativamente barato, atóxico, além de possuir propriedades viscoelásticas e reológicas superiores a outros polímeros bioreabsorvíveis (NAIR; LAURENCIN, 2007).

O polímero PCL, bem como outros polímeros, está sendo usado em muitas aplicações, devido às suas propriedades físico-químicas. Com o intuito de otimizar a produção de embalagens ativas, vêm sendo desenvolvidas pesquisas referentes à matriz polimérica, tipos e

concentrações de agentes antimicrobianos e condições de processamento (PARK et al., 2001; PEI; SHEN; YANG, 2007).

Barbieri e Leimann (2014) desenvolveram microcápsulas de policaprolactona para a encapsulação de óleo de sementes de maracujá, sendo que as microcápsulas carregadas com o óleo foram obtidas a partir da técnica de emulsificação/evaporação de solvente, e as mesmas apresentaram morfologia esférica, com um tamanho de 137,4 μm e um índice de polidispersidade (PDI) de 0,2598, indicando uma boa homogeneidade do sistema. Além disso, foi possível verificar interações entre a parede polimérica e o óleo das sementes de maracujá, indicando que a liberação do óleo, a partir das microcápsulas, pode ser controlada.

3.4 SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DO COMPOSTO ATIVO

Os sistemas de liberação controlada podem ser definidos como aqueles sistemas nos quais o agente ativo é liberado independentemente de fatores externos e apresentam uma cinética de liberação bem estabelecida (VULCANI, 2004). Existe uma ampla variedade de sistemas, visando condicionar a velocidade e o local de liberação dos compostos, entre estes estão incluídos os lipossomas, as matrizes poliméricas, os sistemas reservatórios, as bombas osmóticas, os revestimentos entéricos, entre outros (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

A utilização de sistemas matriciais constituídos por diversos tipos de polímeros é uma opção interessante, pois o mesmo permite a incorporação de quantidades relativamente elevadas de composto. Nesses sistemas, o composto ativo pode se encontrar homogeneamente disperso na matriz polimérica, dentro de um reservatório ou adsorvido em sua superfície, e na sua liberação estão envolvidos processos físicos e químicos, incluindo penetração de água na matriz, difusão do composto ativo pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou por uma combinação dos dois mecanismos (LYRA et al., 2007).

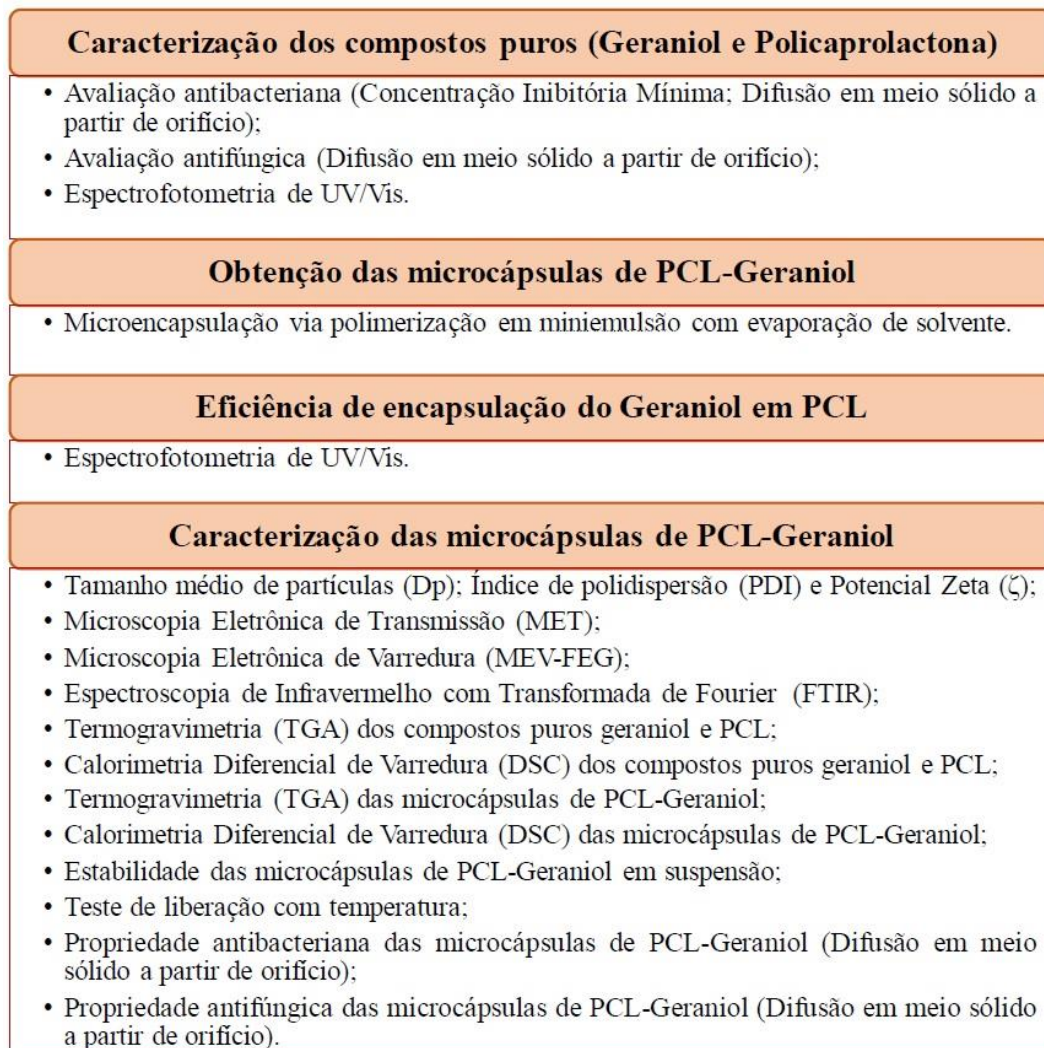
Os sistemas matriciais tem uma classificação que leva em consideração diversos critérios, tais como a estrutura da matriz, a cinética de liberação, a natureza química, as propriedades dos materiais utilizados e os mecanismos para controlar a liberação (erosão, difusão, intumescimento), sendo que nas matrizes insolúveis o composto ativo é liberado essencialmente por difusão e nas matrizes hidrofílicas, a liberação é regulada pelos processos de intumescimento, difusão e erosão (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

A afetabilidade das taxas de liberação do núcleo estão relacionados a interações entre o núcleo e o material encapsulante. Ainda, é sabido que outras variáveis tendem a influenciar na liberação, dentre estas citam-se: volatilidade do núcleo, proporção entre núcleo e encapsulante, tamanho das partículas e grau de viscosidade do polímero encapsulante. Sendo que o mecanismo de liberação do núcleo é determinado a partir do tipo e da geometria das partículas do núcleo e, principalmente, do material encapsulante (OLIVEIRA, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção, são apresentados os materiais utilizados para a realização deste estudo, bem como os procedimentos experimentais adotados. A estratégia de pesquisa é apresentada num fluxograma resumido na Figura 6.

Figura 6 – Fluxograma resumindo a estratégia para a pesquisa



Fonte: A autora, 2017.

4.1 MATERIAIS

Os reagentes utilizados foram Geraniol (Sigma – Aldrich; pureza $\geq 97\%$); Policaprolactona – PCL (Sigma – Aldrich; massa molecular $2.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$); *Brain Heart Infusion* – BHI (Merck); *Mueller Hinton* (Merck, P.A.); Cloreto de Sódio (Merck, P.A.); Dimetilsulfóxido – DMSO

(Vetec, P.A.); Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico – TTC (Merck); Ágar *Sabouraud Dextrose* (Kasvi); Diclorometano (Dinâmica, P.A.); D (+) trealose (Vectec, P.A.).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS GERANIOL E PCL

4.2.1 Avaliação antibacteriana

4.2.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do geraniol

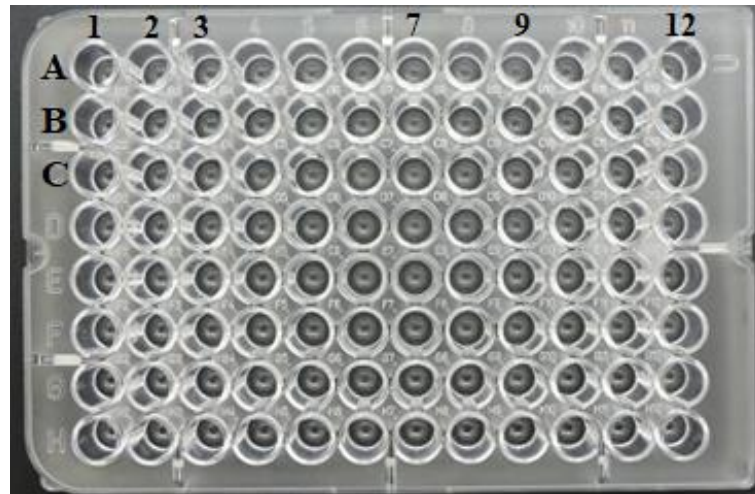
Previamente ao processo de encapsulamento do composto geraniol pelo polímero PCL foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) do geraniol frente a uma bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e uma Gram-negativa, *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os ensaios de CIM foram realizados no Laboratório de Materiais Antimicrobianos do Laboratório de Materiais Multifuncionais da Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ, seguindo os procedimentos descritos pela *Clinical and Laboratory Standards Institute*, com algumas modificações (CLSI, 2012).

Num primeiro procedimento foi preparado um inóculo com suspensões bacterianas cultivadas em caldo BHI. O inóculo foi acondicionado em uma estufa bacteriológica (Quimis, modelo Q316m5) sob temperatura de 37 ± 1 °C por um período de 24 h. Após decorrido esse período, foram isoladas algumas colônias bacterianas, sendo assim, verteu-se *Mueller Hinton* em uma placa de petri (90x15 mm) e deixou-se solidificar. Com auxílio de um *swab* foi retirada uma alíquota da suspensão bacteriana e espalhada sobre o meio de cultura com uma alça de *Drigalski*. As placas foram acondicionadas em uma estufa bacteriológica sob temperatura de 37 ± 1 °C por um período de 24 h.

Utilizando uma alça descartável foram retiradas algumas colônias bacterianas da placa incubada, as quais foram imersas em água salina estéril (0,9%). A turbidez do meio foi ajustada com o auxílio de um espectrofotômetro UV-Vis (Bel photonics, modelo 1105) medindo a absorbância em um comprimento de onda de 619 nm até se obter uma concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹ (absorbância entre 0,08 e 0,10).

O teste foi realizado em microplacas de 96 poços (INLAB) com fundos em forma de "U", conforme exposto na Figura 7.

Figura 7 – Microplacas para determinação da concentração inibitória mínima



Fonte: A autora, 2017.

Em cada um dos poços foram adicionados 100 μL de caldo BHI. Nos procedimentos correspondentes a linha A (coluna 1, 2 e 3) foram adicionados 200 μL de uma solução de geraniol em 10% de DMSO ($11,236 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$), definindo a concentração nos poços de $7,491 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Após a homogeneização da amostra (linha A), alíquotas de 100 μL de cada solução foram sucessivamente transferidas para outros poços da linha A para B, da linha B para a C e assim sucessivamente. Assim, foram obtidas soluções com diferentes concentrações nos poços, conforme exposto na Tabela 1. Posteriormente, adicionaram-se 5 μL de inóculo de suspensão bacteriana com concentração de $10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tabela 1 – Concentração de geraniol para cada linha da microplaca

Linha	Colunas			Concentração ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)
A	1	2	3	7,491
B	1	2	3	3,745
C	1	2	3	1,873
D	1	2	3	0,936
E	1	2	3	0,468
F	1	2	3	0,234
G	1	2	3	0,117
H	1	2	3	0,059

Fonte: A autora, 2017.

Na coluna 7 (controle positivo), foram inseridos 100 µL de BHI e 5 µL de inóculo de suspensão bacteriana com concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹, a fim de atestar que o caldo utilizado proporciona o crescimento dos microrganismos testados.

Na coluna 9 (controle negativo), foram inseridos 100 µL de BHI, 100 µL de diluente, solução aquosa contendo 10% de volume DMSO, e 5 µL de inóculo de suspensão bacteriana com concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹, de modo a atestar que o diluente não está inibindo o crescimento microbiano.

Na coluna 12, apenas 100 µL de BHI foram adicionados, com o objetivo de verificar a esterilidade da placa e do meio de cultura.

Após o término do procedimento, as microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica com temperatura controlada de 37 ± 1 °C durante 20 h. Após esse período de incubação, foram adicionados a cada poço 20 µL de uma solução aquosa de 0,5% de TTC, agente que promove a coloração, permitindo identificar visualmente a presença de bactérias. As microplacas foram novamente incubadas em estufa bacteriológica por mais 4 h, sendo realizada a leitura visual de coloração após decorrido o tempo.

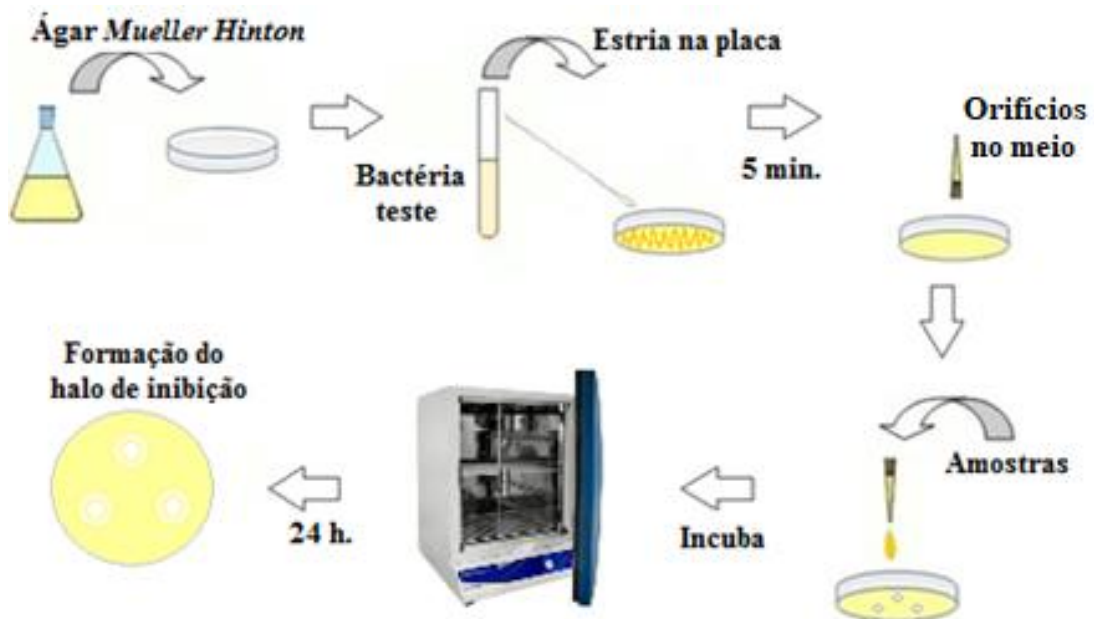
4.2.1.2 Ensaio de difusão em meio sólido a partir de orifício

A atividade antibacteriana do composto geraniol e do agente encapsulante (PCL) foi avaliada com testes de difusão em meio sólido a partir de orifícios, para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, seguindo o método de teste de susceptibilidade de agentes antimicrobianos, descrito pelo NCCLS (2003). Esta análise foi realizada no Laboratório de Materiais Antimicrobianos do Laboratório de Materiais Multifuncionais da UNOCHAPECÓ.

Neste ensaio, inicialmente foram obtidas as suspensões bacterianas à uma concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹, seguindo a metodologia citada anteriormente. O inóculo de suspensão bacteriana foi semeado em forma de estrias sobre o ágar *Mueller Hinton*, pela técnica de plaqueamento em superfície com o auxílio de um *swab*. Foram realizadas as semeaduras em três direções sobre o ágar. Após 5 min foram feitos orifícios circulares equidistantes no ágar, com diâmetro de aproximadamente 9 mm, sendo depositados nos orifícios aproximadamente 100 µL de geraniol puro ou 0,10 g de PCL puro ou 0,10 g de microcápsulas.

O procedimento para avaliar a atividade antibacteriana por difusão em meio sólido, a partir de orifício, está esquematizado na Figura 8.

Figura 8 – Procedimento para atividade antibacteriana por difusão em meio sólido a partir de orifício



Fonte: A autora, 2017.

As placas foram incubadas a 37 ± 1 °C na estufa bacteriológica por 24 h e, decorrido esse tempo, o halo de inibição de crescimento bacteriano formado foi mensurado com auxílio de um paquímetro (Jomarca). As medidas foram realizadas em triplicata e o halo de inibição foi calculado usando a Equação 1.

$$\text{Halo de inibição: } D_{\text{ex}} - D_{\text{in}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, D_{ex} é o diâmetro externo formado pela ação do composto teste sobre as bactérias (mm) e D_{in} é o diâmetro ocupado pelo composto teste (mm).

4.2.2 Avaliação antifúngica

A atividade antifúngica do composto geraniol e do agente encapsulante PCL foi avaliada através do teste de difusão em meio sólido a partir de orifício para os fungos *Candida albicans* (ATCC 24433) e *Aspergillus niger* (ATCC 16888), seguindo o método do teste de susceptibilidade de agentes antifúngicos descrito pelo NCCLS (2004), com modificações. Esta análise foi realizada no Laboratório de Materiais Antimicrobianos do Laboratório de Materiais Multifuncionais da UNOCHAPECÓ.

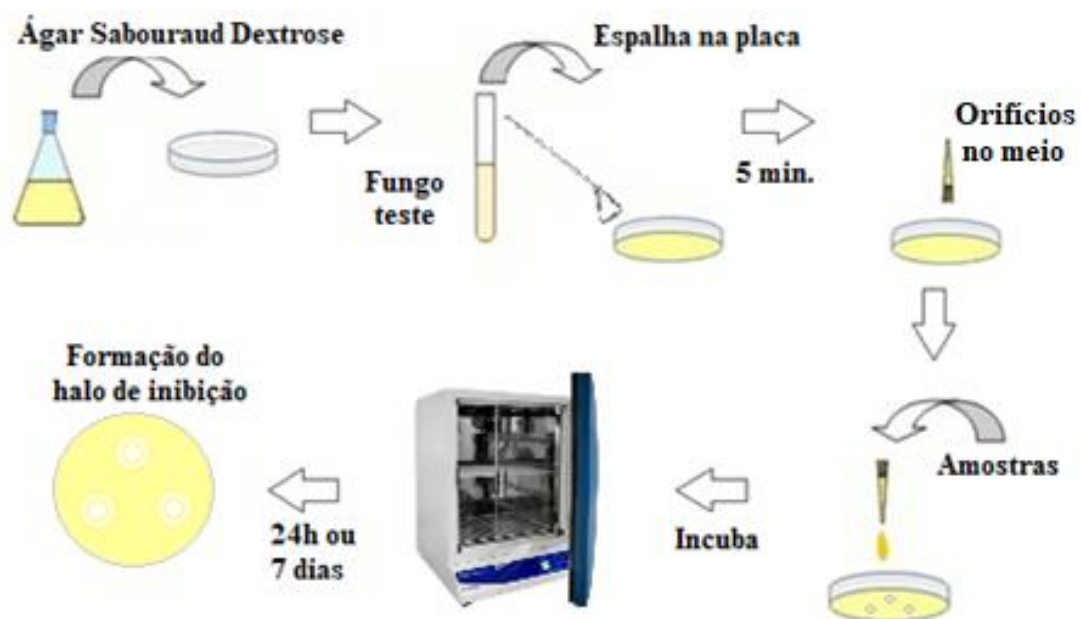
Para os ensaios, a concentração dos esporos dos fungos foi ajustada em solução salina estéril (0,9%) até uma concentração de 10^5 esporos·mL⁻¹, sendo realizada a contagem pelo

método da câmara de Neubauer. Posteriormente, foram vertidos 20 mL do meio de cultura Ágar *Sabouraud Dextrose* em placas de petri (90x15 mm), deixando-o solidificar a temperatura ambiente. Foram então inoculados 20 µL da suspensão de *C. albicans* e *A. niger*, previamente preparados, no ágar e espalhados com uma alça de *Drigalski* em toda superfície. Após 5 min foram feitos orifícios circulares equidistantes no ágar, com diâmetro de aproximadamente 9 mm, sendo depositados nos orifícios aproximadamente 100 µL de geraniol puro ou 0,10 g de PCL puro ou 0,10 g de microcápsulas.

O procedimento para atividade antifúngica por difusão em meio sólido a partir de orifício está esquematizado na Figura 9.

As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C em estufa durante um tempo de 24 h para *C. albicans* e de 7 dias para *A. niger*. Após a incubação, a atividade antifúngica foi avaliada por meio da medição dos halos de inibição, em triplicata, com o auxílio de um paquímetro. O cálculo do halo de inibição foi realizado empregando a Equação 1.

Figura 9 – Procedimento para atividade antifúngica por difusão em meio sólido a partir de orifício



Fonte: A autora, 2018.

4.2.3 Espectrofotometria de ultravioleta visível (UV-Vis)

A técnica de UV-Vis foi empregada para identificar a presença do composto geraniol no processo de encapsulação e nas microcápsulas de PCL. Uma curva de calibração relacionando a concentração de geraniol nas soluções de interesse com a magnitude da absorbância nos

espectros de ultravioleta visível (UV-Vis) foi obtida e empregada para determinar a eficiência do processo de encapsulação.

Para a construção da curva de calibração foram preparadas soluções padrão de geraniol e de PCL solubilizados em diclorometano, sendo que este diluente também foi utilizado como branco na análise. A partir desta solução foram preparadas novas concentrações conhecidas, e analisadas em um espectrofotômetro de varredura UV-Vis (Merck, modelo PHARO 300) utilizando cubetas de quartzo. O espectro de absorção foi obtido por varredura no intervalo de 190 a 800 nm, com resolução de 1 nm. As concentrações utilizadas para a construção do espectro de absorção estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações de Geraniol e de Policaprolactona utilizadas para construção do espectro de absorção em UV-Vis

Geraniol ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Policaprolactona ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1,000	0,00347
0,750	0,00298
0,500	0,00199
0,250	0,00099
0,150	0,00040

Fonte: A autora, 2017.

A curva de calibração foi obtida seguindo o conceito de *Beer Lambert*, que relaciona diretamente a concentração do analito com a magnitude da absorbância quando não ocorrem interações químicas entre as espécies do analito e o índice de refração não sofre variações (SKOOG et al., 2006).

As análises de UV-Vis foram realizadas no Laboratório de Materiais Multifuncionais da UNOCHAPECÓ.

4.3 OBTENÇÃO DAS MICROCAPSULAS DE PCL-GERANIOL

O método utilizado para a síntese das microcápsulas foi a polimerização em miniemulsão com evaporação de solvente, realizado nos Laboratórios de Operações Unitárias I e II da UNOCHAPECÓ.

Para a obtenção das microcápsulas foi empregada a solução com a formulação otimizada de Peres et al. (2012), conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Formulação utilizada para a produção das microcápsulas pelo método de polimerização em miniemulsão com evaporação de solvente

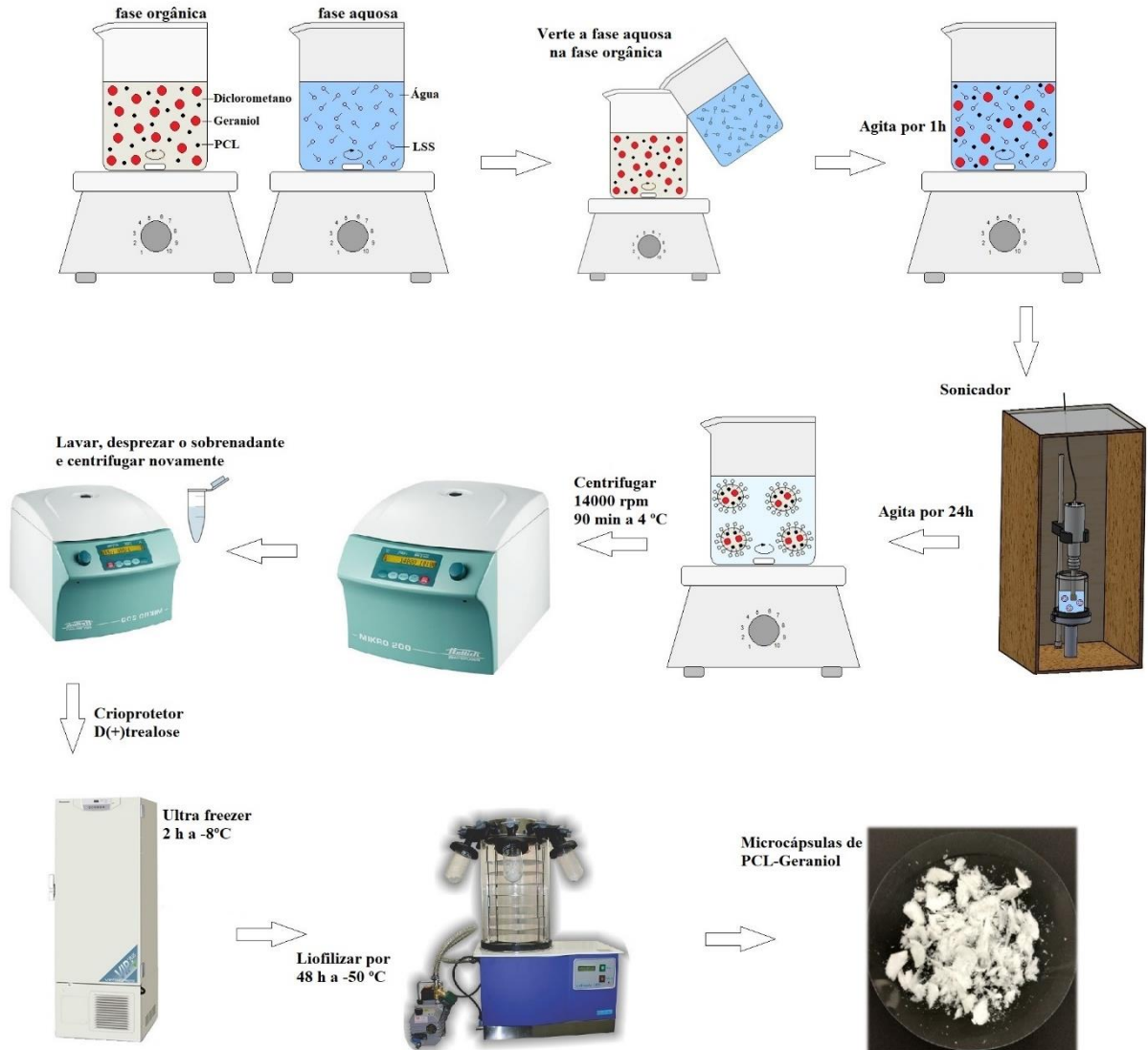
	Compostos	Quantidades (g)
Fase orgânica	Diclorometano	10,00
	PCL	0,30
	Geraniol	0,10
Fase aquosa	H ₂ O	24,00
	Lauril Sulfato de Sódio	0,01

Fonte: A autora, 2017.

O polímero policaprolactona foi dissolvido em solvente diclorometano em um béquer com agitação magnética até completa dissolução do polímero, aproximadamente 10 min, em temperatura ambiente. Na fase orgânica foram adicionados 33% em massa do óleo essencial geraniol em relação ao polímero PCL. Nesta solução foi adicionada água contendo um agente tensoativo, Lauril Sulfato de Sódio, ainda sob agitação, por 1 h a temperatura ambiente, até formar uma suspensão. A suspensão foi sonicada em sonicador (Sonics – Ultra-cell) com microondas pulsadas de amplitude igual a 40% por 3 min.

Após a sonicação a suspensão foi deixada por 24 h a temperatura de 30 °C, sob agitação magnética para a evaporação do solvente e foi então lavada com água destilada, sendo centrifugada a 14000 rpm em temperatura de 4 °C durante 90 minutos em uma centrífuga refrigerada (Hettich, modelo Mikro 200R). Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e a solução foi novamente lavada e centrifugada. Após este procedimento, foi adicionado o crioprotetor D (+) trealose à suspensão antes do pré-resfriamento em uma proporção de 1:3 (p/p) em relação à quantidade de PCL utilizada. Em seguida, a dispersão foi mantida por 2 h a temperatura –8 °C em ultra freezer (Sanyo, modelo MDF-U33V) e liofilizada a –50 °C sob vácuo de 5 mTorr ($9,67 \times 10^{-5}$ psi) por 48 h em um liofilizador (Liobras – Brasil, modelo Liotop L101). Após a liofilização as amostras foram armazenadas em dessecador até uso posterior. A Figura 10 traz o esquema de obtenção das microcápsulas.

Figura 10 – Esquema de obtenção das microcápsulas de PCL-Geraniol



Fonte: A autora, 2018.

4.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL GERANIOL EM PCL

A eficiência de encapsulação tem por finalidade determinar o teor de geraniol encapsulado em PCL em relação ao total de compostos utilizados na solução de síntese. A eficiência normalmente é determinada pela subtração das concentrações total e remanescente do princípio ativo na suspensão. Nesta metodologia, é necessário realizar a separação da fração remanescente e encapsulada por meio de centrifugação.

Para a determinação da eficiência do processo de encapsulação do geraniol nas cápsulas de PCL foram preparadas três formulações, conforme procedimento descrito no item 4.3, com diferentes proporções de PCL em relação ao óleo essencial geraniol: formulação 1 (1:1),

formulação 2 (1:0,33) e formulação 3 (1:0,1). As amostras das formulações foram centrifugadas (SP Labor, modelo SP 703/15000R) com 14000 rpm durante 90 min, sob refrigeração de 4 °C.

As suspensões contendo as cápsulas de PCL-Geraniol foram centrifugadas e uma alíquota do sobrenadante foi retirada após o processo de centrifugação, diluída em água destilada na proporção de 1:2 e submetida a análise por espectroscopia em um espectrômetro de UV-Vis (Hitachi, modelo U-1900) em triplicata. As bandas de absorção em 240 nm, características do composto geraniol, foram avaliadas e os respectivos valores de magnitudes foram utilizados para a determinação da concentração de geraniol remanescente na solução, correspondendo a concentração de geraniol não encapsulado. A eficiência de encapsulação foi determinada empregando a Equação 2.

$$EE\% = \left(\frac{C_{inicial} - C_{livre}}{C_{inicial}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

onde, $C_{inicial}$ é a concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de geraniol adicionado no meio reacional no início do processo de síntese e C_{livre} é a concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de geraniol remanescente na solução (não encapsulado).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE PCL-GERANIOL

4.5.1 Tamanho médio de partículas (Dp), índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta (ζ)

O tamanho médio de partículas (Dp) e o índice de polidispersão (PdI) das cápsulas de PCL foram determinados em triplicatas, através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering* - DLS) em um granulômetro Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, modelo ZEN1600), com ângulo de feixe incidente de 173° e com laser de comprimento de 633 nm. As leituras foram realizadas a 25 °C a partir de uma alíquota das suspensões de cápsulas sem diluição prévia.

O potencial zeta (ζ) foi determinado em triplicatas a partir da técnica de Anemometria Laser Doppler associada a microeletroforese usando equipamento Zetasizer Nano (Malven Instruments, modelo ZS3600). As análises foram realizadas com as suspensões de cápsulas diluídas em água destilada (1:10) a 25 °C. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

4.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a caracterização morfológica das cápsulas de PCL foi empregada a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em um microscópio TEM JEM-1011 (100 kV). As suspensões contendo as cápsulas de PCL-Geraniol foram diluídas em água destilada até 0,1% de sólidos e uma gota de cada amostra diluída foi colocada numa grade revestida de carbono e seca em condição de ambiente. Esta análise foi realizada no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG)

As microcápsulas liofilizadas foram avaliadas com a técnica de microscopia eletrônica de varredura com canhão de campo de emissão (MEV-FEG), também com o intuito de avaliar as características morfológicas das partículas. Os ensaios foram realizados em um microscópio MEV-FEG (modelo Tescan), com tensão de feixe de 20 kV e distância de trabalho de 15 mm. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Polímeros da Universidade de Caxias do Sul – UCS.

4.5.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia por FTIR é uma análise que fornece evidências da presença de grupos funcionais presentes na estrutura de uma substância, podendo ser utilizada na identificação de um composto ou para investigar sua composição química. Um espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (Agilent Technologies, modelo Cary 600 Series FTIR) foi utilizado para examinar a estrutura química das microcápsulas contendo geraniol por refletância total atenuada, com cristal de diamante. Os espectros de FTIR foram obtidos num intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . As análises de FTIR foram realizadas no Laboratório de Polímeros da Universidade de Caxias do Sul – UCS.

4.5.5 Termogravimetria (TGA)

A termogravimetria (TGA) é uma técnica termoanalítica que acompanha a variação da massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo, quando submetida em um ambiente com temperatura e atmosfera controladas. Esta análise foi obtida através de um

Analizador Termogravimétrico (Shimadzu, modelo TGA-50) num intervalo de temperatura de 25 °C a 810 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹, e sob uma atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL·min⁻¹. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Polímeros da Universidade de Caxias do Sul – UCS.

4.5.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi empregada com o objetivo de avaliar as mudanças de fases da amostra durante o aquecimento ou resfriamento. Esta análise forneceu também os valores de entalpia associados às transformações de fases observadas (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

As análises de DSC foram realizadas com as microcápsulas liofilizadas, utilizando o equipamento Perkin Elmer DSC 4000, com atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 20 mL·min⁻¹ e com taxa de aquecimento de 5 °C·min⁻¹. O histórico térmico das microcápsulas foi removido com um primeiro aquecimento a uma taxa de aquecimento de 20 °C·min⁻¹ e com a taxa de resfriamento de -20 °C·min⁻¹. As análises térmicas das microcápsulas foram realizadas a partir do segundo aquecimento. Os ensaios de DSC foram realizados no Laboratório de Polímeros da Universidade de Caxias do Sul – UCS.

4.5.7 Estabilidade das microcápsulas de PCL-Geraniol em suspensão

A estabilidade das microcápsulas de PCL-Geraniol em suspensão foi avaliada visualmente, quanto a presença de precipitados, mudanças de cor e separação de fases. Após estas análises, a estabilidade das microcápsulas foi avaliada em triplicatas monitorando os valores de pH das suspensões, o tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão, o potencial zeta e a eficiência de encapsulação após o armazenamento nos tempos 0 (inicial), 15, 30, 45 e 60 dias, devido ao geraniol ser um composto muito volátil, para garantir a estabilidade das suspensões, as amostras foram armazenadas sob refrigeração de 4 °C.

Para avaliar a eficiência de encapsulação utilizou-se o método descrito no item 4.4, já para determinar os valores de pH das suspensões utilizou-se um pHmetro (Quimis, modelo Q400AS). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Química da UNOCHAPECÓ.

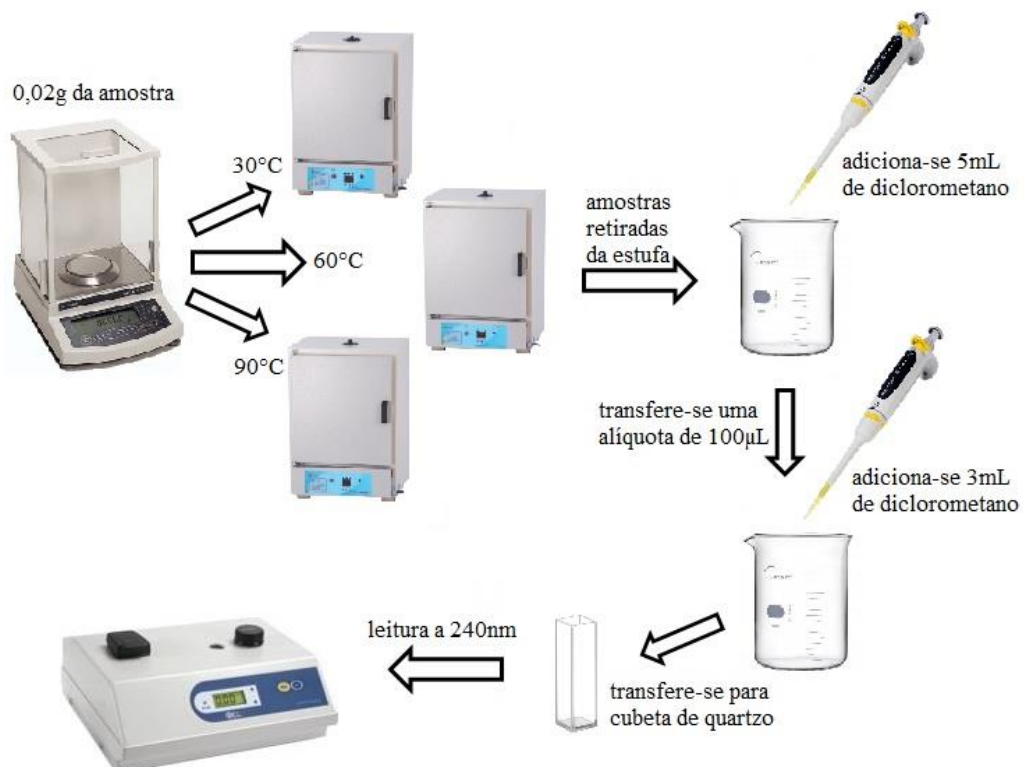
Os procedimentos para as análises de tamanho médio das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta foram os mesmos descritos no item 4.5.1.

4.5.8 Teste de liberação com temperatura

Com o objetivo de avaliar a capacidade de proteção térmica das microcápsulas de PCL no geraniol, foram realizados testes submetendo as microcápsulas de PCL contendo o composto geraniol a diferentes condições de temperatura em estufa (Quimis, modelo Q317M). Amostras de 0,02 g foram acondicionadas em estufa com temperaturas de 30 °C, 60 °C, 90 °C e com temperatura ambiente (sem tratamento), com tempos de 3, 6 e 24 h. Estas temperaturas foram definidas a partir de análises previamente realizadas e adotando valores de temperatura superiores a temperatura de volatilização do geraniol.

Após o tratamento térmico com diferentes temperaturas e tempos, as amostras foram retiradas da estufa e diluídas em 5 mL de diclorometano. Desta solução foi retirada uma alíquota de 100 µL e adicionados mais 3 mL de diclorometano, sendo estas diluições necessárias para que a absorbância fique entre 0 – 1. As amostras diluídas foram transferidas para as cubetas de quartzo e determinadas as absorbâncias em UV-Vis no comprimento de onda de 240 nm. A partir dos valores de absorbância e empregando a equação da curva de calibração foi determinada a concentração de geraniol nas microcápsulas de PCL. A Figura 11 ilustra o esquema do procedimento de liberação com temperatura.

Figura 11 – Procedimento de teste de liberação com temperatura



Fonte: A autora, 2018.

4.5.9 Avaliação antibacteriana das microcápsulas

A atividade antibacteriana das microcápsulas de PCL-Geraniol foi realizada conforme descrito no item 4.2.1.2, com a utilização de 0,10 g das microcápsulas nos orifícios. Com o intuito de verificar se o tratamento térmico altera a difusão do óleo, o teste de difusão em meio sólido foi realizado para as microcápsulas de PCL-Geraniol sem tratamento térmico e para as microcápsulas submetidas a temperatura de 60 °C (ponto de fusão do PCL) por 3 h.

4.5.10 Avaliação antifúngica das microcápsulas

A atividade antifúngica das microcápsulas de PCL-Geraniol foi realizada conforme descrito no item 4.2.2, com a utilização de 0,10 g das microcápsulas nos orifícios. Visando verificar se o tratamento térmico altera a difusão do óleo, a avaliação antifúngica foi realizada para as microcápsulas de PCL-Geraniol sem tratamento térmico e para as microcápsulas submetidas a temperatura de 60 °C por 3 h.

4.6 TÉCNICAS DE ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

Os resultados foram analisados através da estatística descritiva, submetendo-os ao teste de *Tukey* e a análise de variância com aplicação de regressão linear, para comparação entre as médias, com confiança de 95% e ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para estas comparações, utilizou-se o software Statistica[®] 12.0 (StatSoft[®], USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

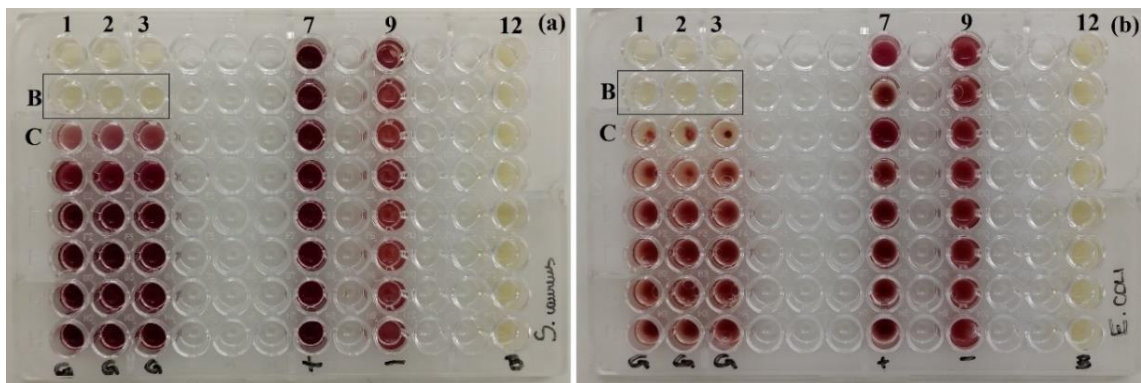
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS GERANIOL E PCL

5.1.1 Avaliação antibacteriana

5.1.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do geraniol (CIM)

O teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado para quantificar a concentração mínima necessária de geraniol para a inibição de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A Figura 12 apresenta as imagens das microplacas resultantes dos ensaios de CIM para o geraniol, utilizando o inóculo com concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹ de ambas bactérias.

Figura 12 – Testes de CIM para geraniol com concentração de inóculo de 10^8 UFC·mL⁻¹: (a) *Staphylococcus aureus* e (b) *Escherichia coli*



Fonte: A autora, 2017.

A coluna 7 (controle positivo) das microplacas é resultado dos testes com o meio contendo 100 µL de BHI e 5 µL de bactérias. É notória a cor vermelho forte, o que indica o crescimento das bactérias sem resistência ao meio. Na coluna 9 (controle negativo) são apresentados os testes com os meios contendo 100 µL de BHI, 100 µL da solução de 10% de DMSO e 5 µL de bactérias. Os resultados indicam que na concentração empregada o solvente DMSO não inibe o crescimento bacteriano, pois todos os poços apresentam a coloração vermelha forte. Para o branco, coluna 12, o meio contém apenas 100 µL meio de cultura e os testes mostram que a placa e o meio utilizado, estão estéreis, não apresentando coloração.

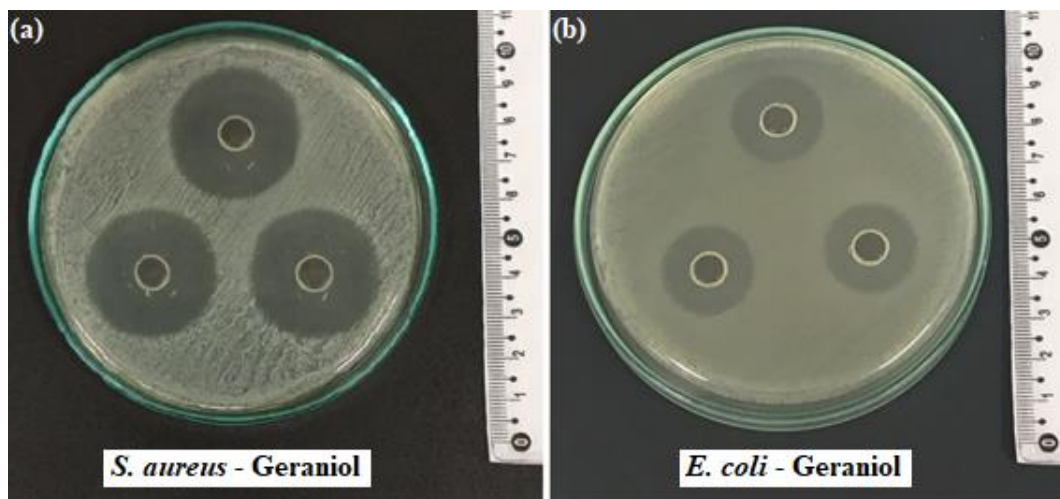
Verifica-se que a concentração inibitória mínima ocorre entre a linha B e C nas colunas 1, 2 e 3 para ambas as bactérias, conforme apresentado na Figura 12. Na linha B a coloração não é vermelha para os testes com ambos os tipos de bactérias, o que representa, de acordo com o padrão, a presença de células bacterianas vivas. Sendo assim, ambos os tipos de bactérias são inibidas pelo geraniol com a concentração inibitória mínima de $3,745 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$.

5.1.1.2 Ensaio de difusão em meio sólido a partir de orifício

5.1.1.2.1 Geraniol

O teste de difusão em meio sólido a partir de orifício foi realizado para avaliar o potencial antibacteriano do óleo essencial geraniol. Na Figura 13 são apresentadas as placas de difusão em meio sólido obtidas nos testes com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, estriadas com a concentração de $10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. Nos orifícios foi aplicado o óleo essencial geraniol puro.

Figura 13 – Testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para o geraniol puro com inóculo $10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$: (a) *Staphylococcus aureus* e (b) *Escherichia coli*



Fonte: A autora, 2017.

Os resultados microbiológicos mostram que houve a formação de halo de inibição para ambas as bactérias, sendo que com a bactéria *Staphylococcus aureus* (Figura 13a) o halo de inibição tem diâmetro médio de $21,00 \pm 0,29 \text{ mm}$ e com a bactéria *Escherichia coli* (Figura 13b) o diâmetro médio é de $12,00 \pm 0,51 \text{ mm}$.

Segundo Alves et al. (2000), o método de difusão em ágar estabelece que diâmetros dos halos de inibição menores que 9 mm devem ser considerados microbiologicamente inativos, os

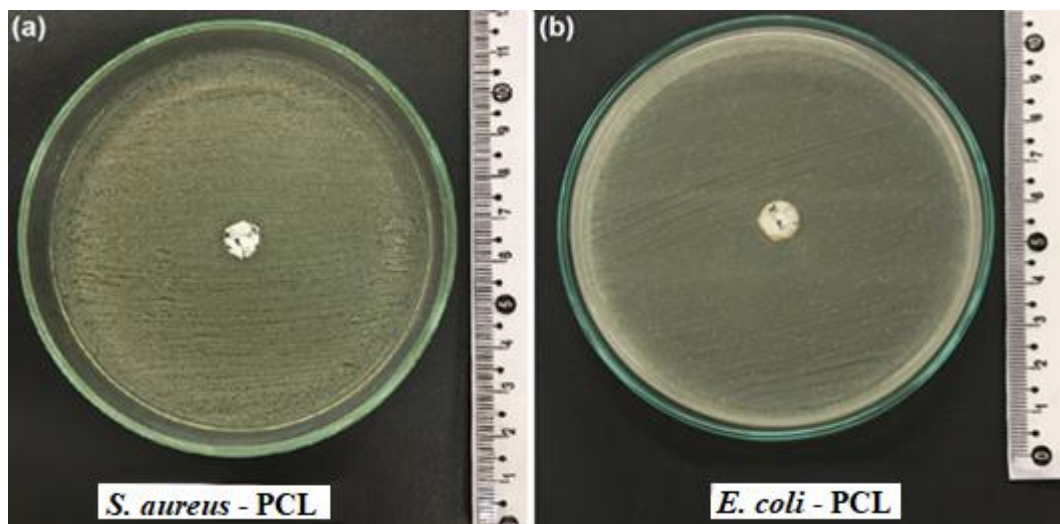
diâmetros entre 9 e 12 mm como parte microbiologicamente ativa, os diâmetros entre 13 e 18 mm como microbiologicamente ativo e os diâmetros maiores que 18 mm microbiologicamente muito ativo. A partir desta classificação, o geraniol puro é microbiologicamente muito ativo, com as bactérias *Staphylococcus aureus* e microbiologicamente ativo com as bactérias *Escherichia coli*. Estes resultados corroboram com os obtidos por Duarte et al. (2005), Jirovetz et al. (2007) e Chen e Viljoen (2010), que relataram que o geraniol encontrado no óleo de citronela e no óleo de palmarosa é um composto de elevada atividade antimicrobiana.

Os resultados com os testes de difusão em meio sólido obtidos com o óleo essencial geraniol são satisfatórios, pois constata a atividade antibacteriana do composto e potencializam a sua aplicação como um agente antimicrobiano natural.

5.1.1.2.2 Policaprolactona (PCL)

A Figura 14 mostra as placas de difusão em meio sólido contendo o polímero policaprolactona puro (PCL) nos orifícios e com as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. As placas foram estriadas com a concentração bacteriana de 10^8 UFC·mL⁻¹.

Figura 14 – Testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para o polímero PCL com concentração de inóculo de 10^8 UFC·mL⁻¹: (a) *Staphylococcus aureus* e (b) *Escherichia coli*



Fonte: A autora, 2017.

Os resultados não indicam a formação de halo de inibição para as bactérias *Staphylococcus aureus* (Figura 14a) e para as bactérias *Escherichia coli* (Figura 14b). A partir da classificação

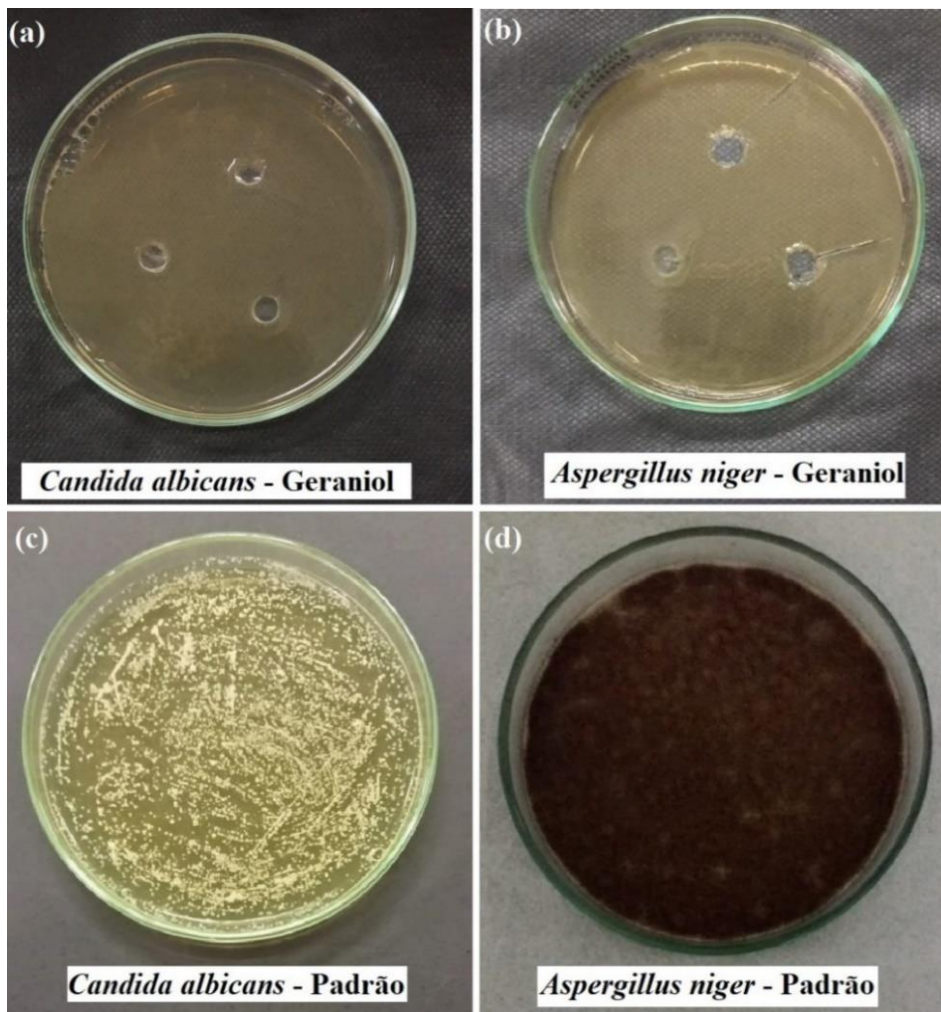
proposta por Alves et al. (2000) o polímero PCL deve ser considerado um composto microbiologicamente inativo para ambos os tipos de bactérias.

5.1.2 Avaliação antifúngica

5.1.2.1 Geraniol

O teste de difusão em meio sólido a partir de orifício foi realizado para avaliar a atividade antifúngica do geraniol puro. A Figura 15 mostra as placas de difusão em meio sólido para *Candida albicans* e *Aspergillus niger* aplicados com a concentração de 10^5 esporos·mL⁻¹, e o óleo essencial de geraniol puro nos orifícios.

Figura 15 – Testes de difusão em meio sólido a partir de orifício com concentração de inóculo 10^5 esporos·mL⁻¹: (a) *Candida albicans* – Geraniol puro; (b) *Aspergillus niger* – Geraniol puro; (c) *Candida albicans* – Padrão e (d) *Aspergillus niger* – Padrão



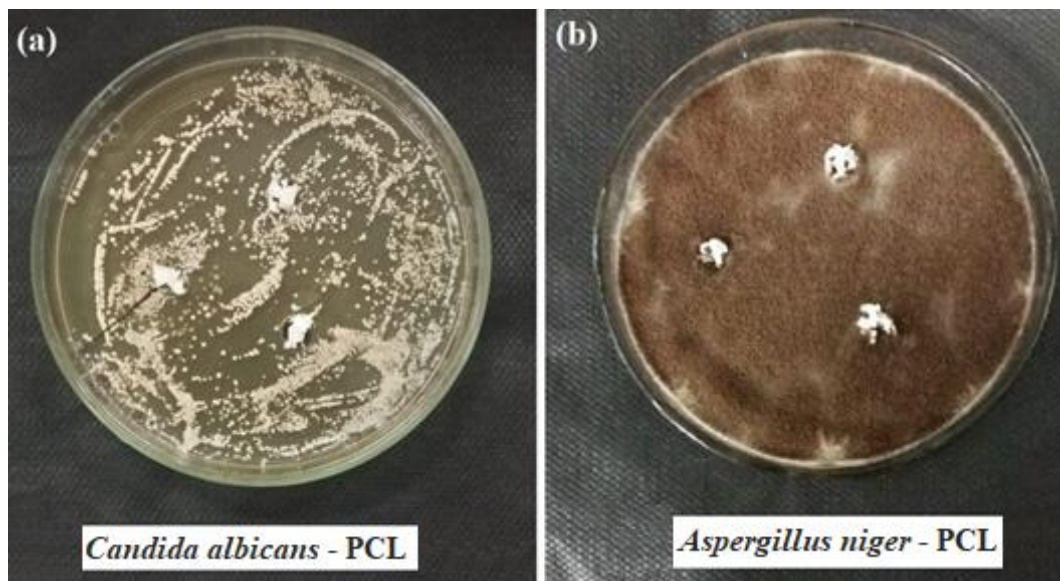
Ambas as placas mostram que houve a inibição completa dos fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger* e comprovam que o geraniol possui excelente atividade antifúngica para as cepas de fungos testadas.

Pereira e Lima (2017), nos seus estudos para o tratamento de candidíase avaliaram a atividade antifúngica do geraniol frente às cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* e concluíram que o óleo essencial de geraniol apresenta excelente atividade antifúngica. Yokomizo e Nakaoka-sakita (2014) avaliaram a atividade do citral (45,9% de geraniol) e concluíram que este composto possui elevada atividade antifúngica frente às cepas *A. niger* e *P. verrucosum*. Estes dados condizem com os obtidos por Martins e Souza (2015), os quais avaliaram a ação antifúngica do geraniol frente à *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans* e *C. gattii*) para tratar a criptococose, a qual é uma infecção fúngica causada por espécies do complexo com alta incidência em indivíduos com a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids).

5.1.2.2 Policaprolactona (PCL)

A Figura 16 mostra as placas de difusão em meio sólido contendo o polímero PCL nos orifícios para *Candida albicans* e *Aspergillus niger* com concentração de 10^5 esporos·mL⁻¹.

Figura 16 – Testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para o polímero PCL com concentração de inóculo 10^5 esporos·mL⁻¹: (a) *Candida albicans* e (b) *Aspergillus niger*



Fonte: A autora, 2017.

Os resultados indicam que houve o crescimento dos fungos ao longo de toda a superfície das placas, não sendo possível observar a formação de halo de inibição característico para os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Logo, o polímero PCL não deve ser considerado um composto antifúngico.

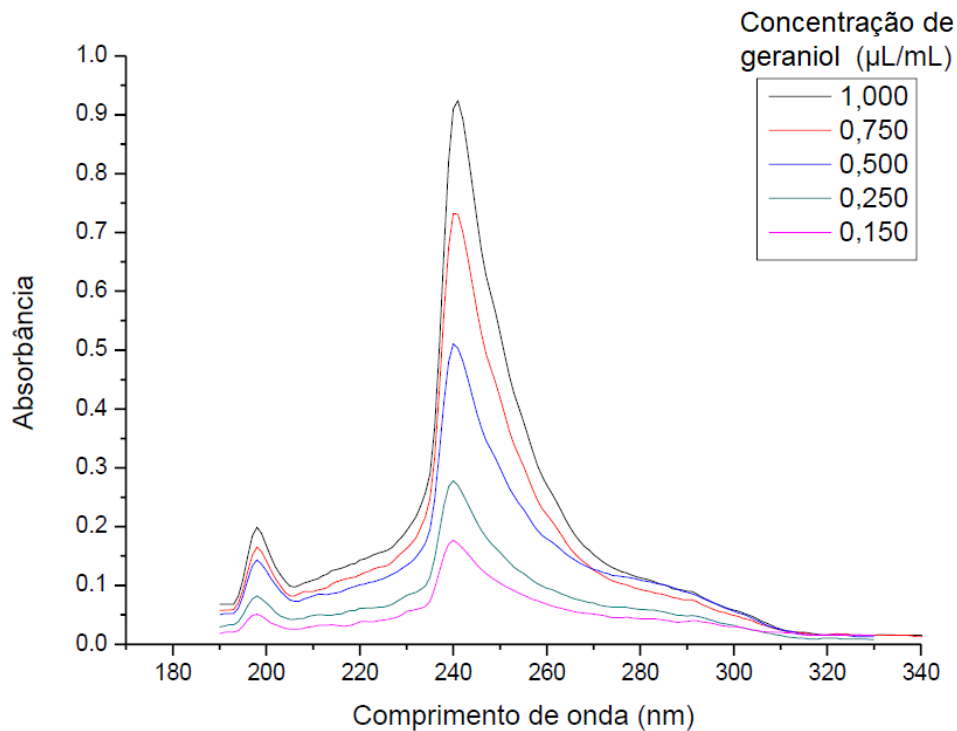
5.1.3 Espectrofotometria de ultravioleta visível (UV-Vis)

A técnica de espectrofotometria do ultravioleta e do visível (UV-Vis) foi empregada para a identificação dos compostos de geraniol e PCL. Para a sua aplicação foram obtidas curvas de calibração relacionando a intensidade de absorbância em um comprimento de onda característico de cada composto com a concentração em solução.

5.1.3.1 Geraniol

Na Figura 17 são apresentados espectros característicos de UV-Vis para o composto geraniol solubilizado com diferentes concentrações em diclorometano.

Figura 17 – Espectros característicos de UV-Vis do geraniol puro solubilizado com diferentes concentrações ($1,000 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ até $0,150 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) em diclorometano



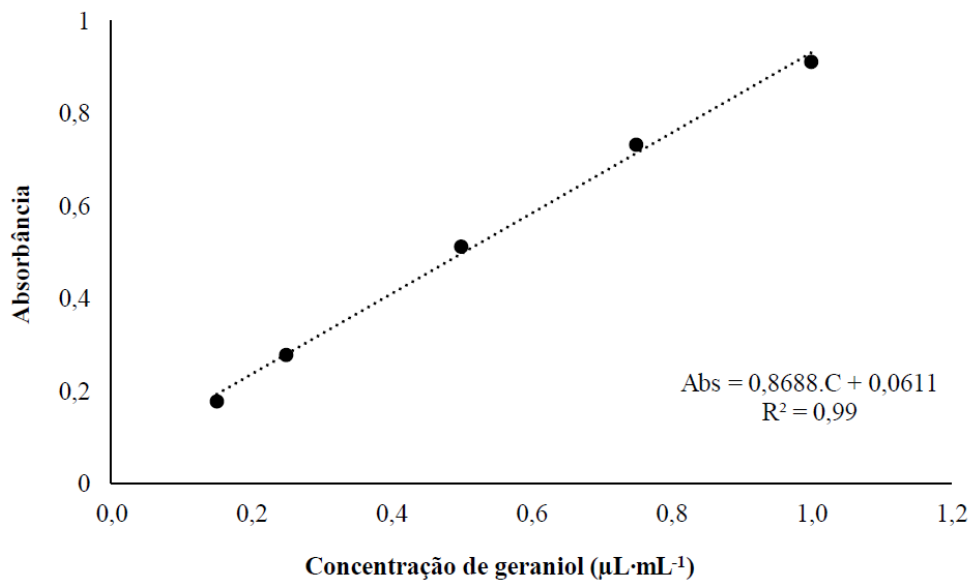
Fonte: A autora, 2017.

Os espectros apresentam picos característicos para o geraniol no comprimento de onda de 240 nm e com magnitude dependente da concentração. Estes picos são importantes para a identificação do composto e a relação da sua magnitude com a concentração para a construção da respectiva curva de calibração.

Estes resultados corroboram com os obtidos por Yue e colaboradores (2017), onde identificaram duas bandas de absorção características para o geraniol, sendo elas em 217 e 239 nm, que provavelmente foram causadas pela ligação dupla C=C e grupo –OH.

A partir dos espectros de UV-Vis a curva de calibração da concentração do composto geraniol foi obtida, Figura 18, bem como a equação que permite a correlação entre a magnitude dos picos de absorbância com a concentração do geraniol em solução.

Figura 18 – Curva de calibração da concentração do composto geraniol com a magnitude do pico característico do geraniol puro em 240 nm no espectro de UV-Vis



Fonte: A autora, 2017.

No intervalo de concentrações de geraniol empregadas nos estudos de espectroscopia UV-Vis a correlação entre a magnitude da absorbância e a concentração de geraniol puro é linear, com um coeficiente de correlação de 0,99, considerado satisfatório. A partir da lei de *Beer Lambert* a correlação linear indica que a magnitude da absorbância pode ser relacionada diretamente a concentração do geraniol na solução e a equação obtida pode ser empregada para o cálculo da concentração de geraniol na solução (SKOOG et al., 2006).

A partir da análise da curva de calibração foi possível estabelecer a relação linear apresentada na Equação 3, correlacionando a concentração de geraniol com a magnitude da banda de absorção em 240 nm.

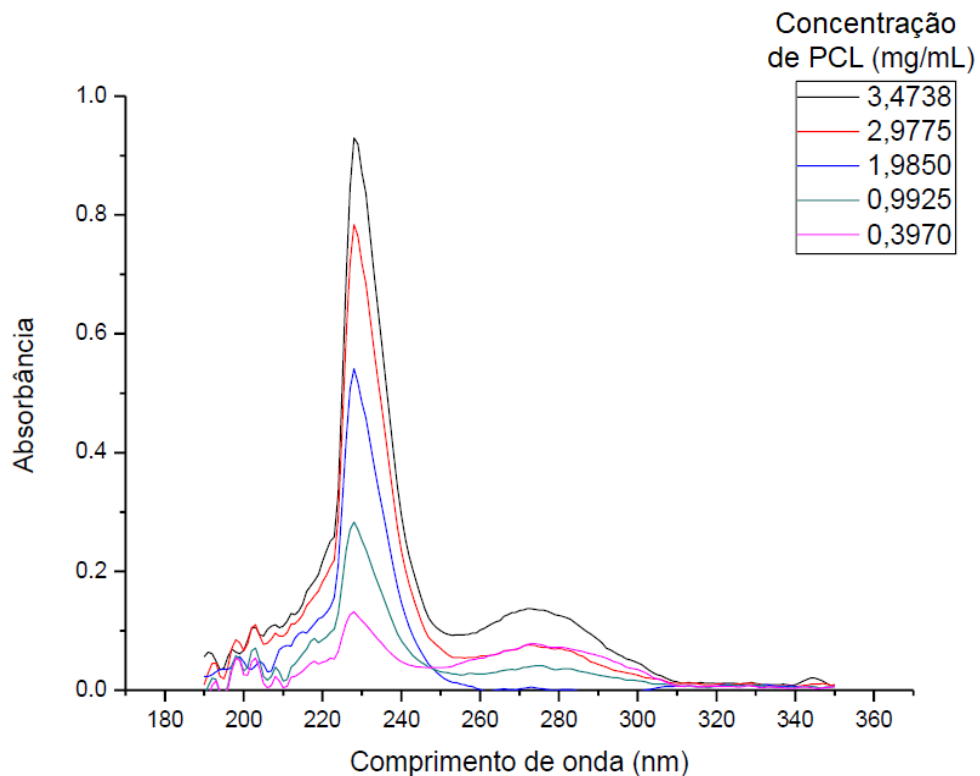
$$I_{abs} = 0,8688.C_e + 0,0611 \quad (\text{Equação 3})$$

onde, I_{abs} é a absorbância em 240 nm e C_e é a concentração de geraniol ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) na solução.

5.1.3.2 Policaprolactona (PCL)

Na Figura 19 são mostrados espectros característicos de UV-Vis obtidos para o polímero PCL solubilizado em diclorometano.

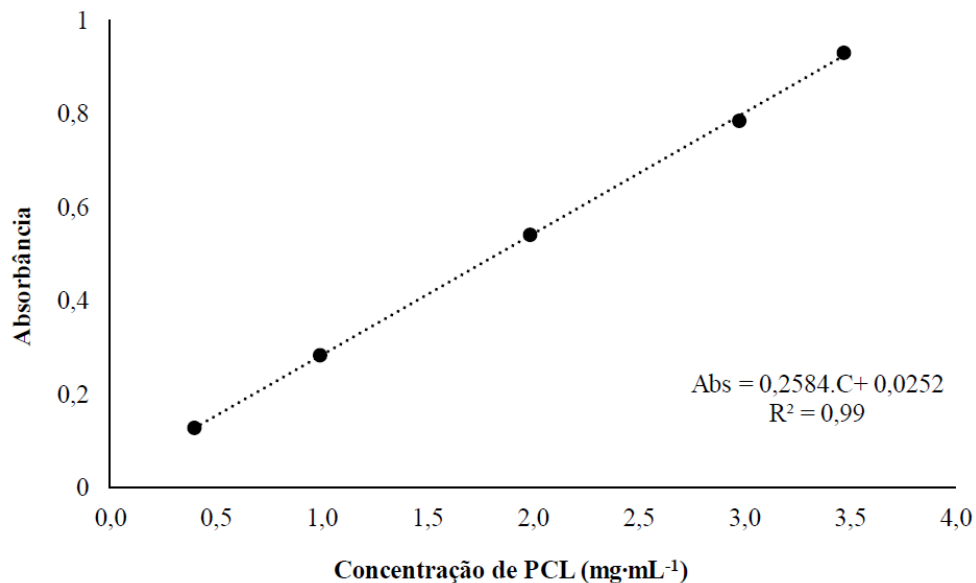
Figura 19 – Espectros de UV-Vis obtidos para o polímero PCL diluído com diferentes concentrações ($3,4738 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ até $0,3970 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em diclorometano



Fonte: A autora, 2017.

Os picos característicos do polímero PCL ocorreram em um comprimento de onda de 228 nm nos espectros de UV-Vis, utilizados para a identificação do polímero e para a construção da respectiva curva de calibração, Figura 20.

Figura 20 – Curva de calibração da concentração de polímero PCL com a magnitude do pico característico do PCL puro em 228 nm no espectro de UV-Vis



Fonte: A autora, 2017.

A correlação entre a magnitude da absorbância e a concentração de policaprolactona pura é linear, com um coeficiente de correlação de 0,99 no intervalo de concentrações estudadas. A magnitude da absorbância pode ser relacionada diretamente com a concentração do polímero PCL na solução e ser empregada para o cálculo da sua concentração em diclorometano.

5.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO GERANIOL EM PCL

A eficiência de encapsulação (EE%) do geraniol em PCL foi determinada utilizando ensaios de UV-Vis e empregando a Equação 2. Foram avaliadas três diferentes formulações, variando o valor percentual de óleo essencial geraniol em relação ao polímero encapsulante PCL. A Tabela 4 mostra os valores determinados para a EE% para as formulações estudadas.

Tabela 4 – Eficiência de encapsulação (EE%), para diferentes relações mássicas de PCL e geraniol

Formulação	PCL:Geraniol	EE % ± D.P.
1	1:1,00	89,23 ± 0,9
2	1:0,33	95,44 ± 0,6
3	1:0,10	97,42 ± 1,2

*D.P. = Desvio Padrão

Fonte: A autora, 2017.

A eficiência de encapsulação do geraniol pelo polímero PCL aumenta com a redução da concentração de geraniol na solução, provavelmente devido à saturação do óleo na fase orgânica em concentrações elevadas. O processo com maior eficiência EE% (97,42%) foi realizado com $1,410 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de geraniol na fase orgânica. Porém, esta concentração de geraniol não é suficiente para inibir o crescimento de bactérias, devido a concentração inibitória mínima ser de $3,745 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, conforme determinado com as análises de CIM para o composto geraniol. Sendo assim, a concentração mais adequada para o processo de encapsulação e suficiente para inibir o crescimento de bactérias é de $4,687 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de geraniol, correspondente a formulação 2, cujo o percentual de geraniol é de 33% em relação a massa de PCL, com uma boa eficiência para o processo, pois EE% foi igual a 95,44%.

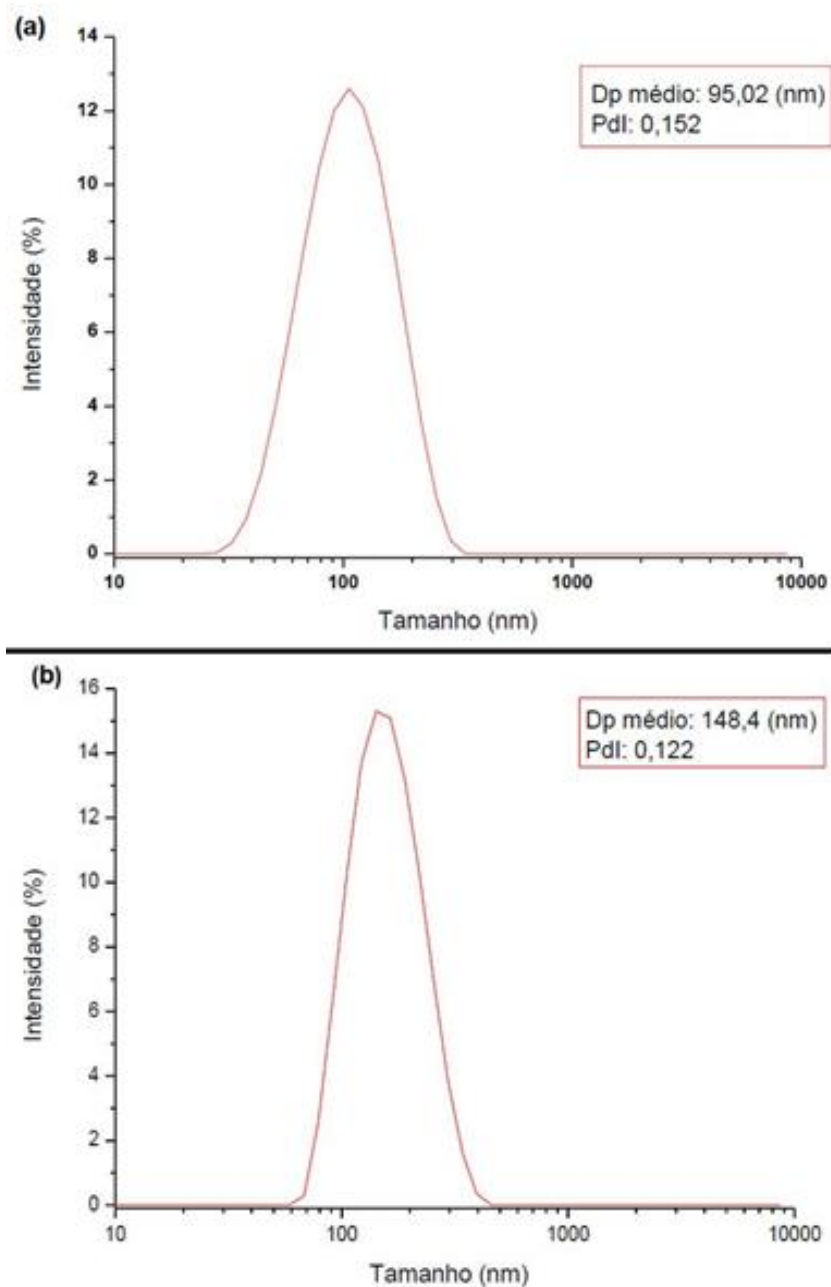
Resultados similares de eficiência de encapsulação utilizando o polímero PCL são encontrados na literatura científica. Mirante e Paula (2015) obtiveram um percentual de encapsulação de 99,86% de óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia Cheel* (Myrtaceae) em nanocápsulas de PCL. Já, Terao, Gonçalves e Leimann (2015), avaliaram o processo de microencapsulação de Curcumina em PCL a partir da técnica de emulsificação/evaporação de solvente, atingindo eficiência de encapsulação de 80%, sendo esta inferior a obtida nesta pesquisa.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE PCL-GERANIOL

5.3.1 Tamanho médio de partículas (Dp) e índice de polidispersão (PdI)

A distribuição de tamanho médio de partículas (Dp), para as cápsulas de PCL sem geraniol e para as cápsulas de PCL-Geraniol são apresentadas na Figura 21. As cápsulas de PCL sintetizadas sem geraniol apresentam um tamanho médio de 95,02 nm e índice de polidispersão de 0,152 (Figura 21a). Já, as cápsulas de PCL, sintetizadas com geraniol têm tamanho médio de 148,4 nm ($0,1484 \mu\text{m}$) e índice de polidispersão de 0,122 (Figura 21b). As cápsulas obtidas de PCL em formulações contendo ou não geraniol podem ser consideradas como microcápsulas, sendo que os seus tamanhos médios são da ordem de micrômetros.

Figura 21 – Distribuição de tamanho médio de partícula (Dp) e valor Índice de polidispersão (PdI) para microcápsulas de (a) PCL sem geraniol e (b) PCL com geraniol



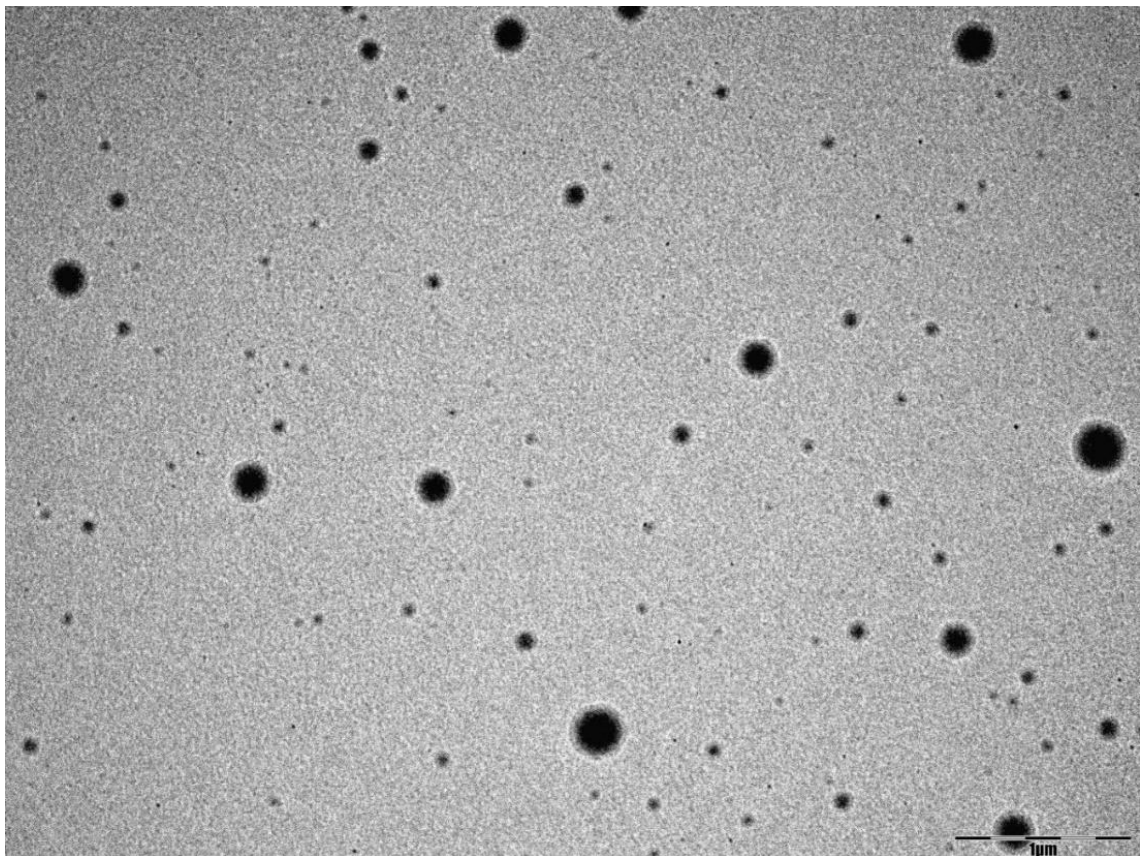
Fonte: A autora, 2017.

Observa-se que ambos os valores de PdI são menores que 0,200. Segundo Cho e colaboradores (2013), valores de PdI entre 0,1 e 0,25 indicam uma distribuição de tamanho reduzido na solução, e um valor de PdI superior a 0,5 indica uma grande distribuição de tamanho. Nestas condições, os valores de PdI inferiores a 0,25 indicam um boa uniformidade no tamanho médio das microcápsulas.

5.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras de cápsulas de PCL-Geraniol foram submetidas a análises por MET. As imagens obtidas por microscopia de transmissão apresentadas na Figura 22 comprovam a formação de cápsulas esféricas e com uma polidispersão nos seus tamanhos.

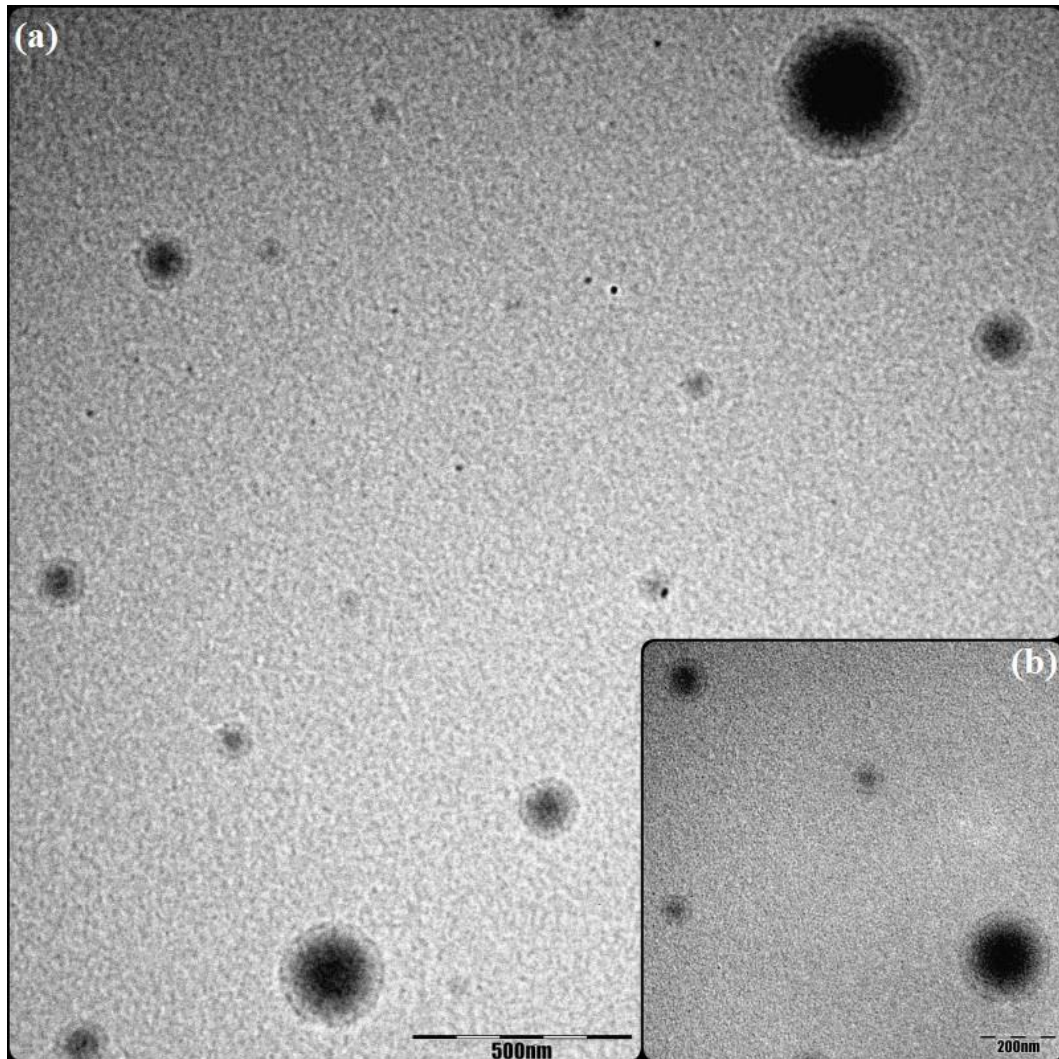
Figura 22 – Imagens de MET obtidas para microcápsulas de PCL-Geraniol, com ampliação de 15000 vezes



Fonte: A autora, 2018.

A Figura 23(a) mostra imagens de MET com ampliação de 31000 vezes, que confirmam a formação de cápsulas esféricas de PCL revestindo o geraniol. Além disso, pode-se confirmar também a formação de revestimentos com espessuras nanométricas de PCL (região clara) e um núcleo de geraniol (região escura). Através das imagens apresentadas na Figura 23(b), com ampliação de 53000 vezes, é possível identificar a formação de cápsulas com dimensões entre 60 nm e 380 nm, corroborando com os resultados de tamanho médio de partículas descritos no item 5.3.1, onde o tamanho das partículas variou de 50-400 nm.

Figura 23 – Imagens de MET obtidas para microcápsulas de PCL-Geraniol: (a) ampliação de 31000 vezes e (b) ampliação de 53000 vezes



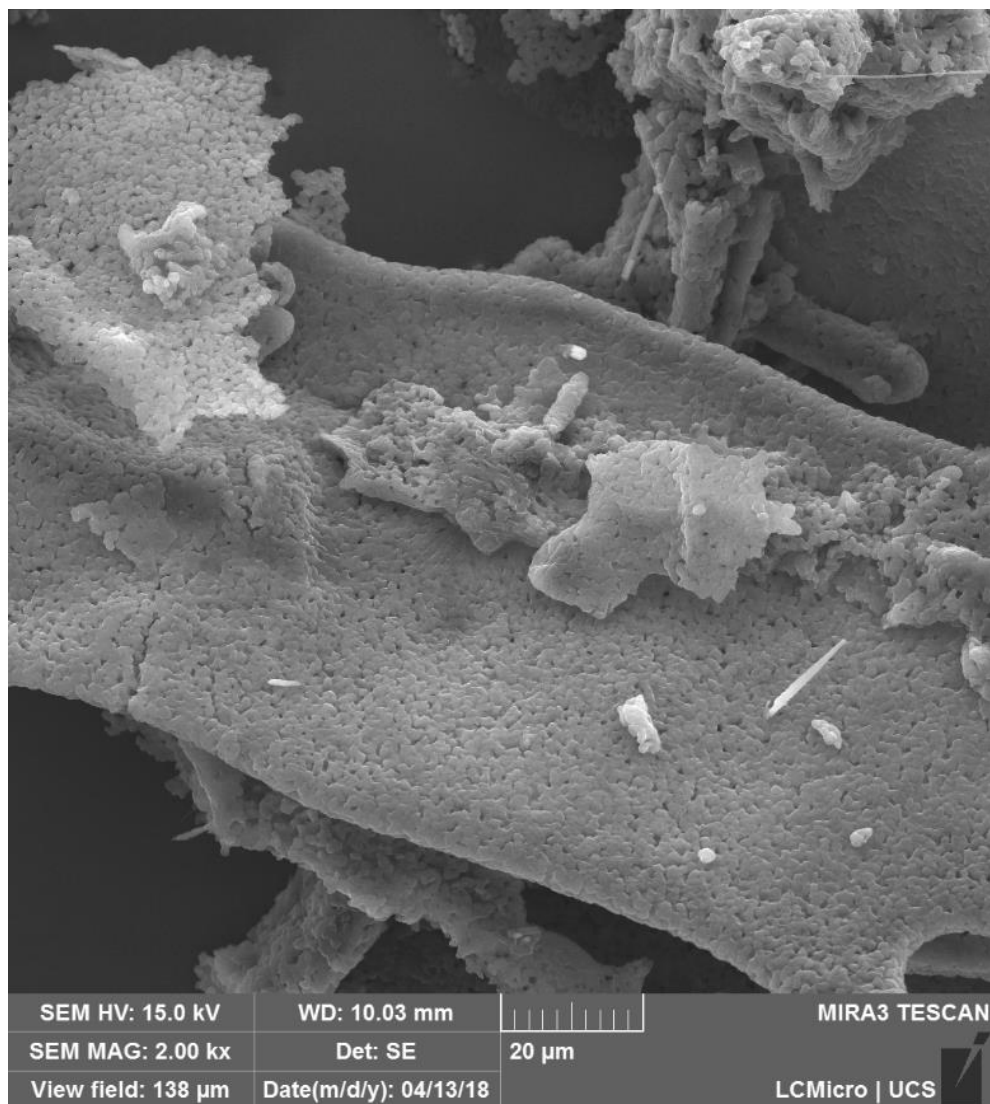
Fonte: A autora, 2018.

Portanto, a partir das análises de MET constata-se a formação de microcápsulas de PCL-Geraniol, sendo que microcápsulas de PCL contém uma fração significativa de óleo essencial geraniol. Além disso, é possível constatar a existência de uma parede da microcápsula cuja espessura pode ser estimada entre 10 nm e 30 nm, dependendo do tamanho da microcápsula. Estes resultados corroboram com o descrito por autores como, Bae, Lee e Park (2007) nas nanocápsulas de poli(óxido de etileno) - poli(óxido de propileno) - poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) encapsulando uma fase oleosa de Lipiodol em sua estrutura de nanoreservatório, e por Lertsutthiwong, Rojsitthisak e Nimmannit (2009) nas análises de nanocápsulas de alginato de quitosana contendo óleo de cúrcuma.

5.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG)

As imagens de MEV-FEG das microcápsulas são apresentadas na Figura 24. As microcápsulas liofilizadas formam aglomerados foliares e porosos, constituídos por aglomerados menores.

Figura 24 – Imagem de MEV-FEG obtidas para as microcápsulas de PCL sintetizadas em meio contendo geraniol, com ampliação de 2000 vezes

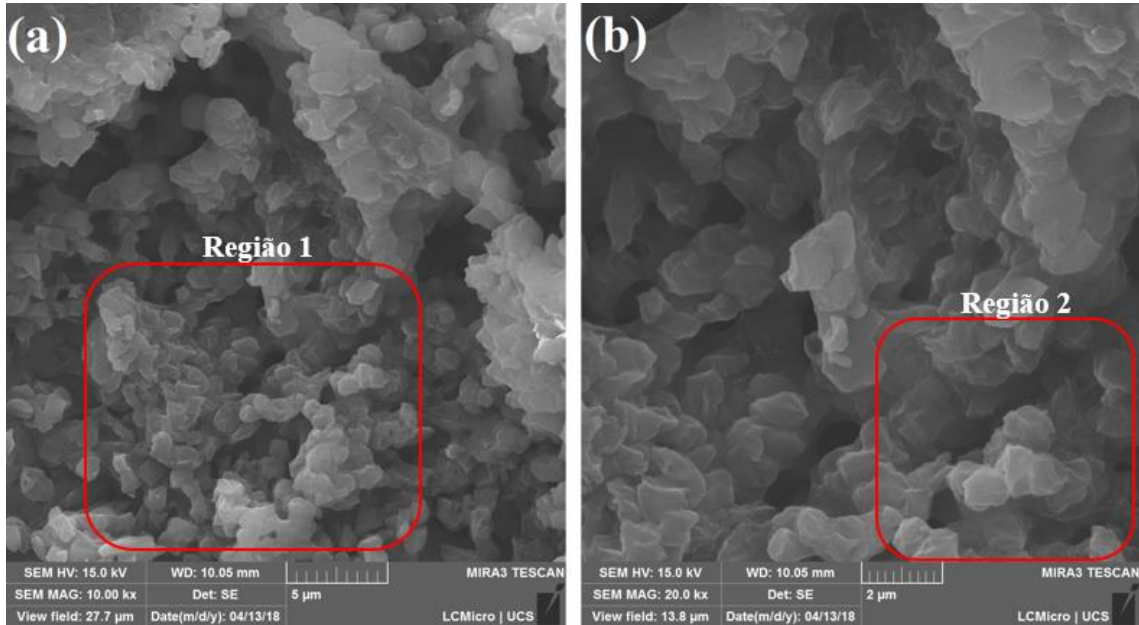


Fonte: A autora, 2018.

A Figura 25(a) apresenta detalhes das imagens de MEV-FEG obtidas das estruturas foliares, Região 1. A Região 2 mostrada na Figura 25(b) revela que os aglomerados são constituídos por pequenos aglomerados com dimensões entre 1 μm e 2 μm , que em algumas

situações coalescem e constituem aglomerados maiores, porém com dimensões da ordem de unidades de micrometros.

Figura 25 – Imagens de MEV-FEG obtidas para as microcápsulas de PCL sintetizadas em meio contendo geraniol: (a) ampliação de 10000 vezes e (b) 20000 vezes



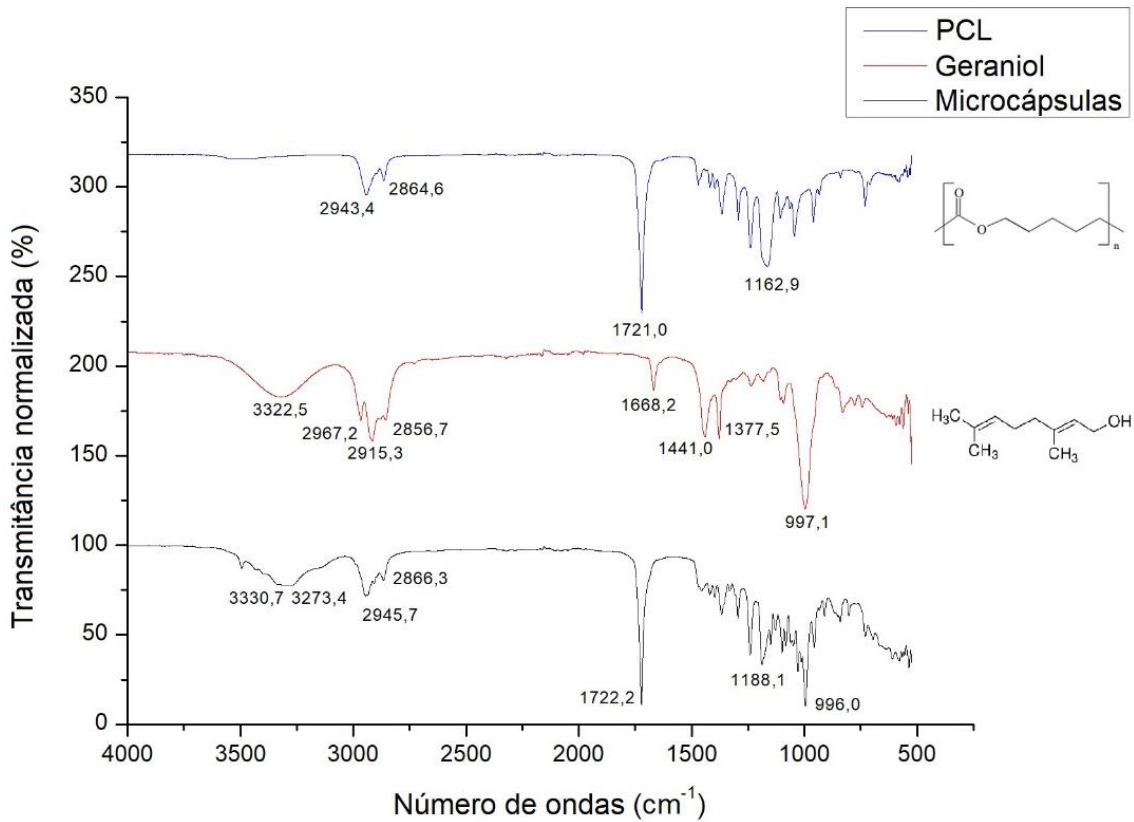
Fonte: A autora, 2018.

Os pequenos aglomerados são constituídos por dezenas de microcápsulas de PCL-Geraniol, que interagem entre si por interações físicas de pequeno alcance estabelecidas entre as superfícies do revestimento de PCL. A policaprolactona é um polímero apolar e ao revestir o geraniol forma microcápsulas com superfície apolar (CIPITRIA et al., 2011). Devido a isto, apresenta um curto alcance de interação física entre as microcápsulas de PCL-Geraniol causando a formação de pequenos aglomerados.

5.3.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR foi utilizada para avaliar a presença dos grupos funcionais característicos do geraniol puro e do polímero puro (PCL), bem como as possíveis modificações nos grupos químicos funcionais das microcápsulas de PCL-Geraniol. Os espectros de FTIR são mostrados na Figura 26.

Figura 26 – Espectro na região do infravermelho, FTIR obtidos para o PCL, geraniol e microcápsulas de PCL-Geraniol

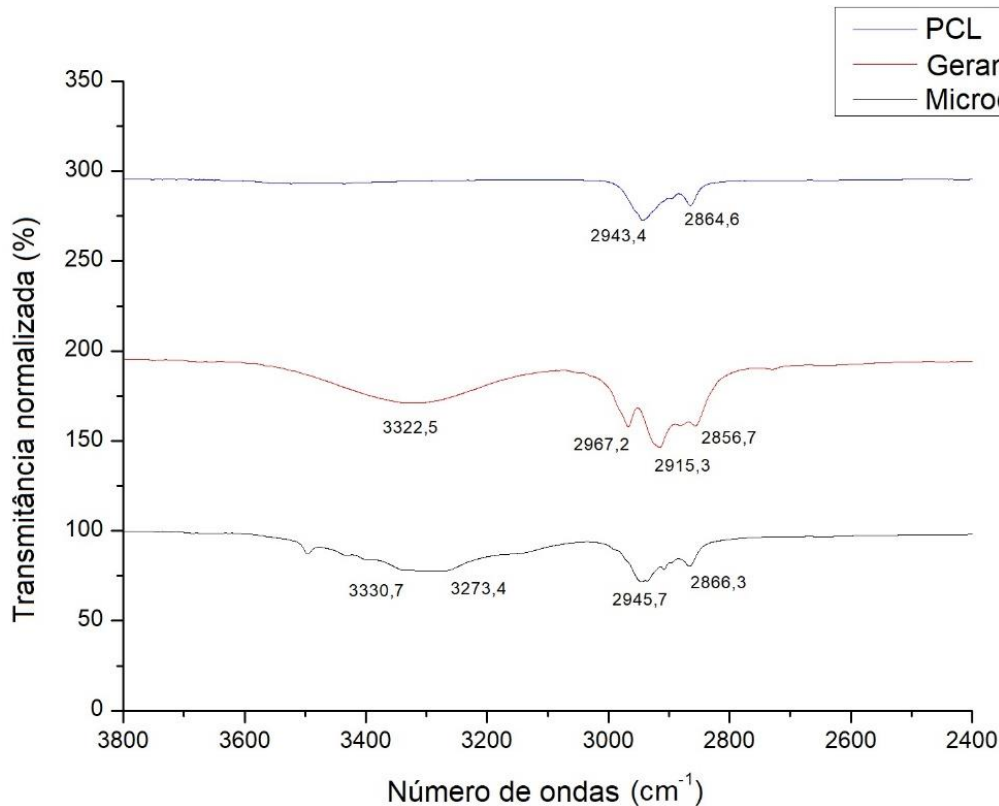


Fonte: A autora, 2018.

Os espectros de FTIR dos compostos PCL, geraniol e das microcápsulas de PCL-Geraniol apresentam bandas em número de ondas que variam de 4000 a 500 cm⁻¹. Para a melhor análise, os resultados de FTIR são apresentados em diferentes intervalos de número de onda entre 3800 a 2400 cm⁻¹, Figura 27, e entre 1900 a 500 cm⁻¹, Figura 28.

O espectro mostrado na Figura 27 para o polímero PCL está de acordo com os resultados relatados por Hoidy, Al-mulla e Al-janabi (2010), sendo as bandas de transmitância em 2943 e 2866 cm⁻¹ relativas aos modos vibracionais de alongamento das ligações C-H. Para o geraniol, as bandas de transmitância em 3322,5 cm⁻¹ referentes aos alongamentos das ligações -OH e em 2967,2 cm⁻¹, 2915,3 cm⁻¹, e 2856,7 cm⁻¹ relativas ao alongamento das ligações C-H. Wany et al. (2013) encontraram resultados semelhantes em seus estudos e identificaram bandas em 2935-2915 cm⁻¹ referentes ao estiramento assimétrico de ligações C-H e em 2800-2700 cm⁻¹ referentes ao alongamento aldeídico terminal do C-H. Estudos realizados por Aytac et al. (2016) identificaram bandas em 3326 cm⁻¹ para as ligações -OH e bandas em 2978 cm⁻¹ e 2933 cm⁻¹ para as ligações CH₂.

Figura 27 – Espectro na região do infravermelho (FTIR) obtido para o PCL, geraniol e para as microcápsulas de PCL-Geraniol. Intervalo de 3800 a 2400 cm^{-1}



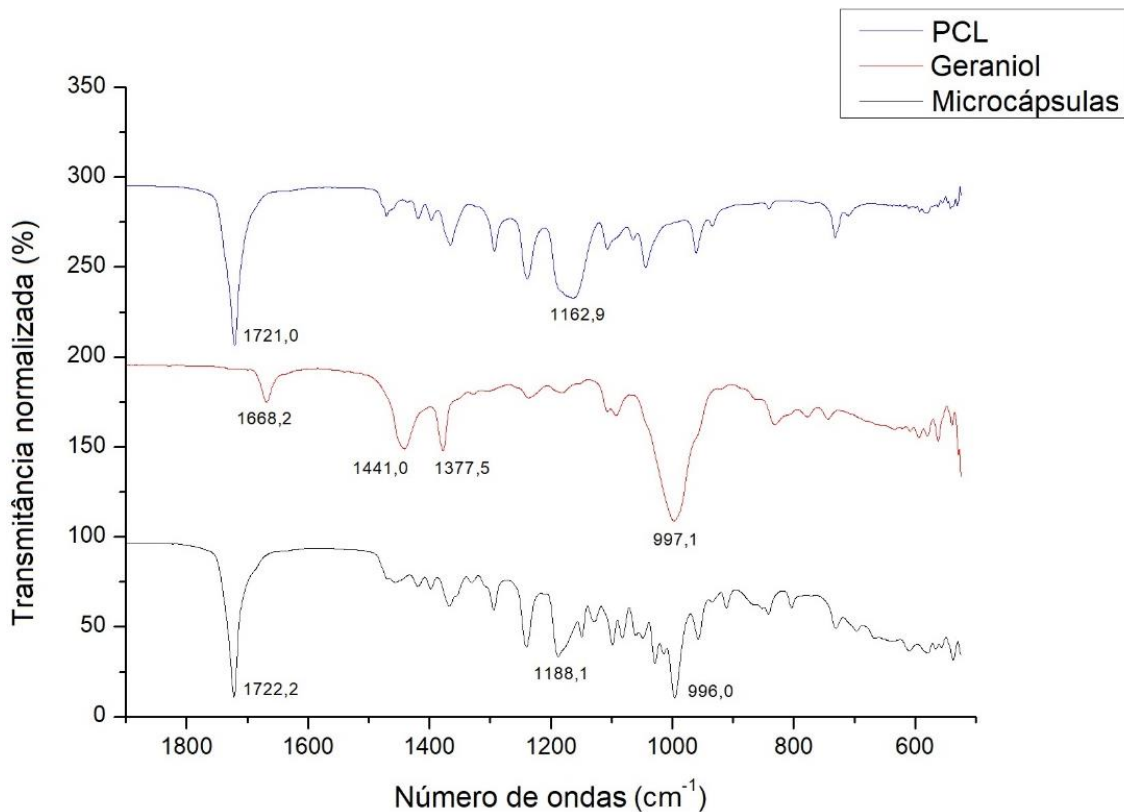
Fonte: A autora, 2018.

Os espectros de FTIR obtidos neste intervalo de número de onda para as microcápsulas de PCL-Geraniol não mostraram evidências de deslocamento significativo das bandas de transmitância quando comparados com os espectros das substâncias isoladas, o que indica que não ocorreram reações químicas significativas no processo de encapsulação do PCL e do geraniol.

Na Figura 28, os espectros mostram para o PCL uma banda de transmitância em $1721,0 \text{ cm}^{-1}$, referente aos modos vibracionais da ligação C=O, e outra em $1162,9 \text{ cm}^{-1}$ referente as ligação C-O. Hoidy, Al-mulla e Al-janabi (2010) identificaram bandas relativas à ligação C=O em 1724 cm^{-1} e às ligações C-O em 1167 cm^{-1} .

Nos espectros de geraniol a banda em $1668,2 \text{ cm}^{-1}$ refere-se ao estiramento C=C, enquanto que aquelas em $1441,0 \text{ cm}^{-1}$ e em $1377,5 \text{ cm}^{-1}$ são referentes ao alongamento do C-H. Além disso, em $997,1 \text{ cm}^{-1}$ há uma banda referente à ligação C=C. Resultados similares foram encontrados por Aytac et al. (2016), que identificaram bandas em 1416 cm^{-1} (OH), 1371 cm^{-1} (CH_2) e em 1650 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} , 946 cm^{-1} , 863 cm^{-1} (C=C). Wany e colaboradores (2013), identificaram bandas em 1670 cm^{-1} (C=C), 1380 cm^{-1} (C-H) e 1350 cm^{-1} (C-C).

Figura 28 – Espectro na região do infravermelho (FTIR) obtido para o PCL, geraniol e para as microcápsulas de PCL-Geraniol. Intervalo de 1900 à 500 cm^{-1}



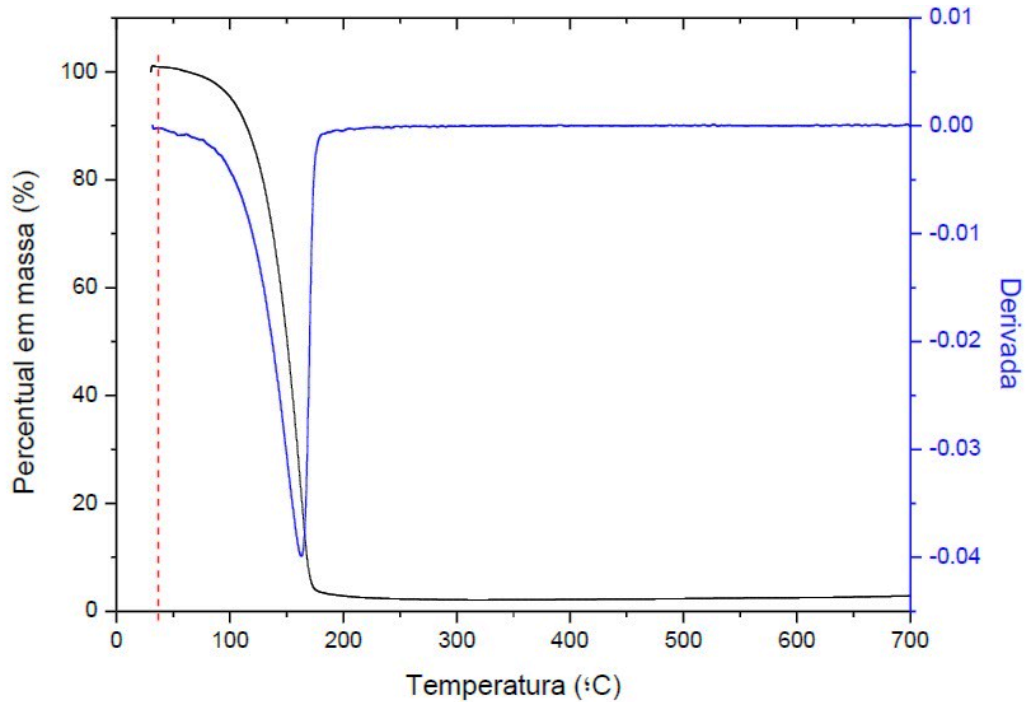
Fonte: A autora, 2018.

As bandas características do espectro de FTIR obtidas com as microcápsulas de PCL-Geraniol possuem intensidades semelhantes quando comparadas aos compostos puros e não apresentam deslocamentos significativos, confirmando assim, a presença do geraniol na matriz polimérica das microcápsulas e apenas interações físicas entre o polímero e o óleo essencial.

5.3.5 Termogravimetria (TGA) dos compostos puros geraniol e PCL

Os compostos geraniol e PCL puro foram analisados com TGA, a fim de identificar possíveis alterações que um aquecimento poderia proporcionar na massa destes compostos. O termograma obtido para o geraniol está apresentado na Figura 29.

Figura 29 – Termograma de TGA e a diferencial do termograma de TGA para o geraniol puro

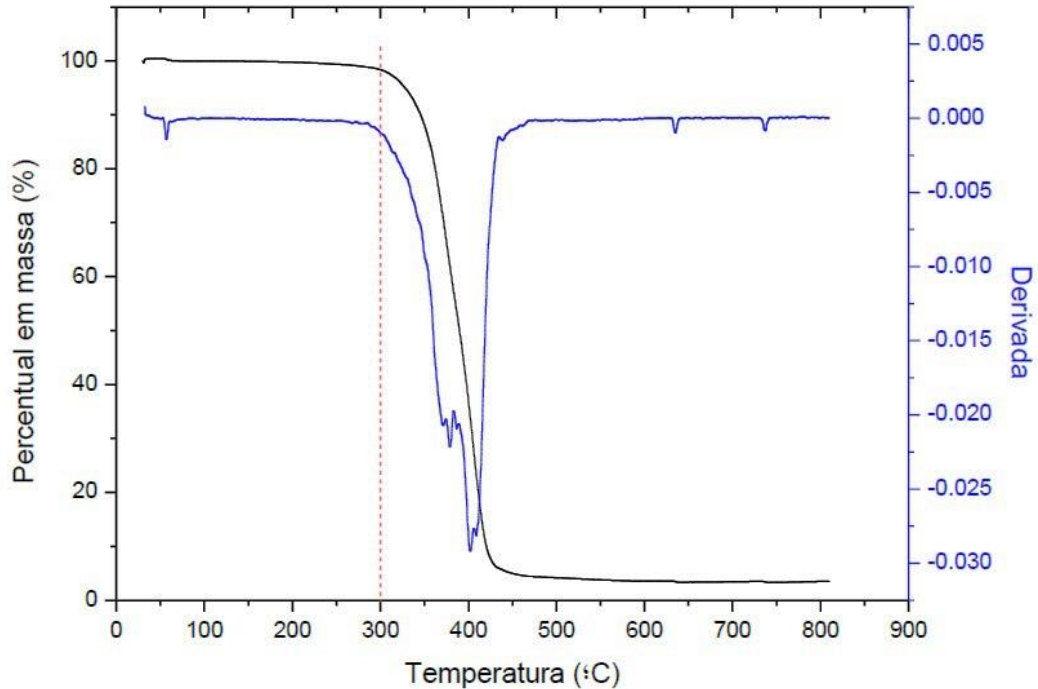


Fonte: A autora, 2018.

O termograma indica que o composto geraniol tem estabilidade térmica até aproximadamente 35 °C. A partir desta temperatura, a maioria das moléculas do composto volatiliza e é liberada durante o aquecimento. Em temperaturas próximas a 175 °C a derivada da TGA mostra o ponto de máxima de perda de massa, correspondendo a condição de temperatura de máxima taxa de degradação térmica do composto. Giongo et al. (2016) encontraram resultados semelhantes para o geraniol, com ponto de volatilização em torno de 33 °C e com a degradação total em torno de 180 °C.

A Figura 30 mostra o termograma obtido para o polímero PCL puro.

Figura 30 – Termograma de TGA e a diferencial do termograma de TGA para o PCL puro



Fonte: A autora, 2018.

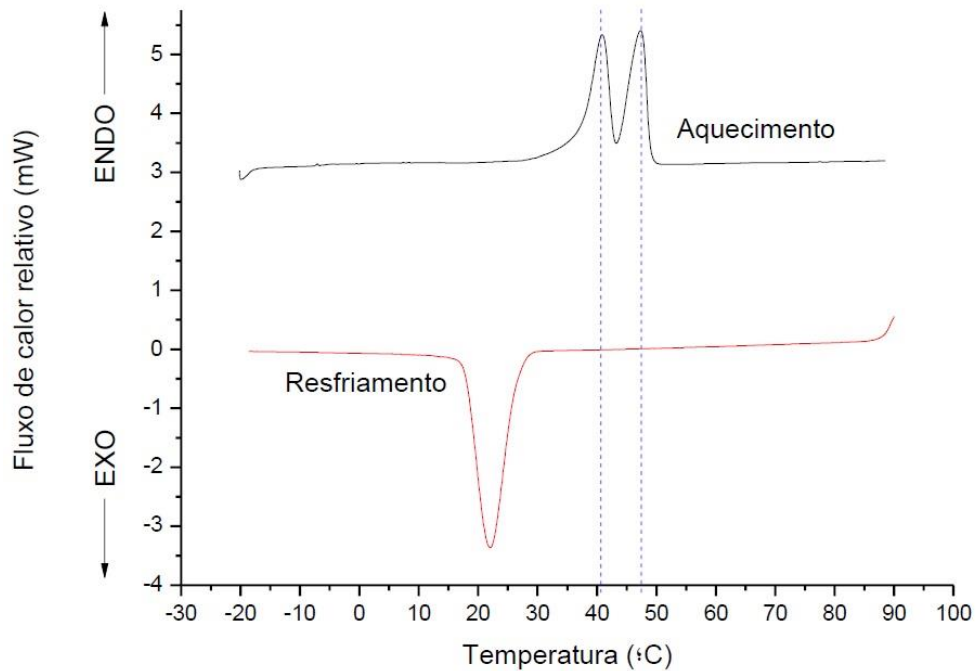
A partir do termograma de TGA obtido para o PCL puro (Figura 30), verifica-se uma redução significativa na massa do polímero a partir de aproximadamente 300 °C, estendendo-se até aproximadamente 425 °C. Neste intervalo de temperatura ocorre a máxima perda de massa por degradação térmica do material. Unger, Vogel e Siesler (2010) obtiveram resultados semelhantes aos do presente estudo, para o PCL, onde a degradação/decomposição iniciou em 310 °C e terminou em 410 °C. Os resultados indicam que o polímero PCL é termicamente estável até temperaturas próximas de 300 °C.

5.3.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos compostos puros geraniol e PCL

A curva de calorimetria diferencial de varredura (DSC) obtida para o polímero PCL é apresentada na Figura 31.

Na análise da curva de calorimetria diferencial de varredura foi considerada apenas o segundo aquecimento, de modo a garantir que o histórico térmico oriundo do processamento de síntese seja eliminado da análise. Os dois picos apresentados na curva de DSC no segundo aquecimento estão associados à fusão do PCL puro e mostram que o polímero tem duas fases cristalinas.

Figura 31 – Curva de DSC obtida para o PCL puro com as curvas de aquecimento e de resfriamento



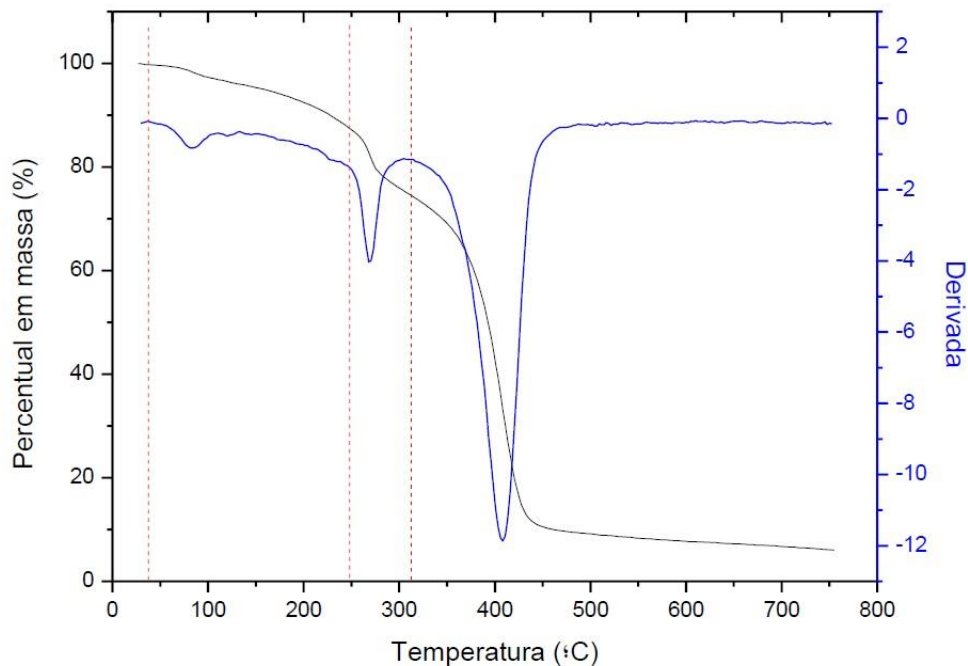
Fonte: A autora, 2018.

O primeiro pico endotérmico é atribuído a fusão da fase α , tendo como temperatura de fusão aproximadamente 41 °C. O segundo pico endotérmico é atribuído a fusão da fase β , com temperatura de fusão aproximadamente 48 °C. Resultados semelhantes foram obtidos por Matsui, Munaro e Akcelrud (2005) em estudos térmicos com o PCL, encontrando para o primeiro pico a temperatura de fusão de 45,1 °C e para o segundo pico a temperatura de 51,4 °C. Os resultados de DSC indicam a presença de duas fases cristalinas quando o polímero PCL está no estado sólido e que a partir de temperaturas acima de 60 °C ambas as fases podem ser fundidas.

5.3.7 Termogravimetria (TGA) das microcápsulas

O termograma TGA apresentado na Figura 32 foi obtido para as microcápsulas de PCL-Geraniol.

Figura 32 – Termograma de TGA e a diferencial do termograma de TGA para as microcápsulas de PCL-Geraniol



Fonte: A autora, 2018.

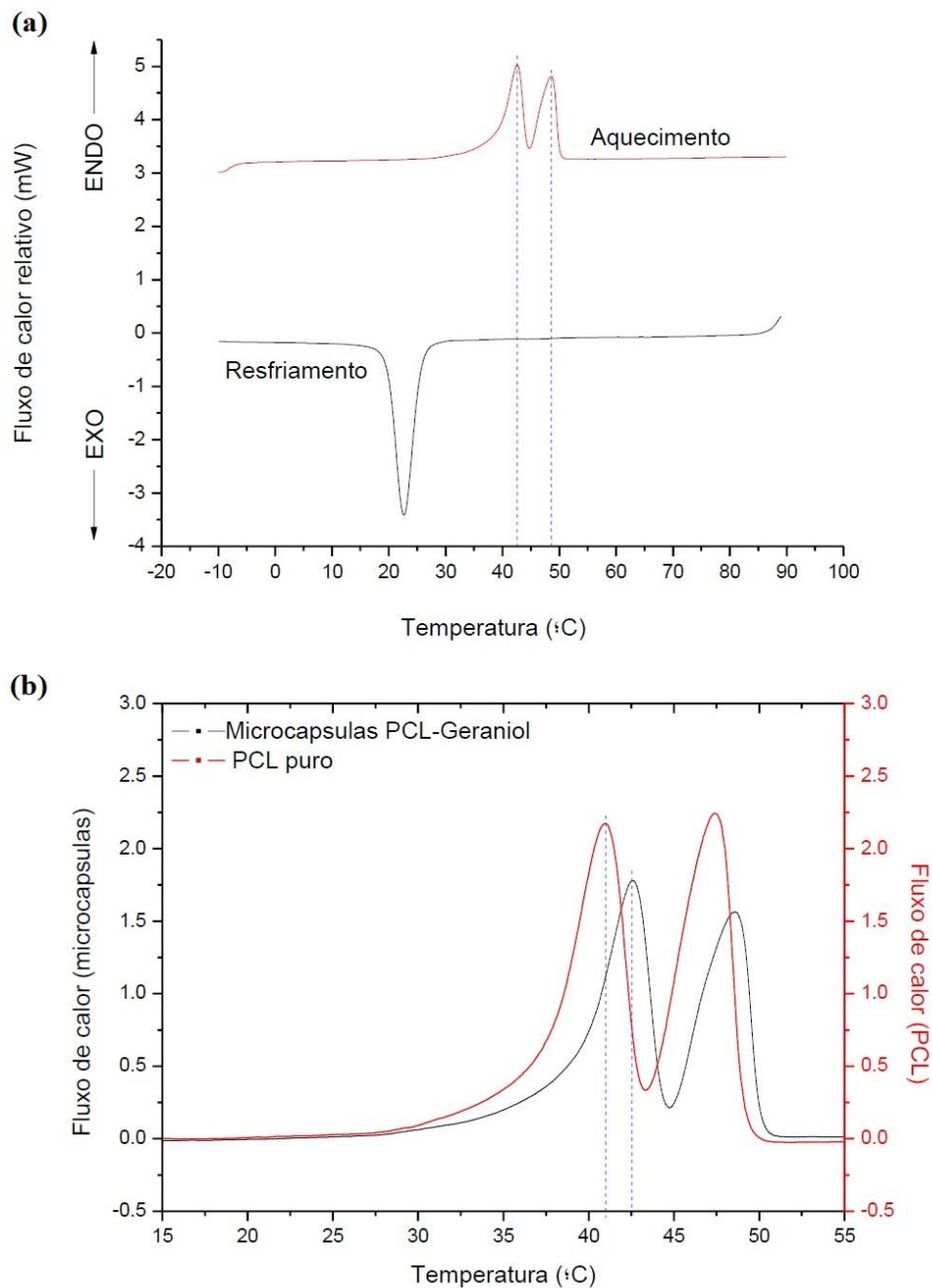
A partir do termograma de TGA obtido para as microcápsulas de PCL-Geraniol é possível observar que na temperatura de aproximadamente 35 °C inicia-se a volatilização do óleo essencial geraniol, a qual identificou-se no termograma do geraniol puro, apresentado na Figura 29. Acima de 60 °C até aproximadamente 100 °C, observa-se a perda por volatilização da água e do geraniol que está impregnado à superfície das microcápsulas. A partir de aproximadamente 250 °C, inicia-se o processo de degradação da cápsula, temperatura característica do PCL puro (Figura 30). Observa-se ainda, que o óleo impregnado nas microcápsulas de PCL tem sua degradação completa na temperatura de aproximadamente 275 °C, que ao comparar ao termograma do geraniol puro (Figura 29), apresenta um deslocamento de 100 °C no pico de degradação, sendo que este resultado demonstra proteção do óleo pelo agente encapsulante. A partir de 310 °C acontece a degradação da PCL, que se completa em aproximadamente 400 °C, comportamento este também observado no termograma do PCL puro.

Com base no termograma obtido, pode-se dizer que uma fração do geraniol não estava adsorvido na microcápsula, devido a volatilização na mesma temperatura do óleo puro, já a fração do geraniol contido nas microcápsulas de PCL permaneceu na matriz do polímero até o momento em que este começou a se fundir e depois se decompor.

5.3.8 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) das microcápsulas PCL-Geraniol

A Figura 33(a) mostra a curva de calorimetria diferencial de varredura (DSC) obtida para as microcápsulas de PCL-Geraniol, e a Figura 33(b) apresenta a comparação dos termogramas de DSC para o segundo aquecimento das microcápsulas de PCL-Geraniol e PCL puro.

Figura 33 – (a) Termograma de DSC obtido para as microcápsulas de PCL-Geraniol com as curvas de aquecimento e de resfriamento e (b) comparação dos termogramas de DSC para o segundo aquecimento das microcápsulas de PCL-Geraniol e PCL puro



Fonte: A autora, 2018.

Os resultados mostram termogramas semelhantes aos termogramas de DSC obtidos para o polímero PCL. É possível verificar que o primeiro pico endotérmico (fase α) ocorre em uma temperatura de fusão de aproximadamente 43 °C e o segundo pico endotérmico (fase β) com temperatura de fusão de aproximadamente 49 °C. Não são observados picos endotérmicos referentes a uma possível volatilização do composto geraniol. Considerando os resultados de TGA com o aquecimento do composto até 40 °C todo geraniol deveria ser volatilizado e picos nos termogramas de DSC deveriam ser identificados. A ausência destes picos corrobora com a possibilidade de que o composto de geraniol esteja encapsulado por revestimentos do polímero PCL.

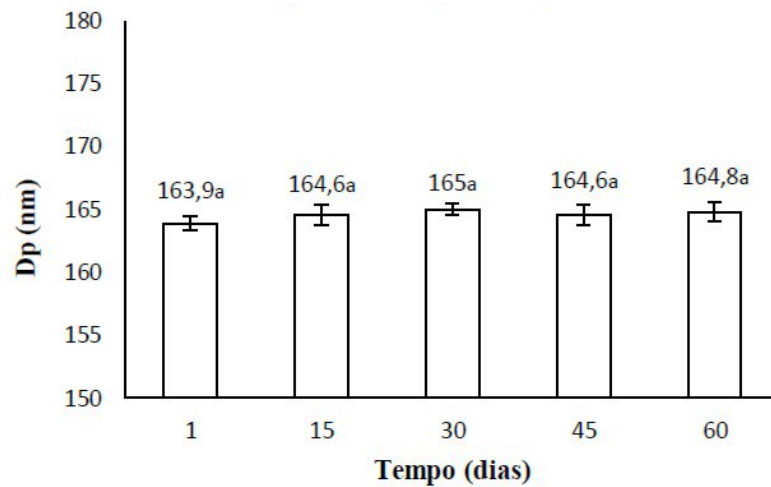
Os resultados também mostram que as microcápsulas de PCL-Geraniol têm as mesmas fases α e β que o PCL puro, porém com um pequeno aumento do valor das temperaturas de fusão, ou seja, mudanças no grau de cristalinidade, Figura 33(b). A presença do geraniol proporciona a redução de 26,5% no grau de cristalinidade total das microcápsulas de PCL-Geraniol, um forte indicativo de que ocorrem interações físicas entre o composto geraniol e a matriz polimérica de PCL que desfavorecem a cristalização do polímero.

5.3.9 Estabilidade das microcápsulas de PCL-Geraniol em suspensão

A estabilidade das microcápsulas de PCL-Geraniol foi avaliada em suspensão a temperatura de 4 °C por um período de 60 dias. Durante os testes de estabilidade nenhuma modificação significativa visual foi observada nas suspensões, como mudança de cor, presença de precipitados e separação de fases. Portanto, todas as suspensões estudadas, com diferentes tempos, foram classificadas como emulsões macroscopicamente normais, o que representa boa estabilidade do sistema. A aparente estabilidade das suspensões ao longo do período de 60 dias pode ser considerada um importante indicador macroscópico da estabilidade das microcápsulas de PCL-Geraniol.

Na Figura 34 são mostrados os valores de diâmetro médio obtidos para as microcápsulas de PCL-Geraniol nas suspensões testadas durante o período de 60 dias. A partir da análise de significância estatística com o teste de *Tukey* ($p < 0,05$) constata-se que o valor médio é de $164,58 \pm 0,27$ nm para todas as suspensões, independentemente do tempo de teste.

Figura 34 – Valores médios de tamanho médio de partícula para as microcápsulas de PCL-Geraniol em suspensão ao longo do tempo

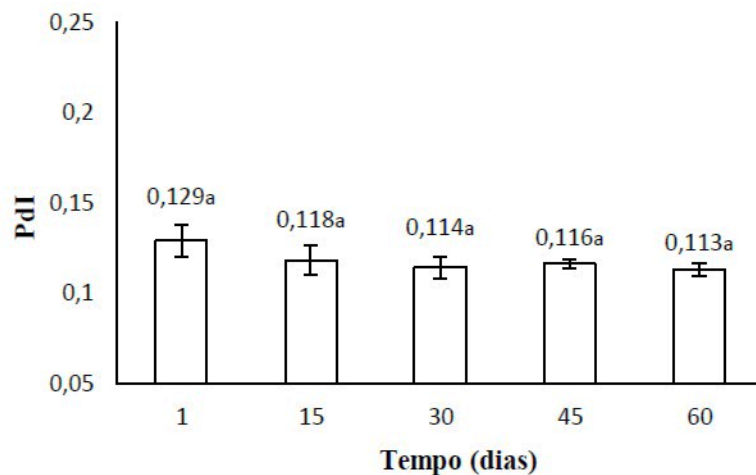


* Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores, pelo teste de *Tukey*.

Fonte: A autora, 2018.

A Figura 35 mostra os valores do índice de polidispersão determinados para as suspensões contendo as microcápsulas de PCL-Geraniol ao longo do período de testes de 60 dias. É possível constatar que não há diferenças para os valores de índices de polidispersão das microcápsulas durante todo o tempo de armazenamento. Os valores dos índices de polidispersão variam entre 0,1 e 0,2, que segundo a literatura científica indicam pequena variação no tamanho das microcápsulas, ou seja, uma boa homogeneidade no tamanho das microcápsulas de PCL-Geraniol quando em solução (CHO et al., 2013).

Figura 35 – Valores do índice de polidispersão determinados para as suspensões contendo as microcápsulas de PCL-Geraniol ao longo do período de testes de 60 dias



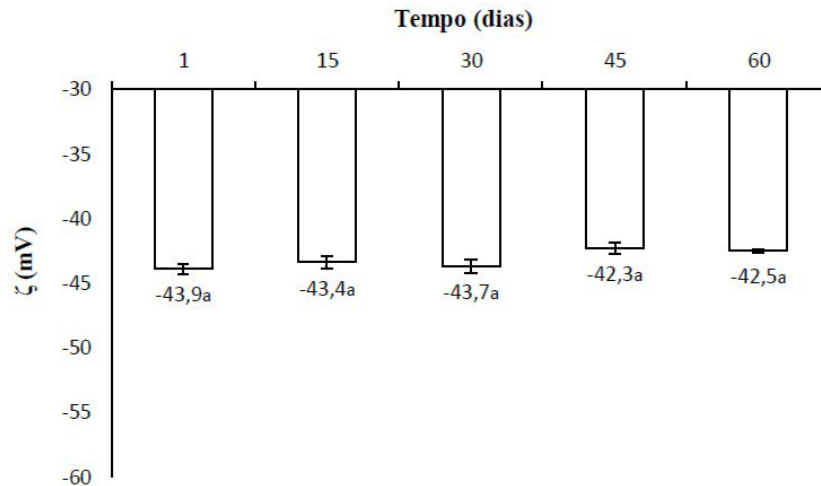
* Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores, pelo teste de *Tukey*.

Fonte: A autora, 2018.

A análise da estabilidade das microcápsulas a partir dos valores de potencial zeta (ζ) revelou que as microcápsulas de PCL-Geraniol apresentaram baixos valores para ζ , entre -42 e -44 mV, conforme apresentado na Figura 36.

Constatou-se que não há diferenças significativas para os valores do potencial zeta determinados para as suspensões testadas durante o período de 60 dias. Os valores do potencial zeta determinados indicam boa estabilidade da suspensão, uma vez que valores superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são considerados potenciais zeta associados a soluções estáveis e que correspondem a condições de impedimento da aglomeração de partículas nas suspensões (CAI; ODE; MURAKAMI, 2006).

Figura 36 – Valores de potencial zeta (ζ) determinados para suspensões de microcápsulas de PCL-Geraniol testadas por diferentes tempos durante o período de 60 dias

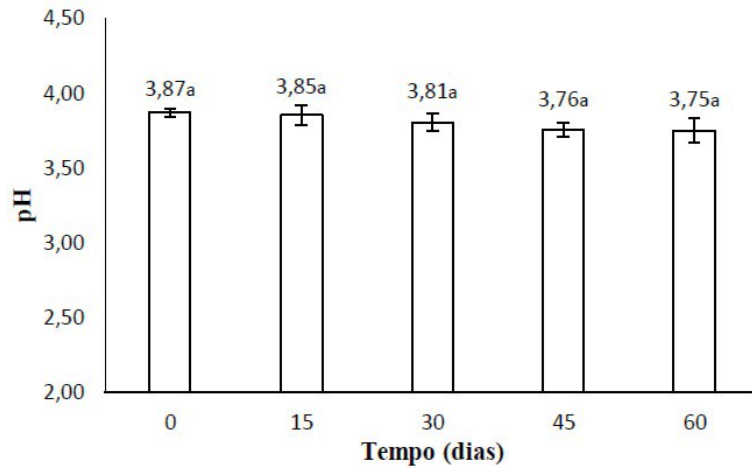


* Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores, pelo teste de *Tukey*.

Fonte: A autora, 2018.

Para avaliar a estabilidade química das microcápsulas de PCL-Geraniol os valores de pH das suspensões foram monitoradas pelo período de 60 dias, conforme pode ser visualizado na Figura 37. Os testes consideram que uma variação no valor do pH das soluções indica uma possível degradação ou interação química entre o polímero PCL e o meio aquoso (GUTERRES et al., 1995). Os valores médios de pH foram próximos a 3,8 e não apresentaram variações significativas de acordo com o teste de significância de *Tukey* ($p < 0,05$).

Figura 37 - Valores de pH para as suspensões de microcápsulas de PCL-Geraniol submetidas aos testes de estabilidade química pelo período de 60 dias

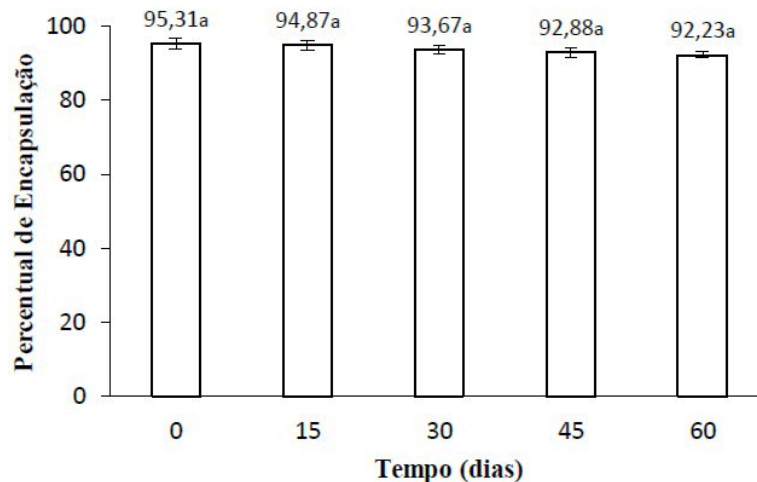


* Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores, pelo teste de *Tukey*.

Fonte: A autora, 2018.

A capacidade de retenção do geraniol pelos revestimentos de PCL nas microcápsulas de PCL-Geraniol, quando em suspensão, foi analisada durante o período de 60 dias. A capacidade de retenção foi avaliada determinando o percentual de geraniol presente nas microcápsulas em relação ao percentual de encapsulado. Ressalta-se que é muito importante que as microcápsulas de PCL-Geraniol sejam capazes de reter o composto ativo encapsulado na matriz polimérica por um período de tempo considerável. A Figura 38 mostra os resultados obtidos nesta etapa.

Figura 38 – Valores de percentual de geraniol encapsulado nas microcápsulas de PCL-Geraniol ao longo do período de 60 dias em suspensão



* Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores, pelo teste de *Tukey*.

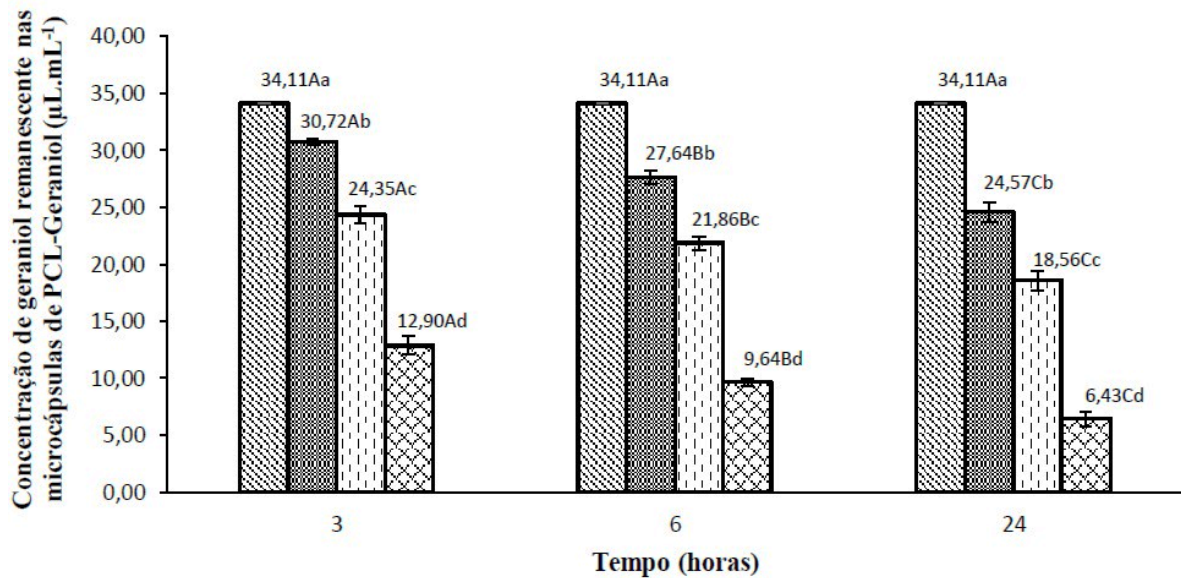
Fonte: A autora, 2018.

A partir da análise estatística com o teste de significância de *Tukey* ($p < 0,05$) constata-se que o valor médio do percentual de geraniol encapsulado não tem diferença significativa com o tempo de testes em suspensão, valor médio de $93,79\% \pm 1,04$. Os resultados indicam que as microcápsulas de PCL-Geraniol tem a capacidade de reter o composto ativo em suspensão durante 60 dias.

5.3.10 Teste de liberação com temperatura

O teste de liberação por efeito de temperatura foi conduzido com experimentos de exposição das microcápsulas de PCL-Geraniol com temperaturas ambiente e 30 °C, 60 °C e 90 °C com tempos de exposição de 3, 6 e 24 h. A Figura 39 apresenta a concentração de geraniol remanescente nas microcápsulas de PCL-Geraniol após tratamento térmico.

Figura 39 – Concentração de geraniol liberada com a exposição das microcápsulas de PCL-Geraniol a diferentes temperaturas e períodos de tempo



■ S/tratamento ■ T = 30°C ■ T = 60°C ■ T = 90°C

* Letras maiúsculas comparam temperatura iguais e tempos diferentes; letras minúsculas comparam temperaturas diferentes e tempos iguais, sendo que pelo teste de *Tukey* ($p < 0,05$), letras diferentes indicam diferença significativa entre os valores.

Fonte: A autora, 2018.

Os resultados indicam que há diferença estatística significativa entre as concentrações médias de geraniol remanescente nas microcápsulas de PCL-Geraniol após terem sido submetidas a diferentes temperaturas e diferentes tempos. É possível observar que apenas para

as amostras sem tratamento (temperatura ambiente) não houve diferença estatística significativa. A quantidade remanescente de geraniol pelas microcápsulas é menor quando estas são submetidas ao tratamento térmico com temperaturas maiores, para qualquer tempo de exposição. Com o aumento do tempo de exposição, para condição de temperatura acima de 30 °C, a quantidade remanescente de geraniol é menor.

A partir das análises térmicas realizadas por DSC com as microcápsulas de PCL-Geraniol nota-se que com temperaturas acima de 40 °C o processo de fusão do PCL é iniciado, porém apenas a fase α é fundida, liberando apenas uma fração encapsulada de moléculas de geraniol. Porém, com 60 °C tanto a fase α quanto a fase β são fundidas, liberando grande parte das moléculas de geraniol encapsuladas pelas estruturas cristalinas do PCL. Com temperaturas maiores, 90 °C, é possível que o geraniol remanescente na estrutura fundida do polímero continue sendo liberado, bem como as moléculas de geraniol que possam estar encapsuladas em microcápsulas menores, pelo seu rompimento.

Diante dos resultados é possível afirmar que a temperatura é um fator importante para definir o início e a taxa de liberação do geraniol encapsulado nas microcápsulas de PCL-Geraniol, podendo ser definido com um fator gatilho para a liberação.

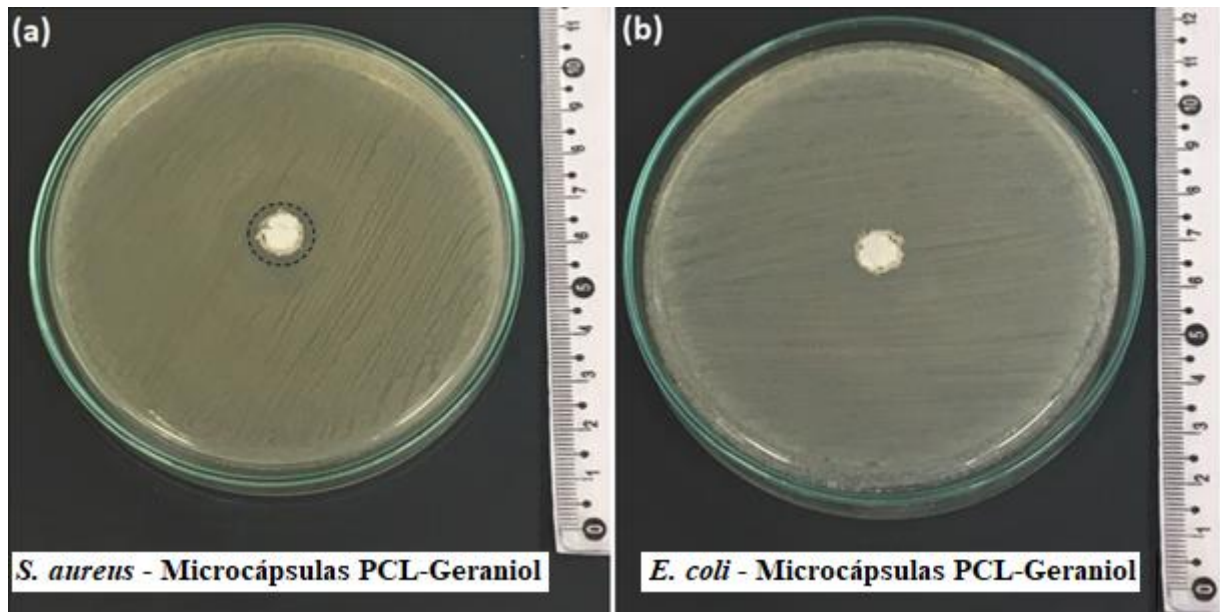
5.3.11 Propriedade antibacteriana das microcápsulas de PCL-Geraniol

5.3.11.1 Sem tratamento térmico

A Figura 40 mostra resultados dos testes de difusão em meio sólido para microcápsulas de PCL-Geraniol, sem tratamento térmico, para bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, estriadas com uma concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹.

Os resultados indicam a presença de um pequeno halo de inibição para *Staphylococcus aureus*, Figura 40(a), com diâmetro próximo a $2,00 \pm 0,29$ mm. Com *Escherichia coli* (b) não houve a formação de um halo de inibição. Esta característica mostra que o geraniol está encapsulado pelo PCL e mesmo ocorrendo a sua difusão para o meio externo às microcápsulas, isto ocorre com pequena taxa de difusão, não sendo suficiente para agregar a capacidade antibacteriana às microcápsulas.

Figura 40 – Resultados dos testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para microcápsulas de PCL-Geraniol, sem tratamento térmico, com inóculo 10^8 UFC·mL⁻¹: (a) *Staphylococcus aureus* e (b) *Escherichia coli*



Fonte: A autora, 2018.

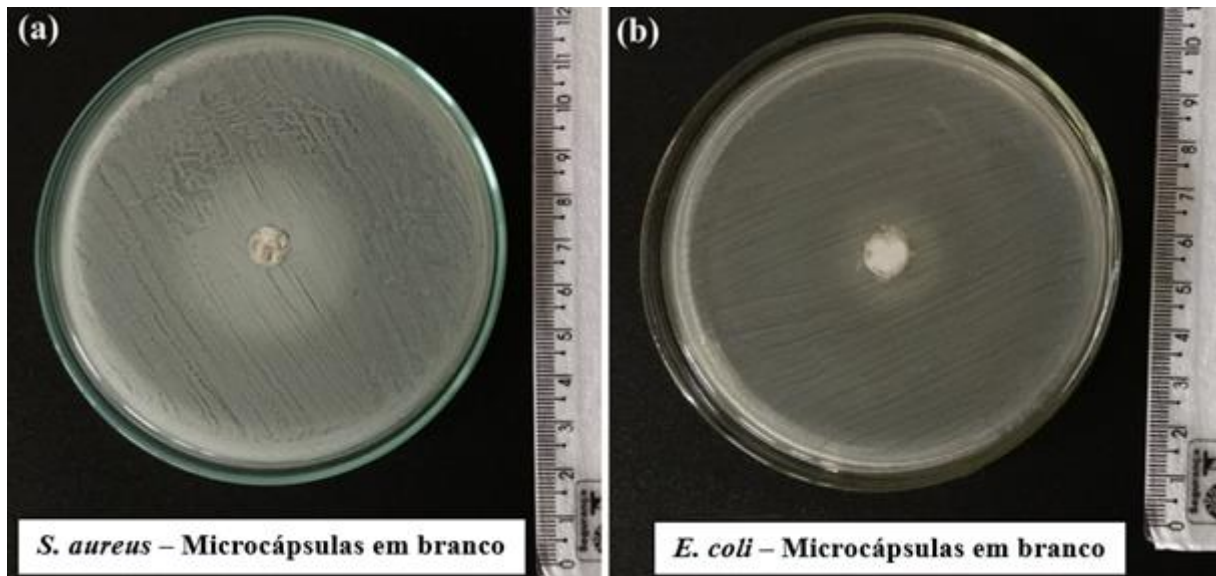
Ressalta-se ainda que nos testes com as microcápsulas em meio estriados com *Staphylococcus aureus* o pequeno halo de inibição formado pode ser decorrente do óleo essencial impregnado na superfície das microcápsulas. Como *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, são mais sensíveis aos agentes antibacterianos que as Gram-negativas, como as *Escherichia coli* (MANN; COX; MARKHAM, 2000).

5.3.11.2 Com tratamento térmico

Considerando que o tratamento térmico a 60 °C é suficiente para a fusão das fases α e β e a liberação de uma quantidade significativa de geraniol das microcápsulas de PCL-Geraniol as microcápsulas com tratamento de 60 °C a 3 h foram submetidas a testes microbiológicos de difusão em meio sólido.

A Figura 41 apresenta resultados dos testes de difusão em meio sólido para as microcápsulas de PCL sem o óleo essencial geraniol e tratadas a 60 °C por 3 h. Nas placas foram estriadas as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, a uma concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹.

Figura 41 – Resultados dos testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para microcápsulas de PCL sem geraniol com tratamento térmico em 60 °C a 3 h, com inóculo 10^8 UFC·mL⁻¹: (a) *Staphylococcus aureus* e (b) *Escherichia coli*

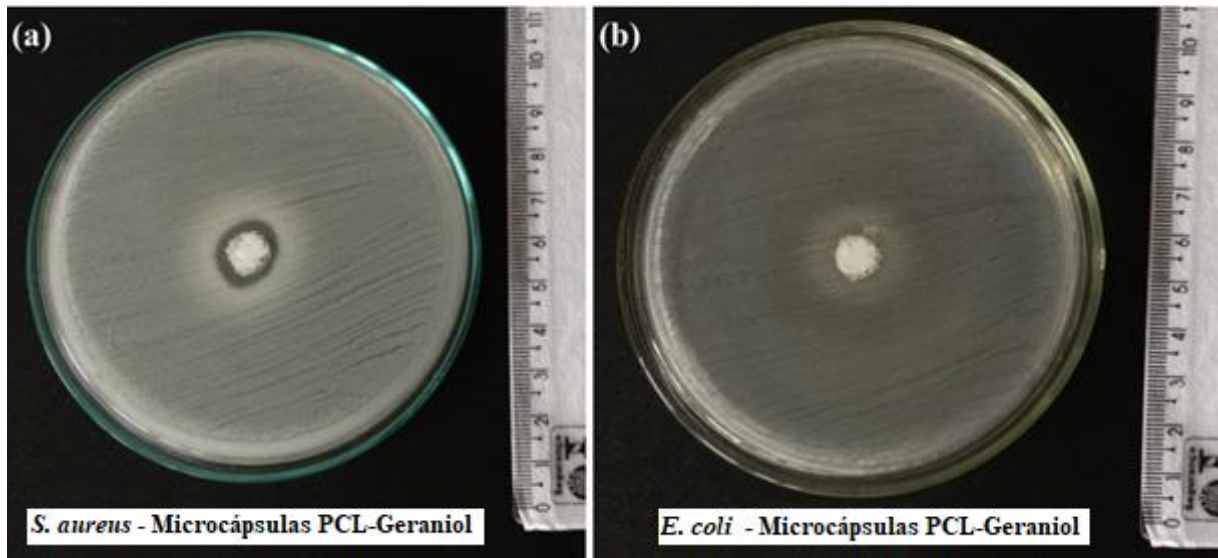


Fonte: A autora, 2018.

Os resultados comprovam que o tratamento térmico não proporciona modificações químicas no polímero PCL, a ponto de manifestar a propriedade antibacteriana. Com ambos os tipos de bactérias não há a formação de halos de inibição indicando que as microcápsulas de PCL sem o geraniol devem ser consideradas como compostos microbiologicamente inativos. Este resultado era esperado visto que o agente antibacteriano é o óleo essencial geraniol, o qual não está presente nestas microcápsulas.

A Figura 42 mostra os resultados dos testes de difusão em meio sólido para as microcápsulas de PCL-Geraniol após o tratamento térmico a 60 °C por 3 h para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Figura 42 – Resultados dos testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para as microcápsulas de PCL-Geraniol após o tratamento térmico com 60 °C a 3 h com inóculo 10^8 UFC·mL⁻¹: (a) *Staphylococcus aureus* e (b) *Escherichia coli*



Fonte: A autora, 2018.

A partir dos resultados é possível constatar que há a formação de um halo de inibição significativo para *Staphylococcus aureus*, com valor de diâmetro médio de $4,33 \pm 0,62$ mm, Figura 42(a). Com as bactérias *Escherichia coli* (b) não há a formação de um halo de inibição significativo, porém é possível constatar indicativos de início de formação de halo e que as microcápsulas de PCL não liberaram a quantidade de geraniol equivalente a concentração inibitória mínima (CIM) para esta bactéria.

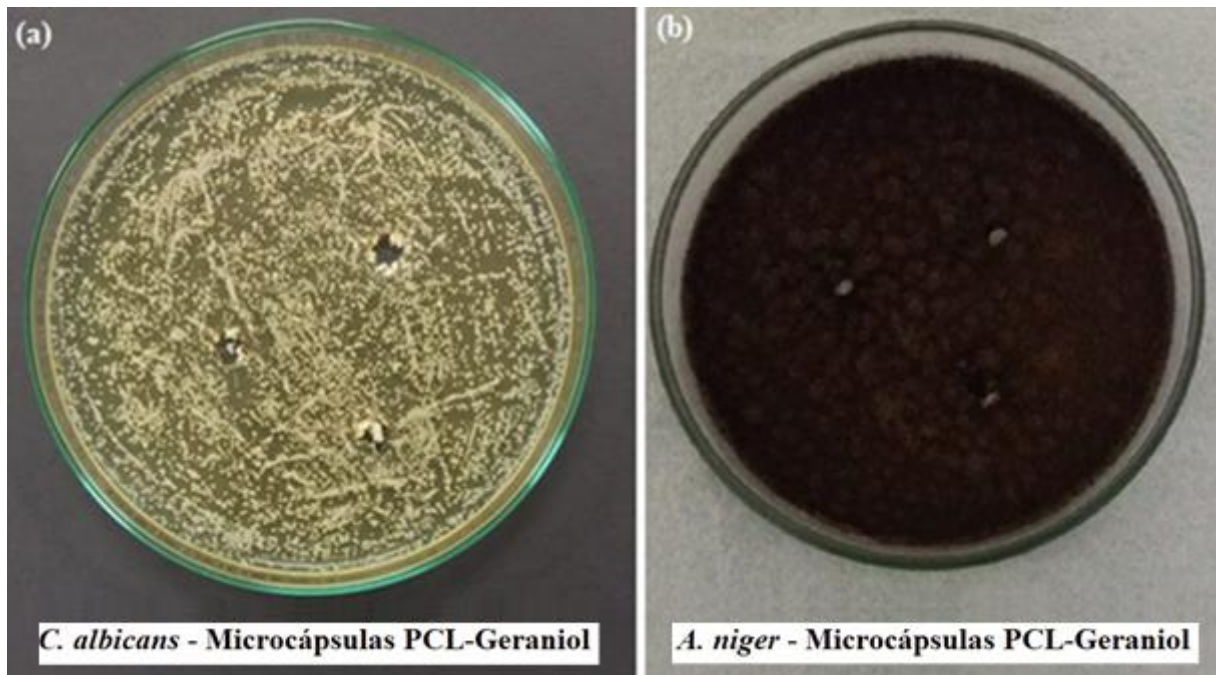
É possível constatar que o tratamento térmico das microcápsulas de PCL-Geraniol proporciona o aumento do halo de inibição do *S. aureus*, de $2,00 \pm 0,29$ mm para $4,33 \pm 0,62$ mm, e comprova que a temperatura é um fator que pode ser considerado um gatilho de liberação do geraniol das microcápsulas de PCL-Geraniol.

5.3.12 Propriedade antifúngica das microcápsulas de PCL-Geraniol

5.3.12.1 Sem tratamento térmico

A Figura 43 mostra os resultados dos testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para microcápsulas de PCL-Geraniol sem o tratamento térmico, para *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

Figura 43 – Resultados dos testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para microcápsulas de PCL-Geraniol sem o tratamento térmico com concentração de inóculo 10^5 esporos·mL⁻¹: (a) *Candida albicans* e (b) *Aspergillus niger*



Fonte: A autora, 2018.

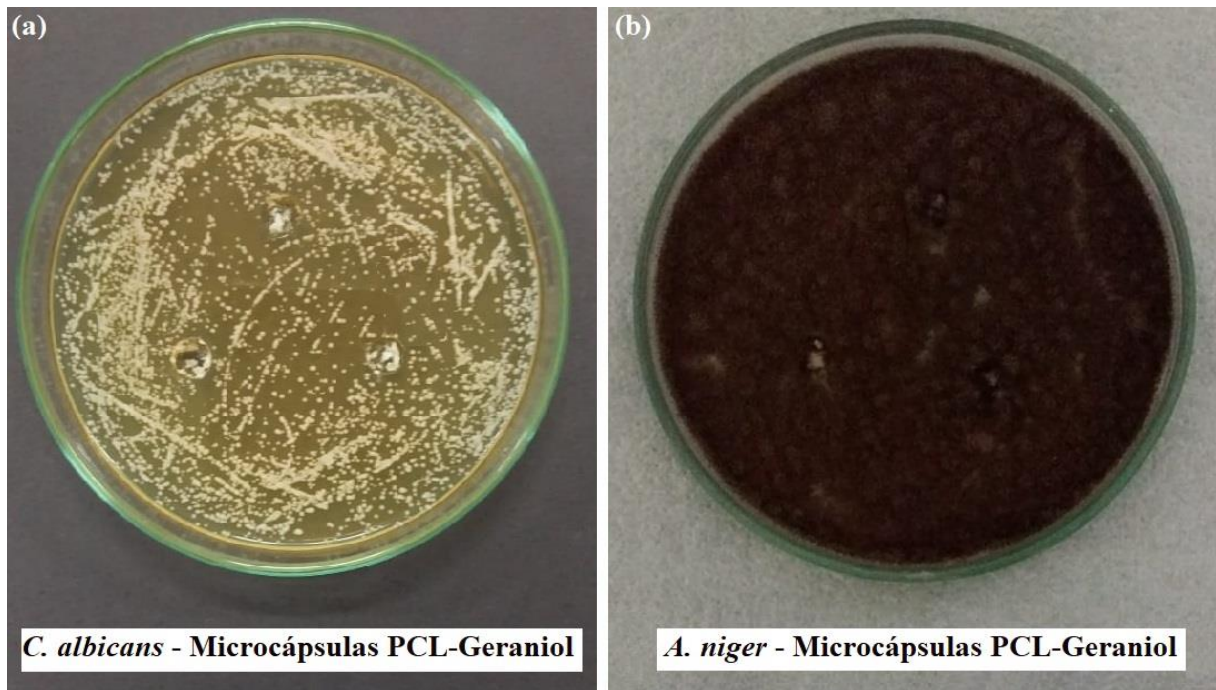
Os resultados não indicam a formação de halos de inibição para ambos os fungos. Esta característica é esperada considerando que as microcápsulas de PCL encapsulam o óleo essencial geraniol e, se ocorrer a liberação sem o tratamento térmico, ocorre com taxas muito baixas, a ponto de não agregar a atividade antifúngica.

5.3.12.2 Com tratamento térmico

Devido ao tratamento térmico mostrar-se como um gatilho, procedeu-se a análise para as microcápsulas com tratamento de 60 °C por 3 h utilizando-se esta temperatura por se tratar do ponto de fusão do PCL.

A Figura 44 ilustra a placa de difusão em meio sólido a partir de orifício contendo microcápsulas de PCL-Geraniol, com tratamento térmico, para *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

Figura 44 – Resultados dos testes de difusão em meio sólido a partir de orifício, com tratamento térmico, para microcápsulas de PCL-Geraniol com concentração de inóculo 10^5 esporos·mL⁻¹: (a) *Candida albicans* e (b) *Aspergillus niger*



Fonte: A autora, 2018.

A partir da Figura 44, pode-se observar que não houve halo de inibição para ambos os fungos, os referidos resultados podem ser explicados devido a não liberação da concentração inibitória mínima de óleo essencial geraniol, o qual é responsável por inibir o crescimento dos fungos.

6 CONCLUSÃO

O óleo essencial geraniol apresentou atividade antibacteriana a partir de uma concentração inibitória mínima de $3,745 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e mostrou-se microbiologicamente ativo frente a estas bactérias. O geraniol apresentou-se ainda como um composto antifúngico frente aos fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

A partir da técnica de polimerização em miniemulsão com evaporação de solvente foi possível obter, com eficiência de 95,44%, microcápsulas de PCL-Geraniol. As microcápsulas demonstraram-se estáveis por um período de 60 dias em suspensão refrigerada e têm tamanho médio de $164,58 \pm 0,27$ nm e baixo índice de polidispersão, entre 0,10 e 0,25.

Os resultados microbiológicos para as microcápsulas de PCL-Geraniol indicam que o geraniol está encapsulado pelo PCL e a sua difusão para o meio externo ocorre com pequena taxa de difusão. Os testes com tratamento térmico demonstram que a temperatura é um fator que favorece a liberação do composto geraniol das microcápsulas de PCL-Geraniol, portanto, pode ser considerado com um fator gatilho para a liberação do geraniol e contribuir para a atividade antimicrobiana das microcápsulas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aplicar as microcápsulas de PCL-Geraniol na fabricação de celulose antimicrobiana;
- Aplicar as microcápsulas de PCL-Geraniol na fabricação de filmes poliméricos antimicrobianos;
- Avançar com estudos mais detalhados a respeito de possíveis outros fatores gatilhos para a liberação do geraniol das microcápsulas de PCL-Geraniol;
- Realizar um estudo da cinética e mecanismo de liberação do composto geraniol das microcápsulas de PCL-Geraniol.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A.; KHAN A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 41-50, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-010-1050-8>.
- ALVES, T. M. de A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. de F. A.; JÚNIOR, S. A.; ZANI, C. L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 368-373, 2000.
- ALVIM, I. D. Microencapsulação: Afinal, o que é?. **Cereal Chocotec News**, São Paulo, p. 4-4, 2010. Disponível em: <
<http://www.ital.sp.gov.br/cerealchocotec/news/4/microencapsulacao.php>>. Acesso em: 13 maio 2017.
- ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 4, p. 689-757, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6700\(01\)00051-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6700(01)00051-x).
- AYTAC, Z.; YILDIZ, Z. I.; KAYACI-SENIRMAK, F.; KESKIN, N. O. S.; TEKINAY, T.; UYAR, T. Electrospinning of polymer-free cyclodextrin/geraniol–inclusion complex nanofibers: enhanced shelf-life of geraniol with antibacterial and antioxidant properties. **Rsc Advances**, v. 6, n. 52, p. 46089-46099, 2016. <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra07088d>.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Brazil Journal of Food and Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005. ISSN 0103-4235
- BAE, K. H.; LEE, Y.; PARK, T. G. Oil-Encapsulating PEO–PPO–PEO/PEG Shell Cross-Linked Nanocapsules for Target-Specific Delivery of Paclitaxel. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 2, p. 650-656, 2007. <http://dx.doi.org/10.1021/bm0608939>.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- BARBIERI, J. C.; LEIMANN, F. V. Extraction of passion fruit seed oil and microencapsulation in poly(ϵ -caprolactone). **Brazilian Journal of Food Research**, v. 5, n. 2, p. 1-9, 19 nov. 2014. <http://dx.doi.org/10.14685/rebrapa.v5i2.151>.
- CAI, K.; ODE, M.; MURAKAMI, H. Influence of polyelectrolyte dispersants on the surface chemical properties of aluminum in aqueous suspension. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 284-285, p.458-463, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.03.028>.
- CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol – A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 643-651, out. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>.
- CHO, E. J.; HOLBACK, H.; LIU, K. C.; ABOUELMAGD, S. A.; PARK, J.; YEO, Y. Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging

Technologies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2093-2110, 3 jun. 2013.
<http://dx.doi.org/10.1021/mp300697h>.

CIPITRIA, A.; SKELTON, A.; DARGAVILLE, T. R.; DALTON, P. D.; HUTMACHE, D.W. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds – a review. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 26, p. 9419-9453, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1039/c0jm04502k>.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9 (ISBN 1-56238-784-7). CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania, 19087- 1898 USA. 2012.

COSTA, J. M. G.; BORGES, S. V.; HIJO, A. A. C. T.; SILVA, E. K.; MARQUES, G. R.; CIRILLO, M. A.; Azevedo, V. M. Matrix structure selection in the microparticles of essential oil oregano produced by spray dryer. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, n. 8, p.717-727, 27 mar. 2013. <http://dx.doi.org/10.3109/02652048.2013.778909>.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.016>.

FAHLBUSCH, K. G.; HAMMERSCHMIDT, F. J.; PANTEN, J.; PICKENHAGEN, W.; SCHATKOWSKI, D.; BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. Flavors and Fragrances. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Germany, v. 15, p. 73-198, 2003.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial Biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. v. 9, n. 5, p. 10-15, abr, 2008.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Review: Microencapsulation of food ingredients. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

GIONGO, J. L.; VAUCHER, R. A.; OURIQUE, A. F.; STEFFLER, M. C. R.; FRIZZO, C. O.; HENNEMMAN, B.; SANTOS, R. C. V.; LOPES, L. Q. S.; RECH, V. C.; NISHIHARA, V. S. K.; RAFFIN, R. R. P.; GOMES, P. STEPPE, M. Development of nanoemulsion containing pelargonium graveolens oil: characterization and stability study. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 12, p. 271-276, 2016.
<http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2016v8i12.15108>.

GONÇALVES, M. J.; CRUZ, M. T.; TAVARES, A. C.; CAVALEIRO, C.; LOPES, M. C.; CANHOTO, J.; SALGUEIRO, L. Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 166-171, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.030>.

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 1, p.57-63, jan. 1995.
[http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00177-7](http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173(94)00177-7).

- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 29-45, maio 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4117-x>.
- HAYEK, S. A.; GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Antimicrobial natural products. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (ed). **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Greensboro, North Carolina: Formatex, v. 2, p. 910-921, 2013.
- HOIDY, W. H.; AL-MULLA, E. A. J.; AL-JANABI, K. W. Mechanical and Thermal Properties of PLLA/PCL Modified Clay Nanocomposites. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 18, n. 4, p. 608-616, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10924-010-0240-x>.
- HUNG, Y. P. **Encapsulation of nanomagnetite within polycaprolactone microspheres for bone replacement**. 2011. 180 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – University of Birmingham, Edgbaston, 2011.
- JANJARASSKUL, T.; TANANUWONG, K.; KONGPENSOOK, V.; TANTRATIAN, S.; KOKPOL, S. Shelf life extension of sponge cake by active packaging as an alternative to direct addition of chemical preservatives. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 166-174, out. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.049>.
- JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; SCHMIDT, E.; STOYANOVA, A. S.; DENKOVA, Z.; NIKOLOVA, R.; GEISLER, M. Purity, Antimicrobial Activities and Olfactoric Evaluations of Geraniol/Nerol and Various of Their Derivatives. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 3, p. 288-291, 2007. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2007.9699283>.
- LANDFESTER, K. Synthesis of Colloidal Particles in Miniemulsions. **Annual Review of Materials Research**, v. 36, n. 1, p. 231-279, 2006. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.matsci.36.032905.091025>.
- LANDFESTER, K.; BECHTHOLD, N.; TIARKS, F.; ANTONIETTI, M. Formulation and Stability Mechanisms of Polymerizable Miniemulsions. **Macromolecules**, v. 32, n. 16, p. 5222-5228, 1999.
- LEITE, M. C. A.; BEZERRA, A. P. de B.; SOUSA, J. P.; LIMA, E. de O. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Mycology**, v. 53, n. 3, p. 275-284, 2015. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu078>
- LERTSUTTHIWONG, P.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 3, p. 856-860, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2008.08.004>.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322005000200003>.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: e-papers, 2001.
- LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; ROCA, M. F. L.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. S.; ROLIM-NETO, P. J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e

Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784-793, 2007.

MANN, C. M.; COX, S. D.; MARKHAM, S. L. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 294-297, 2000. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00712.x>.

MARTINS, C. T.; SOUZA, L. K. H. **Atividade dos óleos essenciais de *Litsea cubeba* e *Cymbopogon martini* sobre isolados do complexo *Cryptococcus neoformans***. 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

MATSUI, M.; MUNARO, M.; AKCELRUD, L. Caracterização térmica de blendas de oligômero uretânico e quitina por DMTA e DSC. In: **Congresso Brasileiro de Polímeros**, 8, 2005. Águas de Lindóia, Brasil. Resumos. Águas de Lindóia: ABPOL, 2005. Res, 661.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2335-2346, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00101-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00101-0).

MIRANTE, D. C.; PAULA, J. P. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antimicrobiana de micropartículas de polilisina e de nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* Cheel (Myrtaceae)**. 2015. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, ago. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>.

NAVARRETE, A.; WALLRAF, S.; MATO, R. B.; COCERO, M. J. Improvement of Essential Oil Steam Distillation by Microwave Pretreatment. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 8, p. 4667-4671, 2011. <http://dx.doi.org/10.1021/ie102218g>.

NCCLS. **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline**. NCCLS document M44-A (ISBN 1-56238-532-1). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NUNES, G. L.; SILVA, T. M.; HOLKEM, A. T.; SCHLEY, V.; MENEZES, C. R. Microencapsulação de culturas probióticas: princípios do método de spray drying. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 132-141, dez. 2015. <http://dx.doi.org/10.5902/2179460x19742>.

OLIVEIRA, D. L. P. **Produção e avaliação de micropartículas lipídicas contendo *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium lactis* produzidas por spray chilling**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, USP, Pirassununga, 2011.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli*

O157:H7, Salmonella Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009>.

PARK, E.; MOON, W.; SONG, M.; KIM, M.; CHUNG, K.; YOON, J. Antimicrobial activity of phenol and benzoic acid derivatives. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, n. 4, p. 209-214, jan. 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/s0964-8305\(01\)00058-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0964-8305(01)00058-0).

PEI, A.; SHEN, Z.; YANG, G. Preparation of TiO₂ nanocapsules for loading and release of antimicrobial triclosan molecules. **Materials Letters**, v. 61, n. 13, p. 2757-2760, maio 2007.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2006.04.123>.

PEREIRA, J. A.; LIMA, E. O. **Atividade antifúngica do geraniol sobre leveduras multirresistentes do gênero *Candida* e perfil farmacológico e toxicológico em estudos *in silico***. 2017. 97 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, 2017.

PERES, L. B.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H.; GONÇALVES, O. H. **Obtenção de nanopartículas de PLLA e nanopartículas blenda PLLA/PMMA e PLLA/OS para incorporação de um análogo da isoniazida**. 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2012.

PEROGLIO, M.; GREMILLARD, L.; GAUTHIER, C.; CHAZEAU, L.; VERRIER, S.; ALINI, M.; CHEVALIER, J. Mechanical properties and cytocompatibility of poly(ε-caprolactone)-infiltrated biphasic calcium phosphate scaffolds with bimodal pore distribution. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 11, p. 4369-4379, nov. 2010.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.05.022>.

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**, v. 43, n. 4, p. 491-502, dez. 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322007000400002>.

PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. **Food Control**, v. 47, p. 381-391, jan. 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.023>.

PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R. G.; EVANS, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 569-575, jul. 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00226-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00226-7)

RICHARDS, J. I. R. S.; BENOIT, J. Microencapsulation. **Techniques de L'Ingénieur**, v. 2, ref. J2210, 2000.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.
<http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722009000400013>.

SCHORK, F. J.; LUO, Y.; SMULDERS, W.; RUSSUM, J. P.; BUTTE, A.; FONTENOT, K. Miniemulsion Polymerization. **Advances in Polymer Science**, v. 175, p. 129-255, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/b100115>.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, jan. 1993. <http://dx.doi.org/10.1080/10408399309527645>.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5. ed. Porto Alegre: UFRGS/EDUFSC, 2005.

SIRACUSA, V.; ROCCULI, P.; ROMANI, S.; ROSA, M. D. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 12, p. 634-643, dez. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.003>.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2006. 999 p. ISBN 8522104360.

SMITHA, G. R.; VIRENDRA, S. R. Variations in essential oil yield, geraniol and geranyl acetate contents in palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. Wats. var. *motia*) influenced by inflorescence development. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 150-160, abr. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.062>.

SOHAIL, A.; TURNER, M. S.; COOMBES, A.; BOSTROM, T.; BHANDARI, B. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 162-168, jan. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.007>.

STEINMACHER, F. R. **Síntese de Nanopartículas de Poli(Acetato de Vinila) via polimerização em miniemulsão**. 2010. 171 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2010.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, set. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>.

TERAO, M; GONÇALVES, O. H; LEIMANN, F. V. **Obtenção e caracterização de micropartículas estruturadas de biopolímeros contendo Curcumina**. 2015. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Campo Mourão, 2015.

TRANCOSO, M. D. Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. **Revista Práxis**, v. 5, n. 9, p. 89-96, 2013.

TURINA, A. DEL V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; PERILLO, M. A. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p. 101-113, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.02.007>.

UNGER, M; VOGEL, C; SIESLER, H. W. Molecular Weight Dependence of the Thermal Degradation of Poly(ϵ -caprolactone): A Thermogravimetric Differential Thermal Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. **Applied Spectroscopy**, v. 64, n. 7, p. 805-809, 2010. <http://dx.doi.org/10.1366/000370210791666309>.

VENKATESAN, P.; MANAVALAN, R.; VALLIAPPAN, K. Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 4, p. 26-35, 2009.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-14282010005000009>.

VULCANI, V. A. S. **Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona**. 2004. 77 f. Dissertação (Mestre em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, USP, São Carlos, 2004.

WANY, A.; KUMAR, A.; NALLAPETA, S.; JHA, S.; NIGAM, V. K.; PANDEY, D. M. Extraction and characterization of essential oil components based on geraniol and citronellol from Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **Plant Growth Regulation**, v. 73, n. 2, p.133-145, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-013-9875-7>.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century. **Progress In Polymer Science**, v. 35, n. 10, p.1217-1256, out. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>.

XU, J.; ZHOU, F.; JI, B. P.; PEI, R. S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 174-179, set. 2008. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02407.x>.

YOKOMIZO, N. K. S.; NAKAOKA-SAKITA, M. Atividade antimicrobiana e rendimento do óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 513-520, 2014. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/12_097.

YUE, L.; LI, J.; CHEN, W.; LIU, X.; JIANG, Q.; XIA, W. Geraniol grafted chitosan oligosaccharide as a potential antibacterial agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, p.356-364, nov. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.043>.