



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Mariele Paludetto Sanches

**Nanopartículas de Pluronic®F127 recobertas com o complexo polieletrólítico
quitosana/alginate de sódio contendo óleo essencial de citronela: Deposição em tecido de
algodão para aplicação antimicrobiana**

Florianópolis

2020

Mariele Paludetto Sanches

Nanopartículas de Pluronic®F127 recobertas com o complexo polieletrólítico quitosana/alginate de sódio contendo óleo essencial de citronela: Deposição em tecido de algodão para aplicação antimicrobiana

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Química
Orientador: Prof. Valdir Soldi, Dr.
Coorientador: Prof. Alexandre Luis Parize, Dr.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sanches, Mariele Paludetto

Nanopartículas de Pluronic® F127 recobertas com o complexo polieletrólítico quitosana/alginato de sódio contendo óleo essencial de citronela : Deposição em tecido de algodão para aplicação antimicrobiana / Mariele Paludetto Sanches ; orientador, Valdir Soldi, coorientador, Alexandre Luis Parize, 2020.

108 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Química. 2. Nanopartícula. 3. Complexo Polieletrólítico. 4. Óleo essencial de citronela. 5. Tecido de algodão. I. Soldi, Valdir. II. Parize, Alexandre Luis. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Mariele Paludetto Sanches

Nanopartículas de Pluronic®F127 recobertas com o complexo polieletrólítico quitosana/alginate de sódio contendo óleo essencial de citronela: Deposição em tecido de algodão para aplicação antimicrobiana

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Rosane Michele Duarte Soares, Dra.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ledilege Cucco Porto, Dra.
Nanovetores Tecnologia

Profa. Daniela Zambelli Mezalira, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Pedro Luis Manique Barreto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Química

Prof. Marcus C. M. Sá, Dr.
Coordenador do Programa

Prof. Valdir Soldi, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado à minha família, especialmente à minha avó Anita, *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelas bênçãos nesta etapa.

Aos meus orientadores, professores Valdir Soldi e Alexandre Parize, pelo apoio, confiança, amizade e paciência.

Aos meus amigos do POLIMAT, pela companhia diária e troca de ideias, especialmente ao Idejan pelo apoio e motivação, ao Alemão pela amizade, parceria e inúmeras gambiarras, ao Juninho, Natalia, Giu, Rubiane e Andressa pelo incentivo e a disposição em ajudar sempre. As parceiras de disciplinas, Anna Crema, Fernanda, Jamile e Tânia.

A Tais Felix e ao Rodrigo Balen pela amizade e disponibilidade do uso de reator de plasma e troca de ideias.

Ao LACBIO e POLISSOL pelo acesso às análises de potencial zeta e espalhamento de luz.

Ao LCME-UFSC pela aquisição das imagens de MEV e TEM, especialmente ao técnico Américo Cruz.

A Juliana Dreyer pela disponibilidade para adquirir as imagens de MEV.

Ao LABEC, professores Luciano Vitali, Gustavo Mücke e ao Alex pela disponibilidade do uso do cromatógrafo.

Aos amigos que me acolheram em Florianópolis, Tatiane, Ari, Jordana, Jeann, Luana Victor, Josiane muito obrigada! A meu primo querido Victor e a Luiza pelo incentivo inicial e orações.

Aos órgãos de fomento, CAPES e CNPq.

RESUMO

Este estudo relata o desenvolvimento de um sistema carreador de óleo essencial de citronela (OEC) a partir da formulação de uma nanopartícula do copolímero Pluronic®F127 revestido pelo complexo polieletrólítico (CPE) de quitosana e alginato de sódio com objetivo de proporcionar uma liberação controlada do ativo. A estabilidade do sistema de acordo com raio hidrodinâmico (R_h), potencial zeta e pH foi acompanhada ao longo de 60 dias. Embora observou-se aumento no R_h e no valor de pH, o decréscimo no potencial zeta (de 54 para 44 mV) ainda indica estabilidade. Medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) em diferentes proporções de água/etanol como meio dispersivo foram importantes para confirmar o recobrimento das nanopartículas de F127 com o CPE. Análises de espectroscopia no infravermelho (FT-IR) indicaram interação da quitosana com alginato de sódio e da quitosana com o F127. O tamanho das nanopartículas avaliado por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) corrobora com os valores observados por DLS (R_h 100-200 nm). A eficiência de encapsulação de 80% para o OEC foi determinada por UV-Vis. O perfil de liberação avaliado em meio tampão fosfato/salino contendo 20% de etanol e em fluido de suor simulado, resultou em 74 e 81% de liberação, respectivamente, onde o mecanismo de liberação se ajustou ao modelo de Korsmeyer-Peppas indicando comportamento difusional para ambos os meios estudados. As nanopartículas foram incorporadas em tecido de algodão e para tanto, a hidrofobicidade da superfície do tecido, cujo ângulo de contato foi de 142° , foi tratada com plasma a frio de O_2 . As imagens de MEV mostraram que o tratamento por um minuto não foi severo à fibra e que proporcionou boa adesão das nanopartículas. Após 72 h de liberação do óleo essencial em meio de suor simulado, a liberação do ativo alcançou 50% e o teste microbiológico mostrou que o tecido foi eficiente contra o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações de 200 e 500 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de OEC e ineficiente contra o crescimento dos fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma virens*.

Palavras-chave: Nanopartícula. Óleo essencial de citronela. Complexo Polieletrólítico. Tecido de algodão.

ABSTRACT

This study relates the development of citronella essential oil carrying system (CEO) up to Pluronic®F127 copolymer nanoparticles coated with chitosan/sodium alginate polyelectrolyte complex (PEC) with the objective to promote controlled release of the active. The system stability according to hydrodynamic radio, zeta potential and pH over time sixty days, although was observed R_h and pH increase, zeta potential decrease (54 to 44 mV) still indicates stability. Dynamic Light Scattering (DLS) in different proportions of water/ethanol as a dispersive medium was important to confirm that the PEC coated the F127 nanoparticles. Infrared spectroscopy suggested chitosan/sodium alginate and chitosan/F127 interactions. The nanoparticle size evaluated by Transmission Electron Microscopy (TEM) corroborated the value observed in DLS (R_h range of 100-200 nm). Encapsulation efficiency of 80% for CEO was evaluated in phosphate buffer saline (PBS) containing 20% of ethanol and in simulated sweat fluid, achieving 74 and 81% respectively. The releasing mechanism fitted the Korsmeyer-Peppas mathematical model, indicating Fickian diffusion behavior for both studied media. In second part, the nanoparticles were incorporated in cotton textile and for this, the surface hydrophobicity, whose contact angle was 142° , was treated with O_2 non-thermal plasma. Scanning Electron Microscopy (SEM) showed that 1 minute of treatment was not aggressive to the fiber and provided good adhesion of nanoparticle. After 72 h of essential oil release in sweat fluid, the releasing achieved 50% and the microbiological test suggested that the textile was efficient against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* growing in 200 and $500\mu\text{L mL}^{-1}$ of CEO and inefficient against the fungi *Aspergillus niger* and *Trichoderma virens* growing.

Keywords: Nanoparticle. Citronella essential oil. Polyelectrolyte Complex. Cotton Textile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema da parede celular de bactérias Gram-positivas (A); Gram-negativas (B) e de fungos (C)	20
Figura 2- Estruturas químicas do citronenol (A), citronelal (B) e β - pineno (C).....	22
Figura 3- Estrutura química do copolímero Pluronic® F127.	24
Figura 4- Estrutura da quitosana	25
Figura 5- Estrutura do alginato de sódio	26
Figura 6- Geração de espécies reativas de O ₂ no plasma e ativação de superfície	31
Figura 7- Cromatograma do óleo essencial de citronela. Os números indicados na caixa vermelha correspondem ao número do pico na Tabela 2.....	42
Figura 8- Variação do raio hidrodinâmico das nanopartículas A1, A2 e A3 em diferentes temperaturas	45
Figura 9- Resultados da variação do PDI das nanopartículas A1, A2 e A3 em função da.....	46
Figura 10- Distribuição de R _h para a amostra QA(1) recém preparada e após um mês de preparo.....	47
Figura 11- Função de correlação (a) e distribuição de raio hidrodinâmico (b) para a amostra da nanopartícula.....	49
Figura 12- Esquema da formação da nanopartícula de F127 contendo óleo essencial de citronela e posterior decoração com o complexo polieletrólítico	50
Figura 13- Estabilidade de pH, potencial zeta e tamanho das nanopartículas durante 60 dias	51
Figura 14- Curvas de correlação obtidas dos dados de DLS para a nanopartícula de F127 contendo OEC em meios de diluição com diferentes quantidades de etanol	52
Figura 15- Foto da variação da turbidez do sistema F127/OEC conforme se aumenta a quantidade de etanol no meio de diluição	53
Figura 16- Efeito da porcentagem de etanol no Rh das nanopartículas de F127/OEC e o mesmo sistema coberto com CPE de quitosana/alginato	54
Figura 17- Imagens de TEM das nanopartículas de F127 recobertas pelo PEC (A) e (B) diluídas em mistura água/ isopropanol; (C) e (D) diluídas em água/ etanol na proporção 80:20 (%v/v).....	56
Figura 18- Superfície lisa das nanopartículas observada nas imagens de MEV-FEG57	

Figura 19- Espectro de FT-IR da quitosana protonada, alginato de sódio, F127, CPE quitosana/alginato e nanopartícula de F127 recoberta pelo PEC.	58
Figura 20- Dados experimentais e barras de desvio padrão para o perfil de liberação <i>in vitro</i> para a liberação de OEC em dois diferentes meios de liberação.....	59
Figura 21- Esquema da reação de oxi- redução do corante Alamar Blue®	62
Figura 22- Placas de poços referentes ao experimento para determinação CIM das nanopartículas e do OEC contra <i>Micrococcus sp.</i> (A); <i>S. aureus</i> (B); <i>E. coli</i> (C) e <i>P. aeruginosa</i> (D).....	63
Figura 23- Formas de molhabilidade de uma superfície sólida	66
Figura 24- Reator de plasma frio com atmosfera de oxigênio.....	68
Figura 25- Foto do esquema de aplicação das nanopartículas no tecido via Spray I, utilizando seringa e fluxo de N ₂	69
Figura 26- Foto do esquema de aplicação das nanopartículas no tecido via Spray II, utilizando pistola de pintura	70
Figura 27- Em (A1) tecido como recebido, (A2) tecido após ser alvejado. Em (B) gotas de água caracterizam a superfície hidrofóbica do algodão.	72
Figura 28- Gota de água na superfície do algodão sem tratamento com plasma frio	73
Figura 29- Espectros de FT-IR das amostras de algodão tratadas e não tratadas com plasma de oxigênio por diferentes tempos	76
Figura 30- Imagens de MEV dos tecidos de algodão, (A) e (B) alvejado sem tratamento com plasma; (C) e (D) tratado com plasma de O ₂ por 1 min; (E) e (F) tratado com plasma de O ₂ por 5 min	79
Figura 31- Tecido não tratado com plasma, com deposição das nanopartículas. Em (A) e (B) deposição via Spray I, (C) e (D) deposição via imersão.	81
Figura 32- Nanopartículas contendo OEC secas por Spray drying.....	82
Figura 33- Tecido de algodão tratado com plasma de O ₂ por 1 minuto impregnado com nanopartículas contendo OEC via imersão (A) e (B); via Spray I (C) e (D) e Spray II (E) e (F)	83
Figura 34- Tecido de algodão tratado com plasma de O ₂ por 5 minutos impregnado com nanopartículas contendo OEC via imersão (A) e (B); via Spray I (C) e (D) e Spray II (E) e (F).....	84
Figura 35- Curvas de liberação do óleo essencial do tecido de algodão em meio de suor simulado em frasco fechado e em frasco aberto	86
Figura 36- Curva de evaporação do óleo essencial	86

Figura 37- Avaliação da ação microbiológica do tecido impregnado de nanopartículas contra *S. aureus*. (A) e (B) tecido branco; (C) e (D) nanopartículas na concentração de 200 µL do OEC; (E) e (F) nanopartículas na concentração de 500 µL do OEC 88

Figura 38- Avaliação da ação microbiológica do tecido impregnado de nanopartículas contra *P. aeruginosa* (A) e (B) tecido branco; (C) e (D) nanopartículas na concentração de 200 µL do OEC; (E) e (F) nanopartículas na concentração de 500 µL do OEC..... 89

Figura 39- Avaliação da ação microbiológica do tecido impregnado de nanopartículas contra *A. niger*, tecido branco (A); tecido com nanopartículas contendo 200µL de OEC (C); tecido com nanopartículas contendo 500µL de OEC (E). Contra *T. virens* tecido branco (B); tecido com nanopartículas contendo 200 µL de OEC (D); tecido com nanopartículas contendo 500 µL de OEC (F) 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantidades de F127 e OEC utilizadas no teste de preparo das nanopartículas.....	35
Tabela 2- Perfil cromatográfico do óleo essencial de citronela obtido da análise de GC-MS.....	42
Tabela 3- Raio hidrodinâmico das nanopartículas de Pluronic® F127 preparadas em diferentes concentrações contendo OEC.....	43
Tabela 4- Valores de potencial zeta para os polímeros puros e para o CPE	47
Tabela 5- Parâmetros cinéticos para a liberação <i>in vitro</i> em meio PBS e em suor simulado	61
Tabela 6- Ângulo de contato do tecido de algodão sem tratamento com plasma	73
Tabela 7- Ângulo de contato do algodão tratado com plasma de N ₂	74
Tabela 8- Perda de massa do algodão tratado com plasma de O ₂	75
Tabela 9- Valores de número de onda correspondentes às vibrações das ligações de grupos funcionais observados no tecido de algodão.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ - mobilidade eletroforética

CG-MS- Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrometria de Massas

CPE- Complexo Polieletrólítico

D- coeficiente de difusão

DBD- Descarga de Barreira Dielétrica

DLS- Espalhamento de Luz Dinâmico (do inglês, *Dynamic Light Scattering*)

E- campo elétrico

FT-IR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

k_B - constante de Boltzmann

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

MEV-FEG- Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (do inglês, *Field Emission Gun*)

M_V - Massa Molar Viscosimétrica

OEC- óleo essencial de citronela

PEO- Poli (óxido etileno)

PPO- Poli (óxido propileno)

q- vetor de onda

R_h - raio hidrodinâmico

TEM- Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês, *Transmission Electron Microscopy*)

Γ - frequência de relaxação

ϵ - constante dielétrica

η - viscosidade

θ - ângulo de espalhamento

λ - comprimento de onda

SUMÁRIO

CAPÍTULO I- Introdução e Objetivos	
1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 15
1.1	OBJETIVOS..... 16
1.1.1	Objetivo Geral 16
1.1.2	Objetivos Específicos 16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1	ÓLEOS ESSENCIAIS 19
2.1.1	Encapsulação de óleos essenciais 22
2.1.1.1	<i>Copolímeros em bloco na encapsulação de óleos essenciais 23</i>
2.1.1.2	<i>Utilização de quitosana e alginato de sódio na encapsulação de ativos 25</i>
2.2	PREPARO DE NANOPARTÍCULAS 27
2.3	UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS EM TÊXTEIS 29
2.4	TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE COM PLASMA FRIO 30
3	METODOLOGIA..... 34
3.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-MS) 34
3.2	PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLURONIC® F127 CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA..... 34
3.3	PREPARO DO COMPLEXO POLIELETROLÍTICO A BASE DE QUITOSANA E ALGINATO DE SÓDIO 35
3.4	ESTUDO DO EFEITO DA COMPOSIÇÃO ETANOL/ÁGUA NO RAIOS HIDRODINAMICO DOS SISTEMAS 36
3.5	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS..... 37
3.5.1	Espalhamento de Luz Dinâmico..... 37
3.5.2	Potencial Zeta..... 38
3.5.3	Controle da estabilidade das nanopartículas 38

3.5.4	Secagem das nanopartículas por Spray- Drying para obtenção de espectros de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	38
3.5.5	Análises de Microscopias Eletrônicas de Transmissão e de Varredura por Emissão de Campo.....	39
3.5.6	Determinação da Eficiência de Encapsulação	39
3.6	ESTUDO DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	40
3.7	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	40
3.8	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.8.1	Caracterização do óleo essencial de citronela via cromatografia gasosa	41
3.8.2	Avaliação da proporção Pluronic® F127/óleo essencial.....	43
3.8.3	Obtenção do complexo polieletrólítico quitosana/alginate de sódio	46
	Caracterização Físico-química das nanopartículas de Pluronic®F127 decoradas com o complexo polieletrólítico	48
3.8.3.1	<i>Determinação do tamanho e índice de polidispersidade por Espalhamento de Luz Dinâmico</i>	49
3.8.3.2	<i>Potencial zeta</i>	50
3.8.3.3	<i>Estabilidade de tamanho, pH e potencial zeta ao longo do tempo</i>	50
3.8.3.4	<i>Variação do Raio hidrodinâmico, do potencial zeta e do pH dos sistemas F127/óleo essencial e F127/óleo essencial cobertos pelo CPE em função da composição etanol/água .</i>	51
3.8.3.5	<i>Microscopias eletrônicas de Transmissão e Varredura</i>	55
3.8.3.6	<i>Análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)</i>	57
3.8.4	Determinação da eficiência de encapsulação e ensaio de liberação “in vitro”	58
3.8.5	Avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas e do OEC.....	61
3.9	CONCLUSÃO DO CAPÍTULO	64
4	METODOLOGIA.....	66
4.1	MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO.....	66

4.2	TRATAMENTO DO ALGODÃO COM PLASMA FRIO	67
4.3	APLICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS NO TECIDO DE ALGODÃO	68
4.3.1	Aplicação via Spray I.....	68
4.3.2	Aplicação via Spray II	69
4.3.3	Aplicação por imersão	70
4.4	ANÁLISE DE FT-IR PARA O TECIDO DE ALGODÃO	70
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	70
4.6	ESTUDO DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	71
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA.....	71
4.8	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.8.1	Limpeza do tecido de algodão	72
4.8.2	Ângulo de contato do tecido de algodão.....	72
4.8.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) para o tecido de algodão.....	76
4.8.4	Microscopia Eletrônica de Varredura para o tecido de algodão	78
4.8.5	Liberação <i>in vitro</i> de OEC do tecido	85
4.8.6	Avaliação da atividade microbiológica do tecido impregnado com as nanopartículas.....	87
4.9	CONCLUSÃO DO CAPÍTULO	92
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
5.1	INDICADORES DE PRODUTIVIDADE NO PERÍODO DE DOUTORADO ..	96
	REFERÊNCIAS.....	97

Capítulo I

Introdução e Objetivos

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Materiais têxteis são excelentes meios para crescimento de microrganismos, principalmente os que são utilizados em hospitais, roupas esportivas, uniformes escolares e calçados (CHATHA et al., 2019). Associadamente, Gallo, (2017) descreve que a superfície da pele humana também é hospedeira de populações de microrganismos, que pode resultar inclusive em alterações das funções celulares.

Fiedler et al., (2019a) relatam a aplicação de nanotecnologia no setor têxtil com intuito de confeccionar produtos com atividade antimicrobiana, proteção contra a radiação ultravioleta, aplicação e liberação de fármacos, entre outros. Para tanto, é de grande interesse a aplicação de ativos micro/nanoencapsulados em substratos têxteis que garantam a liberação controlada do composto sob a variação do pH do meio, calor, pressão mecânica dentre outros fatores (BEZERRA et al., 2016).

Os óleos essenciais são compostos voláteis que apresentam rica atividade biológica, permitindo sua aplicação na área farmacêutica (CHOUDHARY et al., 2009), de cosméticos (SARKIC; STAPPEN, 2018), conservação de alimentos (VIEIRA et al., 2019), tecnologia têxtil (LIS et al., 2018) (WALENTOWSKA; FOKSOWICZ-FLACZYK, 2013) na exploração de propriedades antifúngicas, bactericidas e de repelência a insetos (SILVA et al., 2011) (SENDRA, 2016) (LEE, 2018) (de CASTRO et al., 2019).

Os monoterpenos citronelal, geraniol, e citronelol geralmente são os constituintes principais do óleo essencial de citronela (OEC). Alguns estudos têm reportado propriedades antifúngicas e bactericidas do OEC em função dos compostos citronelal, α - e β - pinenos (NAKAHARA et al., 2003)(LI et al., 2013)(WANG et al., 2018). Contudo, os óleos essenciais exibem uma alta taxa de evaporação das moléculas voláteis devido à alta pressão de vapor. Desta maneira, o encapsulamento destes ativos é uma alternativa viável para preservar suas propriedades químicas e biológicas (FLORES et al., 2011). Neste contexto, o uso de sistemas carreadores formados por nanopartículas poliméricas é uma alternativa interessante para estender o uso de óleos essenciais.

Pluronic® F127 é um copolímero anfifílico tribloco constituído de um bloco central hidrofóbico de poli(óxido de propileno) (PPO), ligado em suas extremidades a dois blocos hidrofílicos de poli(óxido de etileno) (PEO), na proporção PEO₁₀₀-PPO₇₀-PEO₁₀₀ (OLIVEIRA et al., 2015). Estes materiais vem sendo estudados na estabilização de compostos voláteis em ambientes hidrofílicos, reduzindo sua pressão de vapor e, conseqüentemente, a volatilização

(CHAT et al., 2018) possibilitando a encapsulação dos constituintes ativos que visem uma liberação prolongada dos mesmos.

Similarmente, o uso de biopolímeros tais como os polissacarídeos quitosana e alginato de sódio têm sido muito estudado para encapsular óleos essenciais devido a propriedades como biocompatibilidade, não toxicidade e biodegradabilidade, além da ampla disponibilidade de matéria prima (HEYDARI; BAVANDI; JAVADIAN, 2015) (FERRANDIZ et al., 2017) (GRANDE-TOVAR et al., 2018) (HASHEMINEJAD; KHODAIYAN; SAFARI, 2019). Na forma iônica, estes polissacarídeos assumem o comportamento de um polieletrólito, o que possibilita a agregação em nanopartículas através de interações eletrostáticas na formação de um complexo polieletrólítico (CPE) (YANG et al., 2015). O recobrimento de nanopartículas de F127 contendo óleo essencial com um CPE favorece a aplicação em sistemas onde se exige certa resistência mecânica da nanoestrutura além de proporcionar uma melhor adesão ao substrato desejado.

No presente trabalho é proposto a produção de tecidos com propriedades funcionais através da aplicação de nanopartículas contendo óleo essencial de citronela em fibra têxtil de algodão, para conferir propriedades antifúngicas e bactericidas. Os sistemas ativos, como são chamados os tecidos com propriedades funcionais, desempenham o papel de “sistemas reservatórios” que possibilitam a liberação controlada da substância ativa do tecido para a pele (LIS et al., 2019).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Preparar nanopartículas de Pluronic® F127 carregadas com óleo essencial de citronela e recobri-las com complexo polieletrólítico de quitosana-alginato de sódio de forma que garanta liberação controlada do ativo para posterior aplicação em fibras têxteis de algodão.

1.1.2 Objetivos Específicos

Preparar nanopartículas de Pluronic® F127 para encapsulação de óleo essencial de citronela;

Preparar um complexo polieletrólítico de quitosana-alginato de sódio para recobrir as nanopartículas de Pluronic® F127;

Caracterizar as nanopartículas de Pluronic® F127 recobertas com o complexo polieletrólítico por:

- Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) para obter o raio hidrodinâmico e o tamanho da partícula;
- Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) para verificar o tamanho e forma da partícula;
- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) para caracterizar os principais grupos funcionais presentes nos polímeros puros e na nanopartícula.

Obter o perfil cinético de liberação *in vitro* do óleo essencial de citronela em meio de tampão fosfato-salino e em suor simulado;

Realizar teste microbiológico para as nanopartículas e para o óleo essencial puro;

Tratar as fibras têxteis de algodão com plasma frio para conferir caráter hidrofílico ao têxtil;

Caracterizar os têxteis de algodão tratados e não tratados com plasma por ângulo de contato, MEV e FT-IR para verificar as alterações na estrutura da fibra do tecido

Aplicar as nanopartículas nas fibras têxteis;

Obter o perfil cinético de liberação *in vitro* das nanopartículas incorporadas no têxtil;

Realizar teste microbiológico do têxtil incorporadas com as nanopartículas.

Capítulo II

Revisão Bibliográfica

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Para representar o odor de espécies de plantas aromáticas, Paracelsus e outros alquimistas designaram o termo “óleo essencial” por estas transmitirem odores distintos e representativos. Estes odores são atribuídos às complexas misturas voláteis das moléculas orgânicas de baixa massa molar constituintes do óleo cuja concentração pode variar com o período e clima do cultivo da planta (SANKARIKUTTY; NARAYANAN, 2003)(CHÁVEZ-GONZÁLEZ; RODRÍGUEZ-HERRERA; AGUILAR, 2016).

Conforme a sétima edição da farmacopeia europeia, um óleo essencial é um “produto odorante geralmente de composição complexa obtido de uma planta botanicamente definida ou por arraste por vapor d’água ou por destilação a seco ou por um método mecânico viável sem aquecimento. O óleo essencial é geralmente separado da fase aquosa por um método físico que não leva a mudanças em sua composição química” (EL ASBAHANI et al., 2015).

Óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de plantas aromáticas que são sintetizados nas partes verdes como também nas flores e estão alocados em células e glândulas específicas, reservatórios e no espaço intercelular (ALI et al., 2015), produzidos como resposta ao ataque de insetos ou outros organismos (CHÁVEZ-GONZÁLEZ; RODRÍGUEZ-HERRERA; AGUILAR, 2016).

O uso de óleos essenciais é proposto em diversas aplicações em função de propriedades antimicrobiana, acaricida, repelência de insetos, antioxidante, anti-inflamatória e também em aroma terapia são reportadas, onde é conveniente o destaque ao óleo essencial de citronela.

O óleo essencial de citronela é extraído de plantas do gênero *Cymbopogon*, onde os compostos majoritários constituem-se na mistura de monoterpenos sendo em sua maioria aldeídos e álcoois destacando-se citronelal, citronelol, geraniol, β -pineno e D-limoneno dependendo da espécie da planta.

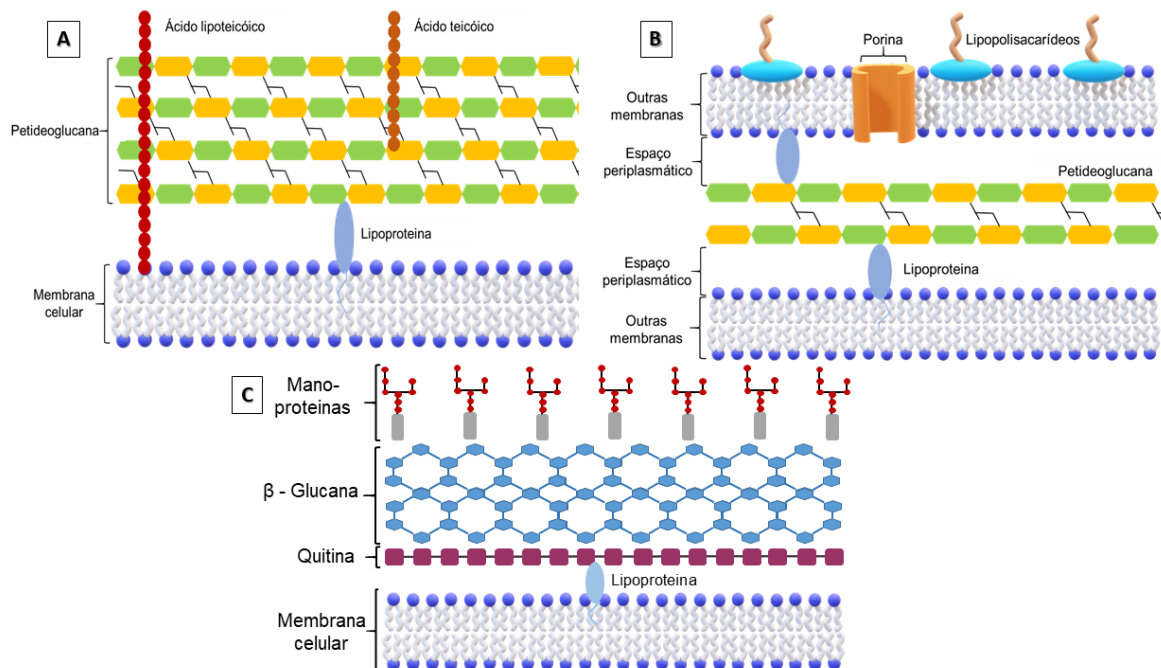
Sakulku et al., (2009) caracterizaram o óleo essencial de *Cymbopogon nardus* por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a detector de massas (CG-MS) e observaram que os terpenos D-limoneno e citronelal representavam os constituintes majoritários. Os autores encapsularam o óleo essencial em nanoemulsões visando uma liberação lenta dos ativos para posterior teste de repelência de insetos. No estudo do perfil químico do óleo essencial de

Cymbopogon nardus Taroq e colaboradores (2018) constataram como constituintes majoritários citronelal e citronelol, eumoni, nerol, acetato de citronelil, e acetato de geranila, os quais são responsáveis pela atividade bactericida que foi conferida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Simic e colaboradores (2008), verificaram a composição química de *Cymbopogon winterianus* onde citronelal, trans-geraniol e citronelol foram relatados como principais constituintes. Os autores observaram, no entanto, atividade bactericida apenas contra bactérias Gram-positivas. No estudo de Gonçalves et al., (2013), o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* majoritariamente composto por citronelal, geraniol e citronelol mostrou atividade inibitória semelhante tanto para as bactérias *Staphylococcus aureus* quanto para *Pseudomonas aeruginosa*, gram-positiva e gram-negativa, respectivamente.

Neste momento é importante uma breve explicação a respeito das características estruturais da parede celular que diferenciam as bactérias Gram-positivas das Gram-negativas e também dos fungos, representadas na Figura 1.

Figura 1- Esquema da parede celular de bactérias Gram-positivas (A); Gram-negativas (B) e de fungos (C)



Fonte: Figura elaborada pela autora deste trabalho (2019), adaptado de Brown et al., (2015)

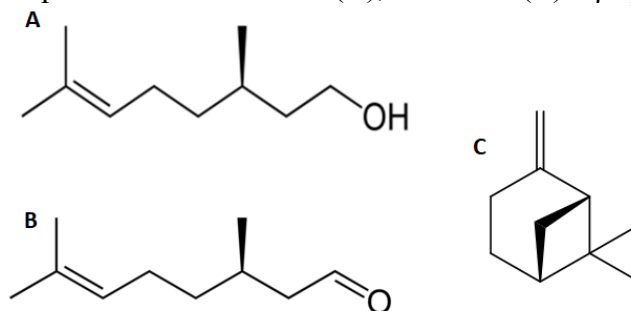
Nestes microrganismos, a membrana plasmática é contornada e protegida por uma bicamada de fosfolípido. Nas bactérias gram-positivas, esta bicamada de fosfolípido é

contornada por peptídeoglucana onde os ácidos lipoteicóico e teicóico, compostos por glicerol e glicosil fosfato, se ancoram por ligações covalentes, (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010), conforme esquema apresentado na Figura 1A. Por outro lado, as bactérias gram-negativas possuem a parede celular mais complexa, Figura 1B. Além da camada de peptídeoglucana que contorna a bicamada fosfolipídica, há uma membrana externa estruturada por uma bicamada lipídica onde encontram-se as porinas, canais proteicos que atuam na difusão de pequenas moléculas, e os lipopolissacarídeos que são responsáveis pelo choque septicêmico nos organismos humanos (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). A membrana externa da parede celular dos fungos, depositada na bicamada de fosfolipídios, é composta por uma camada de quitina ligada covalentemente na camada de β -1,3 glucana, que por sua vez se estende até a superfície da parede celular formando redes ramificadas até se amarrar às manoproteínas (KANG et al., 2018).

Os óleos essenciais podem interagir com a parede celular dos microrganismos e interferir na atividade respiratória e na produção energética da célula. A ação do óleo é mais efetiva contra as bactérias gram-positivas haja vista os lipopolissacarídeos e as porinas presentes na membrana externa das gram-negativas dificultam a permeabilidade de compostos dos óleos essenciais assim como dos antibióticos (GONÇALVES et al., 2013). Relata-se que estes compostos também podem inibir a formação de biofilmes e a produção de micotoxinas fúngicas (NAZZARO et al., 2017). A utilização de óleo essenciais pode ser vantajoso sobre outros agentes antimicrobianos por conterem uma mistura de substâncias ativas dificultando a resistência dos microrganismos (SILVEIRA et al., 2012).

No presente trabalho utilizou-se o óleo extraído de *Cymbopogon winterianus* onde as estruturas dos constituintes majoritários determinados por cromatografia gasosa são os terpenos apresentados na Figura 2.

Figura 2- Estruturas químicas do citronenol (A), citronelal (B) e β - pineno (C)



Fonte: Imagem elaborada pela autora deste trabalho (2019)

O citronelol foi relatado como agente anti-inflamatório, repelente de insetos, larvicida, antinoceptivo, fungicida e bactericida (DE OLIVEIRA PEREIRA et al., 2015) (VASCONCELOS et al., 2016). Além da atividade fungicida e bactericida do citronelal, é reportado o uso em sedativos brandos para o tratamento de ansiedade e insônia (JÄGER et al., 1992). O β -pineno é relatado como forte inibidor de crescimento celular de bactérias gram-positivas (LEITE et al., 2007).

Estas características conferem ao óleo essencial de citronela adquirido a potencialidade de uso em sistemas com atividade microbiológica e também como repelente de insetos. Uma vez que são substâncias voláteis, sensíveis a altas temperaturas e pressão, a encapsulação é viável para preservar suas propriedades químicas e biológicas (DE OLIVEIRA; PAULA; DE PAULA, 2014). Diferentes estruturas de encapsulação podem ser utilizadas para este fim, tais como nano e micro cápsulas, nano e microesferas, micelas, lipossomas, dendrímeros, ciclodextrinas (RODRÍGUEZ et al., 2016)(MARCHESE et al., 2016).

2.1.1 Encapsulação de óleos essenciais

Estudos envolvendo a encapsulação de óleos essenciais para variados fins têm sido desenvolvidos. Diversos trabalhos recentes, têm sido reportados, sobretudo, métodos envolvendo a utilização de surfactantes e também de biopolímeros cujo sistema pode ser utilizado em processos que envolva liberação controlada.

Com o interesse de examinar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Satureja hortensis*, foi produzido por Hosseini et al., (2013), um sistema de liberação controlada deste óleo em micropartículas de alginato de sódio. Neste estudo foram realizados teste de liberação *in vitro* onde constataram que nas partículas com maior conteúdo de óleo ocorreu a liberação mais rapidamente devido ao efeito de tamanho de partícula. Os parâmetros cinéticos ajustados

pelo modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas indicaram que a liberação do óleo do interior das micropartículas seguia comportamento difusional de Fick.

Benavides et al., (2016) desenvolveram microesferas de alginato de sódio por gelificação iônica para encapsulação do óleo essencial de tomilho e avaliaram que ao utilizar alta velocidade de dispersão (18 mil rpm) no sistema obtinham eficiência de encapsulação de 85%. Não houve perda da atividade antimicrobiana do óleo encapsulado, de acordo com os resultados de testes *in vitro* em comparação ao óleo puro, e que o maior efeito foi observado para bactérias gram-positivas. Os compostos lipofílicos presentes no óleo essencial interagiram com os fosfolipídios da membrana celular bacteriana causando aumento da fluidez na membrana e perda do citoplasma.

No trabalho de Velmurugan e colaboradores (2017) óleos essenciais de laranja e lavanda foram encapsulados utilizando Triton X100, um surfactante não iônico, e quitosana como material de parede para serem aplicados em tecido de couro. Os autores atribuíram efeito sinérgico entre quitosana e os constituintes dos óleos essenciais para justificar a atividade antimicrobiana apresentada pelo material.

A encapsulação de óleo essencial de alho por Radünz et al., (2019) utilizando alginato de sódio e glicerol monoestearato ou Tween 20 como emulsificantes, foi desenvolvida para inibir o odor característico do óleo visando posterior aplicação em conservante alimentício.

Além disso, também se encontra trabalhos reportando o uso de copolímeros em bloco como os Pluronic® na encapsulação de óleo essencial. Previamente à apresentação de exemplos da literatura é importante uma breve introdução a respeito desta classe de copolímeros.

2.1.1.1 Copolímeros em bloco na encapsulação de óleos essenciais

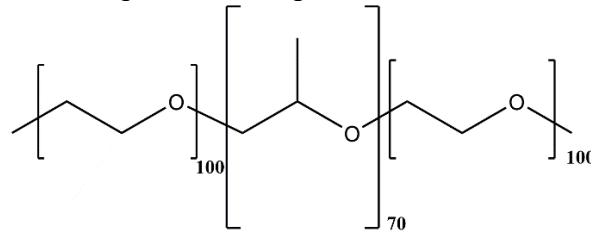
Copolímeros tri blocos não iônicos e anfifílicos são constituídos por unidades repetitivas de poli(óxido de etileno) (PEO) e poli(óxido de propileno) (PPO), com forma geral $(\text{PEO})_x-(\text{PPO})_y-(\text{PEO})_x$ e possuem nome comercial Pluronic® ou Poloxamer. As características físico-químicas desses copolímeros são favoráveis à solubilização de compostos lipofílicos e hidrofílicos, além de serem altamente estáveis, atóxicos e biocompatíveis (BATRAKOVA; KABANOV, 2008).

Em meio aquoso os Pluronics se auto associam em micelas, onde a corona é formada pelos grupos PEO hidrofílicos interagindo com moléculas de água, enquanto os grupos PPO hidrofóbicos permanecem no núcleo interno das micelas, sendo protegidos das moléculas de

água. O core hidrofóbico é o principal responsável pela solubilização de compostos ativos lipossolúveis (BATRAKOVA; KABANOV, 2008).

A concentração micelar crítica (CMC), número de agregação (N_{agg}) e raio da micela são altamente afetados pela variação da temperatura da solução. Ao aumentar a temperatura, a CMC diminui enquanto o raio e o N_{agg} aumentam. Em geral, a temperatura micelar crítica (TMC) diminui com o aumento da concentração do copolímero. O F127 [(PEO)₁₀₀ – (PPO)₇₀ – (PEO)₁₀₀], Figura 3, faz parte da classe dos Pluronic e vem sendo muito utilizado para preparar formulações de diversos princípios ativos, incluindo óleos essenciais (WANKA; HOFFMANN; ULBRICHT, 1994)(ALEXANDRIDIS; HOLZWARTH; HATTON, 1994).

Figura 3- Estrutura química do copolímero Pluronic® F127.



Fonte: Imagem elaborada pela autora deste trabalho (2019)

Por exemplo, Yegin et al., (2015) demonstraram a capacidade do F127 carrear o composto geraniol. Diferentes razões F127:geraniol foram preparadas e testadas contra *Escherichia coli* e *Salmonella*. Os resultados demonstraram que a eficiência de encapsulação (EE%) foi de aproximadamente 58%, ocorrendo um aumento no tamanho das partículas de 26 a 412 nm com o aumento da concentração de geraniol no sistema. As nanopartículas inibiram o crescimento dos microrganismos em concentrações de aproximadamente 0,25 %m/m.

Lucia et al., (2017) prepararam formulações de F127 contendo diferentes monoterpenos, mantendo-os estáveis em solução aquosa. Os autores conseguiram estabilizar 1,25 % m/m dos compostos em solução de F127 5% m/m, além de avaliar os sistemas contra piolhos (atividade pediculicida) aos quais apresentaram mortalidade entre 50 e 60% para 7 dos 10 monoterpenos testados.

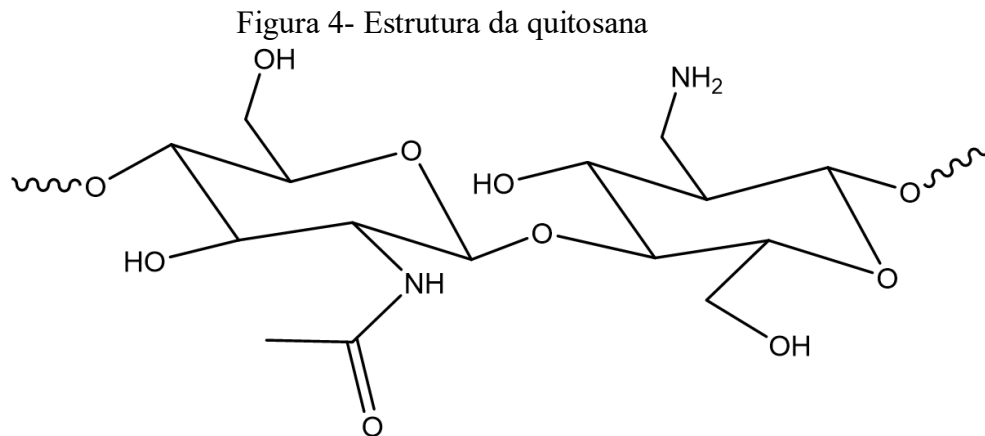
Estudos tem demonstrado que os copolímeros podem interagir com as cadeias poliméricas da quitosana por ligações de hidrogênio entre os grupos –OH e –NH₂ ou –NH₃⁺ da quitosana com os grupos –OH e C–O–C presentes principalmente nos domínios de PEO dos copolímeros (CAFAGGI et al., 2005).

Esses relatos dão aporte à proposta da encapsulação do óleo essencial de citronela em nanopartículas de F127 com posterior recobrimento de biopolímeros. Neste contexto, os biopolímeros quitosana e alginato de sódio foram utilizados no preparo de nanopartículas para encapsular óleo essencial de citronela.

2.1.1.2 Utilização de quitosana e alginato de sódio na encapsulação de ativos

Os polissacarídeos, quitosana e alginato de sódio, são obtidos de fontes renováveis, e largamente utilizados em diversas áreas justamente por serem biocompatíveis e estarem disponíveis em abundância no mercado, razões pelas quais são escolhidos para o preparo de sistemas encapsulados.

A quitosana é um polissacarídeo catiônico derivado da desacetilação alcalina dos grupos aminos presentes na quitina e compreende duas unidades monoméricas: β - (1,4)-2-amino-2 deoxi-D-glucopirranose e N-acetil- D- glucosamina, como mostra a Figura 4 (KAMBUROVA; MITAROVA; RADEVA, 2017). O grau de desacetilação da quitosana determina a densidade de grupos aminos que podem adquirir cargas positivas quando dissolvida em soluções ácidas, uma vez que seu pKa varia entre 5,9- 6,7, assumindo comportamento de polieletrólito catiônico em pH menor que 6,5 (VOGT STHER et al., 2008).

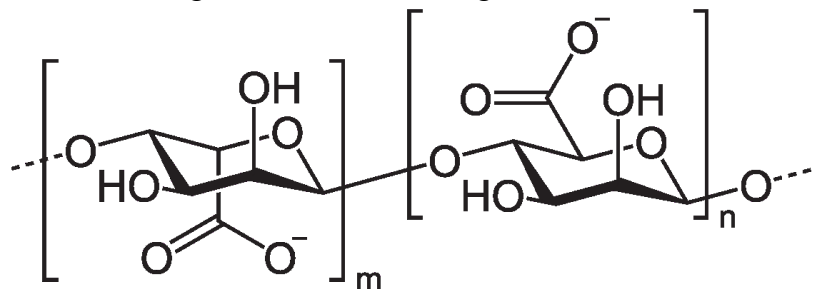


Fonte: Imagem elaborada pela autora deste trabalho (2019)

O alginato de sódio pode ser obtido como produto extracelular das bactérias *Pseudobacter* e *Pseudomonas* e está presente também na composição estrutural de algas marinhas marrons e pode ser extraído via tratamento alcalino, sendo desta fonte de obtenção, o produto disponível comercialmente (KAPLAN, 1998). Consiste de uma cadeia linear composta por resíduos de ácido β -D- manurônico (M) unidos por ligação 1,4 glicosídicas ao seu epímero,

o ácido α -L- gularônico (G). (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; NAVARRO DA SILVA, 2008). Os valores de pKa das unidades ácido manurônico e ácido gularônico do alginato é de 3,38 e 3,65 respectivamente (VOGT STHER et al., 2008). A estrutura do alginato pode ser visualizado na Figura 5. A composição e a sequência dos resíduos dependem da fonte de obtenção do polímero.

Figura 5- Estrutura do alginato de sódio



Fonte: Imagem elaborada pela autora deste trabalho (2019)

Polissacarídeos são polieletrólitos que se apresentam em sua forma iônica quando em solução e que podem se agregar em nanopartículas via interação eletrostática na presença de moléculas ou íons de carga oposta, chamados de agentes complexantes (YANG, JISHENG; HAN, SUYA; ZHENG, HAICHENG; DONG, HONGBIAO; LIU, 2015). Este método, chamado de gelificação iônica, pode ser visualmente detectado por meio da opacidade da solução devido ao processo de auto-organização entre o polímero e a molécula/íon responsável pela ligação cruzada. (SACCO et al., 2016).

Quando a interação eletrostática acontece entre dois polieletrólitos há a formação de um complexo polieletrólítico (CPE), desde que o pH das soluções estejam numa faixa que compreenda os pKa's dos dois polieletrólitos envolvidos (KAMBUROVA; MITAROVA; RADEVA, 2017). A formação de um CPE quitosana/alginato ocorre pela interação eletrostática dos grupos carboxilatos carregados negativamente do alginato com os grupos aminos carregados positivamente da quitosana resultando em uma estrutura mecanicamente mais forte quando comparada com a estrutura dos polímeros puros (HAMMAN, 2010).

Uma vez que a quitosana e o alginato de sódio não apresentam toxicidade biológica, Maity et al., (2017) formularam nanopartículas núcleo-corona destes polímeros cujo objetivo foi encapsular narigenina. A comparação dos picos de absorção no infravermelho para os polímeros puros, e das nanopartículas com e sem narigenina mostraram deslocamento de bandas, sugerindo que efetivamente houve a formação das nanopartículas core-shell pela

interação dos grupos amino da quitosana com os grupos carboxílicos do alginato e também a encapsulação da narigenina no sistema.

Ji e colaboradores, (2019) encapsularam cinamaldeído em nanopartículas de quitosana e alginato de sódio onde a eficiência de encapsulação foi de 73%. Os espectros de infravermelho confirmaram a interação entre os polímeros devido ao deslocamento das vibrações de estiramento de O-H e N-H da quitosana assim como o deslocamento de COO^- do alginato de sódio.

Estes exemplos sinalizam o uso deste CPE como um potencial carreador de agentes ativos na forma encapsulada. A encapsulação é utilizada para aprimorar o potencial cinético e em comparação ao uso do ativo na forma livre. As características das partículas obtidas são resultadas da escolha do material, geralmente carboidratos ou proteínas e do método de preparo das mesmas (MARTINS et al., 2014).

2.2 PREPARO DE NANOPARTÍCULAS

De acordo com a terminologia IUPAC para polímeros e aplicações (2012), uma micropartícula compreende dimensões entre 1.10^{-7} a 1.10^{-4} metros, já uma nanopartícula é uma partícula de qualquer forma estrutural de tamanho variável entre 1.10^{-9} a 1.10^{-7} metros, o limiar entre micro e nano é um assunto ainda em debate. A grande área superficial resultante de materiais nesta escala de tamanho influencia, de maneira significativa as suas propriedades físicas químicas (FUSKELE; SARVIYA, 2017).

Micro e nanopartículas podem ser preparadas a partir de proteínas, carboidratos, polímeros naturais e sintéticos e íons metálicos. Em geral, para definir o tamanho de uma partícula e a sua consequente aplicabilidade, é fundamental considerar parâmetros relacionados com a biocompatibilidade, toxicidade, solubilidade, carga e permeabilidade. As conhecidas técnicas de preparo podem ser classificadas no contexto de dois processos: i) “top- down”, quando são utilizadas metodologias que cisalham as macromoléculas para formar partículas menores e, ii) “bottom- up” que tem como base o processo de autoassociação de moléculas, geralmente induzidas por características do meio em que se encontram, entre estas, solvente, força iônica, pH, concentração e temperatura (JOYE; MCCLEMENTS, 2014). Neste contexto, micro e nanopartículas podem comumente ser obtidas por gelificação iônica (ou coacervação), spray drying, método da evaporação, emulsificação espontânea, método de polimerização e

pela utilização de fluidos supercríticos (KUMAR et al., 2017)(REVERCHON, E; ADAMI, 2006).

Especificamente em relação ao presente trabalho, as metodologias de preparo das micro e nanopartículas incluíram considerações a respeito dos métodos de autoassociação e gelificação iônica.

A auto associação ou auto organização é um processo espontâneo onde estruturas ordenadas são formadas por mecanismos dirigidos por interações de van der Waals, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (GJERDE et al., 2018) (LI et al., 2019). Os polímeros sintéticos, como o Pluronic® F127 se auto associam preferencialmente em solvente onde um dos blocos seja solúvel sendo concentração e temperatura parâmetros que afetam na associação (LEE et al., 2018). A organização em micelas é um processo endotérmico entropicamente dirigido, onde o bloco do meio da cadeia, PPO, forma o núcleo hidrofóbico da micela que é rodeado por uma camada mais hidrofílica, formada pelos blocos de PEO (ALEXANDRIDIS; HOLZWARTH; HATTON, 1994). Em soluções diluídas, F127, se auto associa em micelas esféricas com raio hidrodinâmico de aproximadamente 8 a 12 nm e raio do núcleo de 5,9 nm. Aumentando-se a concentração a estrutura passa a se organizar de forma hexagonal, lamelar até que, espontaneamente, se empacota em redes cristalinas (KERKHOF et al., 2015).

A gelificação iônica ou, coacervação, de acordo com a definição da IUPAC é a separação em sistemas coloidais de duas fases líquidas. Por este método obtém-se um complexo polieletrólítico (CPE) cuja formação é governada pela auto associação de íons com cargas elétricas opostas para que haja interação eletrostática. Usualmente são utilizadas proteínas, polissacarídeos e surfactantes, onde o controle do pH da solução, força iônica do meio, razão de carga entre as moléculas, massa molar, densidade de carga e flexibilidade da cadeia são parâmetros que devem ser controlados para a obtenção do complexo e as partículas (XU et al., 2016) (KAYITMAZER, 2017).

Por estes métodos, a encapsulação de óleos essenciais é facilitada pela simplicidade de manuseio, facilidade de reprodução e baixo custo. Além disso, o conteúdo ativo fica encapsulado no interior da micro ou nanopartícula protegendo-o de degradação (TIMILSENA et al., 2017).

Rafiee e colaboradores (2014) prepararam nanopartículas de alginato de sódio reticulado com CaCl_2 e quitosana via gelificação iônica com tamanho de 161 nm, as quais foram caracterizadas por DLS e MEV. Para avaliar o potencial antioxidante da quercetina *in vitro* e *in*

vivo, Aluani et al., (2017) a encapsularam em nanopartículas de quitosana e alginato de sódio uma vez que a quercetina apresenta baixa solubilidade em água. Dois tipos de nanopartículas foram preparadas pelo método de gelificação iônica, apenas variando a proporção dos polímeros, 10:1 alginato/quitosana (NP1) ou 10:1 quitosana/alginato (NP2). Os autores observaram que a NP2 carregada com quercetina apresentou maior efeito antioxidante que a NP1.

Micro e nanopartículas poliméricas e também metálicas têm sido utilizadas para funcionalizar fibras têxteis quanto a atividades antifúngicas e antibacterianas (RAI et al., 2015), especialmente partículas de prata em polissacarídeos como quitosana por ambos terem potencial antimicrobiano (LIU et al., 2013) (SHAHID-UL-ISLAM; BUTOLA; VERMA, 2019). Estes sistemas são importantes, por exemplo, para fibras de origem natural como lã, algodão e linho que são altamente suscetíveis ao crescimento de microrganismos devido a sua composição química (SZULC et al., 2017)(LI; HE; HUANG, 2017). São importantes também em processos como a biodeterioração que ocorre pela assimilação de carbono e nitrogênio das fibras pelos microrganismos, acarretando em mudanças estruturais do material têxtil assim como na produção de compostos orgânicos voláteis microbianos, responsáveis pelo mau odor (SZULC et al., 2017).

2.3 UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS EM TÊXTEIS

O desenvolvimento de nanopartículas contendo óleo essencial, neste trabalho é focado para o emprego em fibras têxteis visando a sua funcionalização quanto a ações antifúngicas e antibacterianas.

O termo “biofuncional” empregado no contexto de tecidos remete à atividade antimicrobiana do substrato funcionalizado (LIU; SUN, 2011). De acordo com os autores, um tecido biofuncional pode ser utilizado no setor de vestuário conferindo atividades antimicrobianas, de repelência de insetos e funções cosméticas. O setor não vestuário também é beneficiado com os tecidos biofuncionais que podem ser empregados no tratamento de feridas de pele.

Para que a funcionalização do material seja efetiva, é necessário que haja a liberação do princípio ativo do interior da partícula para a fibra têxtil. Em liberação por estímulos mecânicos há fricção ou pressão que ocasiona o rompimento das partículas e liberação do conteúdo ativo das mesmas. Em estímulos químicos geralmente há mudança do pH ou temperatura do meio que leva a destruição e rompimento da estrutura da partícula e também

pode ocorrer a liberação por estímulos térmicos quando as partículas se encontrarem acima da temperatura de fusão do material (GHAYEMPOUR; MONTAZER, 2016).

Microcápsulas de quitosana produzidas por emulsão contendo óleo de eucalipto e óleo de sândalo foram aplicadas em fibras de algodão por Javid e colaboradores (2014). A presença das micropartículas na superfície da fibra foi constatada por análise de MEV e FT-IR e apresentaram alta atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Lis et al., (2018) prepararam tecidos biofuncionais com o objetivo de oferecer uma alternativa ao uso de repelentes sintéticos, como o DEET (*N,N*-dietil-*m*-metilbenzamida). Os autores incorporaram o complexo de inclusão de β -ciclodextrina contendo óleo essencial de citronela em tecidos de algodão e poliéster alcançando respectivamente o máximo de liberação em 10 e 6 horas para o algodão e poliéster.

Métodos que garantam a adesão de micro e nanopartículas em fibras têxteis também são utilizados. Por exemplo, Fiedler et al., (2019a) produziram microcápsulas de amido de milho contendo *Aloe Vera* para aplicação em algodão não tecido. Os autores utilizaram ácido tetracarboxílico para funcionalizar o algodão e por consequência promover ligação cruzada entre a microcápsula e o algodão.

Neste trabalho, como alternativa ao uso de agentes químicos optou-se pela utilização do plasma frio como uma técnica para expor grupos funcionais de caráter hidrofílico da superfície do tecido de algodão tais como C=O e C-O-C para melhorar a adesão das nanopartículas entre este e as nanopartículas.

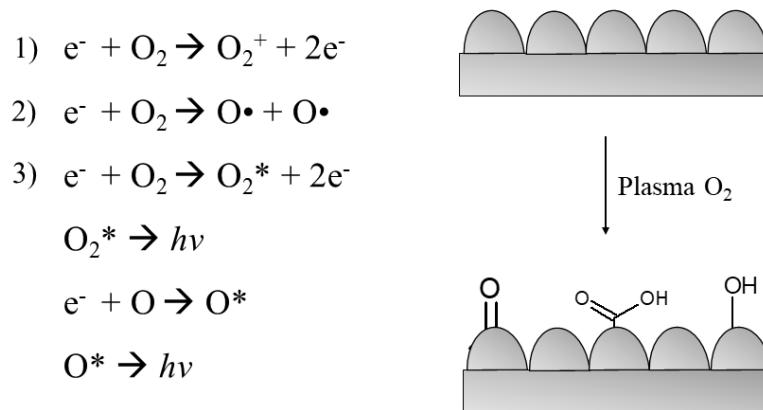
2.4 TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE COM PLASMA FRIO

O termo “plasma” foi primeiramente anunciado por Irving Langmuir, em 1928, e definido como um gás parcialmente ou totalmente ionizado sendo constituído por elétrons, moléculas neutras e excitadas, íons, radiação UV, radicais, e denominado como o quarto estado da matéria (CREMA, 2015).

Em 1969 Raymond Bartnikas criou um modelo de descarga elétrica chamado de plasma de descarga de barreira dielétrica (DBD), onde utilizou um reator de eletrodos metálicos planos ajustados paralelamente e recobertos com uma camada dielétrica para gerar descargas de hélio sob corrente alternada (FELIX, 2017). A barreira dielétrica, a qual pode ser composta por vidros ou cerâmicas, possibilita distribuição homogênea no reator das cargas geradas nos eletrodos (SAATKAMP, 2016).

Gases não polimerizantes, como O_2 , N_2 , Ar, são utilizados na modificação de superfícies no tratamento com plasma, podendo causar oxidação, promover ligações cruzadas e aumentar a rugosidade do material devido à remoção de camadas superficiais. O gás oxigênio é utilizado quando o interesse é promover a molhabilidade de materiais têxteis, durante a DBD são geradas as espécies reativas que podem interagir com a superfície aumentando a hidrofilicidade do material (KAN; MAN, 2018). As reações na Figura 6 representam a ativação de uma superfície por meio da interação das espécies reativas do O_2 , em (1) há a formação de íons e elétrons, em (2) a formação de átomos e radicais e em (3) geração de luz e calor onde O_2^* e O^* são os estados excitados de O_2 e O .

Figura 6- Geração de espécies reativas de O_2 no plasma e ativação de superfície



Fonte: Imagem elaborada pela autora deste trabalho (2019) adaptada de KAN; MAN (2018) e SPARAVIGNA.

O uso do plasma é bastante abordado na literatura no que diz respeito à produção de radicais que aumentam a hidrofilicidade, au

mento de microrugosidade e efeito de limpeza de superfícies têxteis, especialmente do algodão (SPARAVIGNA, [s.d.]) (MATHER, 2009)(KAN, 2016) (ZAHID et al., 2019). Por exemplo, Susan, Widodo e Nur, (2017) avaliaram diferentes tempos de exposição do tecido de algodão ao plasma e observaram que as amostras expostas por maior apresentavam maior rugosidade, fraturas e cavidades em comparação às amostras tratadas em menor tempo. Os autores destacam que estas mudanças superficiais podem prover um caminho para permeação de água nas fibras e assim aumentar a hidrofilicidade do material.

Quanxiang; Aysu; Denning, (2016) relataram a melhoria da adesão da quitosana em algodão tratado com plasma de O_2 justificando a ocorrência de adsorção física. Por meio do

tratamento com plasma, os grupos oxigenados gerados, como ilustrado na Figura 6, atuam como sítios de ligação no algodão. O plasma é uma opção dita como ambientalmente correta ao uso de reagentes que promovem a reticulação entre o substrato e o adsorvato.

Estas características dão aporte para a utilização da técnica de tratamento superficial por plasma frio, em superfícies de tecido de algodão, buscando melhorar a interação do tecido com as nanopartículas de F127 cobertas com o complexo polieletrólítico de quitosana/alginato de sódio.

Capítulo III

Preparo e caracterização das nanopartículas de Pluronic®
F127 contendo óleo essencial de citronela recobertas com o
Complexo Polieletrólítico Quitosana/Alginato de sódio

Considerações do Capítulo

Este capítulo reporta o desenvolvimento de um sistema nanoparticulado carreador do composto hidrofóbico óleo essencial de citronela, formado pela autoassociação do copolímero tribloco Pluronic®F127. A estabilidade do tamanho das nanopartículas foi verificada em função da temperatura, e a formulação mais estável foi recoberta com o complexo polieletrólítico formado por quitosana/ alginato de sódio via gelificação iônica com o intuito de conferir estabilidade às nanopartículas de F127. O sistema obtido foi caracterizado por DLS, TEM, MEV-FEG, FT-IR destacando a alta eficiência de encapsulação e a liberação *in vitro* que sustentaram a proposta e realização dos testes microbiológicos.

Publicação: Artigo em processo de publicação na revista JBCS- *Chitosan-Sodium alginate Polyelectrolyte Complex coating Pluronic® F127 coating nanoparticles loaded with citronella essential oil*. doi: [10.21577/0103-5053.20190244](https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190244)

3 METODOLOGIA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-MS)

O óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) foi adquirido da empresa Harmonia Natural, Canelinha – SC. O perfil químico foi obtido em um cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas (MS 5975C) utilizando uma coluna capilar HP- 5MS (Agilent Technologies) com fase estacionária composta de dimetilsiloxano/fenil 95:5, sendo He o gás de arraste na vazão 1 mL min⁻¹.

3.2 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLURONIC® F127 CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA

Para o preparo das nanopartículas utilizou-se o copolímero Pluronic® F127 adquirido da empresa Sigma-Aldrich, etanol 99,98% adquirido da Neon e o óleo essencial de citronela. Para conhecer a melhor composição a ser recoberta pelo CPE de quitosana e alginato, as nanopartículas foram elaboradas em três diferentes proporções massa/massa em relação a F127/etanol para um volume de 5 mL de etanol contendo 200 µL do óleo essencial, como

mostrado na Tabela 1. A solubilização do Pluronic® em etanol ocorreu sob agitação magnética e após a adição do OEC, o sistema permaneceu em agitação durante 30 minutos.

Tabela 1- Quantidades de F127 e OEC utilizadas no teste de preparo das nanopartículas

Amostra	Massa F127 (g)	Volume OEC (µL)
1	0,1	200
2	0,05	200
3	0,029	200

Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

As amostras 1 foi preparada na concentração de 2,5 %, a amostra 2 na concentração de 1,25 % e a amostra 3 na concentração de 0,725%(m/m) que equivale ao valor da Concentração Micelar Crítica do F127 em água a 25 °C (BASAK; BANDYOPADHYAY, 2013a). Para escolher a amostra a ser recoberta com o complexo polieletrólítico quitosana/alginato de sódio considerou-se o tamanho da nanopartícula obtida, o índice de polidispersão e a estabilidade das mesmas variando-se a temperatura entre 10, 20, 30 e 40 °C. Ambas as análises foram realizadas por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando um Goniômetro Multicorrelador (ALV- LSE 5004, Alemanha) com um laser de HeNe trabalhando a 632,8 nm. O espalhamento de luz das nanopartículas foi verificado na faixa de 30°-150° com intervalo de 10° durante 30 s para cada ângulo. A análise foi realizada em cubetas cilíndricas de vidro contendo 2 mL da amostra previamente diluída em água deionizada e filtrada em filtro de membrana Sartorius® com tamanho de poro de 0,45 µm.

3.3 PREPARO DO COMPLEXO POLIELETROLÍTICO A BASE DE QUITOSANA E ALGINATO DE SÓDIO

A metodologia foi executada com vistas a obter o CPE dos biopolímeros de forma que pudesse ser utilizado para decorar as nanopartículas de F127 contendo o óleo essencial de citronela. O objetivo desta etapa foi fornecer estabilidade física às nanopartículas de Pluronic® e desta forma garantir uma boa eficiência de encapsulação, como uma posterior liberação controlada e por fim adequadas para aplicação em tecido de algodão.

Para tanto utilizou-se quitosana de massa molar média (com grau de desacetilação 87% calculado de acordo com Brugnerotto et al., (2001)) de massa molar viscosimétrica $M_v =$

$10,6 \times 10^4$ e alginato de sódio (com razão ácido manurônico/ácido gulurônico 1,3) de $M_v = 31,1 \times 10^4$. Os valores de massa molar foram calculados de acordo Witt (2012) e ambos polímeros adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. A partir de inúmeros testes preliminares determinou-se as concentrações, pH e a proporção de cada polímero a ser utilizado assim como o tempo e velocidade de preparo do CPE de forma a obter uma amostra estável em tamanho e potencial zeta durante um mês. Esta amostra foi denominada como QA(1) e estas condições foram utilizadas para decorar as nanopartículas de Pluronic®F127.

Desta forma, 1 mL das nanopartículas de F127 (2,5% m/m) contendo 200 μ L de OEC, preparadas como descrito no Item 3.1.2, foi rapidamente adicionada a 25,5 mL de solução de quitosana (0,15% m/v, pH= 4,0) previamente preparada em ácido acético 1% (v/v) permanecendo em agitação magnética durante 30 minutos. Na etapa seguinte, com a adição de 4,5 mL de alginato de sódio (0,15% m/v, pH= 6,0) garantiu-se o preparo do complexo polieletrólítico por meio da técnica de gelificação iônica, a qual se baseia na interação de cargas opostas. Homogeneizou-se em Ultra-Turrax® (modelo IKA® T125) em 5000 rpm durante 20 minutos. O CPE obtido foi mantido em faixa de pH 3,0 a 7,0 para que não houvesse precipitação dos polímeros.

3.4 ESTUDO DO EFEITO DA COMPOSIÇÃO ETANOL/ÁGUA NO RAIOS HIDRODINAMICO DOS SISTEMAS

Este estudo foi conduzido com objetivo de verificar como o complexo polieletrólítico poderia estabilizar as nanopartículas de Pluronic® F127, com a hipótese de ser pela formação de uma camada externa. Os sistemas nanoestruturados foram preparados de acordo com a metodologia descrita acima. As nanopartículas de F127 contendo óleo essencial de citronela e aquelas recobertas com o CPE quitosana-alginato de sódio foram avaliadas pela variação da razão volumétrica água/etanol como meio de dispersão. Após o procedimento de preparo, 1,0 mL da suspensão contendo as nanopartículas foi coletada e diluída em 9,0 mL de solução água/etanol em diferentes razões volumétricas nomeadas: 100/0, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 75/25, 70/30, 60/40, para F127 e óleo de citronela e 100/0, 90/10, 80/20, 75/25 de CPE. Então as suspensões foram filtradas com membranas Sartorius®, com poros de 0,45 μ m e analisadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) de acordo com a metodologia descrita no item 3.5.1. Foram obtidas curvas de correlação em 90° em triplicata durante 1 minuto as quais fornecem

informações sobre o tamanho das nanopartículas em função da fração volumétrica de etanol por meio da obtenção do raio hidrodinâmico (R_h).

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

3.5.1 Espalhamento de Luz Dinâmico

Partículas em solução estão em constante movimento browniano, o que causa flutuações de concentração e densidade na amostra. Em uma análise de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), é medido a dependência da intensidade do espalhamento de luz de uma amostra em movimento browniano com o tempo para gerar uma função de autocorrelação (HASSAN, RANA, VERMA, 2015).

O decaimento da função de autocorrelação é tratado com modelos matemáticos para possibilitar o cálculo do coeficiente de difusão das partículas e assim inferir sobre o seu tamanho. Graficamente, a frequência de relaxação da função de correlação (τ) em função do vetor de onda (q^2) do feixe de luz incidente do equipamento calcula-se o coeficiente de difusão (D), que é o coeficiente angular da reta, de acordo com a Equação 1, na qual τ é a frequência de relaxação:

$$\tau = q^2 D \quad (1)$$

O vetor de onda q é definido pela Equação 2, na qual λ é o comprimento de onda do feixe de luz incidente, θ o ângulo de espalhamento e n o índice de refração do meio (BERNE; PECORA, 1976).

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2)$$

A determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersidade foi realizada por meio de medidas de espalhamento de luz dinâmico em um Goniômetro Multicorrelador (ALV-LSE 5004, Alemanha) com um laser de HeNe trabalhando a 632,8 nm. O espalhamento de luz das nanopartículas foi avaliado na faixa de 30°-150° com intervalo de 10° durante 30s para cada ângulo. A análise foi realizada em cubetas cilíndricas de vidro contendo 2 mL da amostra previamente diluída em água deionizada e filtrada membrana Sartorius® com tamanho de poro de 0,45 μm .

Neste trabalho os valores de raio hidrodinâmico (R_h) foram calculados via análise CONTIN utilizando a equação de Stokes Einstein, Equação 3, onde D é o coeficiente de difusão aparente, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da amostra e η é a viscosidade do meio.

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (3)$$

3.5.2 Potencial Zeta

O potencial zeta é definido como o potencial elétrico no raio de cisalhamento de uma partícula coloidal, em relação a seu valor no seio do material. Uma vez que o raio de cisalhamento é o raio da esfera que captura a camada rígida de carga ligada à partícula coloidal. A camada interna de carga e a atmosfera externa constituem na dupla camada elétrica (ATKINS, De PAULA, 2012).

O potencial zeta das nanopartículas foi determinado por anemometria de Laser Doppler no equipamento Zetasizer Nano Series modelo SZ (Malvern Instruments, Reino Unido) o qual opera com laser no comprimento de onda de 633 nm. A análise foi realizada em célula capilar plástica com 1 mL de amostra sem diluição. Foi realizada uma média de três medidas e por meio da aproximação de Helmholtz-Smoluchowski, Equação 4, os valores do potencial zeta (ζ) foram calculados. Na Equação 4, μ é a mobilidade eletroforética, E o campo elétrico aplicado, η a viscosidade e ε a constante dielétrica do meio.

$$\zeta = \frac{4\pi\mu\eta}{E\varepsilon} \quad (4)$$

3.5.3 Controle da estabilidade das nanopartículas

A estabilidade em relação ao tamanho, potencial zeta e pH foi monitorado utilizando as metodologias previamente descritas. As medidas foram realizadas com as amostras recém preparadas e após 7, 14, 28, 45 e 60 dias de preparo.

3.5.4 Secagem das nanopartículas por Spray- Drying para obtenção de espectros de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Para caracterizar os polímeros e o óleo essencial e verificar possíveis interações entre estes por FT-IR, as nanopartículas com e sem óleo essencial, soluções de quitosana e alginato de sódio preparados nas mesmas condições de uso para a formação de nanopartículas foram secos em Spray Dryer (BUCHI B190, Suíça). As condições operacionais de secagem foram

fixadas em 120 °C para a temperatura de entrada, 100% de taxa de aspiração (35 m³ h⁻¹), 5% de taxa de injeção de amostra (2,5 mL min⁻¹) e um fluxo de ar de 600 L h⁻¹, resultando assim em uma temperatura de saída em torno de 84± 4 °C, com uma agulha de 0,5 mm de diâmetro.

Os espectros de FT-IR do pó que resultou da secagem foram obtidos com um infravermelho Shimadzu Prestige-21, (Japão) em pastilhas de KBr, e os dados foram coletados de 4000-400 cm⁻¹ com resolução de 2,0 cm⁻¹.

3.5.5 Análises de Microscopias Eletrônicas de Transmissão e de Varredura por Emissão de Campo

O tamanho e morfologia das nanopartículas foram observados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) utilizando um microscópio JEM 1011 operando a uma voltagem de aceleração de 80 kV. O preparo do grid ocorreu 24h antes da análise, onde 3 mL de nanopartículas foram diluídas em mistura água/isopropanol e água/etanol nas proporções 80:20 v/v filtradas utilizando membranas Sartorius® 0,45 µm e 10 µL gotejado em grid de cobre recoberto com carbono. O excesso removido com papel filtro e por último corado com acetato de uranila 1%.

A análise de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) de amostras recém preparadas foi executada em microscópio JEOL JSM- 6701F com voltagem de aceleração de 10 kV. A amostra sem diluição foi gotejada em placa de silício colada em suporte de alumínio para receber posterior recobrimento de ouro.

O tamanho e morfologia das nanopartículas secas por spray drying foram observados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio JEOL JSM- 6390LV operando com voltagem de aceleração de 10 kV. A amostra em pó foi depositada diretamente em fita de carbono colada em suporte de alumínio para receber posterior recobrimento de ouro.

3.5.6 Determinação da Eficiência de Encapsulação

O conteúdo de óleo essencial de citronela encapsulado foi determinado por espectrofotometria UV-Vis (UV NOVA/ 1800, Brasil). Primeiramente, 4 mL de amostra foi centrifugado utilizando tubo Viva Spin turbo4, Sartorius®, a 7000 rpm por 20 minutos. O conteúdo centrifugado foi aberto com ácido acético, então 1 mL de hexano foi adicionado com o propósito de extrair o conteúdo orgânico. A absorbância foi medida em 210 nm. Desta forma, a eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com equação 5:

$$EE(\%) = \frac{\text{Concentração total de EOC}}{\text{Concentração inicial de EOC}} \times 100 \quad (5)$$

3.6 ESTUDO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado pelo método de diálise utilizando uma membrana de acetato de celulose com tamanho de poros de $10 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$. Então, 30 mL da suspensão coloidal contendo óleo essencial foram colocados na membrana de diálise. Este sistema foi colocado em um béquer contendo 500 mL de cada meio de diluição meio de diluição a 37°C em agitação magnética a 240 rpm.

Para comparar o mecanismo de liberação, dois diferentes meios de diluição foram utilizados. Baseando-se na metodologia proposta por Natrajan *et al.*, utilizou-se tampão salino fosfato (PBS) em pH 5,5 contendo 20% de etanol para que a liberação do óleo essencial pudesse ocorrer de forma mais uniforme. O segundo meio de diluição, fluido simulado de suor em pH 4,3 foi preparado de acordo com a norma proposta pela American Association of Textile Chemists and Colorists (AATCC Test Method 15-2002) descrita por Kulthong 2010.

O experimento foi realizado em duplicata para cada meio de liberação e respeitando a solubilidade do óleo essencial nos meios propostos, sendo $1,3 \mu\text{L mL}^{-1}$ em meio PBS contendo 20% de etanol e $0,9 \mu\text{L mL}^{-1}$ em fluido de suor. O processo foi conduzido por 24 horas, onde 3 mL de meio eram retirados em tempos definidos para serem quantificados por espectrofotometria UV-Vis (UV NOVA/ 1800, Brasil). A quantia de ativo liberado foi calculada de acordo com a Equação 6.

$$(\%) \text{Liberação} = \frac{[\text{OEC liberado}]}{[\text{OEC Total}]} \times 100 \quad (6)$$

3.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Instituto Brasileiro de Tecnologia do Couro, Calçado e Artefatos (IBTeC), seguindo a Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, padronizada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003) e o trabalho de Araujo; Longo, (2016) . A ação bactericida da nanopartícula e também do óleo de citronela puro foi verificada diante das cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas*

aeruginosa (ATCC 24853), ambas bactérias gram-negativas e diante de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Micrococcus* sp. ambas gram-positivas. As cepas foram semeadas em caldo triptona de soja (TSB) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após este período realizou-se a contagem das células bacterianas para cada cepa em câmara de Neubauer para realizar o ajuste da concentração de células por mL (cel. mL⁻¹). Desta forma, para *S. aureus* trabalhou-se com a concentração de 4,6 10⁷, *P. aeruginosa* 5,6. 10⁷, *E. coli* 4,4 10⁷ e *Micrococcus* sp. 1,0 10⁷ (cel mL⁻¹).

A concentração inibitória mínima foi estimada por meio da técnica de microdiluição para as quatro cepas em estudo com o intuito de estimar o potencial do óleo essencial puro e da nanopartícula. Para tal análise utilizou-se placas com 48 poços (Kasvi). Para todas as placas, as duas primeiras colunas continham respectivamente o controle negativo (C-), apenas o meio de cultura, e positivo (C+), o meio de cultura contendo o inóculo bacteriano; duas colunas para a amostra de nanopartícula branca-CPE quitosana/alginato- denominada de (B); duas colunas com OEC puro (OP) e duas colunas com a nanopartícula contendo OEC (NP). Adicionou-se em todos os poços 100 µL de meio TSB e no primeiro poço de cada coluna 100µL do agente inibidor a partir do qual realizou-se a diluição seriada de modo que nos poços seguintes contivessem os seguintes volumes do agente inibidor: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,152 µL. Por fim, em cada poço foi adicionado 10 µL de inóculo. Após o período de incubação, que ocorreu durante 24h a 37 °C, adicionou-se em cada poço 20 µL de resazurina sódica 0,01% (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido, Alamar Blue® Sigma- Aldrich) e aguardou-se 1h para a leitura visual do resultado.

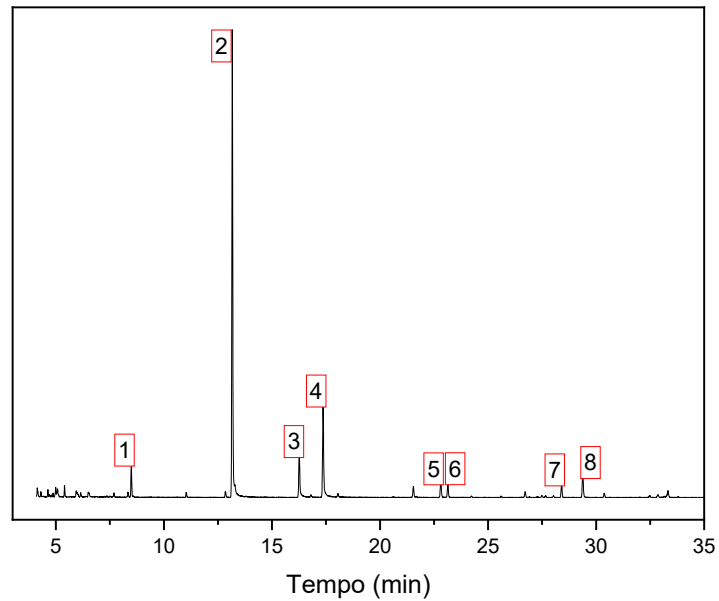
3.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.8.1 Caracterização do óleo essencial de citronela via cromatografia gasosa

A análise de GC-MS foi realizada com o propósito de identificar os compostos do óleo essencial de citronela, comparando os resultados obtidos com os dados espectrais da biblioteca NIST11, para então poder avaliar o seu potencial uso em aplicações antifúngicas e bactericidas. Oito compostos foram identificados sendo estes: D- Limoneno, Citronelal, Citronelol, β-Pineno, 3-Careno, β-(D)-Elemeno, D-Cadineno e 4-metileno-1-metil-2-(2-metil-1-propen-1-il)-1-vinil. Entre estes, citronelal, β-Pineno e citronelol são os componentes majoritários representando 63,5, 14,9 e 7,5% do total, respectivamente. A Figura 7 apresenta o cromatograma do óleo essencial de citronela, os números dos picos assinalados correspondem

a Tabela 2, onde contém as informações a respeito do tempo de retenção e a porcentagem relativa de cada composto, o número do pico é equivalente ao assinalado no gráfico da Figura 7.

Figura 7- Cromatograma do óleo essencial de citronela. Os números indicados na caixa vermelha correspondem ao número do pico na Tabela 2.



Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

Tabela 2- Perfil cromatográfico do óleo essencial de citronela obtido da análise de GC-MS

Número do pico	Tempo de retenção (min)	%Relativa	Nome do composto
1	8.5	3.9	D-Limoneno
2	13.2	63.5	Citronelal
3	16.3	7.5	Citronelol
4	17.4	14.5	β – Pineno
5	22.8	2.6	3- Careno
6	23.1	1.9	β -D-Elemeno

7	28.4	2.0	D-Cadineno
8	29.4	3.7	4-metileno-1-metil-2(2-metil-1-propen-1-il)-2-vinil, cicloheptano

Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

A composição do óleo essencial de citronela que foi utilizado neste trabalho é semelhante ao encontrado por Simic et al., (2008) na espécie *Cymbopogon winterianus* onde os constituintes citronelal (27,0%), geraniol (22,78%) e citronelol (10,09%) foram identificados como majoritários. Os autores verificaram atividade antifúngica e bactericida contra várias espécies, entre os quais o fungo *A. niger* e a bactéria *S. aureus* foram inibidos pela ação do óleo essencial.

Desta forma creditou-se ao OEC o potencial microbiológico que atende ao propósito deste trabalho, assim prosseguiu-se com o processo de encapsulação do mesmo em nanopartículas de Pluronic® F127 recobertas com o complexo polieletrólítico de quitosana e alginato de sódio cujas caracterizações são apresentadas nos tópicos seguintes.

3.8.2 Avaliação da proporção Pluronic® F127/óleo essencial

A Tabela 3 exibe os resultados do raio hidrodinâmico das nanopartículas de Pluronic® F127 preparado nas concentrações de 2,5; 1,25 e 0,725% (m/m). A escolha destas concentrações foi baseada no trabalho de Basak e Bandyopadhyay (2013b) onde os autores trabalharam acima da concentração micelar crítica do F127 ao produzirem micelas em água. No entanto, no presente trabalho as micelas foram preparadas em etanol, e utilizou-se o valor da CMC em água como a menor concentração, o dobro e quádruplo deste valor para testes contendo 200 µL do OEC.

Tabela 3- Raio hidrodinâmico das nanopartículas de Pluronic® F127 preparadas em diferentes concentrações contendo OEC

Amostra	F127% (m/m)	Volume OEC (µL)	R _h (nm)
A1	2,5	200	82
A2	1,25	200	99
A3	0,725	200	102

Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

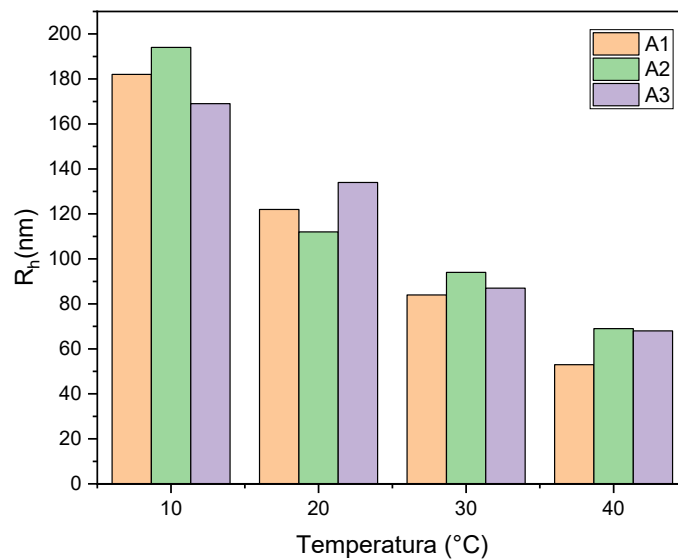
Observa-se aumento dos valores de R_h entre as amostras A1 e A2 cujo valor praticamente é inalterado na amostra A3. A amostra A1, com maior concentração de F127 apresenta o menor raio hidrodinâmico, 82 nm e a amostra A3 com 102 nm, o maior raio. Para esta formulação sugere-se redução da interação entre os componentes da nanopartícula e assim a tendência de aumento de R_h .

Contudo, ao observar a amostra A2 é possível concluir que o aumento da concentração de F127 em relação à amostra A3, não foi suficiente para alterar o tamanho das micelas, sugerindo excesso de OEC na composição da amostra 3. Na amostra A1, que contém o dobro da quantidade de F127 da amostra A2, observa-se um ligeiro decréscimo do R_h , provavelmente, fruto do aumento expressivo do número de micelas nesta em relação àquela visto a presença de um número maior de macromoléculas. O menor R_h foi observado para amostra com maior razão F127/OEC (amostra A1 – 82 nm) o que está de acordo com o observado em relação a influência do OEC no tamanho das micelas de F127 formadas.

Estudou-se a estabilidade de tamanho da micela com a variação de temperatura utilizando-se o equipamento ALV- LSE 5004 no qual foi acoplado um banho termostático e as medidas realizadas à 10, 20, 30 e 40°C.

A Figura 8 mostra que à medida que se aumenta a temperatura de trabalho, diminui-se o raio hidrodinâmico, sendo que a 10°C, o R_h da amostra 1 é 182 nm; da amostra 2, 194 e da amostra 3, 170 nm. A 40 °C estas nanopartículas apresentam R_h de 52 e 70 nm para as amostras A1, A2 e A3 respectivamente e nas temperaturas 20 e 30°C, as nanopartículas adquirem tamanhos intermediários. Uma vez que para as diferentes concentrações de F127 observa-se tamanhos similares do raio hidrodinâmico em cada temperatura, entende-se que a quantidade de OEC utilizada, 200 μ L, é bem solúvel no meio.

Figura 8- Variação do raio hidrodinâmico das nanopartículas A1, A2 e A3 em diferentes temperaturas



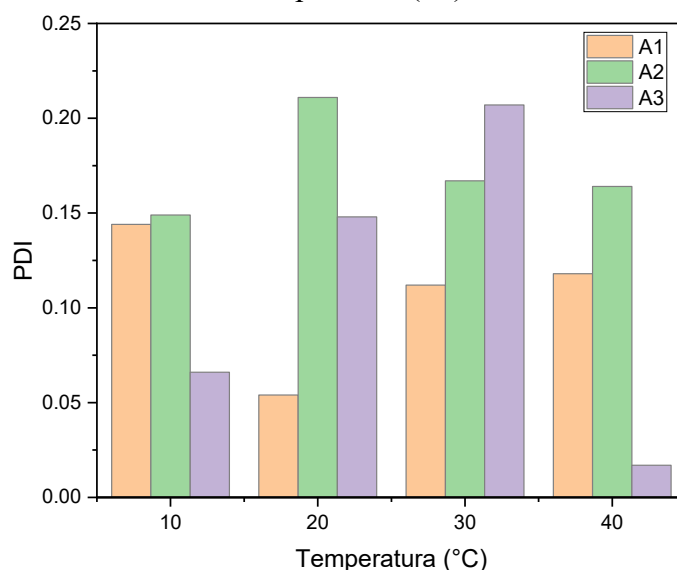
Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

Na encapsulação de terpenos em nanopartículas de F127 produzidas em água, Grillo; Morfin e Prévost (2018) propõe que a estrutura da nanopartícula seja arranjada no modelo: núcleo-camadas (camada interna e externa) de modo que no núcleo contenha grande quantidade de óleo essencial e PPO, a primeira camada contenha óleo, PPO e água e a segunda camada contenha óleo, PEO e água. Já no presente trabalho, o uso de etanol no preparo das nanopartículas deve implicar que em toda a estrutura da nanopartícula contenha óleo essencial e etanol. Assim a explicação para a alteração de tamanho com a temperatura não deve estar necessariamente relacionada com a solubilidade do óleo essencial em F127 mas sim na aglomeração dos unímeros do copolímero em temperaturas mais baixas e moderadas visto que a micelização é um processo endotérmico (CHAIBUNDIT et al., 2007). Na presença de óleo essencial este processo pode estar relacionado com o aumento da entalpia do sistema F127/etanol/óleo essencial, pois para haver a incorporação do óleo é necessário o deslocamento de moléculas de etanol que solvavam o núcleo PPO para favorecer a micelização (GRILLO; MORFIN; PRÉVOST, 2018).

A Figura 9 exibe os valores do índice de polidispersidade (PDI), calculado no software ALV-Correlator Software V.3.0 das amostras A1, A2 e A3 para as quatro temperaturas estudadas. Quando as medidas de espalhamento foram realizadas a 20 e 30°C, faixa de temperatura onde ocorre a micelização, observa-se a menor polidispersidade para a amostra A1.

Este foi um parâmetro que auxiliou a escolha da amostra A1 para seguir os estudos e representa a composição F127/OEC utilizada para produção das nanopartículas recobertas com complexo polieletrólítico quitosana-alginato adiante apresentado.

Figura 9- Resultados da variação do PDI das nanopartículas A1, A2 e A3 em função da temperatura (°C)



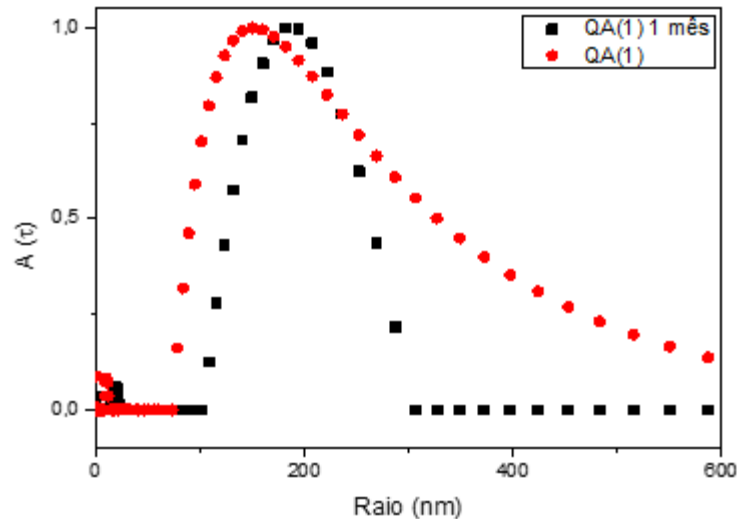
Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

3.8.3 Obtenção do complexo polieletrólítico quitosana/alginato de sódio

Dentre os diversos testes para a obtenção de um complexo polieletrólítico estável em termos de potencial zeta e tamanho de partícula para que pudesse ser utilizado como capa protetora às nanopartículas de F127, a amostra denominada QA (1) foi designada a tal finalidade. Logo após o preparo dos CPE's observou-se visualmente a opalescência das amostras, QA (1), preparada com 85% quitosana e 15% alginato. Esta amostra apresentou uma suspensão opalescente enquanto que, se utilizado proporções iguais de polímeros (50% quitosana/50% alginato) ou 75% quitosana e 25% de alginato observava-se a instantaneamente a formação de agregados indicando neutralização e excesso de cargas dos polieletrólitos. De acordo com Tagliari (2012), a obtenção de amostras opalescentes sinaliza a condição ideal para a formação de CPE a partir de sistemas de alta massa molar. A amostra QA (1) apresentou raio hidrodinâmico de 168 nm no recém preparo e 197 nm após 1 mês do preparo e permanecendo em repouso. O pequeno aumento do raio hidrodinâmico é atribuído à aglomeração das nanopartículas, apesar disto, a Figura 10 mostra uma faixa distribuição de tamanho mais estreita para QA (1) 1 mês, indicando que as partículas e cadeias poliméricas menores se aglomeraram.

Neste período, o PDI manteve-se praticamente igual, variando de 0,22 para QA(1) para 0,25 para QA(1) 1 mês de repouso.

Figura 10- Distribuição de R_h para a amostra QA(1) recém preparada e após um mês de preparo



Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

Os valores de potencial zeta para os polímeros puros preparados na mesma concentração a serem utilizados na preparação do CPE, para a amostra QA(1) e para o QA(1) após 1 mês de preparo podem ser verificados na Tabela 4:

Tabela 4- Valores de potencial zeta para os polímeros puros e para o CPE

Amostra	Potencial Zeta (mV)
Alginato de sódio 0,15%	-58,5
Quitosana 0,15%	+56,0
QA (1)	+49,5
QA (1) 1 mês	+49,1

Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

Em virtude do alginato de sódio ser um sal de polímero aniônico, em solução aquosa neutra em pH 6 este assume o comportamento de poliânion tendo seus grupos carboxilatos ($-\text{COO}^-$) expostos (KOMOTO; FURUIKE; TAMURA, 2019). Por esta razão observa-se o valor de potencial zeta bastante negativo, -58,5 mV, que está associado à alta densidade de carga negativa do polímero. A dissolução da quitosana em ácido acético ocorre por meio da

protonação dos grupos $-NH_2$ e assume o comportamento de polycation que é requerido para haver a interação eletrostática com os grupos $-COO^-$ negativamente carregados do alginato de sódio (SHU et al., 2009). O valor bastante positivo no potencial zeta da quitosana pura, +56,0 mV, apresentado na Tabela 4 indica alta densidade de carga positiva do polímero nas condições de preparo deste trabalho. Os valores de potencial zeta dos polímeros puros serem em módulo praticamente iguais acarretou na neutralização das cargas e explica o porquê da formação de agregados quando os polímeros foram misturados em igual proporção.

Ressaltando que a proporção de polímeros utilizada no preparo do CPE foi de 85% quitosana e 15% alginato, o valor de potencial zeta positivo para a amostra QA (1) de +49,5 mV retrata o excesso de cargas positivas residuais no meio, referente aos grupos $-NH_3^+$ que não interagiram com o alginato desta forma não são somente atribuídas a camada externa da nanopartícula ser de quitosana. Um pequeno decréscimo foi observado após o repouso de um mês, onde a amostra QA (1) apresenta potencial zeta de +49,1 mV. A diminuição do valor de potencial zeta pode estar associado com uma possível interação dos dois polieletrólitos ao longo do tempo, consumindo as cargas residuais da quitosana pelos grupos carboxilato do alginato. Esta interação ao longo do tempo também pode acarretar no aumento de raio do CPE por conta da aglomeração, e visto que a mobilidade eletroforética está relacionada com o tamanho da partícula, então partículas maiores se movimentarão mais lentamente no meio resultando em menor potencial. Embora ocorra interação entre os polieletrólitos e formação de aglomerados durante 1 mês, como mostra o espalhamento de luz, a formulação ainda permanece estável, pois de acordo com a literatura, materiais com potencial zeta ± 30 mV conseguem manter a espessura da dupla camada elétrica e assim impedir a agregação (AVADI et al., 2010).

Os valores de raio hidrodinâmico e potencial zeta alcançados neste trabalho estão na faixa de valores esperada quando se trata da obtenção de complexos polieletrólíticos via gelificação iônica.

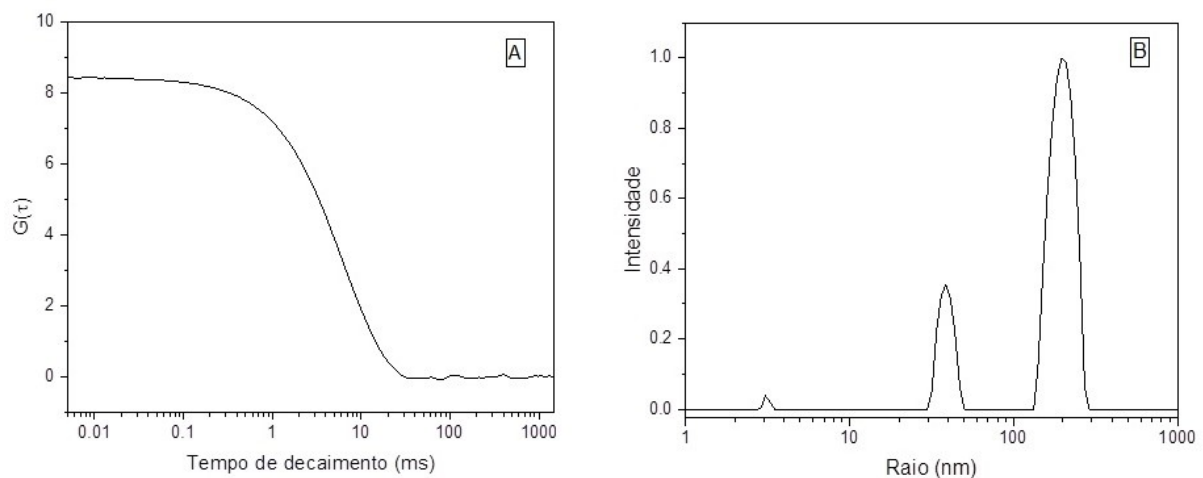
Caracterização Físico-química das nanopartículas de Pluronic®F127 decoradas com o complexo polieletrólítico

Os resultados que serão apresentados a seguir são referentes às nanopartículas de Pluronic® F127 contendo óleo essencial de citronela que foram recobertas com o CPE, sendo obtido via gelificação iônica de quitosana com alginato de sódio.

3.8.3.1 Determinação do tamanho e índice de polidispersidade por Espalhamento de Luz Dinâmico

A Figura 11 mostra a curva de correlação e a distribuição do raio hidrodinâmico no modo logarítmico *unweight*, obtido do sistema Pluronic® F127/OEC/CPE. Em (a), o perfil da curva de correlação é característico de partículas grandes. O valor de 0,85 para a amplitude máxima da função indica boa resolução da medida, uma vez que o limite teórico é 1,0 (HASSAN; RANA; VERMA, 2015). Nota-se em (b) uma distribuição bimodal, provavelmente resultante da variação de tamanho das cadeias poliméricas e do grau de ionização dos polieletrólitos. De acordo com o Software ALV- 7004 V.3.0, aproximadamente 18% da população total apresenta R_h de 38 nm e 82% de 196 nm. Avadi et al., (2010) relatam que o valor de índice de polidispersidade igual a 0,39, valor observado para esta nanopartícula, indica uma dispersão homogênea, desde que o sistema é composto por polímeros naturais, sugerindo também que a formação de partículas pequenas ocorre devido a fortes interações eletrostáticas.

Figura 11- Função de correlação (a) e distribuição de raio hidrodinâmico (b) para a amostra da nanopartícula

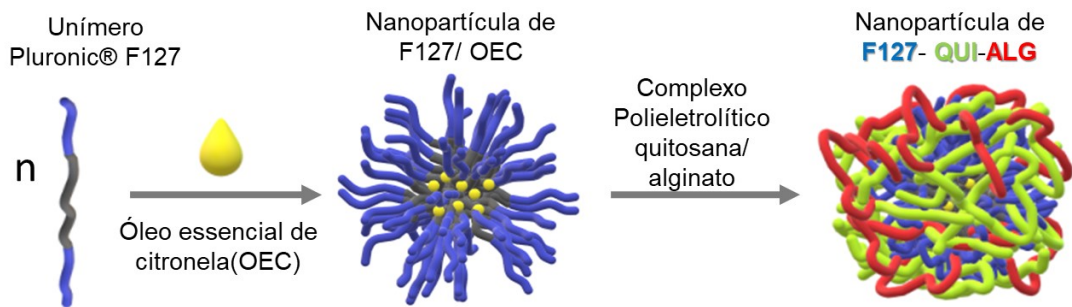


Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

Como esperado, maior raio hidrodinâmico é observado para o sistema contendo as nanopartículas de Pluronic® em relação ao CPE puro. A proposta de estrutura é a nanopartícula de Pluronic® decorada com o CPE como pode ser visualizada na Figura 12 e melhor compreendida com as imagens de TEM. Conforme a metodologia utilizada, as nanopartículas de F127 são adicionadas a quitosana. As interações que ocorrem entre o oxigênio do bloco de PEO do copolímero e o grupo amino das cadeias de quitosana garantem o recobrimento da nanopartícula pelo polieletrólito. Estas interações dependem do pH do meio e da carga da

quitosana (PEPIĆ; FILIPOVIĆ-GRČIĆ; JALŠENJAK, 2008). A última etapa do preparo da nanopartícula decorada ainda envolve a adição do alginato utilizando Ultra-Turrax®, um processo de homogeneização em alta velocidade que colabora no baixo índice de polidispersidade e na distribuição de tamanho das nanopartículas.

Figura 12- Esquema da formação da nanopartícula de F127 contendo óleo essencial de citronela e posterior decoração com o complexo polieletrólítico



Fonte: Adaptado de SANCHES et al. (2019)

3.8.3.2 Potencial zeta

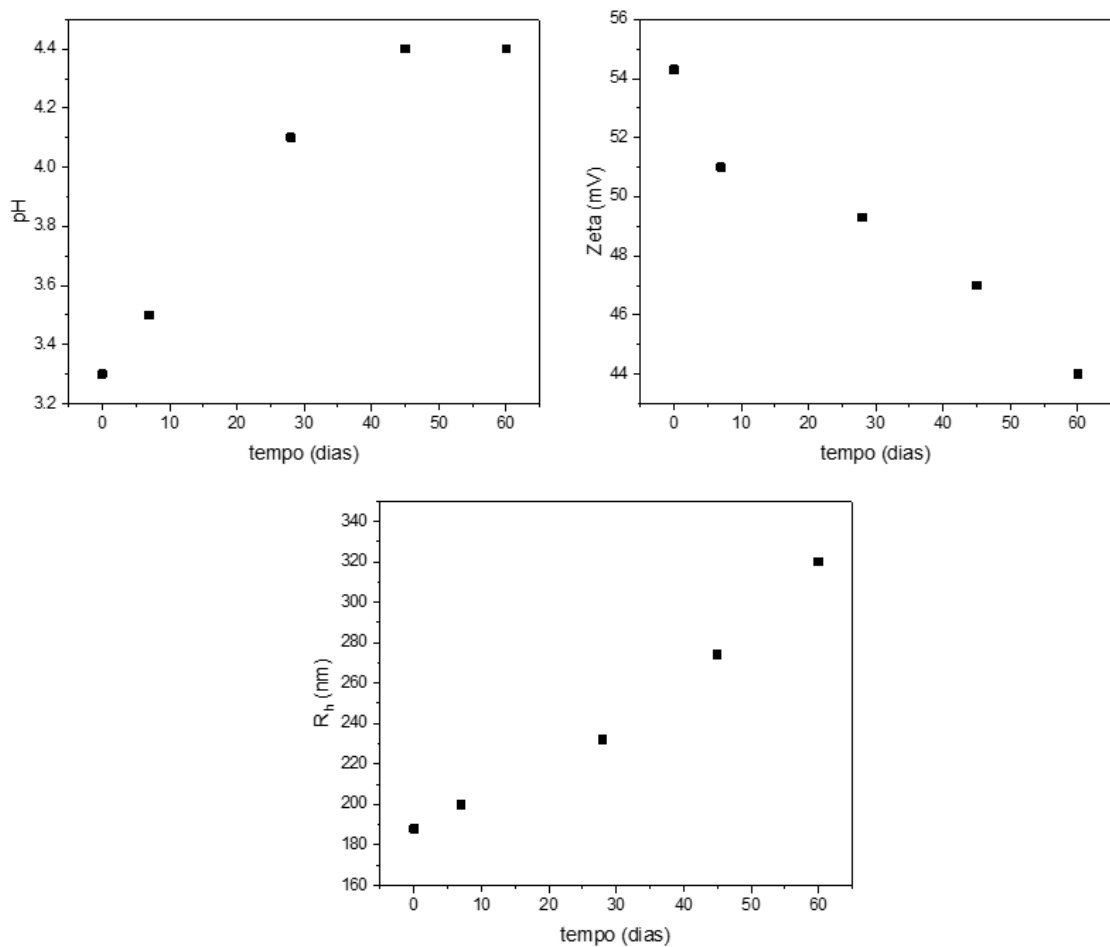
A formação do complexo polieletrólítico ocorre quando o poliânion é gotejado na solução de quitosana havendo interação eletrostática intermolecular. Desde que a razão de cargas aniônica/catiônica das moléculas esteja envolvida na formação do CPE, o valor positivo do potencial zeta de +54,3 mV indica que há excesso de cargas positivas, sugerindo que as nanopartículas estão dispersas em solução de quitosana. Ao comparar com o potencial zeta de +49,5 mV do CPE, presume-se que há maior quantidade do polycation que não interagiu com o alginato durante o preparo.

3.8.3.3 Estabilidade de tamanho, pH e potencial zeta ao longo do tempo

Para verificar a estabilidade da formulação F127/OEC/CPE, acompanhou-se a variação de tamanho, baseado no raio hidrodinâmico, variação do pH e do potencial zeta durante 60 dias. Observa-se na Figura 13 que durante este período houve aumento do pH do sistema de 3,32 para 4,41 o que está de acordo com o decréscimo do potencial zeta de +54,3 para +44 mV, indicando o consumo das cargas positivas da quitosana com o passar do tempo devido ainda à continuidade das interações eletrostáticas no CPE, como sugerido por Wu et al., (2016). Conseqüentemente observa-se aumento do tamanho de partícula de 180 para 320 nm, devido a este processo de aglomeração, assim como houve incremento do índice de polidispersidade, de 0,39 para 0,50. Furtado et al., (2018) similarmente observaram decréscimo do potencial zeta e

aumento do pH de nanopartículas de quitosana/NaF ao longo do tempo e atribuíram a formação de aglomerados ao aumento do pH a 6,2, valor do pKa da quitosana. No presente trabalho, embora houve formação de agregados, aumento do tamanho da partícula e do pH, o potencial zeta permaneceu acima de 30 mV, que é considerado um valor aceitável para um sistema fisicamente estável.

Figura 13- Estabilidade de pH, potencial zeta e tamanho das nanopartículas durante 60 dias



Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

3.8.3.4 Variação do Raio hidrodinâmico, do potencial zeta e do pH dos sistemas F127/óleo essencial e F127/óleo essencial cobertos pelo CPE em função da composição etanol/água

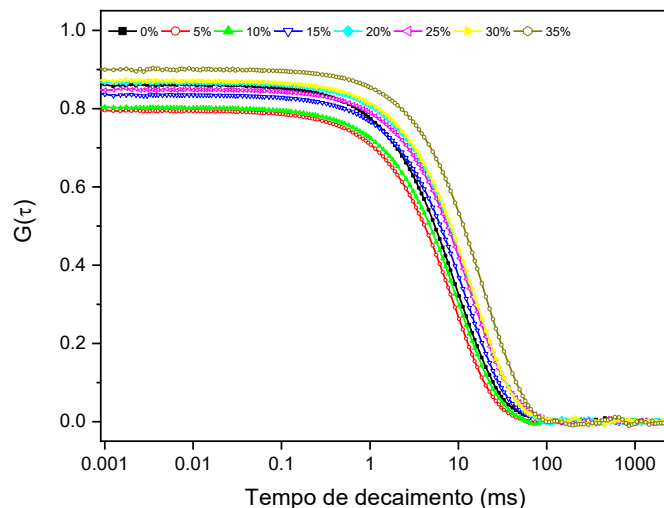
A fim de avaliar se as nanopartículas obtidas do copolímero Pluronic® F127 carregadas com óleo essencial de citronela foram recobertas com o complexo polieletrólítico de quitosana

e alginato de sódio, medidas de DLS foram realizadas para comparar os valores do raio hidrodinâmico dos dois sistemas.

Amostras do copolímero, concentração 2,5% m/m, preparadas em etanol puro com ou sem adição de OEC e em água pura com ou sem adição de OEC, foram analisadas por DLS. As amostras que não continham OEC não indicaram a formação de nanoestruturas, desde que para estes sistemas, a função de correlação não convergiu para a forma exponencial, sugerindo que nestas condições os unímeros de F127 permaneceram livres em solução (CHAT et al., 2018). Entretanto, para as nanopartículas preparadas em etanol com adição de OEC, a curva de correlação obtida revela a formação de nanoestruturas de 146 nm. De acordo com Ashraf e colaboradores (2015), este comportamento pode estar associado ao aumento da hidrofobicidade do bloco de PPO e a diminuição da hidrofiliabilidade do bloco de PEO.

A Figura 14 mostra todas as curvas de correlação obtidas com a variação da fração volumétrica na etapa de diluição da suspensão, como detalhado na seção 3.4 da metodologia. Como pode ser visto, conforme aumenta-se a porcentagem de etanol, a função de correlação ($G(\tau)$) desloca-se para maiores valores de tempo de decaimento sugerindo a formação de partículas alongadas.

Figura 14- Curvas de correlação obtidas dos dados de DLS para a nanopartícula de F127 contendo OEC em meios de diluição com diferentes quantidades de etanol

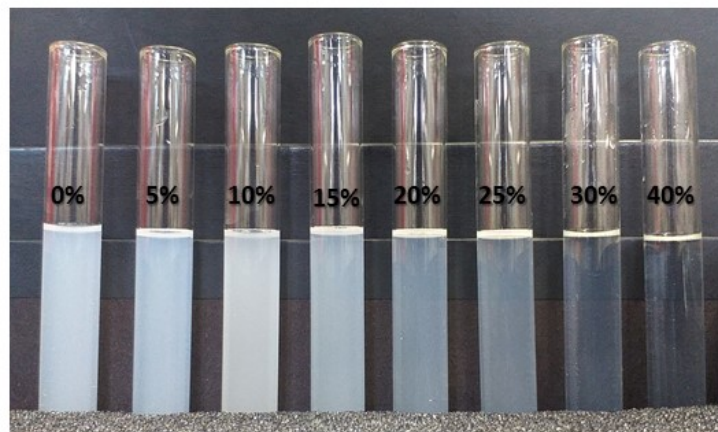


Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

A distorção da forma, nanopartículas alongadas e não esféricas, está relacionada com o maior tempo em que as partículas em movimento Browniano estão submetidas ao feixe de laser do instrumento de DLS (BASAK; BANDYOPADHYAY, 2013b). Na Figura 15 observa-se que

o sistema Pluronic® F127/OEC apresenta variação da turbidez em meio de diluição contendo diferentes proporções de etanol/água. Percebe-se que o aumento de etanol no meio provoca a diminuição da turbidez do sistema, que está relacionado com mudanças da forma estrutural da nanopartícula de F127. Em até 15% de etanol acredita-se que há formação de vesículas, justificado pela alta turbidez do sistema, alternando-se a nanopartículas mais alongadas entre 20 a 30% de etanol. Por fim, em maiores quantias de etanol observa-se limpidez dos sistemas e decaimento da intensidade de espalhamento de luz no DLS, que indicam a solubilização das nanopartículas em razão do etanol ser bom solvente do copolímero. Ganguly et al., (2018) relatam a transição estrutural de agregados de P123 contendo óleo essencial de melaleuca com o aumento da quantidade do óleo no sistema, partindo de solução límpida caracterizada por micelas esféricas, para micelas do alongadas e por fim vesículas onde observaram alta turbidez e alta viscosidade.

Figura 15- Foto da variação da turbidez do sistema F127/OEC conforme se aumenta a quantidade de etanol no meio de diluição

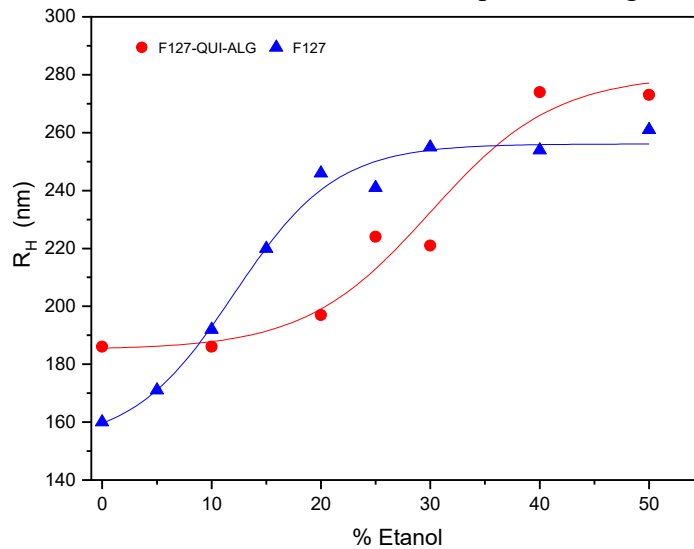


Fonte: Imagem adquirida pela autora deste trabalho (2019)

A Figura 16 mostra os valores de R_h como uma função da porcentagem de volume de etanol no meio dispersivo para o Pluronic® F127 preparado em etanol contendo OEC (curva azul) e para este mesmo sistema do copolímero agora coberto com quitosana e alginato de sódio (curva vermelha). Para o Pluronic® F127 é notável que houve expansão até 30% de etanol no meio e aproximadamente o mesmo tamanho foi observado até 50%. Entretanto, a ruptura da estrutura da nanopartícula foi observada em aproximadamente 35% de etanol, e uma vez acima desta quantia de etanol, a intensidade de luz diminuiu drasticamente. Dado que, o etanol é um

bom solvente para ambos os blocos PPO e PEO, o aumento de tamanho da nanopartícula está relacionado com a solvatação destes blocos devido intumescimento dos mesmos.

Figura 16- Efeito da porcentagem de etanol no R_h das nanopartículas de F127/OEC e o mesmo sistema coberto com CPE de quitosana/alginato



Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

Na presença de quitosana e alginato de sódio um diferente perfil de R_h foi obtido, observando-se aumento de tamanho das nanopartículas devido a cobertura criada pelos dois polímeros, que previnem a solvatação do Pluronic®. O valor de R_h foi observado sem variação significativa até 20% de etanol. Contudo, a partir de 25% o valor de R_h teve um maior aumento, sugerindo que as moléculas de etanol permeiam a cadeia polimérica induzindo a ruptura e/ou agregação das nanopartículas. Isto pode ser observado entre 30 e 50% de etanol, faixa em que a intensidade de luz espalhada diminui vigorosamente, ao passo que se diminui o tempo de decaimento.

Como descrito na literatura, a quitosana interage com Pluronic® principalmente por efeitos eletrostáticos. O oxigênio, com caráter eletronegativo, do bloco de PEO se liga nas cadeias da quitosana, esta devido ao pH do trabalho está com os grupos $-NH_3$ positivamente carregados, via interação íon-dipolo (PEPIĆ; FILIPOVIĆ-GRČIĆ; JALŠENJAK, 2008) (BRANCA et al., 2018). De acordo com estudos desenvolvidos por Pepic e colaboradores (2008), interações entre quitosana e Pluronic® F127 resultaram em aumento de raio hidrodinâmico das nanopartículas e redução dos valores de potencial zeta que foram atribuídos a interação entre os átomos de oxigênio do PEO com a quitosana.

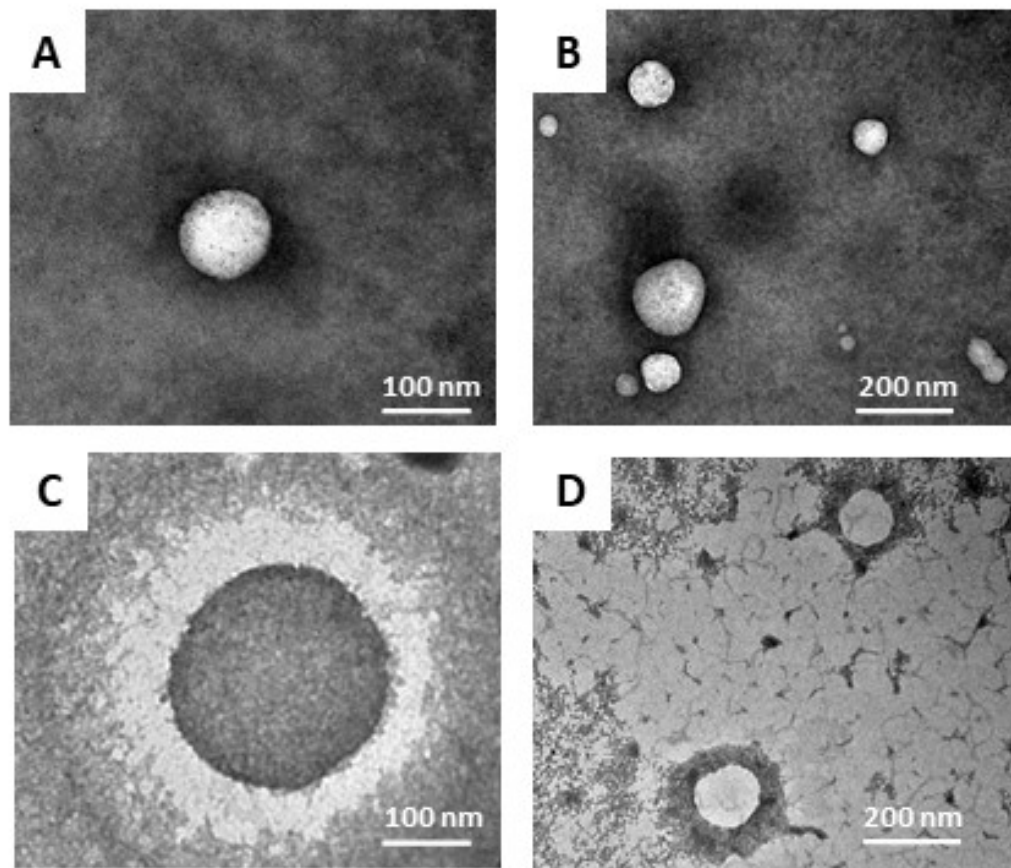
No presente trabalho, sugere-se que a quitosana do complexo polieletrólítico interage com o oxigênio do segmento de PEO, justificando a estabilização da partícula por meio do bloqueio do etanol do meio dispersivo até o core de F127, explicando porque um maior volume de etanol é requerido para aumentar o tamanho da partícula.

Analisou-se também para o sistema F127/quitosana/alginate a variação do pH e do potencial zeta nas diferentes proporções de água/etanol como meio de diluição. O aumento da porcentagem de etanol acarreta em ligeiro aumento do pH (de 3,2 para 4,1), e brusca diminuição do potencial zeta (54,3 para 15 mV). A permeação de moléculas de etanol na nanopartícula pode causar desidratação das cadeias dos polieletrólitos permitindo maior interação entre estes, acarretando em neutralização das cargas residuais e menor valor de potencial zeta. A estrutura proposta das nanopartículas nestes tópicos são vistas no tópico seguinte nas imagens de microscopias eletrônicas.

3.8.3.5 Microscopias eletrônicas de Transmissão e Varredura

As correlações de DLS sugerem a formação de nanopartículas esféricas na presença do OEC encapsulado no Pluronic®, cujo formato é mantido mesmo após o recobrimento com os biopolímeros (SHAO et al., 2018). Nas imagens de TEM, Figura 17, observa-se nanopartículas polidispersas com tamanho variando entre 100 a 200 nm, resultados que corroboram com os dados de DLS. Nas imagens de TEM as partículas se mostram menores que quando observadas nas medidas de DLS, pois como sugerido por Barradas et al., (2017) o sistema pode sofrer achatamento e também desidratação durante o processo de secagem no grid.

Figura 17- Imagens de TEM das nanopartículas de F127 recobertas pelo PEC (A) e (B) diluídas em mistura água/ isopropanol; (C) e (D) diluídas em água/ etanol na proporção 80:20 (%v/v)

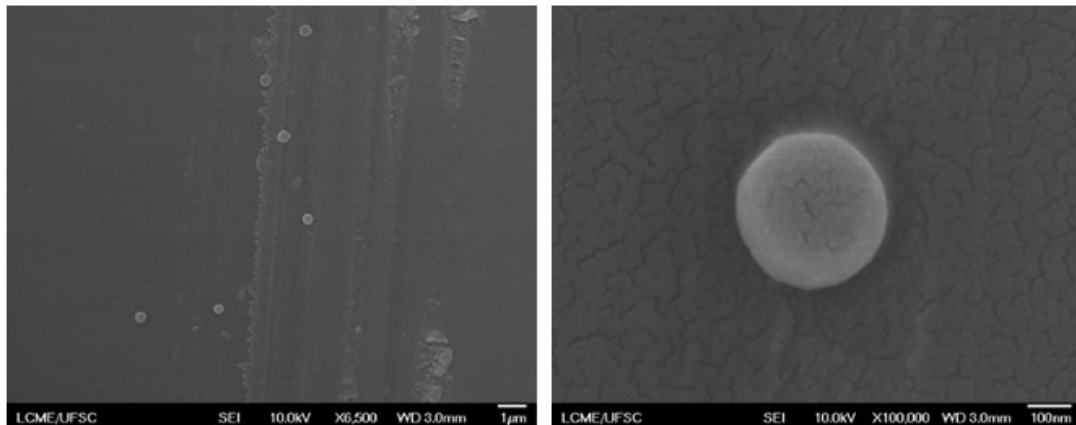


Fonte: Imagens adquiridas pela autora deste trabalho (2019)

As Figuras 17 A e B foram obtidas da diluição em água/ álcool isopropílico e nota-se partículas de superfície densa, de tamanho variado e que estas também se aglomeram. Tagliari et al., (2012) no estudo da encapsulação de ácido glicirrízico em nanopartículas de quitosana e alginato de sódio, atribuíram a superfície densa das nanopartículas a adsorção do ácido nos polímeros. As Figuras C e D referem-se à diluição em água/etanol na proporção 20:80 (%v/v) e confirmam a proposta apresentada anteriormente de que a nanopartícula de Pluronic® é recoberta pelo CPE de quitosana/alginato. No trabalho de Cihan e colaboradores (2017), micelas de Pluronic® P123 contendo o fármaco hidrofóbico Probucol são revestidas com quitosana e resultam em partículas esféricas chamadas de *nano-shell* na faixa de tamanho de 30- 300 nm. A proporção de solvente utilizada no presente trabalho foi escolhida com base no experimento apresentado na 3.6.3.4, onde mostrou-se que em até 20% de etanol no meio de diluição das nanopartículas há recobrimento do CPE quitosana/alginato nas nanopartículas de

F127. Análises de MEV-FEG foram conduzidas, (Figura 18), onde podem ser visualizadas nanopartículas com superfície lisa e de tamanho uniforme. Obter nanoestruturas com tamanho uniforme se torna essencial para o alcance de um sistema estável (GUERRA-ROSAS et al., 2017), o que explica a estabilidade da nanopartícula apresentada anteriormente.

Figura 18- Superfície lisa das nanopartículas observada nas imagens de MEV-FEG

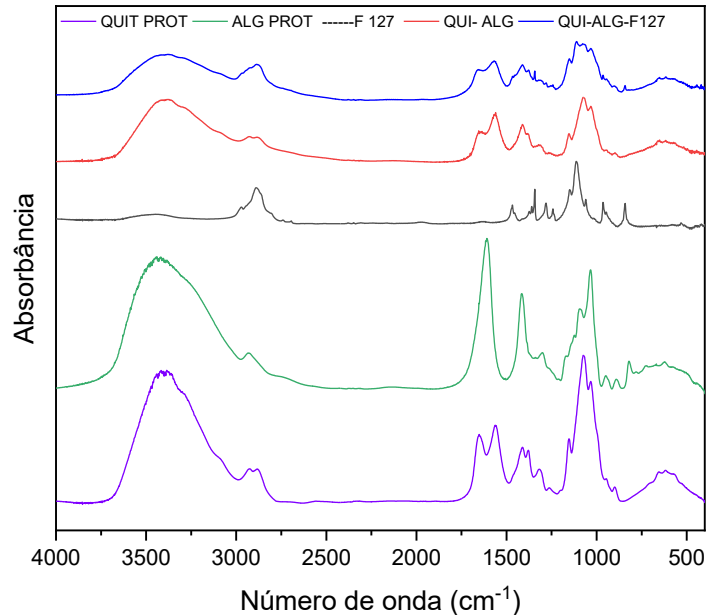


Fonte: Imagens adquiridas pela autora deste trabalho (2019)

3.8.3.6 Análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As bandas majoritárias de absorção no infravermelho são observadas nos espectros da Figura 19. Para a quitosana, representada na linha lilás, as bandas largas de absorção em 3400 cm^{-1} são atribuídas a vibração de estiramento das ligações N-H e O-H. As bandas em 1653 e 1564 cm^{-1} estão relacionadas respectivamente com o estiramento da ligação C=O da amida secundária e o dobramento dos resíduos N-acetilados. Absorções em 1377 e em 1607 cm^{-1} correspondem as vibrações de estiramento das ligações C-N e C-O-C respectivamente. Na linha verde, para o alginato de sódio puro as bandas largas de absorção em 3400 e 2930 cm^{-1} estão relacionadas respectivamente ao estiramento das ligações O-H e C-H. O estiramento assimétrico e simétrico do carboxilato são atribuídas as bandas 1609 e 1411 cm^{-1} respectivamente e o estiramento assimétrico de C-O-C em 1085 cm^{-1} . Na linha preta correspondente ao Pluronic® F127 puro, as absorções em 1341 , 1278 , 1243 e 964 cm^{-1} estão relacionadas a vibração de estiramento dos grupos CH_2 , ao passo que a vibração de C-O-C é atribuída a banda em 1114 cm^{-1} .

Figura 19- Espectro de FT-IR da quitosana protonada, alginato de sódio, F127, CPE quitosana/alginato e nanopartícula de F127 recoberta pelo PEC.



Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

Nas linhas vermelha e azul, as bandas de absorção em 3340 cm^{-1} são atribuídas aos grupos hidroxil e amino do alginato e da quitosana respectivamente. Natrajan et al., (2015), sugerem que haja interação entre estes grupos funcionais induzindo a formação do complexo polieletrólítico entre estes polieletrólitos. No espectro do CPE com relação ao alginato, a banda de absorção em 1609 cm^{-1} deslocou-se para 1650 cm^{-1} sugerindo interação com a quitosana. Na linha vermelha, a banda de absorção do complexo observada em 1560 cm^{-1} representa o estiramento dos grupos NH_2 da quitosana. Desta forma, o espectro do CPE confirma que houve interação eletrostática entre os dois polieletrólitos. As principais bandas de absorção presentes no Pluronic® são também observadas na linha azul, e o deslocamento da banda de 1560 para 1568 cm^{-1} que confirma a interação entre o oxigênio do bloco PEO do F127 com os grupos amino da quitosana.

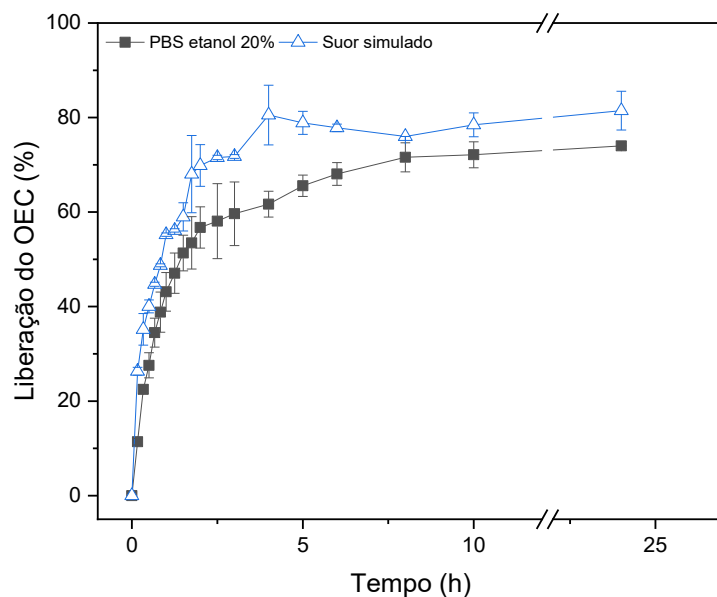
3.8.4 Determinação da eficiência de encapsulação e ensaio de liberação “in vitro”

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada por meio da equação 5, a partir dos dados da absorbância do conteúdo extraído em hexano, onde obteve-se uma eficiência de 80%. Os constituintes majoritários listados para o óleo essencial de citronela foram citronelal,

citronelol e β - pineno, os quais são facilmente solubilizados no core de PEO do Pluronic®, favorecendo o processo de encapsulação.

O estudo de liberação *in vitro* foi conduzido com o objetivo de compreender o mecanismo de liberação do OEC do sistema nanoparticulado. A partir dos valores de absorvância do OEC liberado em cada meio estudado, tampão PBS e suor simulado, construiu-se o perfil da liberação do OEC das nanopartículas de F127 recobertas com quitosana e alginato de sódio, analisados durante 24 horas, Figura 20.

Figura 20- Dados experimentais e barras de desvio padrão para o perfil de liberação *in vitro* para a liberação de OEC em dois diferentes meios de liberação



Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

Os perfis de liberação para ambos os meios estudados exibem o efeito *burst* inicial até 3 horas diferindo apenas na quantidade de OE liberado. Este primeiro estágio de liberação, chamado de região *burst*, pode ser explicado por quantidade de OE não estar de fato encapsulado no sistema polimérico, mas adsorvido na superfície dos polímeros cuja liberação inicia a partir do contato com o meio de dissolução (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010) (HUANG; BRAZEL, 2001).

A estabilização da liberação foi alcançada em aproximadamente 10 horas em ambos os meios de dissolução, com 74 e 81% de liberação do OEC das nanopartículas para PBS contendo 20% de etanol e o suor simulado respectivamente. É importante ressaltar que as nanopartículas apenas de F127 ou recobertas somente com quitosana não possibilitaria a liberação do OEC

pelo período de 24 horas devido a uma rápida dissolução. Assim, os biopolímeros empregados como recobrimento garantem a formação de um sistema sólido ao redor das nanopartículas de F127, como se confirmou nas imagens das microscopias, que garantem uma liberação prolongada por mais de 24 horas.

A quantidade total liberada depende do equilíbrio difusional para cada meio utilizado e a constante cinética, a qual será apresentada na próxima sessão.

Modelos matemáticos já estudados na literatura foram utilizados neste trabalho para investigar o mecanismo de transporte de massa envolvido na cinética de liberação (L. RITGER; A. PEPPAS, 1987) (L. RITGER; A. PEPPAS, 1987)(A. PEPPAS; J. SAHLIM, 1989)(GHOSAL; RAY, 2011). Para isto, utilizou-se o arquivo suplementar para o Microsoft Excel, “DDSolver” onde os dados foram ajustados para os modelos cinéticos de Higuchi e Korsmeyer- Peppas acordo com as seguintes equações 7 e 8:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \sqrt{t} \text{ Equação de Higuchi} \quad (7)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \text{ Equação de Korsmeyer-Peppas} \quad (8)$$

Onde M_t representa a quantidade absoluta do composto ativo liberado do tempo t , M_∞ a quantidade total do composto liberado para o tempo assumido como infinito. K_H corresponde a constante de Higuchi, a qual traz características da estrutura da formulação. Na equação de Korsmeyer-Peppas, k é a constante cinética a respeito das características do mecanismo de liberação do ativo da nanopartícula. O expoente n denota o mecanismo do composto ativo. Sendo assim, se $n \leq 0,43$ significa que o mecanismo é puramente Fickiano, para $n = 0,85$ significa a ocorrência do Caso II de transporte de massa, o relaxamento da matriz polimérica ou liberação por erosão. Valores intermediários de n , isto é, $0,43 < n < 0,85$ indica transporte cinético anômalo, a combinação de ambos os mecanismos (PARIZE et al., 2012).

O modelo de Higuchi não apresentou boa correlação com os dados na liberação conduzida em meio de suor e para o meio de tampão PBS. O coeficiente de correlação r^2 resultou em 0,421 indicando que o mecanismo de liberação não segue as propostas de Higuchi. A Tabela 5 mostra os valores dos parâmetros do modelo Korsmeyer- Peppas. A forma linear da equação 8, plotando $\ln M_t/M_\infty$ contra $\ln t$ resulta no ajuste de $r^2 = 0,977$ e $k = 4,51$ para o meio de tampão PBS e em $r^2 = 0,995$ e $k = 52,25$ para o meio de suor simulado. O valor mais alto da

constante cinética obtido para o meio de suor explica a liberação mais rápida observada no gráfico de perfil de liberação, Figura 20, que pode ser atribuído à presença de ácido láctico na composição do suor, desde que a quitosana é hidrolisada em solução aquosa deste ácido (IL'INA; VARLAMOV, 2004). O modelo empírico de Korsmeyer- Peppas considera o mecanismo de liberação como uma combinação do transporte de Fick e o Caso II de transporte de massa controlado pela relaxação das cadeias poliméricas (KHAZAEI et al., 2013). Analisando o expoente n para amostras esféricas, tem-se informações a respeito da ocorrência da liberação do OEC, desta forma valores $n= 0,33$ e $0,37$ para os meios PBS e suor respectivamente confirma-se que em ambos os estudos o mecanismo da liberação ocorre por difusão.

Tabela 5- Parâmetros cinéticos para a liberação *in vitro* em meio PBS e em suor simulado

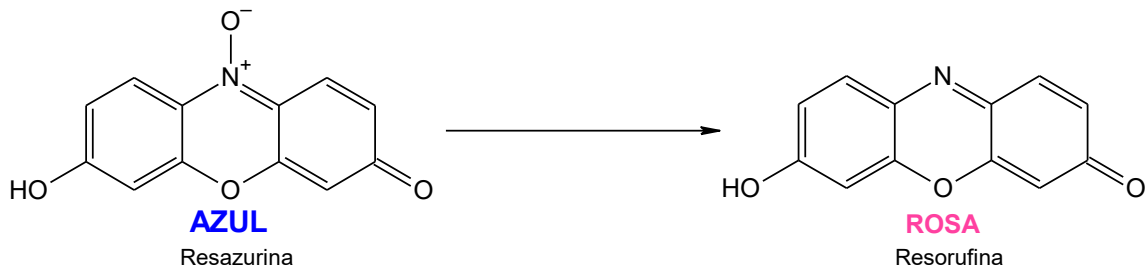
Model	PBS etanol 20%			Suor simulado		
	r^2	k	n	r^2	k	n
Korsmeyer-Peppas	0,977	40,51	0,33	0,995	52,25	0,37

k: constante cinética de liberação; n: expoente que denota o mecanismo de liberação
 Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

3.8.5 Avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas e do OEC

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de F127/OEC/CPE e do óleo essencial de citronela puro foi avaliada pelo método da microdiluição utilizando as placas de poços nas concentrações conforme mostradas na sessão experimental. O Alamar Blue® é um indicador colorimétrico de proliferação celular, adicionado em cada poço da placa onde sofre reação de oxi-redução como resposta à alteração metabólica celular do microrganismo. Na forma oxidada é azul e não fluorescente, chamado de resazurina e na forma reduzida passa a ser rosa e fluorescente chamado de resofurina (O'BRIEN et al., 2000), como apresentado no esquema da Figura 21.

Figura 21- Esquema da reação de oxi- redução do corante Alamar Blue®



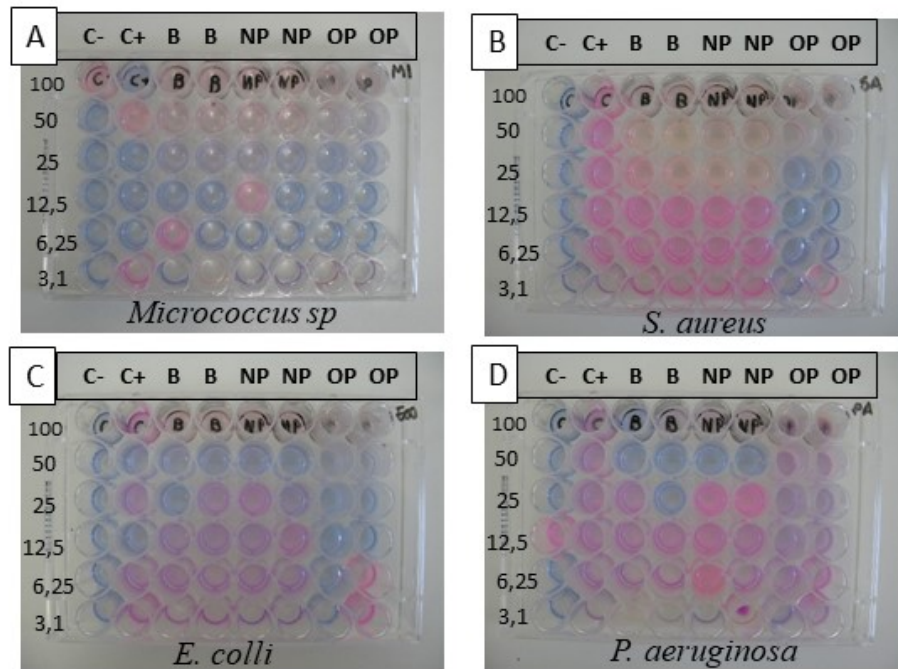
Fonte: própria autora adaptado de O'Brien et al., (2000)

Conforme descrito na sessão 3.7 da metodologia, na placa de poços utilizada, da esquerda para a direita, as duas primeiras colunas representavam respectivamente o controle negativo e positivo e desta forma esperava-se que estas colunas permanecessem azul e rosa, respectivamente, após a adição do Alamar Blue®. As colunas seguintes contêm o branco, a nanopartícula e o óleo essencial puro.

Deste modo, a concentração mínima de inibição do crescimento bacteriano foi determinada visualmente uma vez que a cor azul representa ausência do crescimento e a cor rosa corresponde a presença de células em crescimento. No teste realizado no presente trabalho ocorreu a evaporação do conteúdo de alguns poços após o período de incubação onde somente foi possível observar a marca do conte

údo no interior do poço. A Figura 22 mostra as placas de teste após a adição do Alamar Blue®. Em A, avalia-se o efeito contra a cepa de *Micrococcus sp.* (gram-positiva) onde se observa para as três amostras (branco, nanopartícula e OEC) que as maiores concentrações, 100; 50 e 25 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ estão em tons rosáceos representando crescimento celular bacteriano, e para as três outras concentrações inferiores, 12,5; 6 e 3 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ estão em tom azulado. Este resultado está o oposto do esperado porque em maiores concentrações do ativo seria provável a inibição celular. Possivelmente este resultado associa-se a erro de adição dos conteúdos na placa pois observa-se também nesta placa que o primeiro poço do controle negativo e apenas dois poços do controle positivo estão na coloração rosa. Em B, verificou-se a atividade contra cepas da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* apenas para o OEC puro nas concentrações abaixo de 50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$, os quais permaneceram azuis após a incubação, portanto não ocorrendo crescimento bacteriano.

Figura 22- Placas de poços referentes ao experimento para determinação CIM das nanopartículas e do OEC contra *Micrococcus sp.*(A); *S. aureus*(B); *E. coli* (C) e *P. aeruginosa* (D)



Fonte: Imagens adquiridas pela autora deste trabalho (2019)

A placa da foto em C refere-se ao teste realizado contra as cepas da bactéria gram-negativa *Escherichia coli* onde nota-se inibição celular nos poços pertencentes à concentração de $50\mu\text{L mL}^{-1}$ para as amostras do branco e para as nanopartículas, já para o OEC houve inibição exceto para as concentrações de 6 e $3\mu\text{L mL}^{-1}$. Não é observado o mesmo perfil para o teste com a outra bactéria gram-negativa, *Pseudomonas aeruginosa*, na placa em D, onde apenas nos poços de concentração 100 e $50\mu\text{L mL}^{-1}$ do branco e da nanopartícula mantiveram a coloração azul. Uma possível explanação para a não ocorrência de crescimento celular nas amostras do branco e da nanopartícula nestas placas deve estar associado à propriedade bactericida da quitosana. Moussa e colaboradores (2012) avaliaram o efeito de quitosana (1% m/v) contra *M. lutes* e *E. coli* em experimento de difusão em disco. O rompimento da membrana celular das bactérias foi observado por MEV onde os autores justificam por meio da ocorrência de interações entre a superfície catiônica positivamente carregada da quitosana com a superfície negativamente carregada da membrana celular da bactéria, assim alterando a permeabilidade da membrana celular consequentemente a liberação dos constituintes citoplasmáticos, DNA e RNA levando a morte celular.

Comparando o potencial das amostras testadas, branco, nanopartícula e o OEC puro, para o último observou-se menor crescimento celular, onde apenas para a *P. aeruginosa* a coloração não permaneceu azul. O potencial antimicrobiano do óleo essencial de citronela é bem relatado na literatura devido ao efeito dos constituintes principais que as vezes sinérgico, como citronelal, geraniol, citronelol e β -pineno que se ligam e penetram os canais das paredes celulares de bactérias gram-positivas e também gram-negativas (ÁCS et al., 2018) (DE SILVA et al., 2017)(CHOUHAN, SHARMA, GULERIA, 2017).

Além da consideração aos cuidados de preparo do teste, é importante ressaltar que a liberação do ativo das nanopartículas pode não ter ocorrido por falta de gatilhos de liberação. O teste microbiológico é realizado de forma estática e sem adição de nenhum outro agente que colaboraria para o processo de liberação, comparando aos utilizados no teste de liberação *in vitro*, onde no meio de tampão PBS havia etanol para colaborar na liberação do OEC de forma homogênea e no meio de suor simulado, a presença do ácido lático que favorece a hidrólise da quitosana e assim a liberação do OEC. Por fim, considera-se que a repetição deste estudo microbiológico deve ser feita para afirmar uso das nanopartículas como potencial agente microbiológico.

3.9 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

As nanopartículas de Pluronic® F127 contendo óleo essencial de citronela foram preparadas em etanol. Estas receberam recobrimento do CPE quitosana/alginato e que de acordo com as medidas de DLS, o CPE conduziu ao incremento do R_h de aproximadamente 30 nm. O CPE também foi importante na estabilização das nanopartículas conferindo um interessante sistema carreador para compostos hidrofóbicos tal como óleo essencial de citronela, o qual mostrou alta eficiência de encapsulação (80%). O ativo foi efetivamente liberado tanto no meio PBS/etanol (70%) quanto no meio de suor simulado (80%) por 24h. Estas características associadas a estabilidade da nanopartícula em termos de tamanho e potencial zeta conferem ampla aplicação do sistema, embora o teste da microdiluição exija repetição para afirmação quanto à atividade bactericida das nanopartículas.

Capítulo IV

**Aplicação das nanopartículas de Pluronic® F127/OEC/CPE
em tecido de algodão**

Considerações do capítulo

Este capítulo relata a aplicação em tecido de algodão das nanopartículas de Pluronic®F127 recobertas com o complexo polieletrólítico de quitosana/ alginato de sódio com intuito de conferir características antimicrobianas tornando-o atrativo quanto ao uso no setor têxtil. Para isto, avaliou-se a molhabilidade do tecido e a sua superfície hidrofóbica foi tratada com plasma frio. Após, utilizou-se três diferentes métodos de aplicação das nanopartículas no tecido que foram avaliados por MEV. No teste de liberação *in vitro* buscou-se determinar a quantidade do ativo liberado e por fim, o teste microbiológico do algodão impregnado com as nanopartículas.

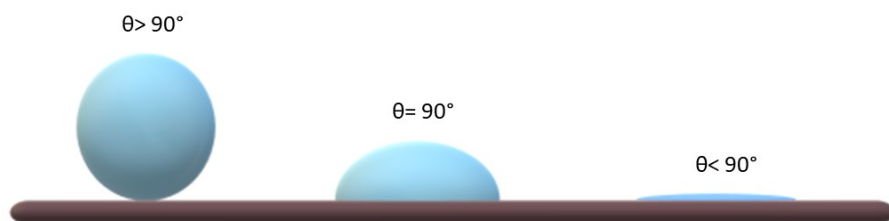
4 METODOLOGIA

O tecido de algodão utilizado neste trabalho foi cedido pela empresa Calçados Contramão, o qual é empregado na confecção do forro de calçados infantis. O tecido como recebido foi alvejado com água/hipoclorito de sódio e enxaguado exaustivamente para remoção de aditivos de tratamento que são recebidos em fábrica para assim prosseguir as análises de caracterização e posterior aplicação das nanopartículas.

4.1 MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO

Valores altos de ângulo de contato ($\theta > 90^\circ$) acusam baixa molhabilidade, e o contrário, valores baixos ($\theta < 90^\circ$) alta molhabilidade da superfície sólida pelo líquido em questão, como ilustra a Figura 23.

Figura 23- Formas de molhabilidade de uma superfície sólida



Fonte: Autora deste trabalho (2019)

A molhabilidade do tecido de algodão foi observada com relação a água pura através de medidas de ângulo de contato (θ). Quatro gotas de água de 5 μ L foram aplicadas em diferentes posições na superfície do tecido com auxílio de uma seringa e calculou-se a média dos valores

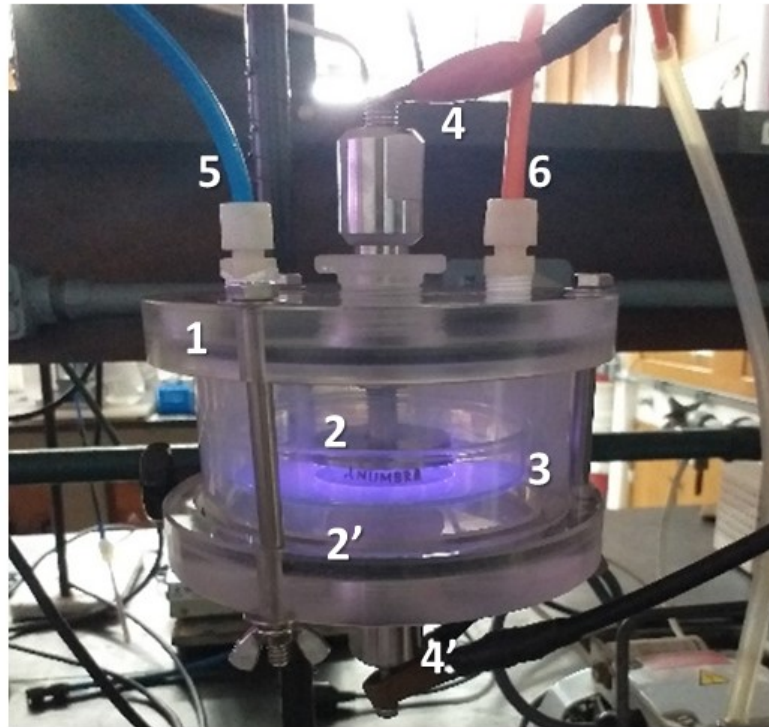
obtidos. As imagens foram obtidas por câmera de alta resolução acoplada a um goniômetro Dataphysis e software SCA 20 que analisa automaticamente o ângulo de contato que a gota representa.

4.2 TRATAMENTO DO ALGODÃO COM PLASMA FRIO

Para limpar a superfície do tecido e então averiguar uma maior deposição de nanopartículas nas fibras de algodão, o têxtil foi submetido ao tratamento com plasma frio, o que de acordo com a literatura ocasiona aumento de grupos funcionais de caráter hidrofílico na superfície do material, devido a exposição em atmosfera oxidante, assim haveria maior interação com as nanopartículas que como já descrito possuem carga superficial positiva (ABDELBAGI; AHMED, 2018)(RAŽIĆ et al., 2017).

Amostras de tecido de algodão (2x2cm) foram fixadas em placa de borosilicato de espessura de 2 mm agindo como barreira dielétrica, centralizada sobre o eletrodo inferior do reator. A distância entre os eletrodos foi fixada em 1 cm. O reator foi alimentado com nitrogênio ou oxigênio com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A pressão interna utilizada foi de 1 Torr e a potência de 7,4 W. As amostras foram expostas ao plasma por 30 segundos, 1 e 5 minutos e imediatamente analisadas por FTIR e medidas de ângulo de contato. O sistema pode ser visualizado na Figura 24, onde a nuvem lilás é o plasma gerado pela descarga elétrica na atmosfera de oxigênio.

Figura 24- Reator de plasma frio com atmosfera de oxigênio



Legenda- 1: reator do plasma; 2 e 2': eletrodos; 3: placa de Petri (dieletro); 4: descarga elétrica; 5: entrada da alimentação do gás; 6: entrada para o vácuo.

Fonte: Autora deste trabalho (2019)

4.3 APLICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS NO TECIDO DE ALGODÃO

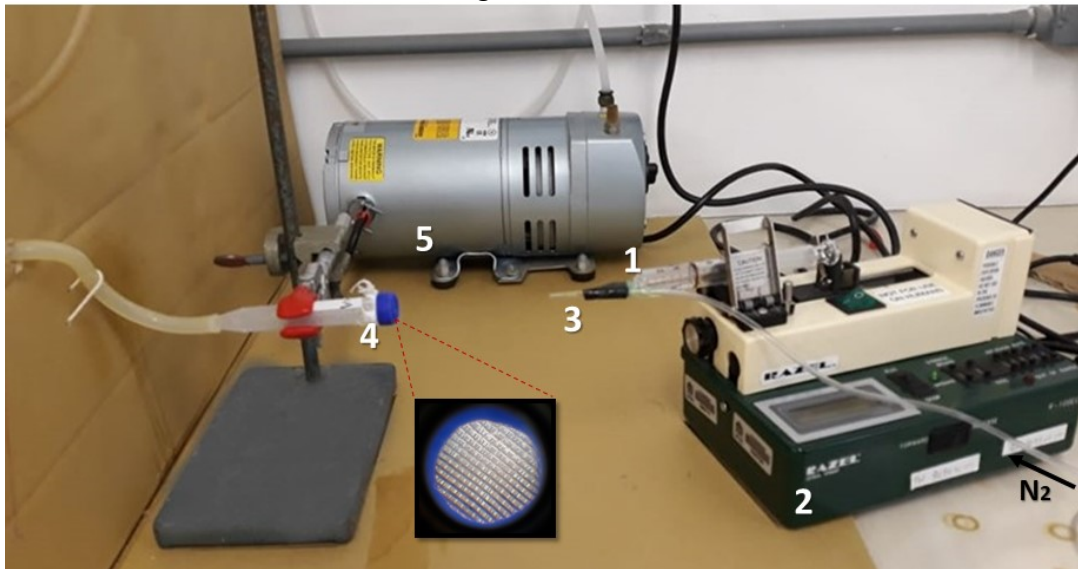
Os métodos de aplicação das nanopartículas no algodão foram variados em ordem de alcançar maior quantidade de ativos incorporados na fibra e assim maior liberação prolongada dos mesmos. Desta forma, amostras do têxtil foram previamente lavadas com água e hipoclorito de sódio (90:10 v/v) com a finalidade de branquear e remover as sujeiras que pudessem interferir na impregnação das nanopartículas e conseqüentemente na aquisição das imagens de MEV. A deposição das nanopartículas contendo óleo essencial de citronela, em tecido tratado e não tratado com o plasma, foi realizada por três procedimentos distintos.

4.3.1 Aplicação via Spray I

Esta aplicação foi realizada via formação de um spray da suspensão de nanopartículas utilizando uma seringa, contendo a suspensão, em paralelo com um fluxo de nitrogênio com

vazão de N_2 igual a $3,25 \text{ mL min}^{-1}$. O sistema montado para este fim, é mostrado na Figura 25, a qual auxilia a compreensão do funcionamento do mesmo.

Figura 25- Foto do esquema de aplicação das nanopartículas no tecido via Spray I, utilizando seringa e fluxo de N_2



Legenda- 1: seringa contendo nanopartículas; 2: gotejador; 3: ponteira com agulha; 4: suporte do tecido; 5: bomba a vácuo.

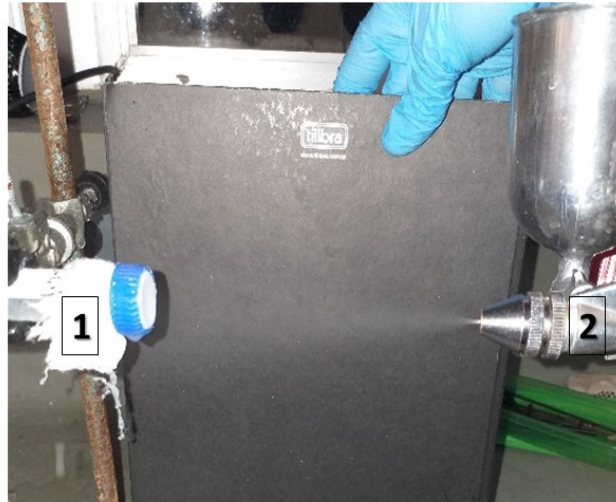
Fonte: Autora deste trabalho (2019)

Para a formação do spray, a seringa foi acoplada a um gotejador marca Razel (Georgia, Vermont) modelo R- 100EC o qual foi utilizado para ação do êmbolo da seringa com taxa de 300 mL h^{-1} contra uma ponteira de micropipeta, com diâmetro do bico igual a 2 mm. A esta ponteira, uma agulha de diâmetro 0,8 mm foi acoplada a fim de alimentar o gás N_2 na vazão previamente citada. Foram aspergidos 10,0 mL da suspensão de nanopartículas, previamente filtrada em filtro de membrana de tamanho $1,20 \mu\text{m}$ contra uma amostra de tecido em formato circular ($d=1,0 \text{ cm}$) alocado sobre um suporte que permitiu a realização de sucção para evitar o acúmulo excessivo de líquido no tecido e, assim, evitar a aglomeração das nanopartículas na etapa de deposição. O tecido foi disposto em anteparo a distância de 10 cm da agulha.

4.3.2 Aplicação via Spray II

Com auxílio de uma pistola de pintura (marca K-2) acoplada a um compressor de ar (vazão de ar comprimido igual a 4 mL min^{-1}) 10,0 mL de suspensão de nanopartículas foram aspergidos contra uma amostra de tecido com 1,0 cm de diâmetro alocada sobre o mesmo suporte citado no tópico exposto acima, conforme a Figura 26.

Figura 26- Foto do esquema de aplicação das nanopartículas no tecido via Spray II, utilizando pistola de pintura



Legenda- 1: suporte do tecido; 2: pistola de pintura contendo as nanopartículas

Fonte: Autora deste trabalho (2019)

4.3.3 Aplicação por imersão

Amostras do têxtil de tamanho (2,0x2,0cm) foram imersas na solução de nanopartícula (cujo teor de sólidos $0,45\text{g L}^{-1}$) durante 12 h e secas em dessecador até o momento das análises.

4.4 ANÁLISE DE FT-IR PARA O TECIDO DE ALGODÃO

A análise de espectroscopia no infravermelho foi realizada para as amostras de algodão que receberam tratamento com plasma e uma amostra sem tratamento para que se pudesse comparar o efeito que as descargas elétricas causaram no material. Foi utilizado um equipamento Shimadzu Prestige-21, no modo de refletância total atenuada (ATR) onde os dados foram coletados com 20 scans na faixa de $4000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ com resolução de $2,0\text{ cm}^{-1}$.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada para observar a superfície das fibras de algodão que foram tratadas com plasma frio e comparar com as fibras que não sofreram tratamento de superfície. A microscopia eletrônica de varredura também subsidiou a obtenção de imagens dos tecidos impregnados de nanopartículas. Desta forma, a análise procedeu-se em um microscópio JEOL JSM- 6390LV operando com voltagem de

aceleração de 10 e 20 kV para as amostras de algodão de 0,5x0,5 cm coladas em suporte de alumínio recobertas com camada de ouro.

4.6 ESTUDO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O estudo da liberação *in vitro* foi conduzido em meio de suor simulado a 37 °C simultaneamente em frascos abertos e fechados contendo em cada frasco uma amostra de tecido de 2,0 cm x 2,0 cm. Alíquotas de 3 mL foram retiradas periodicamente e lidas a sua absorção em UV-Vis. O experimento em frasco fechado simula a liberação do ativo que está no tecido para o meio de suor, caso este tecido estivesse em contato com a pele do usuário, e o experimento em frasco aberto simula a liberação do suor para a atmosfera, e a diferença entre as duas curvas resulta na curva de evaporação. Interessante questão a ser estudada, principalmente no caso do óleo essencial de citronela que além de suas propriedades antimicrobianas tem sido bastante utilizado para a repelência de insetos.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA

Os testes para avaliar o potencial bactericida e fungicida do tecido impregnado pelas nanopartículas via imersão também foram realizados no Laboratório de Microbiologia do IBTeC, de acordo com a Norma Técnica ABNT NBR 15275:2016- *Ensaio Biológico-Palmilha, laminados sintéticos e solados- Determinação da resistência ao ataque microbiano*. A ação bactericida foi verificada diante das cepas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 24853), bactéria gram-negativa e diante de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) gram-positiva. O preparo das cepas ocorreu da mesma forma para os testes realizados com a nanopartícula de modo a trabalhar com a mesma concentração, $4,6 \cdot 10^7$ para a *S. aureus* e $5,6 \cdot 10^7$ (cel mL⁻¹) para *P. aeruginosa*. A atividade fungicida foi testada diante das culturas de *Aspergillus niger* (ATCC 16404) e *Trichoderma viridans* (ATCC 9645) nas respectivas concentrações $1,0 \cdot 10^6$ e $1,6 \cdot 10^6$ (cel mL⁻¹).

Após o período de incubação, uma alçada de cada cepa foi espalhada em placa de ágar TSB, onde uma amostra de tecido de tamanho 2,5 por 2,5 cm foi aderida à placa após ser friccionada para ocorrer a liberação do ativo. Aguardou-se 2 horas para a incubação das placas em estufa a 37°C. Os testes foram realizados em duplicata para cada cultura e para o tecido branco, o qual não foi impregnado com as nanopartículas.

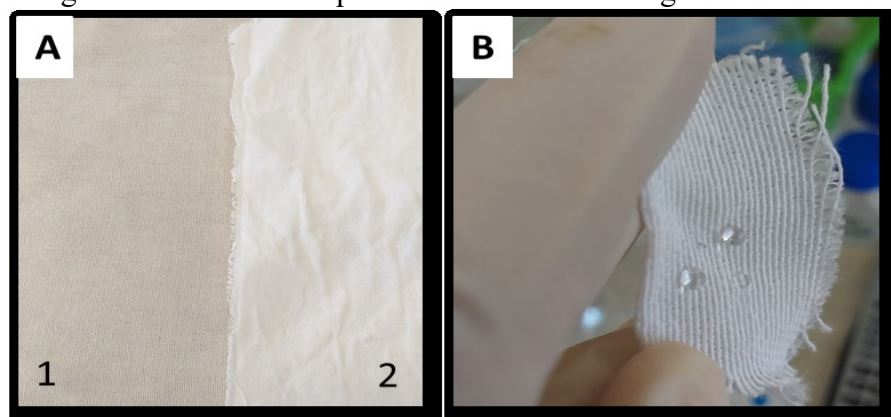
4.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.8.1 Limpeza do tecido de algodão

As amostras do tecido de algodão alvejado e as que receberam tratamento de superfície foram caracterizadas quanto à molhabilidade por ângulo de contato, aos grupos funcionais predominantes por FT-IR e quanto à morfologia por MEV.

Conforme mostra a Figura 27, o tecido de coloração mais escura como recebido de fábrica contém as gomas de acabamento da manufatura que não foram reveladas pelo fabricante. Então, para prosseguir as análises, o tecido foi alvejado e sua coloração mais clara pode ser visualizada no lado direito da Figura A2. A prática de branqueá-lo e limpá-lo surge da necessidade da remoção de impurezas que atrapalhariam na caracterização e deposição das nanopartículas sem o tratamento com plasma. Desta forma, optou-se por utilizar o tecido alvejado em todos os procedimentos inclusive para as amostras que receberiam o tratamento com o plasma. Na Figura 27 B, observa-se que as gotas de água na superfície do algodão alvejado se mantêm esféricas e coesas indicando que não há molhabilidade do substrato. Em função disso, prosseguiu-se com a análise de ângulo de contato para melhor entendimento do processo de molhabilidade.

Figura 27- Em (A1) tecido como recebido, (A2) tecido após ser alvejado. Em (B) gotas de água caracterizam a superfície hidrofóbica do algodão.



Fonte: Fotos obtidas pela autora deste trabalho (2019)

4.8.2 Ângulo de contato do tecido de algodão

Os resultados a respeito da molhabilidade do material revelam a capacidade de um líquido em se espalhar ou manter-se depositado sobre um substrato. A Tabela 6 mostra os

valores de ângulo de contato obtidos do tecido de algodão alvejado previamente a exposição ao plasma frio.

Tabela 6- Ângulo de contato do tecido de algodão sem tratamento com plasma
Ângulo de contato (θ°)

Gota 1	143,6
Gota 2	138,9
Gota 3	142,6
Gota 4	140,4
Média	141,5
Desvio	2,12

Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

O valor de ângulo de contato de $141,5^\circ$ indica que o tecido de algodão sem tratamento com plasma apresenta uma superfície altamente hidrofóbica o que condiz com a composição não celulósica das fibras do algodão onde encontram-se graxas (0,4- 1,2%) e pectinas (0,4- 1,2%) que são responsáveis pelo caráter hidrofóbico do algodão (HSIEH, 2006).

Na Figura 28 observa-se que a gota de água se mantém coesa na superfície do material, o que supera as forças adesivas entre a água e o tecido.

Figura 28- Gota de água na superfície do algodão sem tratamento com plasma frio



Fonte: Imagem adquirida pela autora deste trabalho (2019)

O tratamento de superfícies com plasma frio é empregado para ocasionar alguma modificação no material, especialmente o aumento da molhabilidade e rugosidade de

superfícies (KAN; MAN, 2018). Para isto, primeiramente avaliou-se a molhabilidade do algodão após o tratamento com plasma de gás nitrogênio em diferentes tempos de exposição, como consta na Tabela 7:

Tabela 7- Ângulo de contato do algodão tratado com plasma de N₂

	Ângulo de contato (°)		
	30 s	1 min	5 min
Gota 1	141,1	144,1	139,1
Gota 2	142,3	141,5	132,7
Gota 3	138,2	140,7	128,2
Gota 4	142,8	138,4	133,2
Média	141,1	141,2	133,3
Desvio padrão	2,061	2,351	4,473

Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

Sabendo-se que o ângulo de contato para o algodão sem tratamento resultou em 141,5°, observa-se pequena alteração após 30 segundos e 1 minuto de tratamento, já para 5 minutos houve decréscimo de 11,8°. Contudo, a superfície do tecido ainda permaneceu hidrofóbica apontando que a utilização do gás nitrogênio nestas condições de uso não é adequada para alterar a molhabilidade deste tipo de algodão pois a camada hidrofóbica da cutícula não foi removida. Desta forma, buscou-se fazer o tratamento em DBD com gás oxigênio pois este é mais agressivo que o nitrogênio (PRYSIAZHNYI et al., 2013) e as análises seguintes não foram prosseguidas para este tratamento com N₂.

O ângulo de contato foi aferido imediatamente após a exposição ao plasma de oxigênio, no entanto não foi possível obter um valor para o mesmo pois, assim que a gota de água tocou o material a mesma foi absorvida, sendo o processo de absorção mais lento para a amostra exposta ao plasma por 30 segundos e instantâneo para o tratamento por 5 minutos. No plasma de gás O₂, a descarga elétrica é filamentar que ajuda a pronunciar o efeito de limpeza e remoção da cutícula hidrofóbica dos fios do algodão (AKASHI et al., 2012). De acordo com Pandiyaraj e Selvarajan, 2008, a exposição à descarga de plasma colabora para mudança na distribuição de tamanho dos espaços entre as fios e entre as fibras dos fios de algodão por meio da limpeza da superfície e assim promovendo uma alta velocidade capilar do líquido em estudo no substrato.

Estes autores observaram alteração do ângulo de contato de 132° para 56° após 6 minutos de exposição ao plasma de ar atmosférico de uma amostra de algodão.

A colisão das espécies formadas a partir do gás de trabalho pode ocorrer entre as próprias espécies e entre as espécies com a superfície da fibra, o que dita este caminho é a pressão utilizada no sistema. Sistemas que trabalham a baixas pressões favorecem as colisões com a superfície da amostra, uma vez que a distância entre as espécies na fase gasosa é maior do que entre a fase gasosa/superfície da amostra resultando em bom contato das espécies do plasma com o têxtil. Ao contrário, nos sistemas em que se utiliza altas pressões, o ataque das espécies do plasma a amostra acontece de maneira mais branda pois o grande número de colisões entre as próprias espécies impede a interação espécie- fibra têxtil (HOSSAIN; HERRMANN; HEGEMANN, 2006).

Ainda, por meio da interação das espécies energéticas geradas durante a descarga elétrica com a superfície do material em estudo resulta na remoção de partículas de sujeiras e no caso da fibra de algodão, até mesmo na remoção da cutícula da fibra. Sendo assim, observa-se perda de massa da amostra decorrente do processo de erosão, que pode ser calculada de acordo com a equação 9 (PANDIYARAJ; SELVARAJAN, 2008):

$$Perda_{massa}(\%) = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad (9)$$

Onde M_1 e M_2 correspondem respectivamente a massa da amostra não tratada e tratada com plasma, pesadas imediatamente após o tratamento. A porcentagem de massa perdida devido a ação plasma encontra-se na Tabela 8.

Tabela 8- Perda de massa do algodão tratado com plasma de O₂

Tempo de tratamento	% perda de massa
30 s	1,64
1 minuto	3,10
5 minutos	22,92

Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho

O aumento de perda de massa com o aumento do tempo de tratamento da amostra em DBD é consequência da remoção inicial de camadas de aditivos, tais como gomas que o algodão

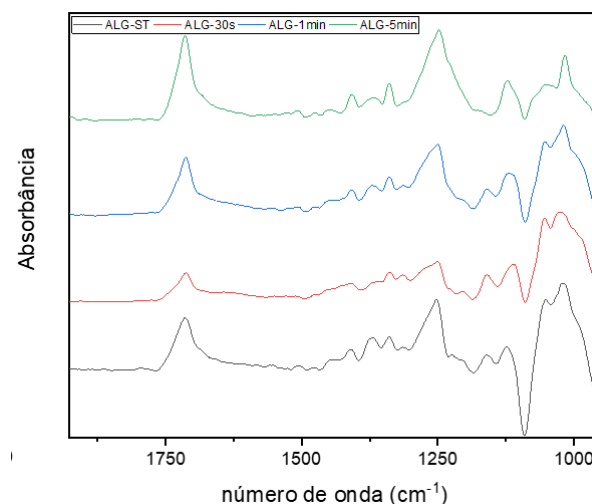
recebe no processo de fabricação confirmando que é oportuno a utilização do plasma frio de oxigênio no âmbito de limpeza de superfícies por curto período de tempo. Um tratamento de superfície durante 5 minutos nas condições que foram empregadas neste trabalho pode ser considerado danoso ao tecido devido à alta porcentagem de massa que é perdida através da remoção não apenas da cutícula hidrofóbica, mas também das camadas internas da fibra do algodão.

Desta forma, as análises seguintes de FT-IR e MEV ajudam a entender a respeito da ação do plasma de O₂ no algodão quanto a exposição de grupos característicos e a remoção das camadas superficiais que constituem a fibra de algodão.

4.8.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) para o tecido de algodão

Por meio da espectroscopia no infravermelho pode-se observar e comparar os grupos funcionais das amostras algodão sem tratamento (ALG-ST) e algodão tratado com plasma de O₂ (ALG-X onde X designa o tempo de tratamento) nos diferentes tempos de exposição ao plasma como consta na Figura 29:

Figura 29- Espectros de FT-IR das amostras de algodão tratadas e não tratadas com plasma de oxigênio por diferentes tempos



Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho

A Tabela 9 contém o número de onda das principais bandas observadas nos espectros acima assim como a atribuição do grupo funcional correspondente.

Tabela 9- Valores de número de onda correspondentes às vibrações das ligações de grupos funcionais observados no tecido de algodão

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional
1018	C-O estiramento
1120	C-O-C estiramento assimétrico
1250	C-H dobramento fora do plano
1338	C-H dobramento
1409	C-H dobramento simétrico no plano
1717	C=O estiramento axial

Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

Haja vista que a fibra de algodão é composta por camadas distintas, onde a camada externa é constituída em maior parte de pectina, a banda em 1717 cm⁻¹ é atribuída ao grupo carboxila deste polímero, cuja intensidade relativa na amostra ALG-ST é mais pronunciada em comparação a amostra ALG-30s. Desta forma sugere-se que as espécies reativas do O₂ geradas durante a exposição ao plasma degradam a camada externa de pectina, o que resulta na diminuição da intensidade da banda de C=O na amostra ALG-30s. Para as amostras ALG-1min e ALG-5min nota-se que, à medida em que aumenta-se o tempo de exposição ao plasma, a banda em 1717 cm⁻¹ torna-se intensa novamente. Desta vez, associado aos grupos hemicelulósicos das paredes primária e secundária da fibra do algodão que foram expostas devido ao tratamento com plasma. A banda em 1409 cm⁻¹, corresponde a vibração de dobramento simétrica no plano da ligação C-H (VESTENA, 2016), e de acordo com FATTAHI MEYABADI et al., 2014 esta é uma banda de região cristalina do material, cuja intensidade relativa no presente trabalho é amplificada nas amostras com maior tempo de tratamento de superfície. Este resultado também indica que as paredes primária e secundária da fibra de algodão estejam expostas pois estas possuem um índice de cristalinidade em torno de 30 e 70% respectivamente (MELO DA SILVA, 2013). As bandas em 1338 e 1250 cm⁻¹ são referentes às vibrações de dobramento fora do plano da ligação C-H. A banda em 1120 cm⁻¹ refere-se à vibração de estiramento assimétrica da ligação C-O-C do éter glicosídico, devido ao conteúdo celulósico do material (RADITOIU et al., 2019). A banda em 1018 cm⁻¹ está associada ao estiramento da ligação C-O.

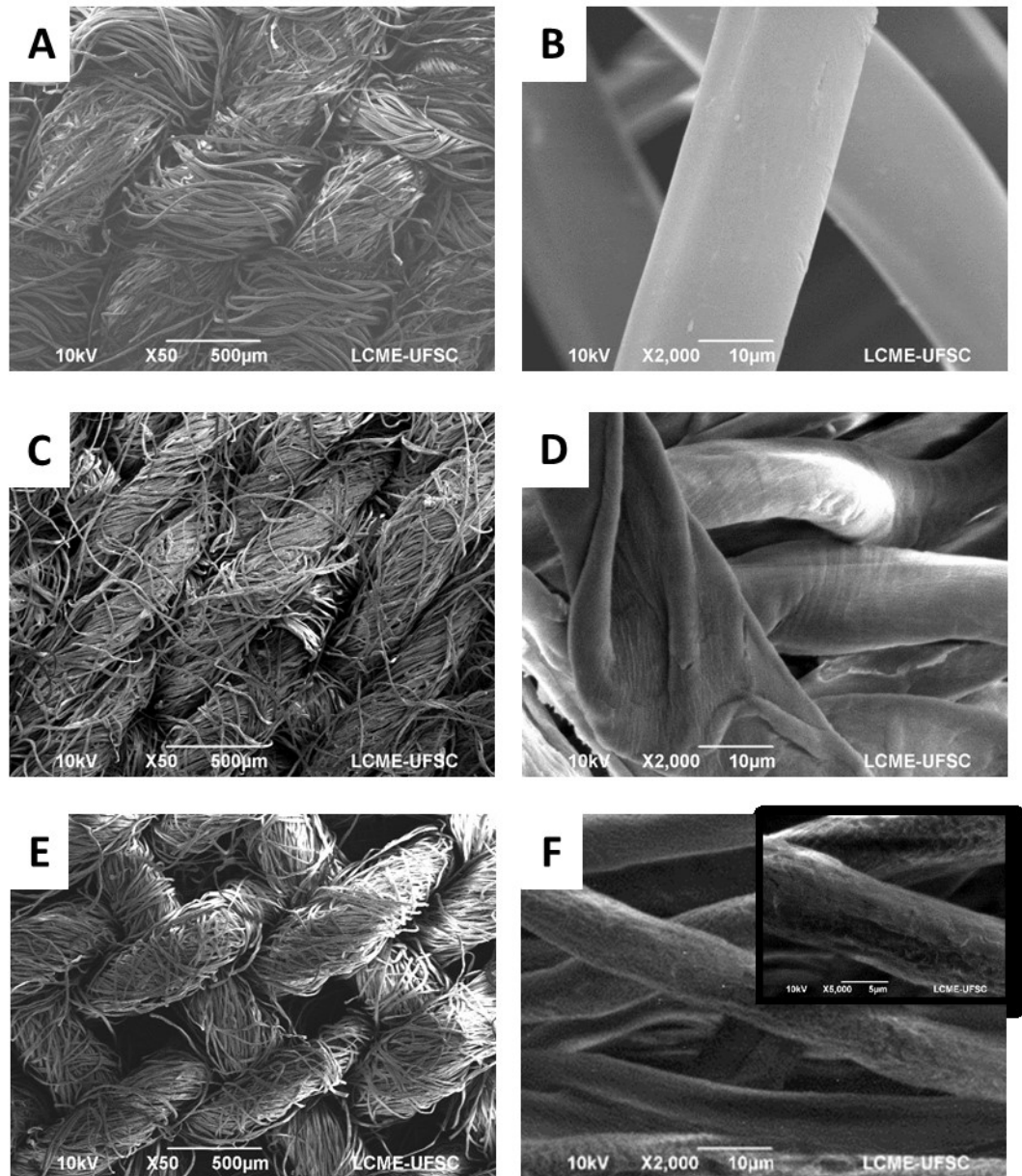
Nota-se que todas as bandas são evidenciadas com o aumento do tempo de exposição da amostra ao plasma, indicando novamente que este tratamento de superfície degrada primeiramente a cutícula que é a camada externa composta por graxas e pectinas (FURLAN, 2012) e então a parede primária da celulose expondo os outros grupos de caráter hidrofílico.

4.8.4 Microscopia Eletrônica de Varredura para o tecido de algodão

Nesta sessão serão apresentadas as imagens das fibras de algodão alvejadas tratadas e não tratadas com plasma de O₂ nos aspectos: puras e contendo as nanopartículas depositadas pelos três métodos de aplicação a fim de comparar qual método garante maior deposição e a influência do tratamento com plasma na integridade do fio e na adesão das nanopartículas no algodão.

Assim, a Figura 30 mostra em A e B o ALG-ST, em C e D o tecido tratado por plasma de O₂ por 1 minuto (ALG-1min) e em E e F o tecido tratado por 5 minutos (ALG-5min).

Figura 30- Imagens de MEV dos tecidos de algodão, (A) e (B) alvejado sem tratamento com plasma; (C) e (D) tratado com plasma de O₂ por 1 min; (E) e (F) tratado com plasma de O₂ por 5 min



Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

Observa-se em B que no algodão alvejado a superfície é lisa e praticamente sem defeitos na estrutura e os fios ainda recobertos com a cutícula cuja camada confere o caráter hidrofóbico ao tecido. Evidentemente há mudança na morfologia da superfície após a exposição a DBD e isto é dependente do tempo de tratamento pois nota-se em D e em F aumento de rugosidade que é pronunciado em F, cuja amostra recebeu 5 minutos de tratamento.

Em D observa-se a remoção da cutícula hidrofóbica em virtude do aparecimento das fibrilas longitudinais que caracterizam a parede primária da fibra do algodão, por efeito do

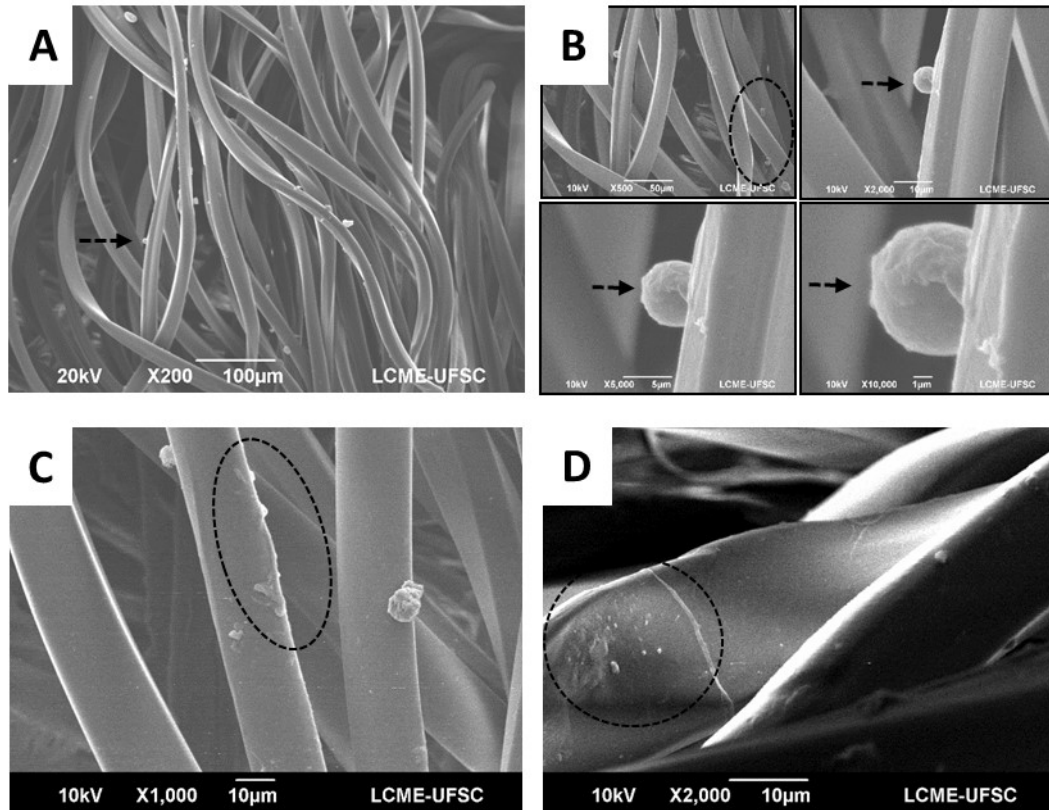
pequeno tempo de tratamento com o plasma (MAN; KAN; NG, 2014). Quando espécies reativas encontram continuamente a superfície do tecido, como no caso da amostra apresentada em F, esta é vigorosamente modificada porque além da exposição das fibrilas, formaram-se vales na superfície do tecido em razão do bombardeamento das espécies formadas de O_2 durante o período de exposição ao plasma. Ademais observa-se a escamação e abertura da fibra, indícios de perda de resistência mecânica do material.

Resultados similares foram obtidos nas imagens de MEV no trabalho de Vinisha, Sarma e Sarma, (2018) e Prysiazhnyi et al., (2013) onde os danos causados na estrutura da fibra são justificados pela remoção das regiões amorfas da camada externa e conseqüentemente ao ataque das espécies radiculares de O_2 na região cristalina da fibra. Estas observações a respeito da morfologia estão de acordo com as sugestões inseridas na análise dos espectros de FT-IR onde propunha-se o aumento da intensidade dos grupos funcionais com o tempo de tratamento devido a remoção da cutícula e exposição das paredes internas da fibra.

Ao comparar as imagens A, C e E observa-se que a exposição da amostra ao plasma colabora inclusive para o aumento do espaço entre os fios e desorganização das fibras. Esta diferença na morfologia também está relacionada a um maior fluxo capilar observado na melhoria da absorção da água nas medidas de ângulo de contato para as amostras que foram expostas à DBD em função dos diferentes tempos de tratamento (HOSSAIN; HERRMANN; HEGEMANN, 2006) (MAN; KAN; NG, 2014).

Em segundo momento, avaliou-se a deposição e distribuição das nanopartículas contendo OEC nas fibras. A Figura 31 refere-se ao algodão sem tratamento, onde em A e B a deposição foi realizada pelo método Spray I e em C e D pelo método de imersão nas nanopartículas. Em A se verifica a presença de esferas e outros aglomerados que podem ser caracterizados como os aglomerados poliméricos oriundos das nanopartículas, a seta preta marca um aglomerado onde maior magnificação é exibida em B. Similarmente, Silva et al., (2019) observaram aglomerados de nanopartículas de ouro decoradas com quitosana quando depositadas em fibra têxtil de soja. Em C além de poucos aglomerados esféricos constata-se um pequeno filme circulado em preto e em D, pequenas esferas aderidas a fibra. Apesar do tecido não ter recebido o tratamento na superfície para deixá-la com caráter hidrofílico, a adesão das nanopartículas pode ser explicada por haver um recobrimento heterogêneo da cutícula hidrofóbica deixando expostos poros da fibra que desempenham o papel de âncoras para a adesão das nanopartículas (PRYSIAZHNYI et al., 2013).

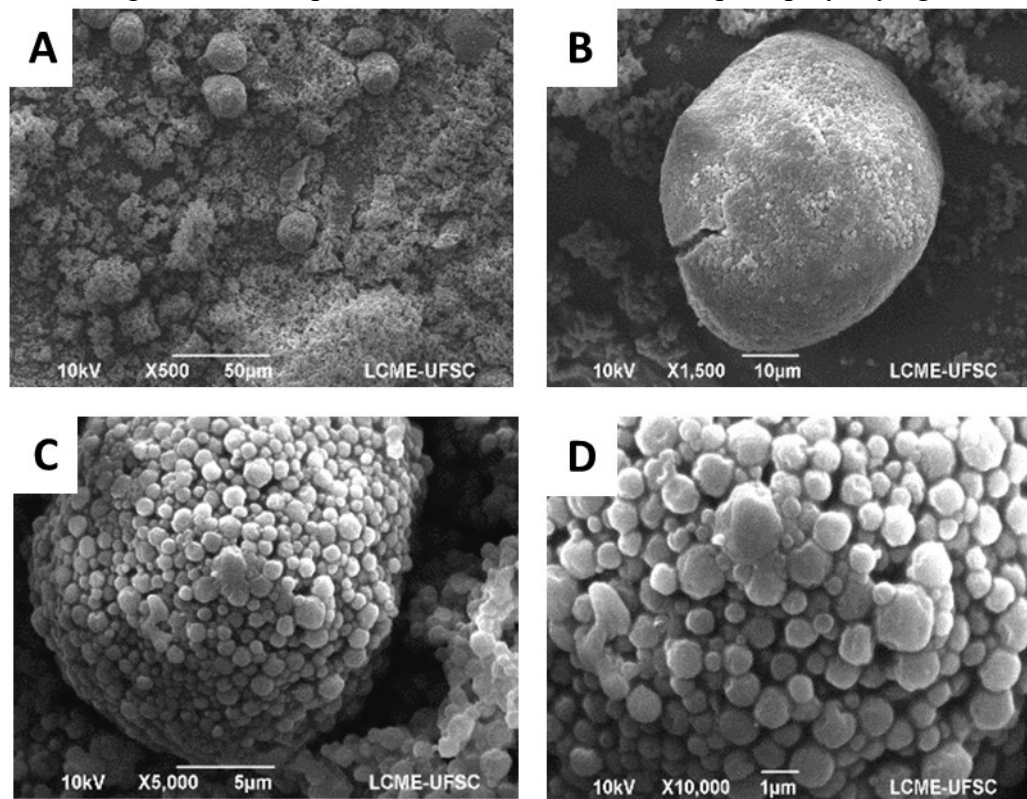
Figura 31- Tecido não tratado com plasma, com deposição das nanopartículas. Em (A) e (B) deposição via Spray I, (C) e (D) deposição via imersão.



Fonte: Imagens adquiridas pela autora deste trabalho (2019)

Uma imagem de MEV das nanopartículas contendo OEC secas em Spray Dryer foi obtida, Figura 32. Observa-se que microesferas na ordem de 1 micrômetro se aglomeram em esferas maiores formando agregados de “formato *raspberry*”, desta forma é possível comparar o tamanho e formato dos agregados visualizados nas fibras do algodão confirmando que são de fato as nanopartículas.

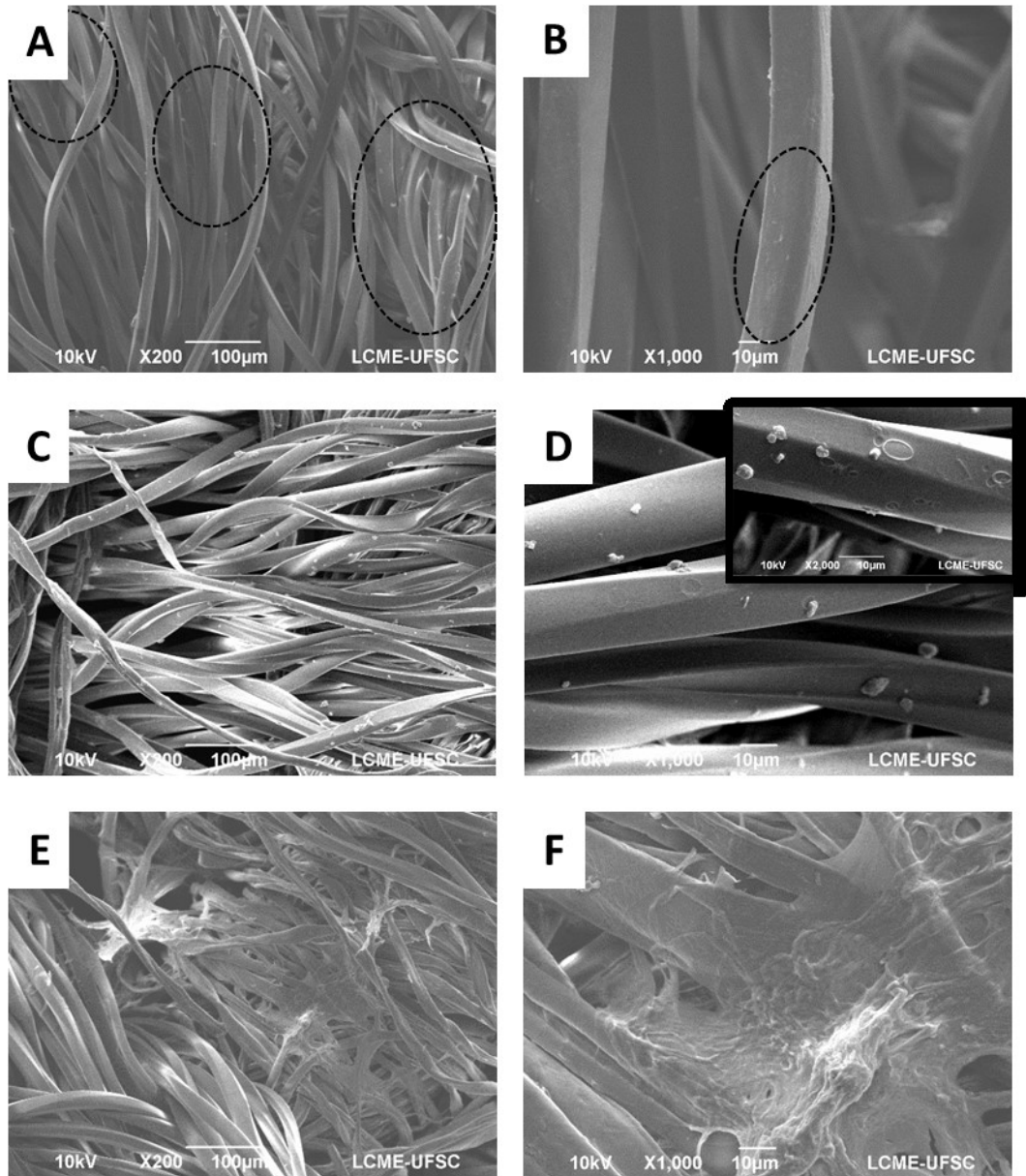
Figura 32- Nanopartículas contendo OEC secas por Spray drying



Fonte: Imagens adquiridas pela autora deste trabalho (2019)

Na Figura 33 é exibida a amostra ALG-P1min e em seguida recebeu a deposição das nanopartículas. Em A e B pelo método de imersão, em C e D pelo método de Spray I e em E e F utilizando o método Spray II. Nas áreas destacadas em A se observa aglomerados de NPs em maior quantidade em comparação ao tecido que não recebeu o tratamento com plasma. Já em B, pequenas esferas aderidas a fibra. Nas imagens C e D nota-se grande quantidade de aglomerados bem dispersos nas fibras e com polispersividade de tamanho. Em D percebe-se estrutura do “tipo cratera” na fibra, característica relatada na literatura para o tecido de algodão após o tratamento com plasma de oxigênio (PRYSIAZHNYI et al., 2013). Em E e F, se verifica que a aplicação das nanopartículas com pistola de pintura garantiu a formação de um filme sobre as fibras devido ao modo de aplicação, onde utilizou-se alta taxa de aspersão.

Figura 33- Tecido de algodão tratado com plasma de O₂ por 1 minuto impregnado com Nanopartículas contendo OEC via imersão (A) e (B); via Spray I (C) e (D) e Spray II (E) e (F)

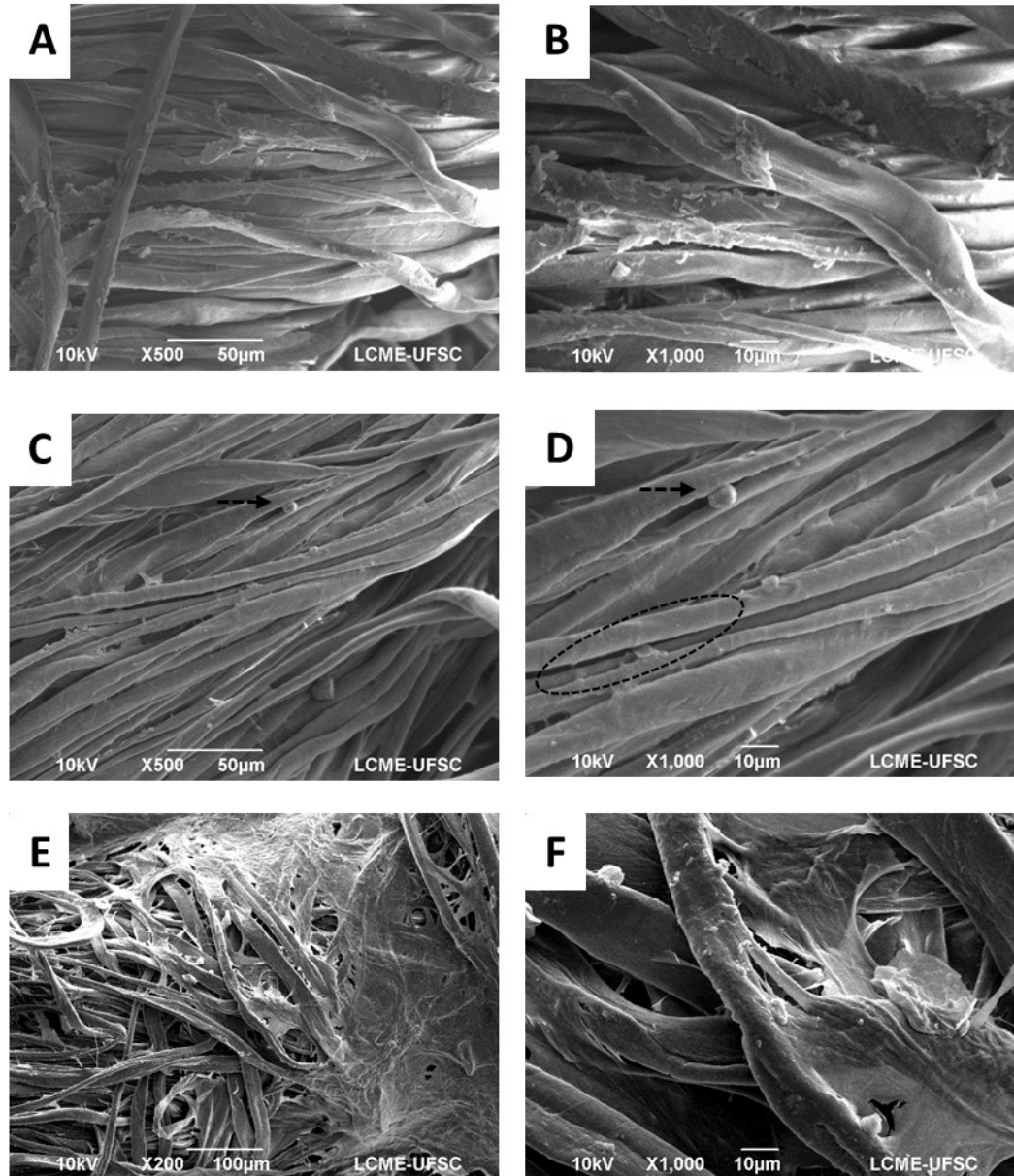


Fonte: Imagens adquiridas pela autora deste trabalho (2019)

Na Figura 34 encontra-se as imagens de MEV do tecido de algodão que foi tratado com plasma durante 5 minutos e que recebeu a deposição das nanopartículas. Em A e B a deposição via imersão resultou no acúmulo de aglomerados nas fibras indicando alta adesão das nanopartículas no substrato. Para a deposição via Spray I neste caso não se observa fibras numerosas cobertas com os aglomerados poliméricos, mas em D nota-se inclusive fibras torcidas, abertas no sentido longitudinal e que houve deposição nesta abertura, assim como

indicado no destaque em preto. Em E e F, na deposição via Spray II de pintura observa-se a formação de filmes na superfície, assim como para o algodão tratado por 1 minuto.

Figura 34- Tecido de algodão tratado com plasma de O_2 por 5 minutos impregnado com nanopartículas contendo OEC via imersão (A) e (B); via Spray I (C) e (D) e Spray II (E) e (F)



Fonte: Imagens adquiridas pela autora deste trabalho (2019)

A melhoria da adesão de nanopartícula verificada nos tecidos tratados justifica-se pelo aumento das propriedades hidrofílicas causadas pela remoção da cutícula hidrofóbica pela ação das espécies reativas do gás oxigênio na superfície que introduz e enaltece grupos funcionais de caráter polar, como C=O e C-O observados a partir da análise de FT-IR. Vinisha Rani; Sarma; Sarma, (2018) observaram aumento na adesão de óxido de grafeno na superfície do algodão quando o plasma foi introduzido como método de funcionalização de superfície. No

caso do presente trabalho sugere-se que haja atração eletrostática entre os grupos amino positivamente carregados da quitosana com as espécies eletronegativas expostas na superfície do substrato têxtil.

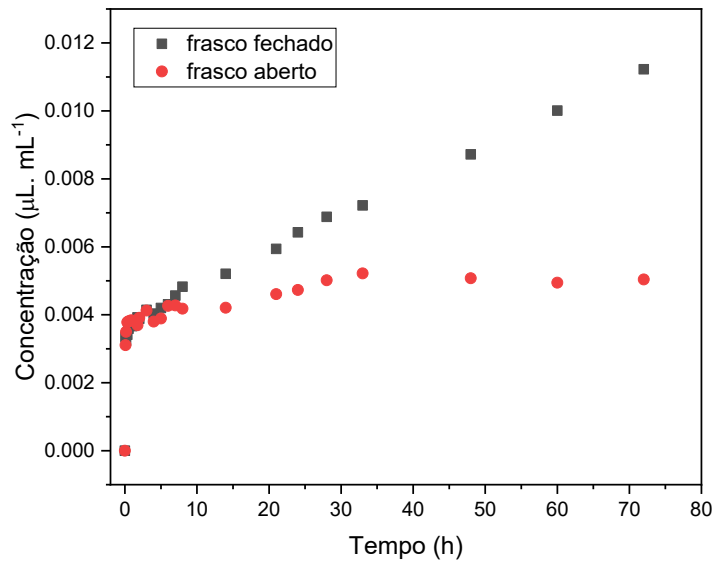
Ao comparar a deposição das nanopartículas de quitosana nas fibras do algodão dos três diferentes substratos por meio das imagens de MEV, constata-se que o tecido tratado com plasma de O₂ por 1 minuto foi o qual apresentou maior deposição via Spray I e o tecido tratado por 5 minutos maior deposição via imersão. O método que utiliza pistola de pintura não se mostrou bom em consequência da formação de filmes na superfície, de acordo com Fiedler et al., (2019) microcápsulas de tamanho menores facilitam a adsorção e penetração na superfície do tecido devido a ocupação dos interstícios entre os fios e fibras. Li et al., (2013) alegam que partículas de tamanho menores também são vantajosas no controle de dosagem de ativos e na durabilidade do tecido.

4.8.5 Liberação *in vitro* de OEC do tecido

Embora o método de aplicação via Spray I tenha garantido maior deposição das nanopartículas ao tecido, testes de liberação preliminares indicaram baixa incorporação do ativo, OEC, devido provavelmente a perda do conteúdo de ativo que não estava encapsulado no core da nanopartícula e sim nas superfícies para atmosfera durante a aplicação. Portanto, o estudo de liberação que será apresentado refere-se ao tecido de algodão cujas nanopartículas foram impregnadas via imersão, neste caso é possível que o conteúdo de OEC que não esteja encapsulado seja também absorvido pela fibra do tecido.

A liberação foi conduzida em meio de suor simulado pH 4,3 de acordo com metodologia descrita na seção experimental. Os resultados experimentais das cinéticas de liberação, realizadas em frasco fechado ou aberto, possibilitaram uma explanação a respeito do mecanismo de liberação do OEC, do tecido para o suor e, do tecido para o suor e em seguida para atmosfera, contribuindo no entendimento da liberação do ativo para o meio de liberação, bem como de sua perda por evaporação ao longo do tempo. A Figura 35 mostra os perfis de liberação que foram obtidos do experimento executado em frasco fechado, para se compreender a respeito da liberação do ativo impregnado no tecido para o suor, e em frasco aberto compreender a liberação do ativo impregnado do tecido para o suor e em seguida a evaporação do ativo no suor para a atmosfera. Os experimentos foram conduzidos simultaneamente até aproximadamente 72 horas de liberação.

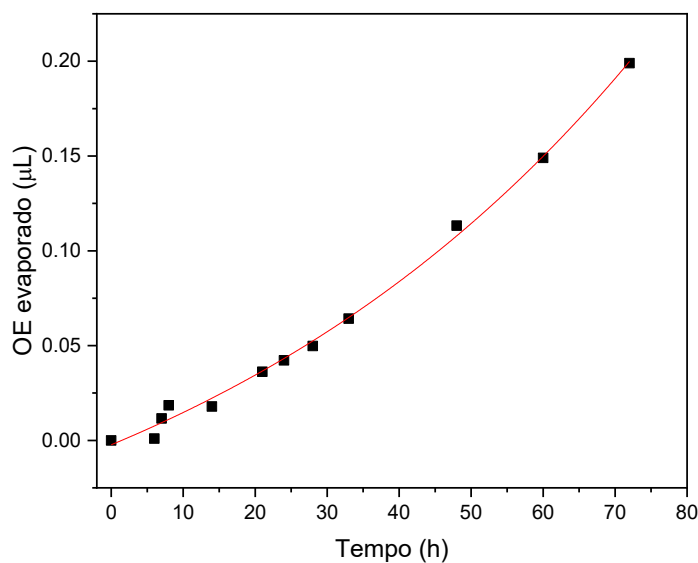
Figura 35- Curvas de liberação do óleo essencial do tecido de algodão em meio de suor simulado em frasco fechado e em frasco aberto



Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

Os valores da ordenada da curva apresentada na Figura 36 referem-se à subtração dos dados da curva cinética obtida para o frasco fechado pelos dados da curva para o frasco aberto. Esta subtração entre as curvas da Figura 35 foi realizada com o fim de representar a evaporação do ativo em função do tempo.

Figura 36- Curva de evaporação do óleo essencial



Fonte: Dados elaborados pela autora deste trabalho (2019)

A curva de evaporação foi construída após o período do efeito *burst* a partir de 5h de liberação. Haja vista que o processo de evaporação do óleo $L_{(suor)} \rightarrow V_{(atmosfera)}$ ocorre seguindo uma cinética de primeira ordem, para o ajuste dos dados, supõe-se que a taxa de evaporação do óleo no suor possa ser descrito de acordo com a equação 10 a seguir:

$$V_{OE}(t) = V_{OE}(0)e^{-k_1t} + y_0 \quad (10)$$

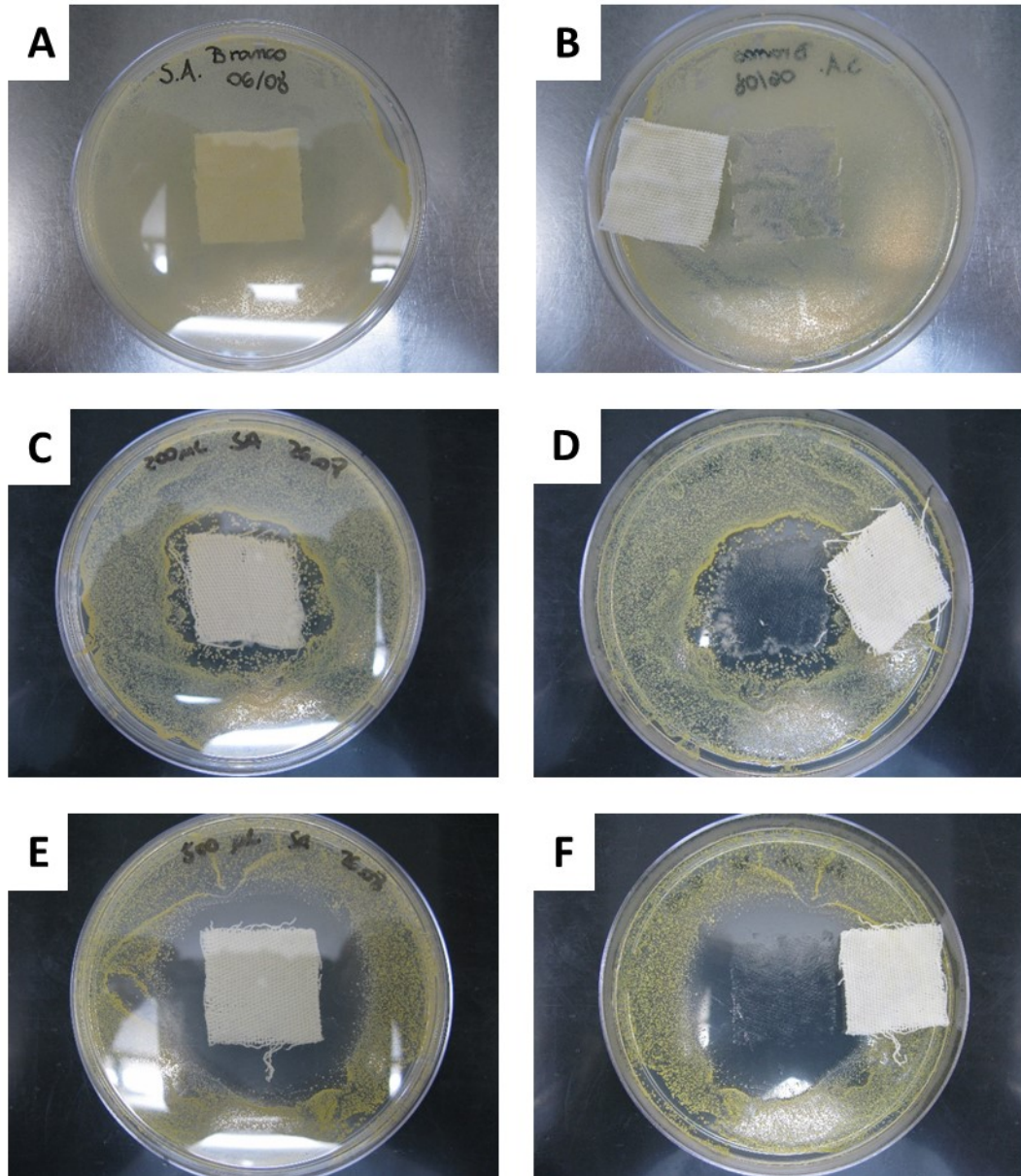
Onde V_{OE} representa o volume de OE evaporado no tempo “t”, y_0 o *offset* parâmetro de ajuste e k_1 a constante cinética de evaporação. Os dados apresentaram bom ajuste ao modelo equacional onde $r^2 = 0,99618$ e $k = 1,46 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, que indica que o processo de evaporação do óleo, do meio de suor para a atmosfera, ocorre lentamente.

4.8.6 Avaliação da atividade microbiológica do tecido impregnado com as nanopartículas

O objetivo desta análise foi verificar a atividade bactericida e fungicida da amostra de algodão contendo nanopartículas carregadas de óleo essencial de citronela. O teste, realizado em condições estáticas, é baseado no crescimento do microrganismo quando este entra em contato próximo e sobre a amostra impregnada, e em contrapartida o composto ativo é submetido a mecanismos de transporte e difusão do tecido para a placa, onde observa-se sua atividade pela inibição do crescimento embaixo e ao redor do tecido (LÓPEZ et al., 2019).

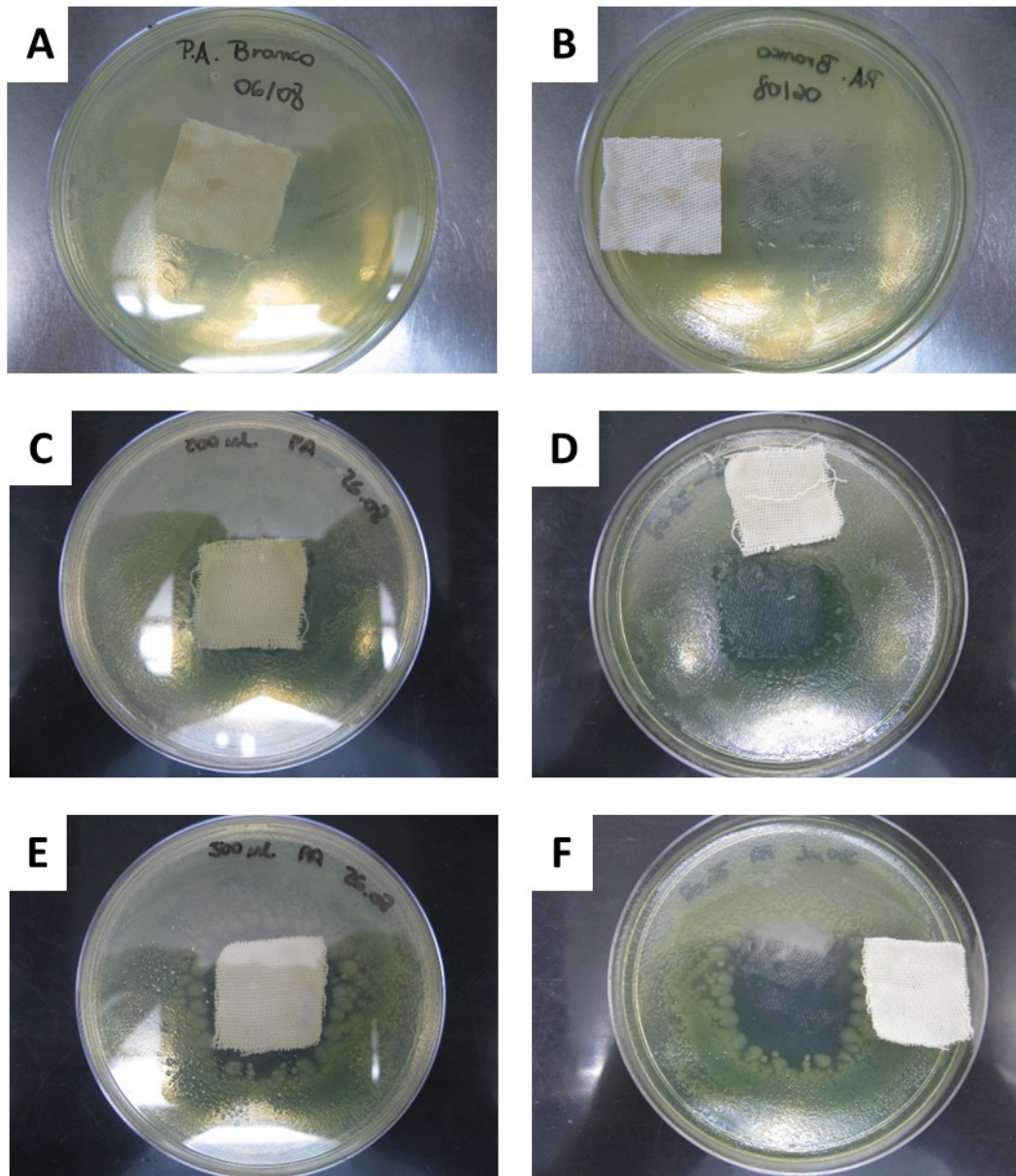
Na Figura 36 observa-se a atividade microbiológica do tecido contra a bactéria gram-positiva *S. aureus* e na Figura 37 o resultado do teste executado para a bactéria gram-negativa *P. aeruginosa*. Em ambos os casos, as fotos A e B apresentam o tecido branco, ou seja, sem tratamento com as nanopartículas, onde houve o crescimento das colônias em forma de filmes finos que são possíveis de visualizar sem uso de microscópio em toda a placa inclusive embaixo do tecido.

Figura 37- Avaliação da ação microbiológica do tecido impregnado de nanopartículas contra *S. aureus*. (A) e (B) tecido branco; (C) e (D) nanopartículas na concentração de 200 μ L do OEC; (E) e (F) nanopartículas na concentração de 500 μ L do OEC



Fonte: Imagens adquiridas pela autora deste trabalho (2019)

Figura 38- Avaliação da ação microbiológica do tecido impregnado de nanopartículas contra *P. aeruginosa* (A) e (B) tecido branco; (C) e (D) nanopartículas na concentração de 200 μL do OEC; (E) e (F) nanopartículas na concentração de 500 μL do OEC



Fonte: Imagem adquirida pela autora deste trabalho (2019)

As fotos C e D mostram a atividade do tecido de algodão tratado com NPs cuja concentração de óleo essencial de citronela utilizada foi 200 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e as fotos E e F para a concentração de 500 $\mu\text{L mL}^{-1}$. De acordo com o método de avaliação da Norma ABNT NBR 15275, o teste se mostrou eficiente quanto à resistência bacteriana para as duas bactérias em estudo para as duas concentrações do OE pois não há colônias embaixo do tecido, e para a concentração de 500 $\mu\text{L mL}^{-1}$ observa-se maior halo de inibição contra a *S. aureus* em comparação com *P. aeruginosa*.

Segundo Nurul Hidayah et al., (2019) o OE de citronela possui características bactericidas que atuam na inibição do crescimento do biofilme de *S. aureus*. Lopez-Romero e colaboradores (2015) atribuem ao citronelol e ao citronelal a atividade bactericida tanto para bactérias gram-positivas quanto para as gram-negativas, mesmo nestas últimas que possuem canais hidrofílicos na membrana externa, estes compostos terpenóides mostraram capacidade de rompê-los. Helander et al., (1998) confirmam o efeito de monoterpenos de óleos essenciais na permeabilidade da membrana externa de bactérias gram-negativas.

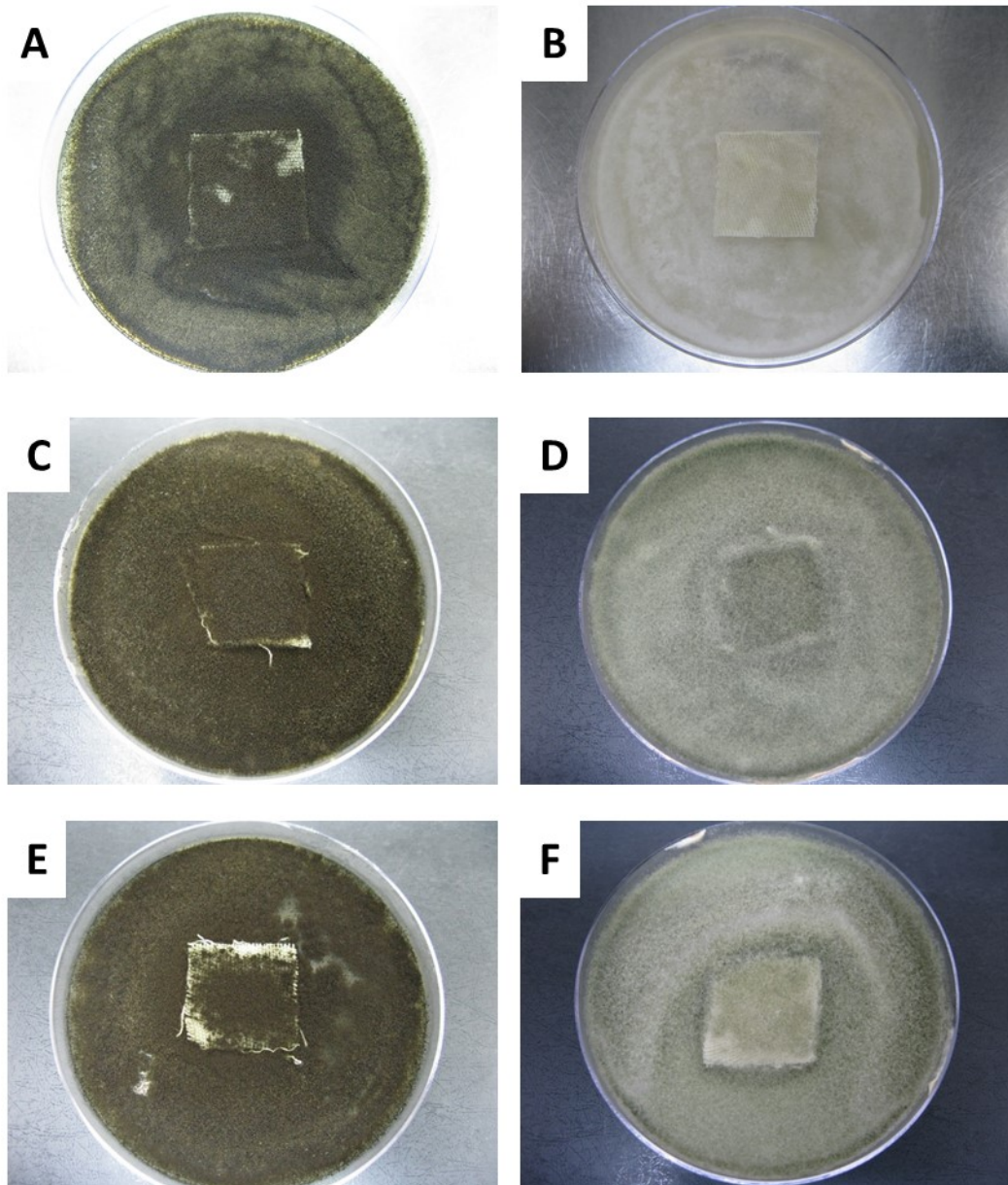
Estes fundamentos da literatura suportam o resultado obtido neste trabalho a respeito da não formação de colônias embaixo do tecido, que foi menos evidenciado para a *P. aeruginosa* possivelmente por possuir flagelos além da membrana exterior celular dificultando a ação dos compostos ativos do OEC.

O tecido de algodão impregnado com nanopartículas contendo o OE de citronela foi submetido ao teste para avaliação do potencial antifúngico nas concentrações de 200 e 500 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A imagem A na Figura 38 representa o tecido branco com alto crescimento de *A. niger* caracterizado pelos micélios pretos por toda a placa. A imagem B mostra o crescimento dos micélios acinzentados de *T. virens* em toda a placa e no tecido branco.

As fotos C e D mostram respectivamente o crescimento dos fungos *A. niger* e *T. virens* no tecido que estava impregnado com nanopartículas na concentração de 200 $\mu\text{L mL}^{-1}$ onde não houve inibição do crescimento. Para o tecido impregnado com nanopartículas na concentração de 500 $\mu\text{L mL}^{-1}$, fotos E e F, observa-se menor crescimento dos fungos em cima do tecido indicando que para haver atividade fungicida é exigido maior concentração do princípio ativo.

Li et al., (2013) estudaram a concentração inibitória mínima do óleo essencial de citronela extraído da espécie *Cymbopogon nardus*, cujo composto principal identificado foi o citronelal, contra o fungo *Aspergillus niger*. Os autores identificaram a concentração de 0,5% (v/v) de óleo como a CIM contra 10^5 esporos mL^{-1} de *A. niger*. As imagens de MEV obtidas após o período de incubação mostraram que o OE havia permeado a parede e também a membrana celular do fungo, alterando a permeabilidade celular. Em consequência, a interação com a membrana citoplasmática que acarretou no rompimento do citoplasma por fim a morte celular.

Figura 39- Avaliação da ação microbiológica do tecido impregnado de nanopartículas contra *A. niger*, tecido branco (A); tecido com nanopartículas contendo 200 μ L de OEC (C); tecido com nanopartículas contendo 500 μ L de OEC (E). Contra *T. virens* tecido branco (B); tecido com nanopartículas contendo 200 μ L de OEC (D); tecido com nanopartículas contendo 500 μ L de OEC (F)



Fonte: Imagens adquiridas pela autora deste trabalho (2019)

Berechet; Chirila[˘]; Deselnicu, (2016) avaliaram a atividade de alguns \acute{o} leos essenciais em amostras de tecido de algod \tilde{a} o por meio do gotejamento de 200 μ L de cada \acute{o} leo diretamente no tecido contra a a \tilde{c} o do fungo *Trichophyton interdigitale* um dos respons \acute{a} veis pelo mau odor encontrado nos p \acute{e} s. Os autores constataram que os OE de or \acute{e} gano e de canela assim como a

combinação dos óleos de alho-laranja-orégano e alho-lavanda-canela na proporção 1:1:1 inibiram completamente o crescimento deste fungo na amostra de algodão.

Diferentemente dos exemplos citados onde os autores trabalharam com o OE puro, no presente trabalho utilizou-se a técnica de encapsulação do ativo para garantir liberação prolongada e maior efeito da ação microbiológica dos constituintes e avaliou-se as mesmas concentrações de OE no tecido para o teste com as bactérias e para os fungos. No entanto o resultado de inibição foi observado apenas para as bactérias pois a estrutura da parede celular destas é menos complexa, formada por peptídeoglicano e lipopolissacarídeo no caso das gram-negativas ou peptídeoglicano e ácido teicóico no caso das gram-positivas. Já a parede celular dos fungos é constituída de quitina, beta glucana, manoproteínas e oligomanose ramificada (BENITO-LEÓN; LAURENCE, 2017), sendo, portanto, mais resistente ao ataque das moléculas constituintes do OE de citronela essencial para garantir a integridade da membrana citoplasmática.

4.9 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

O tratamento com plasma de O₂ proporcionou características hidrofílicas à superfície do tecido de algodão, onde o tempo ideal de tratamento foi de 1 minuto por não causar danos mecânicos à fibra. Na aplicação das nanopartículas via método Spray I observou-se no MEV maior quantidade de partículas depositadas na superfície, no entanto por meio deste método observa-se quantidades muito pequenas do OEC na liberação *in vitro*. Assim, o método de imersão foi escolhido para executar a análise de liberação *in vitro* pois garantiu liberação lenta do ativo por 72 horas. O tecido apresentou atividade bactericida contra as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* e na concentração de 500 µL. mL⁻¹ do OEC apresenta indício de inibição contra os fungos *A. niger* e *T. virens*. Estas características atribuem ao algodão tratado com as nanopartículas de F127/OEC/CPE quitosana e alginato potencial um produto na prevenção da proliferação de microrganismos em peças utilizadas em contato com a pele.

Capítulo V

Conclusões e perspectiva

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A autoassociação dos copolímeros Pluronic® F127 em etanol foi conduzida pela presença do óleo essencial de citronela. A presença das nanoestruturas de 160 nm em suspensão foi comprovada pelas curvas de correlação obtidas por DLS. Após, estas estruturas de F127 contendo OEC foram recobertas com um complexo polieletrólítico quitosana/alginato via gelificação iônica, dando origem a estruturas do tipo *core-shell* conforme observado por imagens de TEM. As nanopartículas recobertas, com raio hidrodinâmico igual a 196 nm apresentaram relevante estabilidade com potencial zeta igual a +54,3 mV e permanecendo estáveis por até 60 dias. Este sistema garantiu alta eficiência de encapsulação do OEC, revelando-se um potencial carreador de compostos hidrofóbicos o que, sem dúvida, ressalta a relevância tecnológica destes sistemas.

Além disso, resultados experimentais mostraram que o raio hidrodinâmico das nanopartículas aumenta com o aumento da fração de etanol no meio dispersivo, o que pode estar associado ao fluxo osmótico de etanol do meio dispersivo para o interior (*core*) da nanopartícula, corroborando à natureza proposta para estrutura observada nas imagens de TEM, a saber um núcleo de Pluronic/OEC recoberto pelo complexo polieletrólítico quitosana/alginato.

Uma vez que a superfície da nanoestrutura apresentou carga residual positiva, uma estratégia para promover uma adesão mais eficiente em tecidos de algodão foi o tratamento da superfície dos têxteis com plasma frio de oxigênio. O tratamento com plasma proporcionou a exposição de grupos de caráter hidrofílico na superfície das fibras do tecido conforme evidenciado pelas análises de FT-IR através das bandas em 1018 e 1717 cm^{-1} associadas respectivamente ao estiramento C-O e C=O. Desta maneira, em função da natureza constitucional das nanopartículas, o aumento da hidrofilicidade da superfície das fibras através do tratamento com plasma frio, garantiu boa adesão das mesmas conforme observado em amostras de MEV. Esta etapa, foi realizada com o objetivo de avaliar a possibilidade de agregar nova funcionalidade tecnológica ao tecido, a saber, propriedades antifúngicas e bactericidas. A lenta liberação *in vitro* do óleo essencial a partir das nanopartículas impregnadas no têxtil indica um excelente sistema para uso neste âmbito. Apesar de não observar atividade antifúngica na dosagem de OEC avaliada, os testes microbiológicos realizados foram efetivos contra as bactérias gram-positiva *S. aureus* e gram-negativa *P. aeruginosa*.

Diante do potencial de uso das nanopartículas, perspectivas para a continuidade da pesquisa para um melhor entendimento do sistema podem ser consideradas. Com relação a estrutura da nanopartícula, análises de espalhamento de raios X em baixos ângulos (SAXS) podem auxiliar na compreensão mais detalhada da organização do F127 e a interação com a quitosana e o alginato. A análise de XPS (Espectroscopia Fotoeletrônica de Raios X) pode ser utilizada para analisar o conteúdo de oxigênio e carbono do algodão antes e após o tratamento com plasma a frio. O óleo essencial impregnado nas fibras têxteis pode ser melhor quantificado utilizando o método de microextração em fase sólida via headspace (Solid Phase Micro Extraction-headspace).

5.1 INDICADORES DE PRODUTIVIDADE NO PERÍODO DE DOUTORADO

No período de doutorado realizou-se publicações de trabalhos científicos em periódico e em congressos, os quais correspondem a resultados experimentais apresentados nesta tese e desenvolvidos na maior parte no Grupo de Estudo em Materiais Poliméricos-POLIMAT e análises realizadas em laboratórios parceiros.

Artigo completo publicado no periódico Journal of the Brazilian Chemical Society:

Chitosan-Sodium Alginate Polyelectrolyte Complex Coating Pluronic®F127 Nanoparticles Loaded with Citronella Essential Oil (doi: 10.21577/0103-5053.20190244).

Apresentação de trabalhos em congressos:

SANCHES, M. P.; GROSS, I. P.; SAATKAMP, R. H.; ENUMO JUNIOR, A.; PARIZE, A. L.; SOLDI, V. Avaliação da nanoencapsulação de óleo essencial de citronela em nanopartículas de Pluronic® P123 decoradas com quitosana- alginato de sódio. 15° CBPOL Bento Gonçalves-RS, 2019.

ENUMO JUNIOR, A; GROSS, I. P.; SAATKAMP, R. H.; **SANCHES, M. P.;** PARIZE, A. L. Avaliação das propriedades térmicas e mecânicas de filmes de Poli (ácido láctico) com ácido maleico e derivados esterificados. 15° CBPOL, Bento Gonçalves-RS, 2019.

SANCHES, M. P.; GROSS, I. P.; PARIZE, A. L.; SOLDI, V. Efeito da composição etanol/água no raio hidrodinâmico de sistemas Pluronic® F127 e óleo essencial de citronela. XXV Encontro de Química da Região Sul, Londrina, PR, 2018.

SANCHES, M. P.; FELIX, T.; PARIZE, A. L.; SOLDI, V. Chitosan and sodium alginate nanoparticles to incorporate in textile fiber treated by non-thermal plasma. XVII SBPMat, Natal, RN, 2018.

SANCHES, M. P.; PARIZE, A. L.; SOLDI, V. Chitosan and sodium alginate nanoparticles with insect repellence potential for textile application. 5th French Brazilian Meeting on Polymers, Florianópolis, SC, 2018.

SANCHES, M. P.; CHAMORRO, A. F.; GRANADA, A.; PARIZE, A. L.; SOLDI, V. development of nanoparticles from chitosan and alginate to incorporate essential oils for textile fibers. XVI SBPMat, Gramado, RS, 2017.

REFERÊNCIAS

A. MOUSSA, S.; F. FAROUK, A.; OPWIS, K. Production, Characterization and Antibacterial Activity of *Mucor rouxii* DSM-119 Chitosan. **Journal of Textile Science & Engineering**, v. 01, n. 01, 2012.

A. PEPPAS, N.; J. SAHLIM, J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International journal of pharmaceutics**, v. 57, p. 169–172, 1989.

ABDELBAGI, H.; AHMED, M. Plasma Treatment in Textile Substrates - A Review *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* Plasma Treatment in Textile Substrates - A Review. n. March, 2018.

ÁCS, K. et al. Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, 27 jul. 2018.

ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARTH, J. F.; HATTON, T. A. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. **Macromolecules**, v. 27, n. 9, p. 2414–2425, abr. 1994.

ALI, B. et al. **Essential oils used in aromatherapy: A systemic review** *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* Hainan Medical University, , 2015.

ALUANI, D. et al. Evaluation of biocompatibility and antioxidant efficiency of chitosan-alginate nanoparticles loaded with quercetin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 771–782, out. 2017.

Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 4, p. 58, 8 ago. 2017.

ARAUJO, M. M. DE; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, n. 0, p. 1–7, 2016.

ASHRAF, U. et al. An investigation of Pluronic P123-sodium cholate mixed system: Micellization, gelation and encapsulation behavior. **RSC Advances**, v. 5, n. 102, p. 83608–83618, 2015.

AVADI, M. R. et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology**,

Biology, and Medicine, v. 6, n. 1, p. 58–63, 2010.

BARRADAS, T. N. et al. Hydrogel-thickened nanoemulsions based on essential oils for topical delivery of psoralen: Permeation and stability studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 116, p. 38–50, 2017.

BASAK, R.; BANDYOPADHYAY, R. Encapsulation of hydrophobic drugs in pluronic F127 micelles: Effects of drug hydrophobicity, solution temperature, and pH. **Langmuir**, v. 29, n. 13, p. 4350–4356, 2013a.

BASAK, R.; BANDYOPADHYAY, R. Encapsulation of hydrophobic drugs in pluronic F127 micelles: Effects of drug hydrophobicity, solution temperature, and pH. **Langmuir**, v. 29, n. 13, p. 4350–4356, 2013b.

BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 2, p. 98–106, 2008.

BENAVIDES, S. et al. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, v. 204, p. 77–83, ago. 2016.

BENITO-LEÓN, J.; LAURENCE, M. The role of fungi in the etiology of multiple sclerosis. **Frontiers in Neurology**, v. 8, n. OCT, 2017.

BERECHET, M. D.; CHIRILĂ, C.; DESELNICU, V. Antifungal activity of some essential oils on cotton fabrics. **ICAMS Proceedings of the International Conference on Advanced Materials and Systems**, 2016.

BRANCA, C. et al. Effect of intercalated chitosan/clay nanostructures on concentrated pluronic F127 solution: A FTIR-ATR, DSC and rheological study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 517, p. 221–229, 2018.

BRUGNEROTTO, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569–3580, 2001.

CAFAGGI, S. et al. Preparation and evaluation of a chitosan salt-poloxamer 407 based matrix for buccal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 1, p. 159–169, 2005.

CHAIBUNDIT, C. et al. Micellization and gelation of mixed copolymers P123 and F127 in aqueous solution. **Langmuir**, v. 23, n. 18, p. 9229–9236, 2007.

CHAT, O. A. et al. Aggregation and Rheological Behavior of the Lavender Oil-Pluronic P123 Microemulsions in Water-Ethanol Mixed Solvents. **Langmuir**, v. 34, n. 3, p. 1010–1019, 2018.

CHATHA, S. A. S. et al. Environmentally responsive and anti-bugs textile finishes –

Recent trends, challenges, and future perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 690, p. 667–682, 2019.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Essential Oils: A Natural Alternative to Combat Antibiotics Resistance. A Natural Alternative to Combat Antibiotics Resistance. **Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches**, p. 227–237, 2016.

CHOUDHARY, M. I. I. et al. Antiinflammatory and lipoxygenase inhibitory compounds from vitex agnus-castus. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 9, p. 1336–1339, 2009.

CIHAN, E.; POLAT, M.; POLAT, H. Designing of spherical chitosan nano-shells with micellar cores for solvation and safeguarded delivery of strongly lipophilic drugs. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 529, n. February, p. 815–823, 2017.

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

DE OLIVEIRA PEREIRA, F. et al. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 228–234, 1 fev. 2015.

DE SILVA, B. C. J. et al. Antimicrobial property of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against pathogenic bacteria isolated from pet turtles . **Laboratory Animal Research**, v. 33, n. 2, p. 84, 2017.

EFFECTS, A. Seasonal and Circadian Study of a Thymol/ γ -Terpinene/. v. 00, n. 00, p. 1–9, 2019.

EL ASBAHANI, A. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. 2015.

FATTAHI MEYABADI, T. et al. Spherical cellulose nanoparticles preparation from waste cotton using a green method. **Powder Technology**, v. 261, p. 232–240, 2014.

FELIX, T. **Funcionalização Físico-Química de Superfícies Poliméricas por Plasma Frio**. [s.l: s.n.].

FERRANDIZ, M. et al. Development and characterization of bioactive alginate microcapsules with cedarwood essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 32, n. 3, p. 184–190, 2017.

FIEDLER, J. O. et al. Application of Aloe vera microcapsules in cotton nonwovens to obtain biofunctional textiles. **Journal of the Textile Institute**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2019a.

FIEDLER, J. O. et al. Application of Aloe vera microcapsules in cotton nonwovens to obtain biofunctional textiles. **Journal of the Textile Institute**, 2019b.

FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: Protection against volatilization. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 968–972, 2011.

FURLAN, F. R. **Caracterização e aplicação de enzimas de forma combinada na biopreparação de tecidos felpudos de algodão**. [s.l: s.n.].

FURTADO, G. T. F. DA S. et al. Chitosan/NaF Particles Prepared Via Iontropic Gelation: Evaluation of Particles Size and Morphology. **Materials Research**, v. 21, n. 4, 2018.

FUSKELE, V.; SARVIYA, R. M. **Recent developments in Nanoparticles Synthesis, Preparation and Stability of Nanofluids**. Materials Today: Proceedings. **Anais...Elsevier Ltd**, 2017

GALLO, R. L. **Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes** **Journal of Investigative Dermatology** Elsevier B.V., , 1 jun. 2017.

GANGULY, R. et al. Micellar structural transitions and therapeutic properties in tea tree oil solubilized pluronic P123 solution. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 537, p. 478–484, 20 jan. 2018.

GARCIA-CRUZ, H.; FOGGETTI, U.; NAVARRO DA SILVA, A. Alginate-chitosan: Aspectos tecnológicos, características e produção. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800–1806, 2008.

GHAYEMPOUR, S.; MONTAZER, M. Micro/nanoencapsulation of essential oils and fragrances: Focus on perfumed, antimicrobial, mosquito-repellent and medical textiles. **Journal of Microencapsulation**, v. 33, n. 6, p. 497–510, 17 ago. 2016.

GHOSAL, K.; RAY, S. D. Alginate/hydrophobic HPMC (60M) particulate systems: New matrix for site-specific and controlled drug delivery. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, p. 833–844, 2011.

GJERDE, N. et al. Effect of PCL end-groups on the self-assembly process of Pluronic in aqueous media. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 4, p. 2585–2596, 2018.

GONÇALVES, T. B. et al. Journal of Essential Oil Bearing Plants Chemical Composition and Antibacterial Evaluation of the Essential Oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Gramineae) Chemical Composition and Antibacterial Evaluation of the Essential Oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Gramineae). 2013.

GRANDE-TOVAR, C. D. et al. Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involve in fruit decay and mechanisms of action. **Trends in Food Science and**

Technology, v. 78, n. May, p. 61–71, 2018.

GRILLO, I.; MORFIN, I.; PRÉVOST, S. Structural Characterization of Pluronic Micelles Swollen with Perfume Molecules. **Langmuir**, v. 34, n. 44, p. 13395–13408, 6 nov. 2018.

GUERRA-ROSAS, M. I. et al. Antimicrobial activity of nanoemulsions containing essential oils and high methoxyl pectin during long-term storage. 2017.

HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F.; SAFARI, M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 275, n. August 2018, p. 113–122, 2019.

HASSAN, P. A.; RANA, S.; VERMA, G. Making sense of Brownian motion: Colloid characterization by dynamic light scattering. **Langmuir**, v. 31, n. 1, p. 3–12, 2015.

HELANDER, I. M. et al. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590–3595, 1998.

HENRIQUE, R.; FLORIANÓPOLIS, S. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ADSORÇÃO DE AZUL DE METILENO EM SERRAGEM DE EUCALIPTOS IN NATURA E PÓS TRATAMENTO POR PLASMA FRIO**. [s.l: s.n.].

HEYDARI, R.; BAVANDI, S.; JAVADIAN, S. R. Effect of sodium alginate coating enriched with horsemint (*mentha longifolia*) essential oil on the quality of bighead carp fillets during storage at 4°C. **Food Science and Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 188–194, 2015.

HOSSAIN, M. M.; HERRMANN, A. S.; HEGEMANN, D. Plasma hydrophilization effect on different textile structures. **Plasma Processes and Polymers**, v. 3, n. 3, p. 299–307, 2006.

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

HSIEH, Y. L. **Chemical structure and properties of cotton**. [s.l: s.n.].

HUANG, X.; BRAZEL, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2–3, p. 121–136, 2001.

IL'INA, A. V.; VARLAMOV, V. P. Hydrolysis of chitosan in lactic acid. **Applied**

Biochemistry and Microbiology, v. 40, n. 3, p. 300–303, 2004.

JÄGER, W. et al. Evidence of the sedative effect of neroli oil, citronellal and phenylethyl acetate on mice. **Journal of Essential Oil Research**, v. 4, n. 4, p. 387–394, 1992.

Ji, M. et al. Green synthesis, characterization and in vitro release of cinnamaldehyde/sodium alginate/chitosan nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 90, n. November 2018, p. 515–522, 2019.

JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. 2014.

KAMBUROVA, K.; MITAROVA, K.; RADEVA, T. Polysaccharide-based nanocapsules for controlled release of indomethacin. **Aspects**, v. 519, p. 199–204, 2017.

KAN, C. W. **Plasma surface treatments for smart textiles**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016.

KAN, C. W.; MAN, W. S. Surface characterisation of atmospheric pressure plasma treated cotton fabric-Effect of operation parameters. **Polymers**, v. 10, n. 3, 2018.

KANG, X. et al. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

KAYITMAZER, A. B. **Thermodynamics of complex coacervation** *Advances in Colloid and Interface Science* Elsevier B.V., , 1 jan. 2017.

KERKHOF, S. et al. Self-Assembly of Pluronic F127 - Silica Spherical Core-Shell Nanoparticles in Cubic Close-Packed Structures. **Chemistry of Materials**, v. 27, n. 15, p. 5161–5169, 2015.

KHAZAEI, A. et al. Grafting amino drugs to poly(styrene-alt-maleic anhydride) as a potential method for drug release. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 7, p. 1109–1115, 2013.

KOMOTO, D.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. Preparation of polyelectrolyte complex gel of sodium alginate with chitosan using basic solution of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 54–59, 1 abr. 2019.

KUMAR, B. et al. Accepted Manuscript Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, n. 17, p. 1773–2247, 2017.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

L. RITGER, P.; A. PEPPAS, N. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5,

p. 37–42, 1987.

Lais Graziela de Melo da Silva BIOPURGA DE MALHA DE ALGODÃO UTILIZANDO PROCESSO ENZIMÁTICO COM ASSOCIAÇÃO DE ENZIMAS. . [s.l: s.n.].

LEE, C.-F. et al. Synergistic Effect of Binary Mixed-Pluronic Systems on Temperature Dependent Self-assembly Process and Drug Solubility. **Polymers**, v. 10, n. 1, p. 105, 2018.

LEE, M. Y. Essential Oils as Repellents against Arthropods. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

LEITE, A. M. et al. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 121–126, 2007.

LI, J.; HE, J.; HUANG, Y. Role of alginate in antibacterial finishing of textiles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 466–473, 2017.

LI, L.-L. et al. Self-assembled nanomaterials: design principles, the nanostructural effect, and their functional mechanisms as antimicrobial or detection agents. **Materials Horizons**, p. 1794–1811, 2019.

LI, W.-R. et al. Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. [s.d.].

LI, W. R. et al. Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 16, p. 7483–7492, 2013.

LIS, M. et al. Smart and Biofunctional Textiles : An Alternative for Vehiculation of Active Principles. n. March, 2019.

LIS, M. J. et al. Inclusion complexes of citronella oil with β -cyclodextrin for controlled release in biofunctional textiles. **Polymers**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2018.

LIU, J. et al. Study on the grafting of chitosan–gelatin microcapsules onto cotton fabrics and its antibacterial effect. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 109, p. 103–108, 2013.

LIU, S.; SUN, G. **Bio-functional textiles**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2011.

LÓPEZ, A. et al. Production and Evaluation of Antimicrobial Microcapsules with Essential Oils Using Complex Coacervation. v. 12, n. 8, p. 377–390, 2019.

LUCIA, A. et al. Novel polymeric micelles for insect pest control: Encapsulation of essential oil monoterpenes inside a triblock copolymer shell for head lice control. **PeerJ**, v. 2017, n. 4, p. 1–19, 2017.

MAESTÁ BEZERRA OSCAR GARCIA CARMONA CARLOS GARCIA CARMONA MANUEL JOSÉ LIS, F. Controlled release of microencapsulated citronella essential oil on cotton and polyester matrices. **Cellulose**, v. 23, [s.d.].

MAN, W. S.; KAN, C. W.; NG, S. P. The use of atmospheric pressure plasma treatment on enhancing the pigment application to cotton fabric. **Vacuum**, v. 99, p. 7–11, 2014.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. 2016.

MARTINS, I. M. et al. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. 2014.

MATHER, R. R. **Surface modification of textiles by plasma treatments**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2009.

NAKAHARA, K. et al. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 37, n. 4, p. 249–252, 2003.

NATRAJAN, D. et al. Formulation of essential oil-loaded chitosan-alginate nanocapsules. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 560–568, 2015.

NAZZARO, F. et al. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 1–20, 2017.

NURUL HIDAYAH, A. et al. Hidayah et al : Bacteriostatic and Bacterisida Effect on MRSA CORRELATION BETWEEN THE BACTERIOSTATIC AND BACTERICIDE EFFECT WITH ANTIBIOFILM AND ANTICOLONY SPREADING FROM JAVANESE CITRONELLA OIL ON METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Fol Med Indones**, v. 55, n. 1, p. 1–9, 2019.

O'BRIEN, J. et al. *Sefa*. v. 5426, p. 5421–5426, 2000.

OLIVEIRA, S. A. et al. Binary micellar solutions of poly(ethylene oxide)-poly(styrene oxide) copolymers with Pluronic® P123: Drug solubilisation and cytotoxicity studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 11, p. 2195–2204, 2015.

PANDIYARAJ, K. N.; SELVARAJAN, V. Non-thermal plasma treatment for hydrophilicity improvement of grey cotton fabrics. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 199, n. 1, p. 130–139, 2008.

PARIZE, A. L. et al. Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray drying. **Quimica Nova**, v. 35, n. 6, p. 1127–1132, 2012.

PEPIĆ, I.; FILIPOVIĆ-GRČIĆ, J.; JALŠENJAK, I. Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 327, n. 1–3, p. 95–102, 2008.

PRYSIAZHNYI, V. et al. Silver incorporation on viscose and cotton fibers after air, nitrogen and oxygen DBD plasma pretreatment. **Cellulose**, v. 20, n. 1, p. 315–325, 2013.

QUANXIANG, M. N.; AYSU, L.; DENNING, O. R. Investigation of chitosan adsorption onto cotton fabric with atmospheric helium/oxygen plasma pre-treatment. **Cellulose**, v. 23, [s.d.].

RADITOIU, V. et al. **Application of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for the Study of Cultural Heritage Artifacts**. Communications in Computer and Information Science. **Anais...**Springer Verlag, 2019

RADÜNZ, M. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. **Food Chemistry**, v. 276, p. 180–186, 15 mar. 2019.

RAFIEE, A. et al. Comparison of chitosan, alginate and chitosan/alginate nanoparticles with respect to their size, stability, toxicity and transfection. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 5, p. 372–377, out. 2014.

RAI, M. et al. Bioactivity of noble metal nanoparticles decorated with biopolymers and their application in drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, p. 159–172, 2015.

RAŽIĆ, S. E. et al. **Plasma effect on the chemical structure of cellulose fabric for modification of some functional properties**. Procedia Engineering. **Anais...**Elsevier Ltd, 2017

REVERCHON, E; ADAMI, R. Nanomaterials and supercritical fluids. **Journal of supercritical fluids**, v. 37, p. 1–22, 2006.

RODRÍGUEZ, J. et al. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. 2016.

SACCO, P. et al. Insight into the ionotropic gelation of chitosan using tripolyphosphate and pyrophosphate as cross-linkers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 476–483, nov. 2016.

SAKULKU, U. et al. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p. 105–111, 2009.

SANKARIKUTTY, B.; NARAYANAN, C. S. ESSENTIAL OILS | Isolation and Production. In: **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. [s.l.] Elsevier, 2003. p. 2185–

2189.

SARKIC, A.; STAPPEN, I. Essential oils and their single compounds in cosmetics-a critical review. **Cosmetics**, v. 5, n. 1, p. 1–21, 2018.

SENDRA, E. Essential Oils in Foods: From Ancient Times to the 21st Century. **Foods**, v. 5, n. 4, p. 43, 2016.

SHAHID-UL-ISLAM; BUTOLA, B. S.; VERMA, D. Facile synthesis of chitosan-silver nanoparticles onto linen for antibacterial activity and free-radical scavenging textiles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 1134–1141, 15 jul. 2019.

SHAO, Y. et al. Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 193, n. March, p. 144–152, 2018.

SHU, S. et al. Polyelectrolyte nanoparticles based on water-soluble chitosan-poly(l-aspartic acid)-polyethylene glycol for controlled protein release. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 10, p. 1197–1204, 2009.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. **The bacterial cell envelope. Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 2010.

SILVA et al. Multifunctional Chitosan/Gold Nanoparticles Coatings for Biomedical Textiles. **Nanomaterials**, v. 9, n. 8, p. 1064, 2019.

SILVA, C. F. et al. Extraction of citronella (*Cymbopogon nardus*) essential oil using supercritical CO₂: Experimental data and mathematical modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 2, p. 343–350, 2011.

SILVEIRA, S. M. DA et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1300–1306, 2012.

SIMIC, A. et al. Essential oil composition of *Cymbopogon winterianus* and *Carum carvi* and their antimicrobial activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 6, p. 437–441, 2008.

SPARAVIGNA, A. **Plasma treatment advantages for textiles**. [s.l: s.n.].

SUSAN, A. I.; WIDODO, M.; NUR, M. Corona Glow Discharge Plasma Treatment for Hydrophobicity Improvement of Polyester and Cotton Fabrics. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 214, n. 1, 2017.

SZULC, J. et al. Low temperature plasma for textiles disinfection. 2017.

TAGLIARI, M. P. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana e alginato de sódio para incorporação de ácido glicirrízico, ácido salicílico ou cafeína visando liberação

tópica. p. 1–229, 2012.

TAGLIARI, M. P. et al. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1228–1232, 2012.

TAROQ, A. et al. Cymbopogon Nardus L. Essential Oil Phytochemical Screening and its Antibacterial Activity against Clinical Bacteria Responsible for Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care. v. 50, n. 03, p. 14–17, 2018.

TIMILSENA, Y. P. et al. Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review. 2017.

VASCONCELOS, T. B. et al. β -citronellol, an alcoholic monoterpene with inhibitory properties on the contractility of rat trachea. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 2, 2016.

VELMURUGAN, P. et al. Encapsulation of orange and lavender essential oils in chitosan nanospherical particles and its application in leather for aroma enrichment. **Surfaces and Interfaces**, v. 9, n. June, p. 124–132, 2017.

VIEIRA, A. I. et al. Edible coatings enriched with essential oils on apples impair the survival of bacterial pathogens through a simulated gastrointestinal system. **Foods**, v. 8, n. 2, 2019.

VINISHA RANI, K.; SARMA, B.; SARMA, A. Plasma treatment on cotton fabrics to enhance the adhesion of Reduced Graphene Oxide for electro-conductive properties. **Diamond and Related Materials**, v. 84, n. March, p. 77–85, 2018.

VOGT STHER, H. et al. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. 2008.

WALENTOWSKA, J.; FOKSOWICZ-FLACZYK, J. Thyme essential oil for antimicrobial protection of natural textiles. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 84, p. 407–411, 2013.

WANG, J. et al. Fabrication of sustained-release and antibacterial citronella oil-loaded composite microcapsules based on Pickering emulsion templates. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 25, 5 jul. 2018.

WANKA, G.; HOFFMANN, H.; ULBRICHT, W. Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)-Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions. **Macromolecules**, v. 27, n. 15, p. 4145–4159, jul. 1994.

WU, C. et al. Edible coating from citrus essential oil-loaded nanoemulsions:

Physicochemical characterization and preservation performance. **RSC Advances**, v. 6, n. 25, p. 20892–20900, 2016.

XU, Y. et al. Selective protein complexation and coacervation by polyelectrolytes. 2016.

YANG, JISHENG; HAN, SUYA; ZHENG, HAICHENG; DONG, HONGBIAO; LIU, J. Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 53–66, 2015.

YANG, J. et al. Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 53–66, 2015.

YEGIN, Y. et al. Development and characterization of geraniol-loaded polymeric nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne bacterial pathogens. **Journal of Food Engineering**, v. 170, p. 64–71, 2015.

ZAHID, M. et al. **Environmentally benign non-wettable textile treatments: A review of recent state-of-the-art** **Advances in Colloid and Interface Science** Elsevier B.V., , 1 ago. 2019.