

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

GUILHERME EVALDT ROSSA

EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL DE PIPER HISPIDINERVUM E PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO  
E NANOCÁPSULAS: EXPERIMENTOS E MODELAGEM  
Porto Alegre  
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul



**EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *PIPER  
HISPIDINERVUM* E PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO E  
NANOCÁPSULAS: EXPERIMENTOS E MODELAGEM**

**GUILHERME EVALDT ROSSA**

ENGENHEIRO QUÍMICO

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA E  
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

**Porto Alegre**

**Março, 2019**



## EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL DE Piper hispidinervum E PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO E NANOCÁPSULAS: EXPERIMENTOS E MODELAGEM

**CANDIDATO: GUILHERME EVALDT ROSSA**

Esta Tese de Doutorado foi julgada para obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**DR. EDUARDO CASSEL - ORIENTADOR**

**DR. RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS - CO-ORIENTADOR**

### BANCA EXAMINADORA

**DRA. ADRIANA RAFFIN POHLMANN - UFRGS**

**DRA. LILIANA AMARAL FÉRIS - DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA - UFRGS**

**DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA - PUCRS**

*Perceber que a vida realmente tem um sentido é perceber também que somos úteis uns aos outros. Ser um ser humano é trabalhar por algo além de si mesmo.*

*(Viktor Frankl)*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

À toda equipe do Laboratório de Operações Unitárias (LOPE), que nesses 8 anos de convivência contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Os momentos que passamos juntos, de dedicação e descontração, sempre tornou o ambiente desse laboratório tão especial. Tenho muito orgulho de dizer que todos contribuíram para construção deste trabalho, e agradeço, em especial, ao Rafael Nolibos Almeida e ao Arthur Fagundes Cavassa pela contribuição direta.

Aos meus orientadores Eduardo Cassel e Rubem Mário Figueiró Vargas que me acompanham desde a graduação e sempre me incentivaram e acreditaram em mim. Sempre irei lembrar, com muito carinho, do tempo que trabalhamos juntos, obrigado por tudo.

Agradeço também aos professores Eduardo Dellacasa e Nara Basso pelas contribuições.

À CAPES pela bolsa de estudo.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>3</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>7</b>
<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1. Objetivos Específicos .....	17
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
3.1. Óleos Essenciais.....	19
3.2. Pimenta Longa e seu Óleo Essencial .....	21
3.3. Métodos de Extração de Óleos Essenciais.....	25
3.4. Modelagem Matemática do Processo Extrativo de Óleos Essenciais .....	26
3.5. Destilação em Bateladas de Óleos Essenciais.....	28
3.6. Nanoemulsão de Óleos Essenciais .....	32
3.7. Nanoencapsulação de Óleos Essenciais .....	33
3.7.1. Nanoprecipitação .....	36
3.7.2. Coacervação simples ou complexa.....	37
3.7.3. Spray Drying .....	37
3.8. Atividade ixodida e sua importância no setor agropecuário.....	38
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
4.1. Preparo da Matéria Prima .....	40
4.2. Obtenção do Óleo Essencial .....	40
4.2.1. Avaliação da porosidade do leito ao longo do processo extrativo ....	43
4.2.2. Modelagem matemática do processo de extração.....	44
4.3. Análise da Composição Química do Óleo.....	46
4.4. Fracionamento do óleo essencial da pimenta longa.....	47

4.4.1. Projeto e montagem estrutural da coluna de destilação .....	47
4.4.2. Metodologia e obtenção de parâmetros de processo da coluna de destilação .....	50
4.4.3. Simulação computacional do processo de destilação em batelada ..	51
4.4.4. Fracionamento do óleo essencial da pimenta-longa .....	52
4.5. Nanoemulsão do óleo essencial da pimenta longa.....	53
4.6. Nanoencapsulação do óleo essencial da pimenta longa.....	55
4.7. Avaliação do perfil da evaporação do óleo essencial de pimenta-longa nanoencapsulado em policaprolactona .....	57
4.7.1. Modelagem Matemática do Processo de Evaporação do Óleo Essencial.....	59
4.7.2. Determinação da difusividade mássica do óleo essencial da pimenta longa no ar .....	62
4.7.3. Determinação da constante de Henry .....	64
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>66</b>
5.1. Obtenção do óleo essencial de <i>Piper hispidinervum</i> .....	66
5.2. Análise da composição química do óleo essencial de Pimenta longa.....	69
5.3. Fracionamento do óleo essencial de pimenta longa.....	78
5.3.1. Obtenção de parâmetros de processo da coluna de destilação .....	59
5.3.2. Simulação computacional do processo de destilação em batelada ...	59
5.3.3. Fracionamento experimental do óleo essencial da pimenta-longa ....	59
5.4. Nanoemulsão do óleo essencial da pimenta longa.....	78
5.5. Nanoencapsulação do óleo essencial da pimenta longa.....	81
5.6. Avaliação do perfil de evaporação do óleo essencial de pimenta-longa nanoencapsulado em policaprolactona .....	86
5.7. Considerações finais .....	86
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>94</b>
<b>7 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>95</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>96</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura molecular de alguns tipos de terpenos encontrados em óleos essenciais: (A1, A2, A3, A4) Monoterpenos; (B1, B2) Sesquiterpenos; (C1) Diterpeno; (D1) Triterpeno; (E1) Tetraterpeno .	20
Figura 3.2. <i>Piper Hispidinervum</i>	22
Figura 3.3. Estrutura e formula química dos compostos majoritários presentes no óleo essencial da pimenta longa	22
Figura 3.4. Fluxograma de processo da destilação por arraste a vapor: [1] – Caldeira; [2] – Vaso Extrator; [3] – Condensador; [4] – separador líquido-líquido.	26
Figura 3.5. Diagrama genérico do processo de destilação em batelada. (Almeida, 2016).	29
Figura 3.6. Perfil da composição de topo de um processo de destilação hipotético (Almeida, 2016).	30
Figura 3.7- Etapas para simulação do processo de destilação fracionada de óleos essenciais (Almeida, 2016).	32
Figura 4.1- Unidade Piloto de Destilação por Arraste a Vapor	41
Figura 4.2. Fluxograma da unidade de destilação por arraste a vapor: [T] – Sensor de temperatura; [P] – Sensor de pressão; [N] – Sensor de nível; [1] – Caldeira; [2] – Vaso Extrator; [3] –Trocador de calor; [4] – Separador líquido-líquido.	42
Figura 4.3. Software de monitoramento da unidade piloto de destilação por arraste a vapor.	42
Figura 4.4. Metodologia aplicada para o processo de fracionamento do óleo essencial de pimenta longa.	47
Figura 4.5. Coluna de destilação em batelada (A) e tanque de acúmulo no topo da coluna (B).	49
Figura 4.6. Vidraria de duas pontas (A) e frasco de coleta das frações (B).	49
Figura 4.7. Célula de Arnold	58
Figura 5.1 Variação da altura do leite com o tempo de extração.	68

Figura 5.3: Cromatograma do óleo essencial da pimenta longa. ....	70
Figura 5.4: Curva de calibração para o padrão de safrol .....	72
Figura 5.5: Curva de calibração para o padrão de terpinoleno.....	72
Figura 5.6: Coluna de destilação finalizada.....	73
Figura 5.7: Curva de calibração para mistura acetona/etanol .....	74
Figura 5.8: Imagens geradas pelo JCOSMO para visualização da distribuição de cargas. ....	75
Figura 5.9: Temperatura de topo por tempo de destilação: simulação computacional (linha contínua); dados experimentais (marcação).....	76
Figura 5.10: Fração mássica do destilado por tempo de destilação: simulação computacional e dados experimentais .....	76
Figura 5.11: Distribuição do tamanho das gotículas por DLS avaliadas ao longo de 5 meses.....	79
Figura 5.12. Resultados das análises espectrofotométricas com varredura para o óleo essencial de pimenta-longa: (A) concentração de 0,05 mg/mL; (B) concentração de 0,025 mg/mL; (C) concentração de 0,0125 mg/mL.....	80
Figura 5.13: Curva de calibração da concentração do óleo essencial de pimenta-longa versus absorvância .....	81
Figura 5.14: Distribuição do tamanho das partículas para as nanopartículas de policaprolactona contendo o óleo essencial de pimenta-longa, preparadas com diferentes razões mássica polímero/óleo e analisadas por espalhamento de luz dinâmica (DLS) .....	81
Figura 5.15 - Distribuição do tamanho do diâmetro hidrodinâmico das partículas formadas para cada amplitude aplicada na sonda .....	84
Figura 5.16 - Morfologia das partículas obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEG-FEG).....	84
Figura 5.17 - Análise por TG-DTA do limoneno.....	84
Figura 5.18 - Análise por TG-DTA do eucalipitol .....	84

Figura 5.19: Análise por TG-DTA do óleo essencial de pimenta longa. ....	88
Figura 5.20. Dados do equilíbrio líquido-vapor do óleo essencial de pimenta-longa livre nanoemulsionado (a) e do óleo essencial de pimenta-longa encapsulado em policaprolactona (b).....	89
Figura 5.21: Dados experimentais e modelagem matemática do perfil de evaporação do óleo essencial de pimenta longa .....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Classificação dos terpenos de acordo com o número de unidades de isopreno (Marriott et al., 2001). .....	20
Tabela 3.2 – Resultados obtidos para atividade ixodocida frente a larvas de <i>Hyalomma lusitanicum</i> (Cassel et al., 2016). .....	23
Tabela 3.3 – Análise do efeito sinérgico dos composto majoritários presente no óleo essencial da <i>Piper Hispidinervum</i> (Cassel et al., 2016). .....	24
Tabela 3.4 – Publicações científicas relacionadas ao processo de encapsulação de OE .....	35
Tabela 4.1 – Classificação do Coeficiente de variação (CV) segundo Ferreira et al. (1991). .....	54
Tabela 4.2. Formulações preparadas para nanoencapsulação do óleo essencial de pimenta-longa.....	56
Tabela 5.1 – Análise do efeito sinérgico dos composto majoritários presente no óleo essencial da <i>Piper Hispidinervum</i> (Cassel et al., 2016). .....	24
Tabela 5.2: Parâmetro empírico $\beta$ utilizado no cálculo da porosidade pela Equação 4.7, obtido a partir de dados experimentais da variação da altura do leito.	67
Tabela 5.3: Parâmetros estimados pelo modelo matemático do processo de extração por arraste a vapor. ....	69
Tabela 5.4: Resultados da análise por CG/EM do óleo essencial da pimenta longa	71
Tabela 5.5: % em massa de safrol e terpinoleno presente no óleo essencial da pimenta longa.....	73
Tabela 5.6: Frações obtidas no processo de destilação em batelada do óleo essencial de pimenta.....	77
Tabela 5.7: Resultados da análise por espalhamento de luz dinâmica DLS para as formulações das nanopartículas de policaprolactona contendo o óleo essencial de pimenta-longa.....	82
Tabela 5.8: Eficiência no processo de encapsulação do óleo essencial de pimenta longa em nanopartículas de policaprolactona .....	85

Tabela 5.9: Constante de Henry para nanoemulsão e para as nanoparticulas.....90

## RESUMO

IVALDT ROSSA, Guilherme. **Extração e fracionamento de óleo essencial de *Piper hispidinervum* e produção de nanoemulsão e nanocápsulas: experimentos e modelagem.** Porto Alegre. 2019. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A pimenta-longa (*Piper hispidinervum*) é um arbusto da família Piperaceae encontrada em grande quantidade no vale do rio Acre. Estudos com o óleo essencial desta planta comprovam sua atividade amebicida diante do *Acanthamoeba polyphaga*, atividade nematicida frente à *Meloidogyne javanica* e atividade carrapaticida frente a larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Apesar destas propriedades promissoras, a alta volatilidade, a baixa solubilidade em água e a suscetibilidade à degradação por agentes físicos e químicos podem comprometer a atividade biológica dos óleos essenciais, fomentando assim o estudo sobre novas formas de aplicação, encapsulação e liberação controlada, e de proteção dos seus constituintes ativos. O objetivo geral deste trabalho é realizar a extração e o fracionamento do extrato volátil da *Piper hispidinervum* e a produção de nanoemulsão e nanoencapsulas com posterior estudo de liberação. A etapa extração por arraste a vapor concluiu que o efeito da variação da pressão de operação não variou significativamente o rendimento do processo e a composição do óleo essencial e o fracionamento do óleo essencial teve como resultado a obtenção de frações com diferentes composições dos compostos majoritários safrol e terpinoleno. As nanoemulsões preparadas apresentaram uma boa estabilidade e as nanocápsulas de policaprolactona contendo o OE de pimenta-longa obtiveram resultados satisfatórios quanto ao índice de polidispersão, tamanho de partícula e eficiência de encapsulação. Os perfis de evaporação da nanoemulsão e das nanocápsulas indicaram que a alteração na volatilidade do óleo essencial promovida pelo revestimento físico das nanocápsulas foi muito pequena e a modelagem matemática proposta apresentou uma boa representação dos dados experimentais

Palavras-Chaves: *Piper hispidinervum*, nanoencapsulação, nanoemulsão.

## ABSTRACT

IVALDT ROSSA, Guilherme. **Extraction and fractionation of essential oil of *Piper hispidinervum* and production of nanoemulsion and nanocapsules: experiments and modeling.** Porto Alegre. 2018. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

The *Piper hispidinervum* is a shrub of the family Piperaceae found in great quantity in the valley of the river Acre. The essential oil of this plant demonstrate its amebicidal activity against *Acanthamoeba polyphaga*, nematocidal activity against *Meloidogyne javanica* and carrapaticidal activity against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* larvae. Despite these promising properties, high volatility, low solubility in water and susceptibility to degradation by physical and chemical agents can compromise the biological activity of essential oils, thus promoting the study of new forms of application, encapsulation and controlled release, and protection of its active constituents. The objective of this work is to perform the extraction and fractionation of the volatile extract of *Piper hispidinervum* and the production of nanoemulsion and nanocapsules with subsequent release study. The extraction step concluded that the effect of the change in operating pressure did not significantly change the yield of the process and the composition of the essential oil. The fractionation of the essential oil resulted in the obtaining of fractions with different compositions of the safrol and terpinolene. The nanoemulsions had good stability and the polycaprolactone nanocapsules obtained satisfactory results in terms of particle size and encapsulation efficiency. The evaporation profiles of the nanoemulsion and nanocapsules indicated that the change in the volatility of the essential oil promoted by the physical coating of the nanocapsules was very small and the proposed mathematical model presented a good representation of the experimental data

Key-words: *Piper hispidinervum*, nanoencapsulation, nanoemulsion

## 1. INTRODUÇÃO

A pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC) é um arbusto da família Piperaceae encontrado em abundância no vale do rio Acre. O seu óleo essencial (OE) apresenta comprovada atividade antifúngica diante de fungos fitopatogênicos como *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides* (Zacaroni et al., 2009), bem como atividade inseticida, diante de larvas do *Tenebrio molitor* e *Spodoptera frugiperda*. (Fazolin et al., 2007; Lima et al., 2009; Nascimento et al., 2008) atividade amebicida diante do *Acanthamoeba polyphaga* (Sauter et al., 2012), atividade nematocida contra *Meloidogyne javanica* (Andrés et al., 2017) e atividade ixodicida frente a larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Cassel et al., 2016).

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é considerado o mais importante ectoparasita pela indústria agropecuária mundial, encontrado em zonas tropicais e subtropicais dos países da América Latina, África, Ásia e Oceania, sendo responsável no Brasil por uma perda anual de estimados 7,11 bilhões de dólares (Grisi et al., 2014; Calligaris et al., 2013; Cruz et al., 2015). O uso exagerado de produtos ixodicidas sintéticos, com diferentes mecanismos de ação, gerou a seleção natural de carrapatos resistentes para diferentes classes destes produtos, tornando promissor o uso de métodos para o controle de carrapatos no setor agropecuário sem a utilização de produtos ixodicidas sintéticos. Diante deste contexto, os compostos acaricidas fitoquímicos, como, por exemplo, óleos essenciais, pode representar uma ferramenta útil para o controle deste ectoparasita.

De maneira geral, os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, apresentando instabilidade na presença de ar, luz, calor, umidade e metais. Pela capacidade de conservação e conhecida ação antibacteriana, antifúngica e antiviral, os OEs são utilizados nas

indústrias de alimentos, de perfumaria e cosméticos, na agricultura e também em tratamentos de patologias (Bakkali et al., 2008).

Apesar destas propriedades promissoras, a alta volatilidade, a baixa solubilidade em água e a suscetibilidade à degradação por agente físicos (luz UV, temperatura, pH) e químicos (ar, umidade) podem comprometer a atividade biológica dos óleos essenciais. Portanto, processos que envolvem a produção de nanoemulsão ou nanoencapsulação dos OEs vêm sendo investigada a fim de promover a proteção contra degradação e modulação da liberação dos seus constituintes ativos, prolongando o tempo de permanência destes compostos no meio de ação por evitar sua volatilização e proporcionando uma melhor distribuição quanto a sua concentração (Asbahani et al., 2015).

Nanoemulsão pode ser caracterizada como uma dispersão coloidal de gotículas de óleo com tamanho inferior a 500 nm, as quais estão dispersas em um meio aquoso. A formulação de nanoemulsões de óleos essenciais é realizada objetivando aprimorar a estabilidade dos seus constituintes ativos, tornando-os dispersos em água de maneira homogênea e em concentrações adequadas para sua aplicação (Prakash et al., 2018), enquanto que a micro ou nanoencapsulação é um processo de revestimento físico no qual substâncias chamadas de núcleo ativo (pequenas partículas sólida, gotículas líquidas ou um gás) são cercadas por um agente encapsulante com o objetivo de isolar parcialmente ou completamente os núcleos ativos na forma de cápsulas. As principais metas desse procedimento são controlar o núcleo ativo quanto a sua liberação, evitar reações de oxidação, reduzir sua volatilidade e reatividade e aumentar sua estabilidade sob condições ambientais adversas, como a presença de luz, oxigênio ou em meios com pH extremos (Silva et al., 2014).

Neste contexto, este trabalho tem como proposta realizar a nanoemulsão e nanoencapsulação do óleo essencial de pimenta-longa a fim de avaliar a liberação de seus constituintes ativos presente no OEs com atividade carrapaticida e assim viabilizar sua aplicação. Além disso, o trabalho visa percorrer as etapas de obtenção do óleo essencial por destilação por arraste a vapor, aprimorando o estudo da extração para o óleo essencial da pimenta-longa, bem como realizar o fracionamento

do óleo obtido por destilação em batelada, visando à obtenção de frações com diferentes composições, já que foi demonstrado em estudos prévios que a proporção dos componentes majoritários do óleo essencial da pimenta-longa (safrol e terpinoleno) é uma variável que influi na atividade biológica deste extrato volátil (Andres et al., 2017).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é a extração e o fracionamento do extrato volátil da *Piper hispidinervum* e a produção de nanoemulsão e nanoencapsulas com posterior estudo de liberação.

### 2.1. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Obter o óleo essencial de pimenta-longa por arraste a vapor em diferentes condições de pressão e realizar a modelagem matemática do processo extrativo.
- Identificar os compostos presentes nos OEs obtidos por CG/EM.
- Obter frações do óleo essencial da pimenta-longa por destilação a vácuo em batelada e realizar a simulação computacional do processo de fracionamento.
- Preparar uma nanoemulsão contendo o óleo essencial de pimenta-longa através da metodologia de dispersão e evaporação de solvente e avaliar sua estabilidade.
- Realizar o processo de nanoencapsulação do óleo essencial de pimenta-longa com policaprolactona através da metodologia de nanoprecipitação e caracterizar as partículas obtidas quanto sua morfologia e tamanho por microscopia eletrônica de varredura e Zetasizer.

- Analisar a eficiência de encapsulação por espectrofotometria e estabelecer a melhor proporção óleo essencial/polímero no processo de nanoprecipitação.
- Avaliar o perfil de liberação e realizar a modelagem matemática do processo de evaporação do óleo essencial da pimenta-longa nanoemulsionado e para o produto nanoencapsulado em policaprolactona.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são compostos presentes no metabolismo vegetal e são constituídos geralmente por hidrocarbonetos terpênicos, podendo estar associados a outros componentes como álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos e até compostos com enxofre. Podem ser extraídos de folhas, cascas, flores, frutos e rizomas, apresentando uma solubilidade limitada em água e totalmente solúvel em solventes orgânicos (Czepak e Bandoni, 2008; Simões, 2007). De forma geral, os OEs são misturas complexas de compostos voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, apresentando instabilidade na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (Simões, 2007).

A estrutura química base dos constituintes presentes nos óleos essenciais parte da molécula do isopreno  $[(C_5H_8)_n]$ , onde o subíndice  $n$  representa o número de moléculas do isopreno que forma o esqueleto dos terpenos. A Figura 3.1 apresenta alguns tipos de terpenos comumente encontrados em óleos essenciais, onde em sua grande maioria possui menos que 20 carbonos. Estes podem ser classificados quanto ao número de unidades de isopreno, como apresentado na Tabela 3.1 (Marriot et al., 2001).

Na natureza, os óleos essenciais apresentam papel importante na proteção das plantas, agindo contra herbívoros, como agentes antimicrobianos e como inseticidas. Pela capacidade de conservação e conhecida ação antibacteriana, antifúngica e antiviral, os óleos essenciais são utilizados nas indústrias de alimentos, de perfumaria e cosméticos, na agricultura e também em tratamentos de patologias (Bakkali et al., 2008).

Tabela 3.1. Classificação dos terpenos de acordo com o número de unidades de isopreno (Marriott et al., 2001).

Átomos de Carbono	Unidade de Isopreno	Classificação
10	2	Monoterpenos
15	3	Sesquiterpenos
20	4	Diterpenos
25	5	Sesterpenos
30	6	Triterpenos
40	8	Tetraterpenos

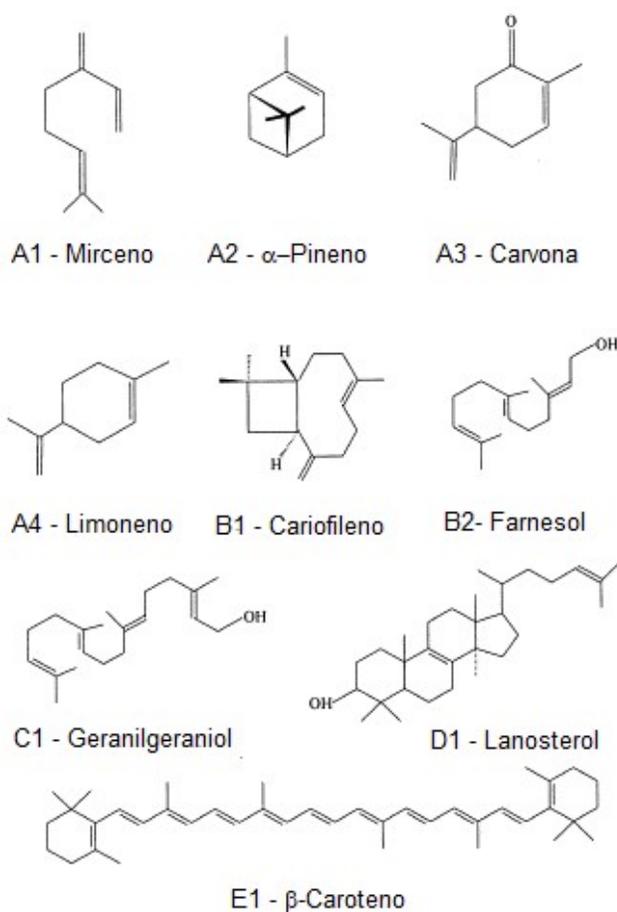


Figura 3.1. Estrutura molecular de alguns tipos de terpenos encontrados em óleos essenciais: (A1, A2, A3, A4) Monoterpenos; (B1, B2) Sesquiterpenos; (C1) Diterpeno; (D1) Triterpeno; (E1) Tetraterpeno (Marriott et al., 2001).

Apesar destas propriedades promissoras, a alta volatilidade e baixa solubilidade em água podem afetar a eficácia na aplicação dos óleos essenciais, devido ao reduzido tempo de permanência destes compostos ativos e distribuição

heterogênea de sua concentração no meio a ser aplicado. Portanto, muitos estudos estão sendo realizados sobre técnicas de micro/nanoemulsão ou micro/nanoencapsulação, a fim de promover a proteção e a modulação da liberação de constituintes ativos presentes nos óleos essenciais, transformando produtos líquidos e voláteis em forma sólida ou gel (Castangia et al., 2015).

### **3.2. Pimenta-Longa e seu Óleo Essencial**

O gênero *Piper* (Piperaceae) possui mais de 700 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais. Muitas dessas espécies possuem alto valor comercial devido às propriedades do seu óleo essencial, caracterizado como uma fonte de metabólitos secundários bioativos com aplicabilidade no setor alimentício e farmacêutico (Sauter et al., 2012).

A pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC) é um arbusto da família Piperaceae, encontrada em abundância no vale do rio Acre (Figura 3.2). Esta espécie possui uma capacidade alta de regeneração, podendo rebrotar após o corte. O interesse por esta planta foi despertado por parte das indústrias de cosméticos e inseticidas devido ao safrol presente no óleo essencial (Wadt, 2004).

Estudos realizados por Sauter e colaboradores (2012) indicam que o óleo essencial possui uma composição com aproximadamente 85% em safrol. Essa substância concentra-se principalmente nas folhas e nos ramos secundários, podendo ser extraída por processo de hidrodestilação, assim como por arraste a vapor. Terpinoleno é o segundo composto majoritário presente, com aproximadamente 6% da composição. A Figura 3.3 apresenta a estrutura molecular e fórmula química desses compostos.



Figura 3.2. *Piper hispidinervum*

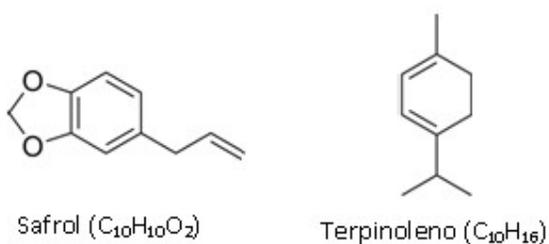


Figura 3.3. Estrutura e formula química dos compostos majoritários do óleo essencial da pimenta-longa

Na literatura, o óleo essencial (OE) da pimenta-longa é apresentado em estudos que comprovam sua atividade antifúngica diante de fungos fitopatogênicos como *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides* (Zacaroni et al., 2009), bem como atividade inseticida, diante de larvas do *Tenebrio molitor* e *Spodoptera frugiperda* (Fazolin et al., 2007; Lima et al., 2009; Nascimento et al., 2008) atividade amebicida diante do *Acanthamoeba polyphaga* (Sauter et al., 2012) e atividade nematocida contra *Meloidogyne javanica* (Andrés et al., 2017).

Um estudo realizado por Cassel e colaboradores (2016) avaliou o efeito do óleo essencial da pimenta-longa na atividade ixodicida frente a larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, utilizando o óleo essencial extraído em diferentes pressões (1,0 bar, 1,5 bar e 2,0 bar), bem como o padrão puro dos compostos majoritários presentes no óleo (safrol e terpinoleno). Além disso, avaliou-se o efeito sinérgico entre safrol e terpinoleno a partir da preparação de soluções com diferentes proporções mássicas destes compostos. Como controle positivo foi utilizado Acibelte®, um produto ixodicida sintético comercial, e como controle negativo foi utilizado solvente (metanol ou acetona). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.2, comprovando a atividade ixodicida frente a larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Ademais, a partir dos resultados apresentados na Tabela 3.3 é possível observar um forte sinérgico entre os componentes, visto que a variação da concentração da mistura proporcionou uma variação da toxicidade da mesma. A mistura que apresentou os melhores resultados é a mistura 1 (Tabela 3.3), porém as misturas 2 e 3 também apresentaram resultados compatíveis com um produto ixodicida. Já o resultado apresentado pela mistura 4 corrobora esta justificativa de sinérgico, visto que uma variação na concentração dos compostos inviabiliza o uso da solução como ixodicida frente ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Tabela 3.2 – Resultados obtidos para atividade ixodicida frente a larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Cassel et al., 2016).

Óleo Essencial – pressão de extração	Quantidade ( $\mu\text{g}_{\text{amostra}}/\mu\text{g}_{\text{solução}}$ )	Mortalidade das larvas (%)
OE 2 atm	40	100.0 $\pm$ 0.0
	20	95.7 $\pm$ 1.0
	15	32.6 $\pm$ 0.3
	10	4.6 $\pm$ 0.3
OE 1,5 atm	40	100.0 $\pm$ 0.0
	20	90.3 $\pm$ 1.2
	15	60.4 $\pm$ 3.7
	10	5.0 $\pm$ 0.8
OE 1,0 atm	40	97.6 $\pm$ 0.57
	20	46.8 $\pm$ 2.1

	10	2.4 ± 2.1
Compostos Puros		
Safrol (S)	20	88.4 ± 1.18
	10	55.3 ± 1.9
	4	21.2 ± 1.0
Terpinoleno (T)	20	93.8 ± 0.9
	10	100 ± 0.0
	5	86.6 ± 1.6
	2.5	63.8 ± 3.0
	1.2	25.6 ± 0.4
	0.6	20.4 ± 2.4
Acibelte®	40	100.0 ± 0.0
	20	100.0 ± 0.0
	10	100.0 ± 0.0
Solvente		0.0 ± 0.0

Tabela 3.3 – Análise do efeito sinérgico dos composto majoritários presente no óleo essencial da *Piper hispidinervum* (Cassel et al., 2016).

Safrol(S):Terpinoleno(T): $\alpha$ - Pinen(P)*	Quantidade de produto (mg extrato/mg de celulose)	Mortalidade das larvas de <i>Rhipicephalus</i> ( <i>Boophilus</i> ) <i>microplus</i> (%)*
Mistura 1	40	100 ± 0.0
S:T:P	20	84.0 ± 2.0
9:1:1	10	21,3 ± 0.6
Mistura 2	40	100 ± 0.0
S:T:P	20	46,5 ± 1.2
16:1:2	10	17.0 ± 0.8
Mistura 3	40	91,7 ± 0,6
S:T:P	20	22,5 ± 1,1
7,5:1: 1,5	10	7,0 ± 0,8
Mistura 4	40	0.0 ± 0.0
S:T:P		
1:9: 3		

\* o  $\alpha$ -pineno somente é usado como veículo e na concentração de 5% não interfere na atividade carrapaticida do safrol + terpinoleno.

Os resultados apresentados no estudo (Cassel et al., 2016) indicam que o óleo essencial de pimenta-longa, bem como seus compostos majoritários (safrol e

terpinoleno), apresentam potencial de uso como matéria-prima na formulação de estratégias de controle de carrapatos no setor agropecuário.

### **3.3. Métodos de Extração de Óleos Essenciais**

Existem diversas técnicas para obter óleos essenciais de plantas aromáticas, cada um com diferentes especificações e necessidades de uso. A definição do método de extração a ser utilizado parte do tipo de compostos que se deseja obter, da quantidade de extrato volátil presente e de sua possível localização na planta. O método mais empregado é a destilação por arraste a vapor, entretanto outros processos como hidrodestilação, extração por fluido supercrítico, prensagem, extração com micro-ondas e extração com solventes orgânicos também são empregados (Asbahani et al., 2015).

A destilação por arraste a vapor é o método mais utilizado para obtenção de óleos essenciais devido a sua simplicidade e economia. O método é baseado nos mesmos princípios da hidrodestilação, com a diferença de não haver o contato direto do material vegetal com a água líquida em ebulição e sim com vapor d'água, reduzindo assim possíveis alterações químicas das moléculas terpênicas. Durante a extração, água e moléculas do OE formam uma mistura heterogênea no qual os compostos da mistura são destilados simultaneamente. A imiscibilidade da água com a maioria das moléculas terpênicas é uma vantagem na sua utilização como solvente, pois possibilita a separação do OE obtido por uma simples etapa de decantação após a condensação da mistura. Este processo consiste basicamente na passagem de um fluxo de vapor d'água pelo material vegetal, carregando consigo os compostos voláteis. Em seguida, a mistura vapor/óleo é introduzida em um condensador onde a mistura é liquefeita. Por fim, devido à imiscibilidade entre o OE e a água, a separação do óleo essencial pode ser realizada por decantação (Asbahani et al., 2015; Cassel et al., 2009; Guenther, 1976).

Uma unidade de destilação por arraste a vapor é constituída basicamente por uma caldeira geradora de vapor, um vaso extrator, onde é depositado o material vegetal como um leito fixo o qual deve ser depositado de forma homogênea para evitar a criação de caminhos preferenciais, um condensador para liquefazer a

mistura óleo/água e um separador líquido-líquido para separar o OE da água. O fluxograma do processo de destilação por arraste a vapor está apresentado na Figura 3.4 (Rossa et al., 2018).

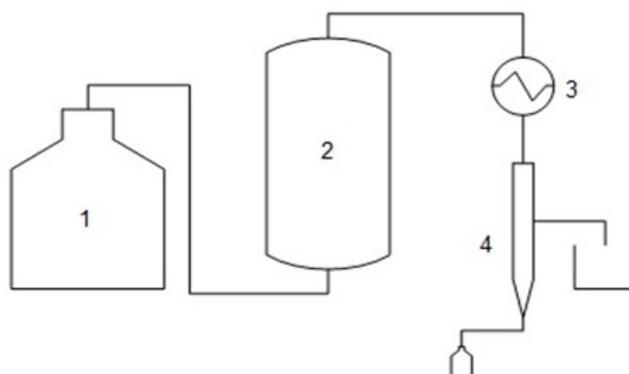


Figura 3.4. Fluxograma de processo da destilação por arraste a vapor: [1] – Caldeira; [2] – Vaso Extrator; [3] – Condensador; [4] – separador líquido-líquido.

Andrés et al. (2017) utilizaram o processo de destilação por arraste a vapor para obter óleo essencial de *Piper hispidinervum* em diferentes pressões (1,0 bar, 1,5 bar e 2 bar), avaliando o efeito desta variável de processo quanto ao rendimento de OE e quanto a sua composição química. O estudo conclui que o melhor rendimento foi obtido na pressão de 1,5 bar, não existindo diferença significativa na composição dos óleos essenciais obtidos.

### 3.4. Modelagem Matemática do Processo Extrativo de Óleos Essenciais

Em unidades industriais, a modelagem matemática é de suma importância para permitir a simulação e otimização de processos físico-químicos. Portanto, a representação matemática adequada do processo de extração de óleos essenciais é fundamental para permitir prever o comportamento dos fenômenos envolvidos no processo, reduzindo assim a necessidade de procedimentos experimentais, além de permitir estratégias alternativas para o cálculo das condições das variáveis de processo (Cassel et al., 2009).

Benyoussef et al. (2002) utilizaram um modelo matemático que considera o processo extrativo como uma dessorção irreversível do óleo essencial em água. O

modelo possui cinética de primeira ordem e assume que a difusão do óleo essencial em água é a etapa controladora e que a vaporização do óleo essencial é instantânea devido ao equilíbrio de fases formado. Entretanto existem algumas limitações associadas ao modelo proposto: só é aplicado para frutos com geometria esferoide; a difusão do óleo essencial em água se aplica para matéria-prima moída e o termo empírico estimado relacionado ao equilíbrio do óleo essencial na superfície da planta e o vapor é definido como um coeficiente de partição, sem nenhum uso de uma relação termodinâmica, sendo independente da solubilidade e da volatilidade do óleo essencial em água.

O modelo proposto por Sovová e Aleksovski (2006) considera o óleo essencial como um pseudo-componente, a difusão controla o processo e tem como parâmetro o tamanho das partículas. É assumido que o soluto possui uma distribuição inicial igual em todo o leito e que o óleo essencial está depositado na célula vegetal protegida por uma parede vegetal na qual é rompida pela passagem do solvente, deixando o óleo essencial exposto ao fluido. A temperatura e pressão são mantidas constantes ao longo do processo e o solvente é livre do soluto na entrada do extrator. Uma constante de partição é estabelecida para o equilíbrio entre o óleo essencial superficial e o vaporizado, independente da composição das fases, temperatura e da difusão.

Cassel e colaboradores (2009) desenvolveram um modelo baseado na segunda lei de Fick para transferência de massa de óleos essenciais de espécies de alecrim, manjerição e lavanda, considerando o transporte unidimensional com geometria retangular, onde os componentes presentes nos óleos essenciais a serem extraídos estão distribuídos uniformemente no interior da planta e a resistência superficial é negligenciada. O modelo matemático possui um parâmetro ajustável relacionado ao coeficiente de difusão, sendo dependente da estrutura e natureza da planta aromática (espessura da planta e quantidade inicial de óleo essencial) e assume-se que todo o óleo essencial presente na planta é extraído.

O modelo proposto por Xavier et al. (2011) dividiu o processo extrativo por arraste a vapor em duas etapas: uma etapa inicial que está associada à extração do soluto livre presente em células rompidas da planta e uma etapa final que

corresponde a difusão a partir de células intactas. Na etapa inicial é considerado que a resistência de transferência de massa por difusão é desprezível e o fator limitante do fenômeno se dá pelo equilíbrio de fases. Já a etapa final é controlada pelo processo de difusão do soluto a partir de células internas da estrutura vegetal.

O modelo matemático apresentado por Reverchon (1996) utiliza duas equações diferenciais vinculadas ao balanço material realizado na fase solvente e outro na fase sólida que constitui o leito de extração, associando este conjunto de equações diferenciais parciais a transferência de massa nessas fases. Assume-se como hipótese que a dispersão axial é negligenciável, densidade e vazão de solvente são constantes e o óleo essencial é um pseudo-componente. O modelo foi desenvolvido para estudos de extração supercrítica, mas por se tratar de um balanço material em um leito fixo, pode ser estendido ao processo de destilação por arraste a vapor. Sartor e colaboradores (2011) utilizaram o modelo e obtiveram êxito no ajuste do modelo matemático a dados experimentais relacionados à extração do óleo essencial de alecrim em escala industrial, considerando a porosidade constante ao longo de todo o processo extrativo.

### **3.5. Destilação em Bateladas de Óleos Essenciais**

O processo de destilação em bateladas é possivelmente o mais antigo método de separação de misturas líquidas. Este processo é essencialmente aplicado para produção de pequenos volumes, entretanto com alto valor agregado que represente um nicho de mercado associada à química fina (Mujtaba, 2004).

O processo de destilação consiste na separação de misturas fundamentada pela diferença de volatilidade entre os compostos presentes. O aquecimento do fundo da coluna e o resfriamento no topo promovem um gradiente de temperatura ao longo dela, onde o contato entre as fases líquida e vapor proporciona a transferência de massa e energia entre as fases, concentrando o componente mais volátil na fase vapor.

A destilação fracionada em batelada difere do processo contínuo por vaporizar ininterruptamente uma carga líquida da mistura inicial, onde o vapor de

topo é condensado e retirado. Desta forma, a mistura original é consumida dinamicamente, alterando conseqüentemente as composições ao longo da coluna conforme o consumo de cada componente. Um esquema genérico da destilação fracionada em batelada é apresentado na Figura 3.5 (Almeida, 2016).

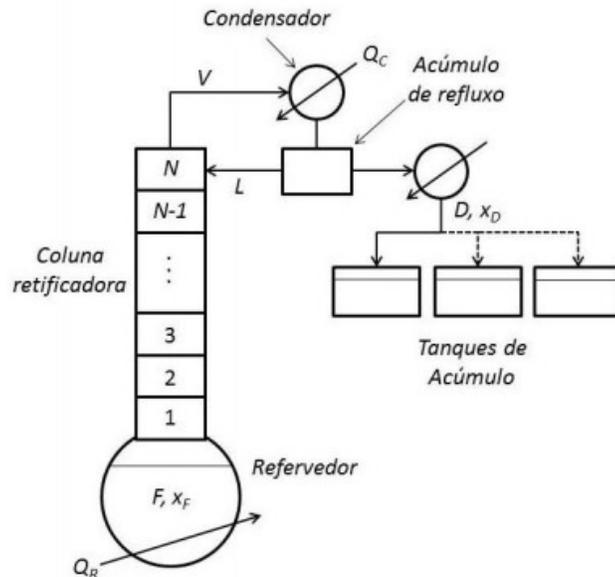


Figura 3.5. Diagrama genérico do processo de destilação em batelada. (Almeida, 2016).

Esse tipo de processo proporciona a obtenção de diferentes frações de uma determinada mistura com apenas uma operação unitária, sendo que a composição de topo varia com o tempo, possibilitando uma série de “cortes” e tornando o processo dinâmico. A Figura 3.6 apresenta curvas que representam a variação da composição de topo de um processo hipotético, onde os números representam cortes hipotéticos para diferentes composições de destilados (Almeida, 2018).

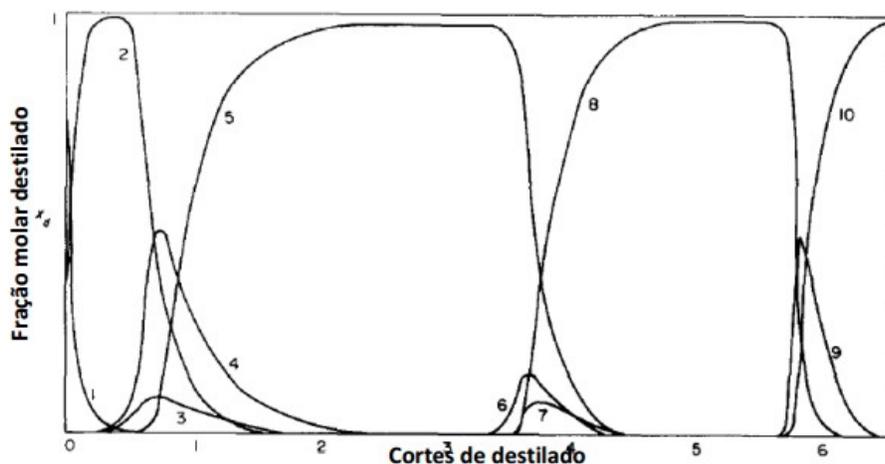


Figura 3.6. Perfil da composição de topo de um processo de destilação hipotético (Almeida, 2016).

A realização deste processo à pressão reduzida, próxima ao vácuo, é para evitar a degradação de compostos termolábeis como os compostos presentes nos OEs. Com a redução da pressão os pontos de ebulição dos compostos presentes na mistura são reduzidos em relação aos mesmos à pressão atmosférica, reduzindo a temperatura de operação necessária para o processo de separação.

Os óleos essenciais são constituídos por múltiplos compostos, que possuem grupos funcionais e aplicações diferentes. O uso da destilação batelada ganha importância já que a composição do destilado ao longo do processo em batelada varia com o tempo, possibilitando cortes enriquecidos com os compostos de interesse, podendo-se obter, em uma mesma operação, cortes com mais de um produto desejado. O fracionamento ainda pode gerar cortes com composição específica em que a relação entre componentes demonstra uma sinergia que potencializa sua aplicação (Andres et al., 2017). Andres e colaboradores, por exemplo, apresentaram um estudo do efeito sinérgico entre os compostos majoritários presente no óleo essencial da *Piper hispidinervum* (safrol e terpinoleno) na atividade nematicida contra *Meloidogyne javanica*, onde comprovam que a proporção entre esses dois componentes afeta diretamente na atividade biológica investigada.

A elaboração e validação de modelos matemáticos que simulam o processo de destilação em batelada foram inicialmente baseadas em misturas de

hidrocarbonetos derivados do petróleo, posteriormente estendida a compostos orgânicos presentes na indústria da química fina. Entretanto, no que diz respeito ao processo de fracionamento em batelada de óleos essenciais, a simulação matemática é pouco investigada, onde a natureza química dos compostos que constitui os OEs é o maior complicador por não existir na literatura referências quanto dados de equilíbrio de misturas que envolvam componentes presentes nos OEs, fundamental para aplicação dos conhecimentos em engenharia relacionados a este processo (Almeida et al., 2018).

Almeida et al. (2018) implementou um modelo matemático para simulação da destilação em batelada de óleos essenciais, onde as propriedades necessárias para cálculo do equilíbrio da mistura a ser fracionada são obtidos por modelos preditivos baseados tanto em química computacional como contribuições de grupos e relação da termodinâmica clássica. Ainda, segundo o autor, com a simulação é possível realizar a otimização do processo, sendo que, para algumas misturas, uma pequena redução no tempo total da batelada corresponde a uma considerável redução nos custos operacionais, tendo vista a alta demanda energética vinculada.

O simulador do processo de destilação de óleos essenciais elaborado por Almeida (2016) é baseado num modelo matemático composto basicamente pelos balanços de massa do sistema e suas relações de equilíbrio de fases, tendo as seguintes considerações: acúmulo molar constante de líquido em cada prato; acúmulo de vapor negligenciável; equilíbrio entre as fases; operação adiabática; mistura perfeita nos pratos; condensação total e sem sub-resfriamento no condensador.

Segundo Almeida (2016), a simulação do processo de destilação fracionada de óleos essenciais é realizada seguindo as etapas apresentadas na Figura 3.7, onde as três primeiras etapas estão relacionadas à obtenção de propriedades estáticas, sendo estas função apenas da temperatura e executadas apenas uma vez para cada substância envolvida. Já as duas últimas etapas, cálculos das propriedades da mistura e simulação dinâmica, ocorrem simultaneamente ao longo

da simulação de maneira dinâmica, pois as propriedades são função da composição que varia com o tempo (Almeida, 2016).

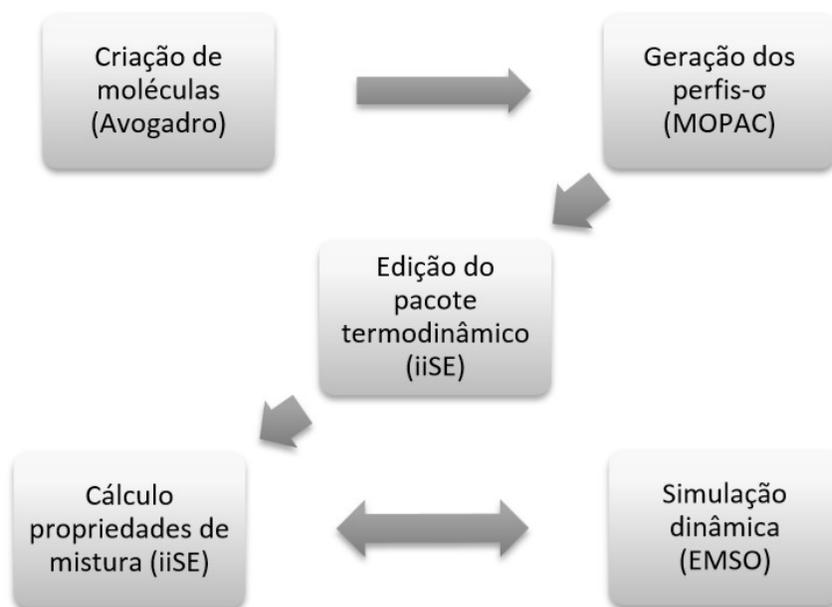


Figura 3.7- Etapas para simulação do processo de destilação fracionada de óleos essenciais (Almeida, 2016).

### 3.6. Nanoemulsão de Óleos Essenciais

Nanoemulsão consiste em uma dispersão coloidal de gotículas de óleo com tamanho inferior a 500 nm, dispersas em um meio aquoso e estabilizado por um tensoativo. Diferentemente de emulsões, as quais são termodinamicamente instáveis e naturalmente tendem a separação das fases, as nanoemulsões apresentam uma condição física de metaestabilidade, induzida pelo movimento browniano das gotículas de óleo dispersas no meio aquoso. Além disso, forças atrativas entre as gotículas tendem a diminuir em sistemas nanométricos, reduzindo a propensão ao fenômeno de coalescência (Donsi et al., 2016).

Nanoemulsões de óleos essenciais são empregadas para produzir sistemas que contêm o OE disperso de maneira homogênea em concentrações adequadas para sua aplicação. Em escala nanométrica, algumas propriedades do OE podem ser aprimoradas devido a melhor difusão dos compostos ativos através de

membranas biológicas, além de minimizar o impacto em propriedades organolépticas (Prakash et al., 2018).

Diversos estudos envolvendo nanoemulsões que utilizam diferentes óleos essenciais são encontrados na literatura, sendo, na sua grande maioria, direcionado ao setor de alimentos. O uso de nanoemulsão contendo limoneno, um composto terpênico presente majoritariamente no óleo essencial de frutas cítricas, é um exemplo de estudo realizado para avaliar a atividade *in vitro* da nanoemulsão preparada em micro-organismos patógenos (Zahi et al., 2017). Outro exemplo a ser citado é o estudo realizado por Amrutha e colaboradores (2017), onde foi avaliada a atividade antimicrobiana *in vitro* em *Escherichia coli* e *Salmonella entérica* de uma nanoemulsão contendo o óleo essencial do cominho (Prakash et al., 2018; Donsi et al., 2016).

Diferentes metodologias utilizada na preparação de nanoemulsões contendo óleo essencial são encontradas na literatura, podendo ser separadas em duas abordagens distintas, chamadas de *top down* e *bottom up*. As metodologias baseadas na abordagem *top down* consistem na redução do tamanho de gotícula do óleo por ação mecânica, necessitando fornecer uma grande quantidade de energia ao sistema para a produção da nanoemulsão. Cita-se como exemplo a homogeneização a alta pressão e a ultrasonicação. Já as metodologias baseadas na abordagem *bottom up* produzem nanoemulsões a partir da associação espontânea dos surfactantes ao redor das moléculas do óleo essencial, como, por exemplo, o método por dispersão e evaporação de solvente e o método por inversão de fases (Prakash et al., 2018; Donsi et al., 2016).

### **3.7. Nanoencapsulação de Óleos Essenciais**

Micro/nanoencapsulação é um processo de revestimento físico no qual substâncias chamadas de núcleo ativo (pequenas partículas sólidas, gotículas líquidas ou um gás) são cercadas por um agente encapsulante com o objetivo de isolar parcialmente ou completamente os núcleos ativos na forma de cápsulas. As principais metas desse procedimento são controlar o núcleo ativo quanto a sua liberação, evitar reações de oxidação, reduzir sua volatilidade e reatividade e

aumentar sua estabilidade sob condições ambientais adversas como a presença de luz, oxigênio ou em meios com pH extremos (Silva et al., 2014).

A micro/nanoencapsulação é um procedimento empregado no setor farmacêutico, visando a produção e o desenvolvimento de sistemas que possam auxiliar na biodisponibilidade de fármacos. Sistemas de liberação controlada utilizam agentes encapsulantes para modular a liberação do fármaco, proteger os agentes terapêuticos contra a degradação, superar barreiras biológicas e serem vetorizados a sítios de ação específicos, melhorando assim algumas propriedades consideradas não ideais dos medicamentos no organismo, como a baixa solubilidade, rápida decomposição e baixa biodistribuição (Lepeltier et al., 2014; Allen et al., 2004).

Os óleos essenciais possuem componentes ativos de característica volátil e de fácil degradação, quando esses estão expostos a alta temperatura ou em contato com a luz ultravioleta, comprometendo assim sua atividade biológica. Portanto, de maneira análoga a estudos de sistemas de liberação controlada de fármacos, a micro/nanoencapsulação dos EOs vem sendo investigada atualmente a fim de promover a proteção contra degradação e modulação da liberação dos seus constituintes ativos, prolongando o tempo de permeância destes compostos no meio de ação por evitar sua volatilização e proporcionar uma melhor distribuição quanto a sua concentração (Asbahani et al., 2015).

Melhorar a atividade antimicrobiana e estabilidade do óleo essencial de *Mentha piperita* encapsulada em quitosana e prolongar a liberação do óleo essencial de *Lippia sidoides* são exemplos de trabalhos que utilizaram técnicas de encapsulação de OEs (Beyki et al., 2014; De Oliveira et al., 2014). Na Tabela 3.4 são apresentados trabalhos relacionados a este procedimento, descrevendo o método aplicado e finalidade do estudo.

Um conjunto de metodologias que consistem na produção de partículas com dimensões nanométricas encontra-se na literatura, onde substâncias são revestidas por um agente encapsulante, geralmente polímeros – polietilenoglicol – ou biopolímeros – quitosana, gelatina e goma-arábica (De Oliveira et al., 2014). As

principais metodologias aplicadas a óleos essenciais são nanoprecipitação, coacervação simples ou complexa e *spray drying*.

Tabela 3.4 – Publicações científicas relacionadas ao processo de encapsulação de OE

Óleo essencial ou composto terpênico	Agente Encapsulante	Método	Finalidade e Aplicação	Referência
<i>Lippia sidoides</i>	Quitosana e goma	Coacervação Complexa	Prolongar a liberação e melhorar a atividade biológica	Abreu et al., 2012
<i>Mentha piperita</i>	Quitosana	Gelatinização Iônica	Aprimorar a atividade biológica antimicrobiana e maior estabilidade	Beyki et al., 2014
<i>Schinus molle</i>	Maltodextrina e goma arábica	Spray Drying	Prolongar o efeito inseticida	Lopez et al., 2014
<i>Lippia sidoides</i>	Policaprolactona	Nanoprecipitação	Promover maior estabilidade	Pinto et al., 2016
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	Policaprolactona	Nanoprecipitação	Aprimorar a atividade biológica	Christofoli et al., 2015
<i>Ocimum sanctum</i>	Gelatina	Coacervação Simples	Promover estabilidade	Sutaphanit e Chitprasert, 2014
Eugenol	Quitosana	Gelatinização Iônica	Promover estabilidade térmica	Woranuch e Yoksan, 2013
Carvacrol	PLGA	Nanoprecipitação	Aprimorar atividade antimicrobiana	Iannitelli et al., 2011
<i>Cymbopogon citratus</i>	Álcool Polivinílico	Coacervação Simples	Prolongar a liberação	Leimann et al., 2009
<i>Origanum vulgare</i>	Inulina	<i>Spray Drying</i>	Avaliar o perfil de liberação do OE encapsulado	Beirão-da-Costa et al., 2013

### 3.7.1. Nanoprecipitação

A técnica de nanoprecipitação, patenteada por Fessi e colaboradores (1989), é uma metodologia simples e reprodutiva que possibilita a obtenção de nanopartículas monodispersas, sendo adequada para nanoencapsulação de compostos hidrofóbicos, como os óleos essenciais. A técnica consiste na formação de duas fases miscíveis: uma fase orgânica, a qual contém o agente encapsulante em um solvente orgânico juntamente com o óleo essencial, e outra fase aquosa. As nanopartículas são formadas instantaneamente pela rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa, o qual é despejado lentamente e sob forte agitação de maneira a proporcionar a sua máxima dispersão, sendo posteriormente eliminado por uma etapa de volatilização à pressão reduzida. Os agentes encapsulantes utilizados nesta técnica são geralmente polímeros como policaprolactona (PCL), poli-láctico-co-glicólico (PLGA) e poliácido láctico (PLA) (Asbahani et al., 2015; Khoee e Yaghoobian, 2009; Quintanar-Guerrero et al., 1996).

Pinto e colaboradores (2016) utilizaram o método para formular nanocápsulas em suspensão aquosa contendo o óleo essencial de *Lippia sidoides* e utilizando policaprolactona (PCL) como agente encapsulante. Segundo os autores, estudos prévios relacionados à nanoencapsulação de óleos essenciais utilizaram como material encapsulante polímeros de origem natural, como alginato, quitosana e goma arábica, os quais apresentaram origem duvidosa e viabilidade econômica incerta. Ainda, segundo os autores, estes polímeros de origem natural apresentam limitações quanto a sua utilização para este fim por apresentar qualidade irregular, tornando os resultados não reprodutivos. Por outro lado, polímeros sintéticos, como a PCL, são testados e utilizados amplamente em diversas aplicações industriais, o que garante sua padronização.

Christofoli e colaboradores (2015) também utilizaram o método de nanoprecipitação para produzir nanocápsulas contendo óleo essencial de *Zanthoxylum rhoifolium* em policaprolactona, obtendo partículas com morfologia esférica e homogêneas com uma eficiência de encapsulação superior a 96%.

### 3.7.2. Coacervação simples ou complexa

A técnica de coacervação é definida pela separação de duas fases líquidas em uma solução coloidal, sendo classificada como simples ou complexa se um ou dois materiais poliméricos forem utilizados, respectivamente. A fase rica em polímero é chamada de fase coacervada e a que não contém o polímero é chamada de solução de equilíbrio. A coacervação simples utiliza um solvente para induzir a separação das fases, como acetona ou solução de sulfato de sódio. Já a coacervação complexa utiliza outro polímero de carga oposta para neutralizar as cargas, sendo resultado da interação eletrostática atrativa dos polímeros a indução da formação de duas fases. A encapsulação ocorre pela deposição da fase rica em polímero ao redor das gotículas do material hidrofóbico, induzido pelo resfriamento abaixo da temperatura de gelificação, seguido por uma etapa de endurecimento do material encapsulante através da adição de um agente que promove a ligação cruzada entre as moléculas do polímero. Gelatina, goma arábica e quitosana são os principais polímeros empregados nesta técnica (Asbahani et al., 2015; Lemetter et al., 2009).

Sutaphanit e Chitprasert (2014) utilizaram o método de coacervação simples para encapsular o óleo essencial de *Ocimum sanctum* em gelatina, utilizando glutaraldeído para promover a ligação cruzada entre as moléculas poliméricas. As partículas obtidas tiveram uma morfologia porosa e não uniforme, com tamanho na ordem de 300  $\mu\text{m}$ .

### 3.7.3. Spray Drying

*Spray drying* é um método típico de produção de partículas na forma de pó aplicável a escala industrial e também a processo de encapsulação. O princípio funcional dessa técnica possui três componentes principais: um atomizador ou nebulizador, que converte a solução em gotas; uma fonte de calor, que vaporiza o solvente, difunde o soluto e precipita o produto final; e um coletor de partículas. As vantagens principais dessas técnicas são o baixo custo, a condição de ser um processo contínuo e a aptidão de produzir nanopartículas esféricas, quimicamente

homogêneas e de diversos tipos de materiais (Nandiyanto e Okuyama, 2011; Iskandar, 2009).

A seleção do agente encapsulante apropriado é uma das principais etapas para o processo de micro ou nanoencapsulação por *spray drying*. Os mais comuns empregados, por exemplo, para indústria de alimentos, são a goma arábica e a maltodextrina (Rajabi et al., 2015).

Fernandes e colaboradores (2016) utilizaram o método para encapsular óleo essencial de *Zingiber officinale* em goma arábica (Gm), uma mistura de goma arábica maltodextrina (Gm/Ma) e goma arábica com insulina (Gm/In). O processo parte da formação de uma emulsão de uma solução que contém estes agentes encapsulantes com o óleo essencial, utilizando uma sonda ultrassônica. A emulsão preparada é processada no *spray drying* para formação das partículas na forma de pó seco. As partículas obtidas pelos autores tiveram uma eficiência de encapsulação de 93% para a mistura (Gm/Ma), entretanto não apresentaram homogeneidade quanto ao tamanho e morfologia.

### **3.8. Atividade ixodícida e sua importância no setor agropecuário**

O carrapato é um ectoparasita responsável por um grande impacto econômico no setor agropecuário. Sua ação parasitária proporciona consequências diretas em bovinos, como perda de peso por toxinas e irritação, anemia e danos na pele causada pela sucção de sangue e diminuição na fertilidade e na produção de leite (Mapholi et al., 2014). Grisi e colaboradores (2014) estimaram que as perdas anuais associadas a estas consequências eram de pelo menos 13,96 bilhões de dólares no Brasil.

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é considerado o mais importante ectoparasita da indústria agropecuária mundial, encontrado em zonas tropicais e subtropicais dos países da América Latina, África, Ásia e Oceania, sendo responsável no Brasil por uma perda anual de estimados 7,11 bilhões de dólares (Grisi et al., 2014; Calligaris et al., 2013; Cruz et al., 2015).

Os Estados Unidos iniciou em 1906 o *Cattle Fever Tick Eradication Program* (CFTEP) que eliminou o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em 1941 em treze estados, através do uso de acaricidas químicos. Entretanto, o uso exagerado de produtos ixodicidas sintéticos, com diferentes mecanismos de ação, gerou a seleção natural de carrapatos resistentes para diferentes classes químicas destes produtos, incluindo os organofosforados (Guerrero et al., 2012; Miller et al., 2008), piretroides sintéticos (Li et al., 2007; Miller et al., 2007) e os formamidinas (Corley et al., 2013; Li et al., 2007). Em muitos países, o crescimento da população de carrapatos com resistência chegou ao ponto que poucos acaricidas sintéticos continuaram a apresentar eficiência superior a 75% (Graf et al., 2004; Gross et al., 2015).

Neste contexto, o uso de métodos para o controle de carrapatos no setor agropecuário sem a utilização de produtos ixodicidas sintéticos se tornou promissor. Compostos acaricidas fitoquímicos, como, por exemplo, óleos essenciais, pode representar uma ferramenta útil para o controle de ectoparasitas (de Oliveira Cruz et al., 2013).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Preparo da Matéria Prima

A matéria-prima base do estudo consiste em partes aéreas da *Piper hispidinervum* cultivada no centro de agricultura EMATER localizado em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. As sementes foram obtidas da Pirisa Pireto Industrial Ltda e cultivadas sob irrigação, onde a quantidade de água utilizada é equivalente ao registro médio de chuva anual da região, em torno de 1350 mm (Cassel et al., 2016).

Para padronização da matéria-prima, as partes aéreas da pimenta-longa passaram por uma etapa de secagem em uma estufa a 40° C e sua umidade foi determinada utilizando uma balança termogravimétrica a 60° C. Considerou-se adequado para a continuidade dos experimentos valores de umidade que variaram entre 2% a 8%. A justificativa para utilização da matéria-prima seca se dá pela grande variação da umidade quando a mesma se encontra *in natura*, sendo dependente de fatores externos, como temperatura e umidade do ar, impossibilitando a sua padronização e prejudicando a reprodutibilidade dos resultados.

### 4.2. Obtenção do Óleo Essencial

A obtenção do óleo essencial de *Piper hispidinervum* foi realizada em uma unidade piloto de destilação por arraste a vapor, localizada no Laboratório de Operações Unitárias da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. A unidade consiste basicamente de uma caldeira que gera o vapor, um vaso de extração onde é depositado o material vegetal, um condensador para liquefazer a mistura óleo essencial-água e um separador líquido-líquido que promove a formação

de duas fases, fase óleo e fase água. A caldeira possui sensores de níveis (tanto superior como inferior), pressão e temperatura, e o vapor é gerado por uma resistência elétrica de 2kW/h. O vaso extrator possui uma capacidade de 10 L de volume útil e sensores de temperatura e pressão. O condensador é do tipo multitubular casco-tubo refrigerado com água a aproximadamente 1° C. As Figuras 4.1 e 4.2 apresentam a unidade piloto e seu fluxograma, respectivamente.



Figura 4.1. Unidade Piloto de Destilação por Arraste a Vapor

O equipamento foi projetado com o objetivo de obter dados experimentais adequados para o *scale up*, visando ao projeto e à operação de unidades industriais de produção de óleos essenciais por arraste a vapor. As variáveis de processo medidas pelos sensores são monitoradas através de uma interface com o usuário (Figura 4.3), utilizando um *software* de controle com gráficos de tendências e *displays*.

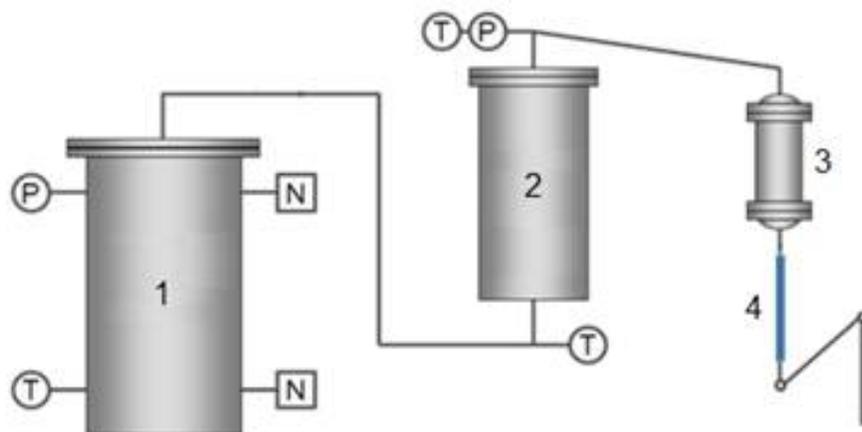


Figura 4.2. Fluxograma da unidade de destilação por arraste a vapor: [T] – Sensor de temperatura; [P] – Sensor de pressão; [N] – Sensor de nível; [1] – Caldeira; [2] – Vaso Extrator; [3] –Trocador de calor; [4] – Separador Líquido-Líquido.

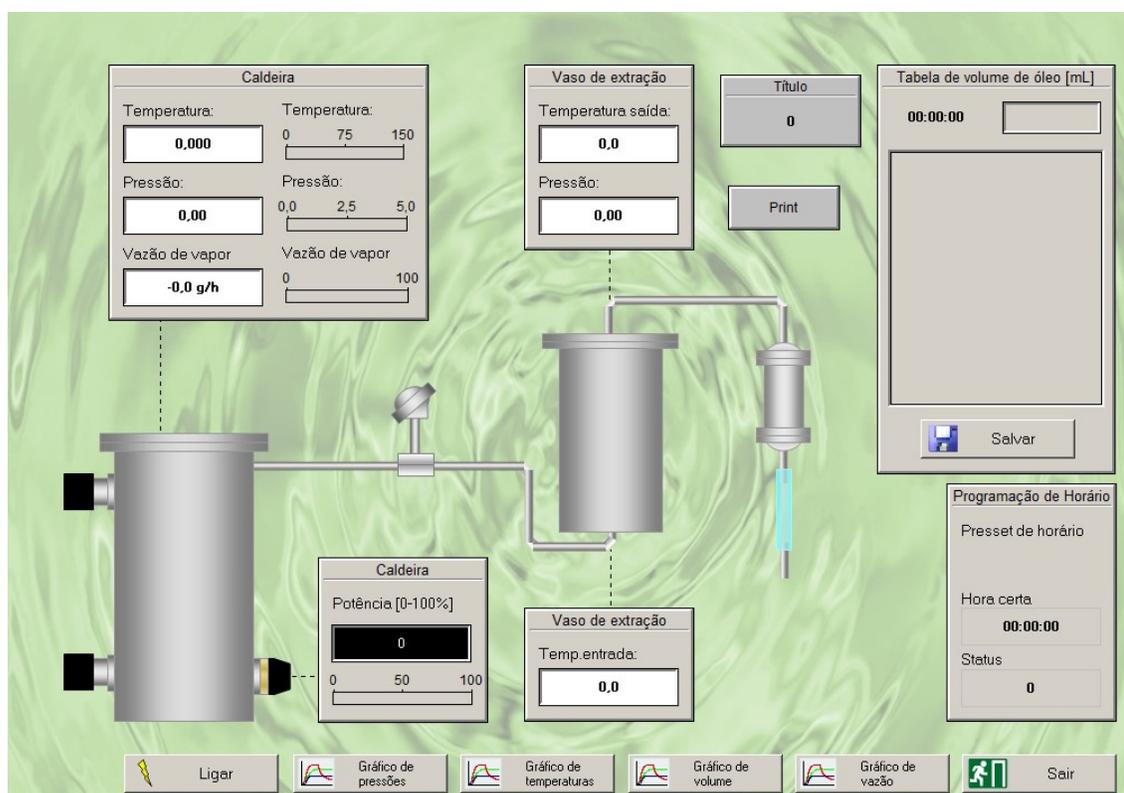


Figura 4.3. Software de monitoramento da unidade piloto de destilação por arraste a vapor.

As extrações na unidade piloto por arraste a vapor foram realizadas utilizando 400 g das partes aéreas da pimenta-longa seca, o suficiente para preencher todo o leito do vaso extrator. Os experimentos foram realizados em três

diferentes pressões (1 atm, 2 atm e 3 atm) com o objetivo de avaliar o efeito deste parâmetro no rendimento do processo, bem como na cinética da extração e na composição do óleo essencial obtido. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada condição, sendo mensurada a quantidade de óleo essencial extraído de 5 em 5 min, partindo da percepção da primeira gota de condensado gerado até o momento onde não houve uma variação significativa no volume de óleo extraído. Com estes dados foram gerados as curvas de extrações rendimento *versus* tempo.

#### 4.2.1. Avaliação da porosidade do leito ao longo do processo extrativo

A porosidade do leito extrativo é um parâmetro necessário para aplicação do modelo matemático baseado num balanço material (Reverchon, 1996). Para determinação deste parâmetro, primeiramente é preciso determinar o volume real ocupado da planta, sendo possível assim estabelecer o valor de sua massa específica.

O volume real da planta foi determinado utilizando a técnica de picnometria a gás (Ruggieri et al., 2009), com o uso de multipicnômetro (Quantachrome). O gás utilizado foi o nitrogênio e a massa da amostra utilizada foi de 10 g. A partir da queda de pressão estabelecida no experimento, é possível calcular o volume ocupado pela amostra, aplicando a Equação 4.1.

$$V_S = V_C - V_R \left( \left( \frac{P_1}{P_2} \right) - 1 \right) \quad (4.1)$$

onde  $V_S$  é o volume da amostra,  $V_C$  é o volume da célula,  $V_R$  é um volume de referência do equipamento,  $P_1$  é a pressão inicial e  $P_2$  é a pressão final. A massa específica é então determinada pela razão entre a massa da amostra e o seu volume ( $V_S$ ).

A avaliação da variação da porosidade ao longo do processo extrativo foi realizada através da interrupção do processo de extração em diferentes tempos (40, 80 e 120 min) para assim avaliar a altura do leito, que pode variar devido a sua compactação ao decorrer do processo. O estudo também avaliou a variação deste

parâmetro em três diferentes pressões (1 atm, 2 atm e 3 atm). Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada tempo de interrupção e pressão, totalizando 27 extrações.

Uma equação para porosidade em função do tempo ( $\varepsilon(t)$ ) pode ser determinada, portanto, como função da altura do leito (Equação 4.2).

$$\varepsilon(t) = \frac{V_v}{V_t} = 1 - \frac{V_s}{V_t} = 1 - \frac{\frac{m_s}{\rho_s}}{AH(t)} \quad (4.2)$$

onde  $V_v$  é o volume de vazios,  $V_t$  é o volume total,  $V_s$  é o volume da planta,  $m_s$  é massa de planta,  $\rho_s$  é massa específica da planta,  $A$  é a área da seção transversal do leito e  $H(t)$  é a altura do leito.

#### 4.2.2. Modelagem matemática do processo de extração

A modelagem matemática do processo de extração por arraste a vapor do óleo essencial da *Piper hispidinervum* foi realizada baseada no modelo de Reverchon (1996). Este modelo considera que a dispersão axial é negligenciável, a densidade e vazão de solvente são constantes e o óleo essencial é um pseudo-componente. As equações diferenciais estão vinculadas ao balanço material realizado na fase solvente e outro na fase sólida que constitui o leito de extração, associando este conjunto de equações diferenciais parciais à transferência de massa nessas fases. As Equações 4.3 e 4.4, que representam o modelo, estão descritas abaixo:

Balanço de massa na fase fluida:

$$\frac{\partial C(z, t)}{\partial t} = -v \frac{\partial C(z, t)}{\partial z} - \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \rho_s \frac{\partial q(z, t)}{\partial t} \quad (4.3)$$

Balanço de massa na fase sólida:

$$\frac{\partial q(z, t)}{\partial t} = -k_{TM}[q(z, t) - q(z, t)^*] \quad (4.4)$$

onde  $C(z,t)$  é a concentração de óleo na fase vapor,  $q(z,t)$  é o teor de óleo na planta em  $\text{g}_{\text{óleo}}/\text{kg}_{\text{planta}}$ ,  $v$  é a velocidade intersticial do vapor,  $\varepsilon$  é a porosidade do leito,  $k_{TM}$  é o coeficiente global de transferência de massa e  $\rho_s$  é a massa específica da planta. A relação de equilíbrio entre as fases é descrita pela Equação 4.5.

$$q(z,t)^* = KC(z,t) \quad (4.5)$$

onde  $K$  é a constante de equilíbrio entre as fases. A resolução do sistema de equações diferenciais parciais segue ainda as seguintes condições de contorno e inicial:

Condições iniciais (em  $t=0$ ):

$$t = 0 \rightarrow C(z,t) = 0; q(z,t) = q_0 \text{ em todo } z$$

Condições de contorno ( $z=0$ )

$$z = 0 \rightarrow C(z,t) = 0 \text{ em todo } t$$

A incorporação ao modelo proposto por Reverchon (1996) do parâmetro porosidade como uma variável temporal representa um aprimoramento do modelo matemático quando aplicada a extração por arraste a vapor, pois se aproxima mais da condição real, onde ocorre a compactação do leito extrativo ao longo do processo. Assim, a modificação no modelo utilizado neste estudo se dá no balanço material para fase fluido (Equação 4.6).

$$\frac{\partial C(z,t)}{\partial t} = -v \frac{\partial C(z,t)}{\partial z} - \frac{1 - \varepsilon(t)}{\varepsilon(t)} \rho_s \frac{\partial q(z,t)}{\partial t} \quad (4.6)$$

onde o termo de porosidade como uma variável temporal ( $\varepsilon(t)$ ) é inserida no modelo através da determinação de uma equação empírica função da altura do leito, apresentado na Equação 4.7.

$$\frac{H(t) - H_0}{H_f - H_0} = (1 - \exp^{-\beta t}) \quad (4.7)$$

onde  $H(t)$  é a altura do leito variável com o tempo,  $H_0$  é a altura inicial do leito,  $H_f$  é altura final do leito,  $\beta$  é o parâmetro ajustável aos dados experimentais da variação da altura do leito.

O sistema de equações diferenciais parciais é resolvido numericamente utilizando o simulador dinâmico de equações EMSO (*Environment for Modeling, Simulation and Optimization*), onde os parâmetros coeficiente global de transferência de massa ( $k_{TM}$ ) e a constante de equilíbrio entre as fases ( $K$ ) são estimados a partir do ajuste dos dados experimentais da curva de extração pelo método de mínimos quadrados, usando o algoritmo otimizador de Nelder-Mead.

### 4.3. Análise da Composição Química do Óleo Essencial

A análise da composição química do óleo essencial de pimenta-longa foi realizada em um cromatógrafo à gás (CG), acoplado a um espectrômetro de massa (EM); equipamento Hewlett Packard – Agilent sistema CG/EM (GC/MS em inglês), CG modelo 7890A e EM modelo 5975C. As amostras foram preparadas contendo 30 mg do óleo essencial diluídas em 50 mL de metanol. A coluna utilizada foi uma HP-5MS, 30 m x 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno com espessura de filme de 0,25  $\mu\text{m}$ . O gás de arraste utilizado foi hélio ultra puro com fluxo de 0,8 mL/min, temperatura do injetor 250 °C, volume de injeção 1  $\mu\text{L}$ , no modo split, razão de split 1:10. O método de análise inicia a uma temperatura de 60 °C, que se mantém durante 08 min, aumentando a 03 °C/min até 180 °C, mantendo esta temperatura por 1 min, aumentando a 20 °C/min até 250 °C e mantendo essa temperatura por 10 min. A temperatura da interface entre o cromatógrafo e o EM foi de 230 °C, a voltagem de

ionização por impacto de elétrons foi 70 eV e a faixa de massa analisada foi de 40 a 450 u.

Os compostos foram identificados através dos seus índices de retenção, determinados a partir de uma série de n-alcenos (C8-C20), com aqueles reportados na literatura (Adams, 2007). A comparação dos espectros de massas também foi realizada para a confirmação da identidade dos compostos.

Padrões de safrol (>96%) e terpinoleno (>90%) foram utilizados para obtenção de uma curva de calibração destes compostos, seguindo a metodologia supracitada, variando a razão de split (1:20; 1:10; 1:5; 1:3; 1:2; 1:1), permitindo assim obter o percentual em massa destes compostos presentes em cada amostra. O padrão de safrol foi obtido a partir do fracionamento do óleo essencial da pimenta-longa, seguindo a metodologia relatada na seção 4.4 deste trabalho. Já o padrão de terpinoleno foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (Alemanha).

#### 4.4. Fracionamento do óleo essencial da pimenta-longa

O processo de fracionamento por destilação fracionada a vácuo em batelada do óleo essencial de pimenta-longa tem como objetivo principal obter safrol com alto grau de pureza, bem como recuperar frações que contêm diferentes proporções mássicas dos compostos majoritários do óleo essencial, safrol e terpinoleno, devido à comprovada ação sinérgica entre estes dois compostos referentes a atividades biológicas. Para isso, a metodologia aplicada a este processo foi separada em quatro etapas, como apresentado na Figura 4.4.

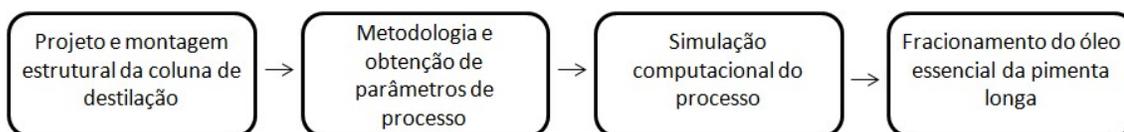


Figura 4.4. Metodologia aplicada para o processo de fracionamento do óleo essencial de pimenta-longa por destilação fracionada a vácuo em bateladas.

##### 4.4.1. Projeto e montagem estrutural da coluna de destilação

A montagem da coluna de destilação em batelada tem por objetivo obter um equipamento capaz de fracionar óleos essenciais, operando a vácuo, com controle de razão de refluxo e monitoramento da temperatura de topo e fundo. O equipamento foi projetado em escala laboratorial (Figura 4.5 a), utilizando um balão volumétrico de 250 mL como refulvedor, o qual é aquecido por uma manta de aquecimento da marca Fisatom. A coluna é de vidro com 15 mm de diâmetro e 20 cm de altura com recheios cilíndricos de vidro com diâmetro interno de 5 mm e altura de 7 mm. Uma vidraria projetada para realizar a função de tanque de acúmulo foi acoplada ao topo da coluna (Figura 4.5 b), a qual permite a passagem do vapor ascendente e direciona o líquido resfriado para uma válvula solenoide, que por sua vez é responsável por alternar o fluxo ora para coluna ora para coleta do produto. Um temporizador NT240 e um controlador N1040, ambos da NOVUS, foram utilizados para atuar na válvula solenoide, estabelecendo uma razão de refluxo constante ao longo do processo e as temperatura de topo e fundo foram monitoradas utilizando termopares do tipo Pt-100.

O equipamento foi projetado em escala laboratorial devido à disponibilidade de pequena quantidade de óleo essencial de pimenta-longa, visto que este extrato volátil não é comercializado, sendo assim obtido na unidade piloto de extração por arraste a vapor.

Muitos compostos terpênicos presentes em óleos essenciais são termolábeis, portanto o processo de destilação deve ocorrer em pressões reduzidas, próximo ao vácuo. Uma linha de vácuo conectada a uma bomba de vácuo da marca TECNAL modelo TE-058 foi acoplada no topo do condensador e no sistema de coleta do produto destilado. O sistema de coleta (Figura 4.6) consiste em uma vidraria de duas pontas, uma ponta é conectada com a linha de vácuo e outra é utilizada para o transporte do produto destilado; e uma vidraria composta por um jogo de válvulas, o qual permite restringir o vácuo e permitir que o balão de coleta fique a pressão atmosférica, sem interferir na pressão de operação da coluna.

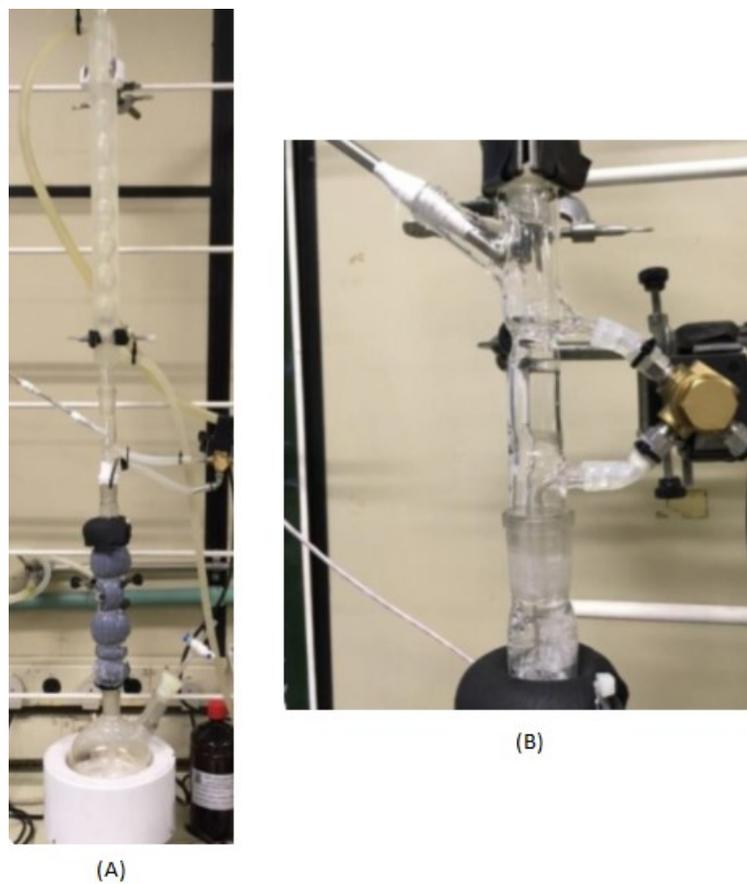


Figura 4.5. Coluna de destilação em batelada (A) e tanque de acumulo no topo da coluna (B).

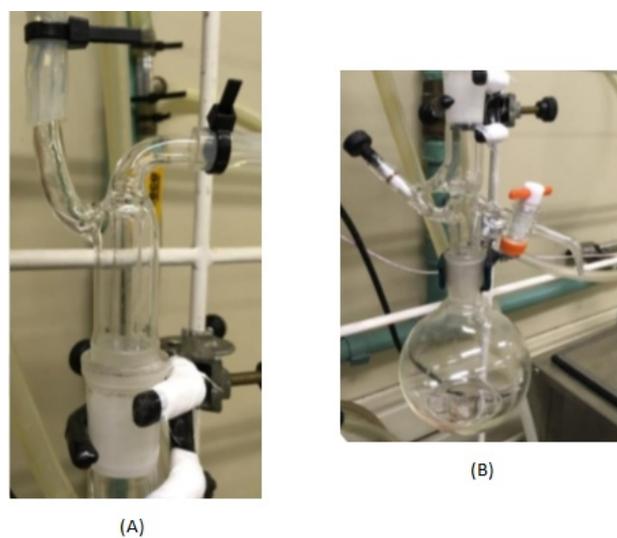


Figura 4.6. Vidraria de duas pontas (A) e frasco de coleta das frações (B).

#### 4.4.2. Metodologia e obtenção de parâmetros de processo da coluna de destilação

Os experimentos realizados na coluna de destilação em batelada consistiram em alimentar o balão volumétrico com a mistura a qual se deseja fracionar. Esta mistura é aquecida pela manta térmica a uma potência controlada, vaporizando os compostos presentes. O vapor gerado preenche toda a coluna recheada, chegando ao condensador resfriado por um banho termostático a temperatura de 5 °C. O vapor é então condensado e gotejado no tanque de acúmulo no topo da coluna e este líquido é direcionado para válvula solenoide. A operação de destilação inicia em refluxo total até que o estado estacionário seja alcançado. Em seguida é definida uma razão de refluxo, começando então a coleta de cortes do fracionamento.

Ensaio de avaliação do comportamento da coluna foram realizados com o objetivo de verificar o funcionamento do equipamento, através do monitoramento do sistema de aquecimento, do controle da razão de refluxo e dos sensores de temperatura e pressão, bem como a verificação da presença de vazamento. Para os ensaios foi utilizada água destilada, onde a temperatura de ebulição foi monitorada, determinando assim a pressão de operação da coluna. Os dados experimentais foram comparados com dados de propriedades termodinâmicas da água saturada (Van Wylen, 2013).

A obtenção de parâmetros de processo é uma etapa necessária para simulação computacional baseada no modelo matemático apresentado na seção 3.5. O *holdup* da coluna, ou seja, o volume de líquido retido na coluna durante a batelada foi mensurado a partir de um volume conhecido na alimentação (40 mL) de água destilada, o qual foi submetido ao processo de destilação seguindo a metodologia supracitada. O experimento foi realizado em triplicata e o *holdup* foi determinado pela diferença entre o volume inicial da alimentação com o volume remanescente após o processo somado ao volume coletado no topo da coluna.

O número de pratos teóricos foi determinado utilizando 40 mL de uma mistura etanol/acetona (3:1 v/v), a qual foi submetida ao processo de destilação na coluna projetada. Ao entrar em estado estacionário, sobre refluxo total, uma alíquota do

primeiro estágio de equilíbrio atingido pela coluna foi retirada, a temperatura de topo foi determinada, possibilitando a obtenção da sua composição por espectrofotometria. Para avaliação da composição, uma curva de calibração foi realizada para mistura em questão, onde diferentes amostras foram preparadas, variando a composição entre etanol/acetona, e sua absorbância foi mensurada em um comprimento de onda de 330 nm (*cutoff* da acetona), utilizando etanol como branco. De posse da composição do primeiro estágio de equilíbrio atingido, o simulador descrito na seção 3.4.1 foi utilizado para calcular o número de pratos teóricos da coluna.

#### 4.4.3. Simulação computacional do processo de destilação em batelada

A simulação computacional do processo de destilação fracionada para o óleo essencial de *Piper hispidinervum* é uma etapa fundamental para realizar a otimização do processo, visando o isolamento do safrol e a obtenção de frações ricas em terpinoleno, sendo estes os compostos majoritários presentes no óleo essencial em questão.

A primeira etapa é a definição da mistura a ser separada, sendo caracterizada, tanto qualitativamente, quanto quantitativamente. A composição inicial da mistura é definida a partir dos resultados da análise cromatográfica do óleo essencial (seção 4.3). Simplifica-se para dez componentes, levando em conta os compostos majoritários. De posse das substâncias envolvidas, as moléculas foram criadas no software Avogadro, onde a molécula é otimizada até seu menor estado de energia com algoritmo *Steepest Descent*, gerando um arquivo com as coordenadas espaciais das moléculas.

O pacote semiempírico de química quântica MOPAC interpreta as coordenadas espaciais para criar uma malha correspondente à distribuição de cargas na superfície molecular, gerando os perfis- $\sigma$ , necessários para o cálculo do coeficiente de atividade. Um pacote termodinâmico empregado em simulações industriais iiSE (Vrtech, 2014) é utilizado para inserção das propriedades pertinentes ao cálculo do modelo. A pressão de vapor dos compostos foi calculada pelo método CSGC (*Corresponding-States with Group Contribution*) e inserida no pacote. O

modelo matemático foi implementado no simulador genérico de processos EMSO (*Environment for Modeling, Simulation and Optimization*) orientado a equações e adequado para simulações dinâmicas (Soares e Secchi, 2003) e um *plugin* de comunicação entre os dois programas EMSO-iiSE é utilizado para que as propriedades sejam atualizadas dinamicamente (Almeida, 2016).

A simulação é iniciada em regime de refluxo total, para estabelecer a concentração inicial em cada prato, onde o equilíbrio é atingido em toda a coluna. Após atingir um regime estacionário, em refluxo total, os valores de composição e temperatura são arquivados e utilizados como ponto de partida para simulação. Foi determinada inicialmente uma razão de refluxo constante igual a 8 com uma carga inicial no refeedor de 10 mols de óleo essencial com uma potência de aquecimento de 200 W.

Com a simulação é possível obter, portanto, um perfil de temperatura na coluna, calculado como consequência do equilíbrio termodinâmico de cada prato. Os patamares obtidos para temperatura de topo são utilizados como tomada de decisão sobre quando o frasco de coleta de destilado deve ser trocado, visando a obtenção de diversos produtos por batelada, cada um com uma composição específica. Além disso, a simulação gera um gráfico onde é possível avaliar a evolução da composição do destilado ao longo do tempo de batelada, permitindo traçar um paralelo entre os perfis de composição com a temperatura de equilíbrio.

#### **4.4.4. Fracionamento do óleo essencial da pimenta-longa**

O fracionamento do óleo essencial da pimenta-longa foi realizado na coluna projetada, utilizando 40 mL do óleo essencial por batelada. Inicialmente o processo foi mantido sob regime de refluxo total até que não houvesse variações significativas na temperatura de topo, indicando que o equilíbrio termodinâmico foi atingido em todos os pratos. A válvula solenoide foi então ativada alternando a direção do fluxo, mantendo 4 s para refluxo da coluna e 0,5 s para o frasco de coleta, mantendo assim uma razão de refluxo igual a 8 ao longo do processo. A pressão de operação foi mantida em 8,0 kPa. As temperaturas de corte do topo da coluna foram definidas baseadas na simulação computacional realizada, estando de acordo com as

diferentes composições de destilado que se deseja obter. Ao atingir a temperatura de topo desejada, alíquotas de 1 mL a 2 mL foram retiradas e analisadas por cromatografia gasosa, segundo a metodologia relatada na seção 4.3.

#### **4.5. Nanoemulsão do óleo essencial da pimenta longa**

A etapa de preparação de nanoemulsão, contendo o óleo essencial de pimenta-longa, foi realizada visando obter como produto uma solução aquosa contendo os princípios ativos presentes no óleo essencial em uma concentração reduzida, porém suficiente para possuir atividade biológica. Vale salientar que a atividade ixodicida do óleo essencial de pimenta-longa possui IC<sub>90</sub> na ordem de microgramas. A produção de uma nanoemulsão homogênea e estável pode representar uma alternativa para fins de aplicação do óleo essencial como um produto ixodicida, onde os compostos com princípios ativos estariam dispersos de maneira homogênea e em concentrações adequadas para sua aplicação.

Nanoemulsões contendo o óleo essencial de pimenta-longa foram preparadas seguindo a metodologia de dispersão e evaporação de solvente (Sessa e Donsi, 2015; Silva et al., 2012). Para isso, 350 mg do óleo essencial foram solubilizados em 15 mL de acetona e adicionado gota a gota, utilizando uma pipeta Pasteur, a 30 mL de uma solução aquosa contendo Twenn 80 1% (m/m), sob forte agitação por vortex. A ação do vortex é promover a máxima dispersão da solução orgânica na aquosa. O solvente é então removido, utilizando um evaporador rotativo a baixa pressão e temperatura de 35° C. As nanoemulsões preparadas foram armazenadas em tubos Falcon na temperatura de 25° C.

A estabilidade de emulsões pode ser avaliada visualmente, onde a formação de duas fases indica instabilidade provocada por sedimentação, coalescência ou floculação das gotículas. Entretanto, uma análise mais criteriosa foi aplicada às nanoemulsões preparadas: determinação do diâmetro hidrodinâmico das gotículas por espalhamento de luz dinâmica (DLS) e determinação do potencial zeta, realizadas em equipamento ZetaSizer® Nanoseries (Malvern, Inglaterra), onde 10 µL da nanoemulsão preparada foram diluídas em 1 mL de água. A avaliação destes

parâmetros foi realizada ao longo de cinco meses após a preparação da nanoemulsão, sendo que estas foram preparadas em triplicata.

Visando avaliar a reprodutibilidade dos resultados foi realizado o cálculo do coeficiente de variação (CV), definido pela razão do desvio padrão com a média dos resultados obtidos. A Tabela 4.1 apresenta uma classificação para o coeficiente de variação, segundo Ferreira et al. (1991).

Tabela 4.1. Classificação do Coeficiente de variação (CV) segundo Ferreira et al. (1991)

Faixa	Dispersão dos resultados	CV
Até 15%	Baixa dispersão dos resultados (Dados homogêneos)	Baixo
Entre 15% e 20%	Média dispersão dos resultados	Médio
Entre 20% e 30%	Alta dispersão dos resultados	Alto
Maior do que 30%	Dispersão dos resultados muito alta	Muito Alto

Além disso, foi avaliada a quantidade mássica de óleo essencial perdida no processo, já que a etapa de remoção de solvente se dá à pressão reduzida, podendo acarretar na volatilização dos compostos terpênicos, juntamente com o solvente. As análises foram realizadas por espectrofotometria, onde alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  da nanoemulsão preparada foram diluídas em 10 mL de acetato de etila, avaliando assim sua absorvância. Previamente, o comprimento de onda aplicado foi determinado utilizando um espectrofotômetro com varredura para uma solução contendo o OE de pimenta-longa solubilizado em acetato de etila em concentrações de 0,05, 0,025 e 0,0125 mg/mL, variando o comprimento de onda de 190 nm até 320 nm. Após a determinação do comprimento de onda adequado, uma curva de calibração foi estabelecida por regressão linear, usando concentrações de 0,05, 0,025, 0,0125, 0,00625, 0,00312 e 0,00156 mg/mL em soluções contendo o OE e acetato de etila. Devido às baixas concentrações empregadas, justificada pela alta absorvância apresentada pelo safrol (composto majoritário do OE), o experimento foi realizado em triplicata, sendo que, para cada concentração, foram preparadas e medidas três amostras, visando assim à minimização do erro na quantificação.

#### 4.6. Nanoencapsulação do óleo essencial da pimenta longa

A etapa de nanoencapsulação do óleo essencial de pimenta-longa foi realizada com o objetivo de proporcionar um revestimento físico aos compostos terpênicos do óleo essencial, formando assim um produto em solução aquosa, onde os constituintes ativos do óleo essencial estão dispersos de maneira homogênea e em concentrações reduzidas. As nanocápsulas são preparadas em concentrações análogas às das nanoemulsões preparadas. Além disso, espera-se que com este procedimento ocorra a proteção dos compostos terpênicos pelo revestimento físico do agente encapsulante, alterando a liberação dos seus constituintes ativos, de maneira a prolongar o tempo de permeância destes compostos no meio de ação por evitar sua volatilização, promovendo assim um aprimoramento na sua atividade biológica.

O agente encapsulante utilizado nesta etapa foi a policaprolactona (PCL 40 kDA), cedido pela empresa PURAC (Alemanha). A PCL é um polímero biodegradável e biocompatível, insolúvel em água e amplamente utilizado em diversas aplicações industriais.

As nanocápsulas de policaprolactona contendo o óleo essencial de pimenta-longa foram preparadas pelo método de nanoprecipitação (Fessi et al., 1989). Inicialmente é preparada uma fase orgânica (FO) contendo o biopolímero (PCL) e o princípio ativo (óleo essencial), diluídos em 15 mL de acetona. Em seguida, a FO é adicionada gota a gota, utilizando uma pipeta Pasteur, a 30 mL de solução aquosa contendo Twenn 80 1% (m/m), sob forte agitação por vortex. Após a adição da FO, a emulsão é mantida 1 min sob forte agitação, garantindo assim a máxima dispersão das fases. Nesta etapa foram realizados testes utilizando uma sonda ultrassônica de 20 KHz, na qual a aplicação da sonda foi realizada com diferentes amplitudes (20%, 30%, 40%, e 50%) por um tempo de 10 min, utilizando um banho de gelo para evitar o aquecimento da amostra. Em seguida o solvente orgânico (acetona) foi removido da solução em um evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura constante de 35° C. Diferentes proporções mássicas polímero/óleo essencial foram preparadas e suas composições são apresentadas na Tabela 4.2. Os experimentos

foram realizados em triplicatas para cada proporção, sendo que a proporção mássica 1:5 foi a utilizada no teste da aplicação da sonda ultrassônica. As amostras foram armazenadas na geladeira em tubo Enppendorf na temperatura de 5 °C.

Tabela 4.2. Formulações preparadas para nanoencapsulação do óleo essencial de pimenta-longa.

Formulação	Razão Polímero/Óleo	Massa de Polímero (mg)	Massa de Óleo (mg)	Aplicação da Sonda Ultrassônica (amplitude)
F1	1:0,5	70	35	-
F2	1:1	70	70	-
F3	1:2	70	140	-
F4	1:3	70	210	-
F5	1:4	70	280	0%*, 20%; 30%; 40%; 50%
F6	1:5	70	350	-
F7	2:1	140	70	-

\*experimento sem o uso da sonda ultrassônica.

As nanopartículas geradas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEG-FEG), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta. As análises de microscopia foram realizadas no equipamento (Fei® Inspect F50) instalado no Laboratório Central de Microscopia e Microanálises da PUCRS. Para geração das imagens, uma gota de cada amostra foi aplicada em uma fita de carbono e metalizada por 80 s, utilizando um equipamento de *gold sputtering*. Para visualização das partículas foi utilizada uma distância de trabalho de 12 mm, força de raio de 20 kV e magnificação de 2500-5000 vezes. A determinação do diâmetro hidrodinâmico, realizada por DLS, bem como as análises de potencial zeta, foram realizadas no equipamento ZetaSizer® Nanoseries (Malvern, Inglaterra), onde 10 µL da nanocápsulas preparada foram diluídas em 1 mL de água para análise.

A eficiência do processo de encapsulação do óleo essencial foi determinada por espectrofotometria, fazendo-se o uso da curva de calibração obtida segundo a metodologia apresentada na seção 4.5 deste trabalho. Inicialmente foi determinada a massa de óleo essencial perdida no processo de maneira análoga à realizada para as nanoemulsões. A quantidade de óleo essencial encapsulado foi determinada pelo método de filtração por centrifugação. Para isso, 0,5 mL da suspensão contendo as

nanocápsulas foram adicionadas em filtros centrífugos de membranas de celulose regenerada da marca Microcon, com limite de peso molecular de 10 kDa (Merck, Alemanha). A suspensão foi centrifugada por 20 min a 10000 rpm e 100 µL do ultrafiltrado foram solubilizados em 5 mL de acetato de etila para quantificação por espectrofotometria do óleo essencial não encapsulado. A eficiência do processo de encapsulação foi determinada pela equação 4.8.

$$EE\% = \frac{m_f - m_{uf}}{m_o} * 100 \quad (4.8)$$

onde  $m_o$  é a massa de óleo essencial adicionado no início do processo,  $m_f$  é a massa de OE na suspensão de nanopartículas formada e  $m_{uf}$  é massa de OE presente no ultrafiltrado.

#### **4.7. Avaliação do perfil da evaporação do óleo essencial de pimenta-longa nanoencapsulado em policaprolactona**

A etapa de avaliação do perfil de evaporação do óleo essencial de pimenta-longa foi realizada com o objetivo de verificar se de fato o procedimento de revestimento físico do óleo essencial retardou o seu processo difusivo, proporcionando assim um aprimoramento na sua atividade biológica devido ao aumento do tempo de permanência destes compostos ativos no meio de ação. Para isso, 20 mL da formulação F6 (Tabela 4.2), seguindo a metodologia relatada na seção 4.6, foram submetidas a ensaios experimentais utilizando uma célula de Arnold (Figura 4.7). O processo de transferência de massa se dá por difusão, onde o óleo essencial presente nas nanocápsulas evapora para o ar presente na proveta, sob a hipótese de gás estagnado. O mesmo procedimento foi realizado utilizando a nanoemulsão, para assim realizar a comparação da cinética de evaporação do óleo essencial encapsulado com o nanoemulsionado.

Os ensaios experimentais consistem em obter dados de concentração de óleo essencial presente na suspensão das nanopartículas ao longo do processo de evaporação. Dados de concentração de óleo essencial da nanoemulsão também foram coletados para realizar a comparação entre as cinéticas de evaporação.

Estes dados foram obtidos por espectrofotometria, onde alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  foram diluídas em 10 mL de acetato de etila e determinado assim sua absorbância, onde, através de uma curva de calibração, determina-se a concentração do óleo essencial presente na suspensão das nanocápsulas (sendo também realizado para nanoemulsão). O experimento foi realizado ao longo de 28 dias, sendo que as amostras foram coletas nos tempos de 1, 2, 3, 7, 14, 21 e 28 dias após o início do processo difusivo. Cada coleta foi realizada em triplicata, onde foi mensurada a absorbância três vezes para cada amostra coletada, visando à minimização do erro. A temperatura foi mantida constante em 25° C ao longo de todo experimento, utilizando uma resistência elétrica aletada para aquecer o ar no interior da célula com um controlador PID associado a um termopar para manter a temperatura constante. Um *cooler* foi acoplado na parte superior da célula para gerar um fluxo de ar no contorno  $z = L$  do caminho difusivo, sendo possível considerar que nesta condição de contorno possui concentração de óleo essencial igual à zero.

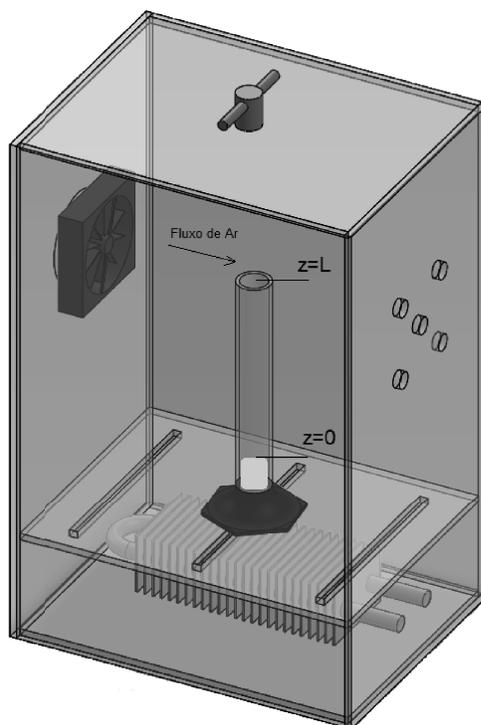


Figura 4.7. Célula de Arnold

### 4.7.1. Modelagem Matemática do Processo de Evaporação do Óleo Essencial

A modelagem matemática do processo de transferência de massa por difusão, onde o óleo essencial (a) presente nas nanocápsulas evapora para o ar (b) presente na proveta (Figura 4.7), parte de um balanço material do líquido que contém a suspensão das nanopartículas (Equação 4.9).

$$\frac{\partial \rho_{la}}{\partial t} = -\frac{N_{ai}A}{V_l} \quad (4.9)$$

onde  $\frac{\partial \rho_{la}}{\partial t}$  é a taxa de massa de óleo essencial por unidade de volume,  $N_{ai}$  é o fluxo mássico de óleo essencial avaliado na interface com o líquido,  $A$  é a área perpendicular ao fluxo e  $V_l$  é o volume de líquido. Assume-se que a mistura que compõe o óleo essencial é um pseudocomponente (a), o nível de líquido (água) não varia com o tempo, os gases a e b tem comportamento ideal e a difusão ocorre sob a hipótese de gás estagnado. O fluxo mássico de óleo essencial é avaliado pela 1ª lei de Fick (Equação 4.10).

$$N_a = -D_{ab}\nabla\rho_{va} + \frac{\rho_{va}}{\rho_t}(N_a + N_b) \quad (4.10)$$

onde o primeiro termo da equação representa o fluxo com origem no gradiente de concentração, o segundo termo representa o fluxo com origem na condição em que o meio está em movimento e transporta consigo a espécie química “a” (óleo essencial),  $D_{ab}$  é a difusividade mássica do óleo essencial no ar,  $\rho_{va}$  concentração mássica do óleo essencial no vapor,  $\rho_t$  é a concentração mássica total e  $N_b$  é nulo devido à hipótese de gás estagnado. O fluxo mássico avaliado na interface ( $N_{ai}$ ) esta apresentado na Equação 4.11, considerando que o mesmo ocorre apenas na coordenada axial  $z$ .

$$N_{ai} = \frac{-D_{ab}}{1 - \left(\frac{\rho_{veqa}}{\rho_{veqa} + \rho_{ar}}\right)} \frac{\partial \rho_{va}}{\partial z} \Big|_{z=0} \quad (4.11)$$

onde  $\rho_{veqa}$  é a concentração de óleo essencial na fase vapor em equilíbrio com o líquido e  $\rho_{ar}$  é a massa específica do ar nas condições do experimento. Aplicando a Equação 4.11 na Equação 4.9, obtém-se a expressão para a variação da concentração do óleo essencial na suspensão que contém as nanopartículas (Equação 4.12).

$$\frac{\partial \rho_{la}}{\partial t} = \frac{D_{ab}A}{V_l \left[ 1 - \left( \frac{\rho_{veqa}}{\rho_{veqa} + \rho_{ar}} \right) \right]} \frac{\partial \rho_{va}}{\partial z} \Big|_{z=0} \quad (4.12)$$

Para estabelecer o gradiente de concentração do óleo essencial, avaliado na interface e em relação à coordenada axial, é necessário a determinação do perfil de concentração ao longo do caminho difusivo  $z$ . Para isso, a segunda lei de Fick foi aplicada, considerando a simplificação referente ao fluxo da espécie química com origem no movimento do meio, podendo ser negligenciável por ser muito menor em relação ao fluxo com origem no gradiente de concentração. A segunda lei de Fick é representada pelas Equações 4.13 e 4.14 para as condições de contorno indicadas:

$$\nabla^2 \rho_{va} = \frac{1}{D_{ab}} \frac{\partial \rho_{va}}{\partial t} \quad (4.13)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial^2 \rho_{va}}{\partial z^2} = \frac{1}{D_{ab}} \frac{\partial \rho_{va}}{\partial t} \\ t = 0; \rho_{va} = 0 \\ z = 0; \rho_{va} = \rho_{veqa} \\ z = l; \rho_{va} = 0 \end{array} \right. \quad (4.14)$$

A concentração de óleo essencial na interface ( $\rho_{veqa}$ ) corresponde à condição de equilíbrio líquido-vapor, logo é dependente da concentração de óleo essencial no líquido ( $\rho_{la}$ ), que por sua vez varia com o tempo à medida que ocorre o processo de transferência de massa. Portanto, para se obter o modelo matemático que

represente o fenômeno é importante estabelecer a relação de equilíbrio entre as fases. A Lei de Henry estabelece que a concentração de uma espécie química solubilizada num líquido é diretamente proporcional a sua pressão parcial na superfície do líquido, para soluções diluídas e em condição de equilíbrio. Portanto, a relação do equilíbrio líquido-vapor na interface pode ser definida pela Equação 4.15, devido às baixas concentrações de óleo essencial presente nas nanopartículas em suspensão aquosa.

$$\rho_{veqa} = H\rho_{la} \quad (4.15)$$

onde H é a constante adimensional de Henry.

O sistema de equações descrito foi resolvido numericamente usando o software Matlab. Para segunda Lei de Fick (Equação 4.15) a discretização numérica foi realizada utilizando o método de Euler no tempo e esquema de segunda ordem centrada no espaço, também conhecido como esquema FTCS (*forward-time central-space*). Para o balanço material no líquido (Equação 4.12) foi aplicado o esquema de Euler no tempo e avanço simples no espaço, por estar na condição de contorno.

Para determinação do passo temporal e espacial do método numérico, foi aplicada a análise de estabilidade de Van Neumann, que estabelece que para uma equação diferencial parcial linear, com coeficiente constante, numa malha uniforme, discretizada num esquema FTCS, o método é estável se a seguinte condição for satisfeita (expressão 4.16):

$$\Delta t \leq \frac{\Delta z^2}{2D_{ab}} \quad (4.16)$$

onde  $\Delta t$  é o passo temporal e  $\Delta z$  é o passo no espaço.

#### 4.7.2. Determinação da difusividade mássica do óleo essencial da pimenta longa no ar

Para determinar a difusividade mássica do óleo essencial de pimenta-longa no ar ( $D_{ab}$ ) foi utilizada a mesma célula de Arnold apresentada na Figura 4.7. Uma amostra de 5 g de óleo essencial foi adicionada na proveta que se encontra no interior da célula. O processo difusivo foi realizado em triplicata durante 168h a uma temperatura constante de 25° C, controlado pelo sistema supracitado. Ao final do processo difusivo, a variação de massa de óleo essencial foi determinada em uma balança analítica.

O modelo pseudoestacionário foi utilizado para calcular a difusividade mássica, onde se assume que a expressão para o fluxo molar do óleo essencial se encontra em estado estacionário com a consideração de que o tamanho do caminho difusivo sofre variação com o tempo devido o nível de líquido no interior da célula de Arnold sofrer um decréscimo à medida que a vaporização ocorre. A Equação 4.17 representa o fluxo molar no estado estacionário por difusão através de um gás estagnado.

$$Na = \frac{cD_{ab}}{(z_2 - z_1)} \ln \left( \frac{1 - y_{a2}}{1 - y_{a1}} \right) \quad (4.17)$$

onde  $Na$  é o fluxo molar de (a),  $c$  é a concentração molar total,  $D_{ab}$  é a difusividade mássica de (a) no ar,  $z_2$  é a coordenada axial no final da célula de Arnold,  $z_1$  é a coordenada axial na interface do líquido,  $y_{a2}$  é a fração molar de (a) no final da célula de Arnold e  $y_{a1}$  é a fração molar de (a) na interface com o líquido.

A partir de um balanço de massa no líquido no fundo da célula de Arnold, obtém-se a Equação 4.18, seguindo as seguintes considerações:

$$Z = (z_2 - z_1); V_l = A(h - Z) \rightarrow \frac{\partial V_l}{\partial t} = -A \frac{\partial Z}{\partial t}$$

$$NaM_a = \rho_l \frac{\partial Z}{\partial t} \quad (4.18)$$

onde  $V_l$  é o volume do líquido,  $h$  é a altura total da célula de Arnold,  $A$  é a área perpendicular ao fluxo e  $M_a$  é a massa molar de (a). Substituindo a Equação 4.17 na Equação 4.18 e realizando a integral definida, onde o tempo varia de 0 a  $t$  e a variável  $Z$  varia de  $z_0$  a  $z_f$ , onde  $z_f$  é a altura final do caminho difusivo após a evaporação de (a) e  $z_0$  é a altura inicial do caminho difusivo, obtemos uma expressão que permite avaliar a variação de altura do líquido com o tempo, associada à vaporização de (a), sendo função da difusividade mássica (Equação 4.19).

$$\rho_l \frac{(z_f^2 - z_0^2)}{2} = M_a c D_{ab} \ln \left( \frac{1 - y_{a2}}{1 - y_{a1}} \right) t \quad (4.19)$$

Sendo que:

$$c = \frac{P}{RT}$$

$$y_{a2} = 0$$

$$y_{a1} = \frac{p_{va}}{P}$$

onde  $P$  é a pressão,  $R$  é a constante dos gases,  $T$  é a temperatura,  $y_{a2}$  é igual a zero devido ao fluxo de ar no topo da célula de Arnold e  $y_{a1}$  é função da pressão de vapor do óleo essencial.

A pressão de vapor do óleo essencial foi determinada experimentalmente por termogravimetria com análise térmica diferencial (TG-DTA), utilizando o equipamento TA *Instruments* STD Q600. Para isso foram utilizados amostras de 60 mg do óleo essencial de pimenta-longa com uma taxa de aquecimento de  $10^\circ \text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ , em uma atmosfera de nitrogênio com uma vazão de  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  com temperatura variando de  $20^\circ \text{C}$  até  $300^\circ \text{C}$ . A equação de Langmuir (Equação 4.20) relaciona a

pressão de vapor, a uma determinada temperatura, com a taxa de perda de massa, sendo necessário determinar a constante  $k$  por calibração. Para obtenção da constante  $k$ , padrões de limoneno (97% da Sigma-Aldrich) e de eucaliptol (99% da Sigma-Aldrich) foram utilizados, seguindo a mesma metodologia, com 30 e 20 mg de amostra, respectivamente.

$$p^v = k \left[ \left( \frac{T}{MM} \right)^{\frac{1}{2}} \left( \frac{dm}{dt} \right) \right] \quad (4.20)$$

onde  $p^v$  é a pressão de vapor,  $T$  é a temperatura,  $MM$  é a massa molar e  $\frac{dm}{dt}$  é a taxa de perda de massa.

Segundo Hazra et al. (2002), o método para obter a curva da pressão de vapor por TG-DTA pode ser aplicado para um sistema multicomponente, como o caso dos óleos essenciais, se a composição e a massa molar média são conhecidas. Para isso, a análise por CG/EM foi utilizada para determinar a massa molar média do óleo essencial de pimenta-longa. A equação de Antoine (Equação 4.20) foi utilizada para modelar a curva da pressão de vapor obtida.

$$\ln p(Pa) = A - \frac{B}{T(K) - C} \quad (4.20)$$

onde  $A$ ,  $B$  e  $C$  são parâmetros ajustáveis a partir dos dados experimentais.

#### 4.7.3. Determinação da constante de Henry

A constante de Henry estabelece a relação de equilíbrio entre as fases líquido e vapor, sendo necessária a determinação deste parâmetro para representação matemática do fenômeno de evaporação do óleo essencial. Esta relação de equilíbrio foi determinada experimentalmente para cinco diferentes concentrações de óleo essencial encapsulado, bem como em nanoemulsão, utilizando uma massa inicial de óleo essencial no processo de preparação de 0,07; 0,14; 0,21; 0,28 e 0,35 mg. Cada formulação foi armazenada em um vial e mantida a uma temperatura constante de 25° C por tempo suficiente para que atinja a condição de equilíbrio.

Para determinação da concentração da fase vapor foi utilizada a técnica de *headspace*, onde 250  $\mu\text{L}$  do ar presente no vial foram coletados, utilizando uma seringa de injeção manual da marca Agilent, sendo então injetado num cromatógrafo acoplada a um espectrômetro de massa (EM), equipamento Hewlett Packard – Agilent sistema CG/EM (GC/MS em inglês), CG modelo 7890A e EM modelo 5975C. As condições do cromatógrafo utilizado para análise foram as seguintes: coluna utilizada foi uma HP-5MS, 30 m x 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno com espessura de filme de 0,25  $\mu\text{m}$ . O gás de arraste utilizado foi Hélio ultra puro com fluxo de 0,8 mL/min, temperatura do injetor 250° C, no modo splitless, onde os 250  $\mu\text{L}$  de ar coletado são injetados no cromatógrafo. O método de análise inicia a uma temperatura de 60° C, que se mantém durante 8 min, aumentando a 3° C/min até 180° C, mantendo esta temperatura por 1 min, aumentando a 20° C/min até 250° C e mantendo essa temperatura por 10 min. A temperatura da interface entre o cromatógrafo e o EM foi de 230° C, a voltagem de ionização por impacto de elétrons foi 70 eV e a faixa de massa analisada foi de 40 a 450u. A concentração da fase vapor foi determinada, portanto, a partir da área do cromatograma do pico referente ao safrol, sendo calculada a concentração a partir da curva de calibração do padrão deste composto (os demais componentes do óleo não apresentaram área significativa no cromatograma para fase vapor). O experimento foi realizado em triplicata para cada formulação preparada.

Para a determinação da concentração do óleo essencial da fase líquida foi utilizado o método de espectrofotometria, onde alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  foram diluídas em 10 mL de acetato de etila e determinado assim sua absorbância, onde através de uma curva de calibração se determina a concentração do óleo essencial presente na suspensão das nanocápsulas e nas nanoemulsões. Cada coleta foi realizada em triplicata, onde foi mensurada a absorbância três vezes para cada amostra coletada, visando à minimização do erro.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Obtenção do óleo essencial de *Piper hispidinervum*

A obtenção do óleo essencial de *P. hispidinervum* foi realizada na unidade piloto de destilação por arraste a vapor em três diferentes pressões absolutas (1 atm, 2 atm e 3 atm). O rendimento do processo em base seca é apresentado na Tabela 5.1, sendo calculado pela razão entre a massa de óleo essencial e a massa de planta seca. A umidade da planta, determinada em uma balança termogravimétrica, foi de  $5,34 \pm 1,45\%$ .

Tabela 5.1: Rendimento de óleo essencial de *P. hispidinervum* obtido por arraste a vapor

Pressão (atm)	Temperatura (°C)	Rendimento (% m/m)	Tempo de extração (min)
1	100	$1,884 \pm 0,234$	120
2	120	$2,407 \pm 0,242$	120
3	133	$2,091 \pm 0,427$	60

A massa específica da planta seca, determinada em um multipicnômetro, foi de  $0,984 \pm 0,014 \text{ g.cm}^{-3}$ , enquanto que a densidade do óleo essencial obtido foi de  $1,103 \pm 0,006 \text{ g.cm}^{-3}$ . Observou-se que não houve variação de densidade para os óleos essenciais obtidos nas diferentes pressões.

Uma análise de variância foi aplicada à média dos resultados de rendimento do processo extrativo para as três diferentes pressões, com significância de 95%, onde foi aceita a hipótese nula, ou seja, não existe diferença significativa entre as médias dos rendimentos. Entretanto, foi possível observar uma diferença na cinética da extração para pressão de 3 atm, onde o tempo necessário para extrair quantidades semelhantes de óleo essencial foi reduzido pela metade, como apresentado na Tabela 5.1. Este resultado pode ser explicado pela maior

temperatura do vapor à pressão de 3 atm, visto que o processo opera com vapor saturado, alterando a solubilidade dos compostos presentes a ser extraído.

A porosidade do leito extrativo é um parâmetro necessário para aplicação do modelo matemático baseado num balanço material (Reverchon, 1996). O parâmetro porosidade como uma variável temporal representa um aprimoramento do modelo matemático quando aplicado à extração por arraste a vapor, pois se aproxima mais da condição real, visto que ocorre a compactação do leito extrativo ao longo do processo. Portanto, a variação da porosidade do leito de planta, a partir da avaliação da altura do leito ao longo do processo extrativo, foi realizada para as três pressões de operação e esta é apresentada na Figura 5.1. Observa-se uma variação considerável na altura do leito, tendo diferentes comportamentos para cada pressão avaliada, onde a extração com maior pressão apresenta uma maior variação. O parâmetro empírico  $\beta$  (Equação 4.7), utilizado para obter uma representação matemática da porosidade do leito como uma variável temporal, foi estimado para cada condição de pressão e está apresentado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Parâmetro empírico  $\beta$  utilizado no cálculo da porosidade pela Equação 4.7, obtido a partir de dados experimentais da variação da altura do leito em três pressões.

Pressão (atm)	$\beta$
1	-0,0005
2	-0,0026
3	-0,0034

Tendo em vista os resultados obtidos nesta etapa do trabalho (Figura 5.1), a proposta de incorporar este parâmetro como uma variável dependente do tempo representa uma modificação adequada do modelo original, permitindo uma representação mais fidedigna da fenomenologia presente no processo, visto que há variação da porosidade do leito extrativo com o tempo de extração.

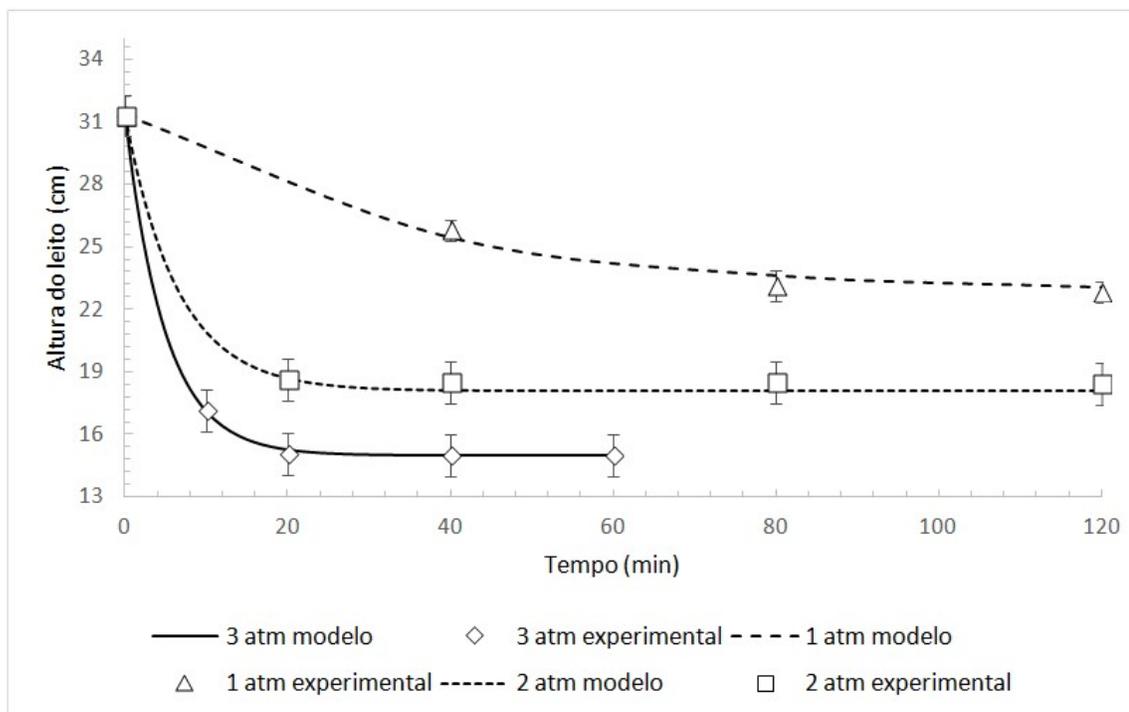


Figura 5.1 Variação da altura do leito com o tempo de extração para experimentos realizados em três pressões: 1, 2 e 3 atm.

A representação da curva de extração (massa extraída *versus* tempo) do processo de extração por arraste a vapor do óleo essencial de *P. hispidinervum*, utilizando o modelo de Reverchon (1996) modificado para as três pressões, é mostrada na Figura 5.2. As variáveis de entrada na modelagem matemática foram a vazão mássica de vapor, calculada a partir da potência utilizada na caldeira, a massa específica do vapor, calculada pela Equação de Estado Peng-Robinson (Peng e Robinson, 1976) e os parâmetros empíricos  $\beta$  que representam a variação da porosidade do leito com o tempo de extração (Tabela 5.2).

Com isso, os valores da constante de equilíbrio ( $K$ ) e do coeficiente global de transferência de massa ( $K_{tm}$ ) foram ajustados a partir dos dados experimentais (massa extraída *versus* tempo) por mínimos quadrados. Os valores dos parâmetros estimados estão apresentados na Tabela 5.3, bem como o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Tabela 5.3: Parâmetros estimados pelo modelo matemático do processo de extração por arraste a vapor do óleo essencial de *P. hispidinervum* em três pressões de operação.

Pressão Operacional	$K_{tm}$ (s <sup>-1</sup> )	$K$ (m <sup>3</sup> .kg <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
1 atm	5,251*10 <sup>-4</sup>	2,468*10 <sup>-5</sup>	0,9924
2 atm	2,093*10 <sup>-4</sup>	3,747*10 <sup>-4</sup>	0,9939
3 atm	1,099*10 <sup>-3</sup>	3,202*10 <sup>-7</sup>	0,9949

Os parâmetros ajustados do modelo  $K_{tm}$  e  $K$  apresentam uma ordem de grandeza que se assemelham aos dados da literatura (Rossa et al., 2018) e, como pode ser observado pela Figura 5.2 e pelos dados do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), o modelo representou bem aos dados experimentais.

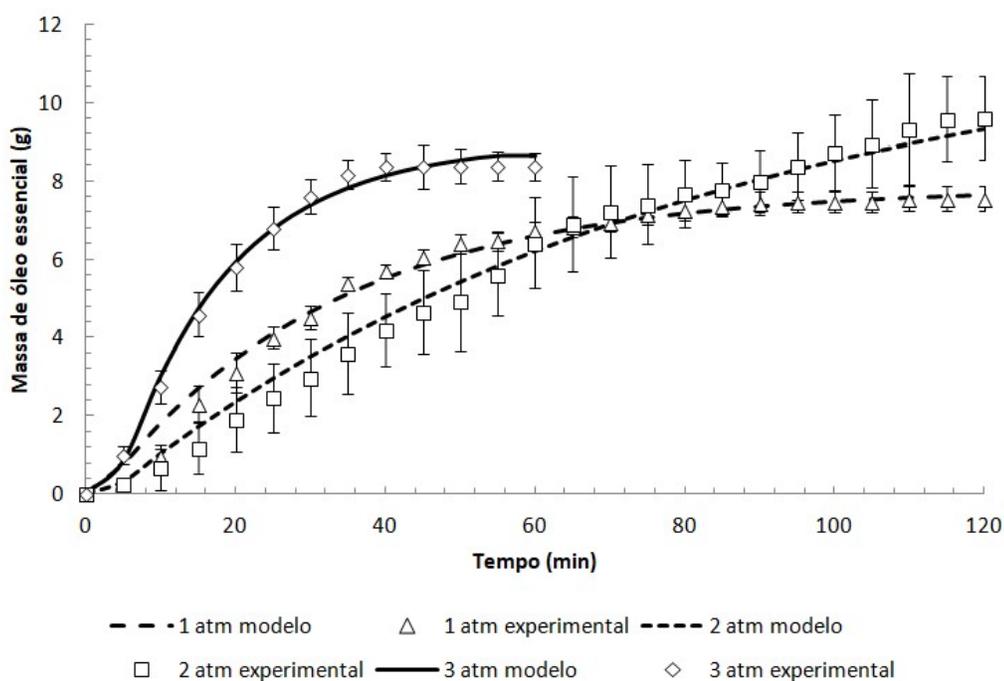


Figura 5.2: Curva de extração massa extraída versus tempo do óleo essencial de *P. hispidinervum* obtido a 1, 2 e 3 atm: dados experimentais e modelo matemático.

## 5.2. Análise da composição química do óleo essencial de pimenta-longa

Os óleos essenciais de pimenta-longa extraídos por arraste a vapor nas três diferentes pressões foram analisados por CG/EM. Na Tabela 5.4 são apresentados

os componentes detectados e suas porcentagens em área com relação ao total de área dos picos do cromatograma. Avaliando os resultados do CG/EM, pode-se concluir que o composto majoritário safrol apresenta aproximadamente 80 % da composição do óleo essencial, seguido pelo terpinoleno, com aproximadamente 6% da composição. Observou-se que não há diferença na composição dos óleos obtidos em diferentes pressões de operação. Este resultado vai de encontro a diversos artigos publicados e citados anteriormente referente à composição química do óleo essencial da pimenta-longa (Rossa et al., 2018; Sauter et al., 2012). Vale salientar que pequenas variações na composição do óleo podem estar associadas a inúmeros fatores, como influência do local de produção, do tipo de cultivo, estação do ano, entre outras, característica estas vinculada a produtos de origem natural. Portanto, observa-se que não há variação da composição dos óleos essenciais de pimenta-longa para as três diferentes pressões estudadas. A Figura 5.3 apresenta o cromatograma do óleo essencial *P. hispidinervum* obtido à pressão atmosférica, evidenciando os picos referentes ao safrol e ao terpinoleno.

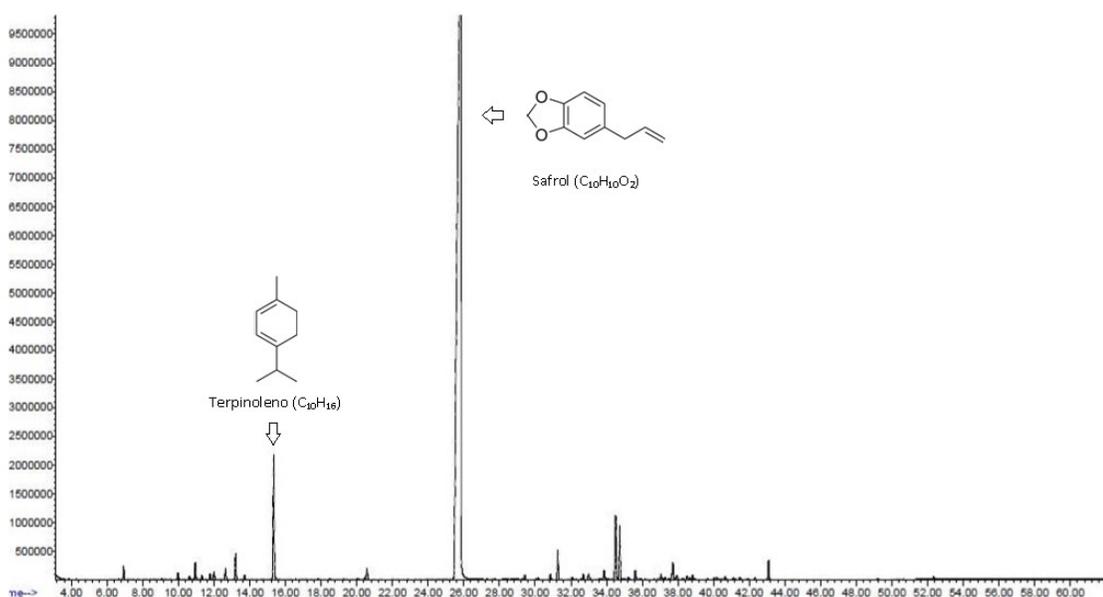


Figura 5.3: Cromatograma do óleo essencial da pimenta-longa extraído por arraste a vapor na pressão de 1 atm..

Tabela 5.4: Resultados da análise por CG/EM do óleo essencial de pimenta-longa extraído por arraste a vapor em três diferentes pressões.

Compostos <sup>a</sup>	% Área <sup>c</sup>			
	IR <sup>b</sup>	1 atm <sup>d</sup>	2 atm <sup>d</sup>	3 atm <sup>d</sup>
α-pineno	926	0,362	0,604	0,432
mirreno	987	0,089	0,367	0,162
α-felandreno	1005	0,319	0,183	0,516
α-terpineno	1020	0,372	0,363	0,419
α-cimeno	1024	0,157	0,393	0,228
Z-β-ocimeno	1036	0,095	0,580	0,217
E-β-ocimeno	1046	0,218	1,361	0,482
<b>terpinoleno</b>	1083	<b>6,728</b>	<b>7,577</b>	<b>5,838</b>
<b>safrol</b>	1289	<b>84,528</b>	<b>79,675</b>	<b>83,669</b>
ciclosativeno	1369	0,117	0,186	0,240
metil eugenol	1401	0,158	0,157	0,175
α-gurjuneno	1411	0,675	1,145	1,286
cariofileno	1431		0,114	0,148
α-guaieno	1446	0,118	0,192	0,210
α-humuleno	1453	0,152	0,211	0,256
germacreno D	1489	1,336	1,542	1,064
valenceno	1495	1,030	1,912	1,830
γ-cadineno	1517	0,220	0,297	0,349
elemicina	1559	0,048	0,053	0,092
espatunelol	1571	0,928	0,264	0,693
óxido de				
cariofileno	1576	0,231	0,154	0,284
guaiol	1599	0,097	0,065	0,185
bulnesol	1671	0,059		0,077
Total identificado (%)		98,035	97,394	98,849

IR\*- Índice de retenção

a - A identificação de picos é baseada na comparação entre os dados do Índice Linear de Retenção (LRI) experimental com aqueles da literatura (Adams, 2007).

b - Tempo de retenção linear calculado em relação às séries de hidrocarbonetos n reportados de acordo com sua ordem de eluição na série HP-5MS.

c - Os valores correspondem às proporções relativas dos constituintes do óleo essencial que foram expressas como porcentagens obtidas pela normalização da área do pico.

d - Condições operacionais em pressão absoluta.

Tradicionalmente é aceito que a concentração em massa dos compostos presentes nos óleos essenciais seja proporcional à área pico cromatográfico, porém neste estudo foi realizada uma determinação quantitativa utilizando padrões dos dois compostos de interesse. Para os padrões de safrol e de terpinoleno foi construída a curva de calibração massa do composto *versus* área do pico cromatográfico. Estes resultados são apresentados nas Figuras 5.4 e 5.5, para o safrol e o terpinoleno, respectivamente. A partir das curvas de calibração foi possível obter o percentual em massa destes compostos majoritários, para o óleo essencial de pimenta-longa obtido nas diferentes condições, relacionando a massa injetada da amostra com a área do pico gerado no cromatograma, respectivo ao composto de interesse. Os percentuais em massa dos compostos majoritários do óleo essencial da pimenta-longa estão apresentados na Tabela 5.5, comprovando que não há diferença na composição dos óleos essenciais obtidos em diferentes pressões de operação.

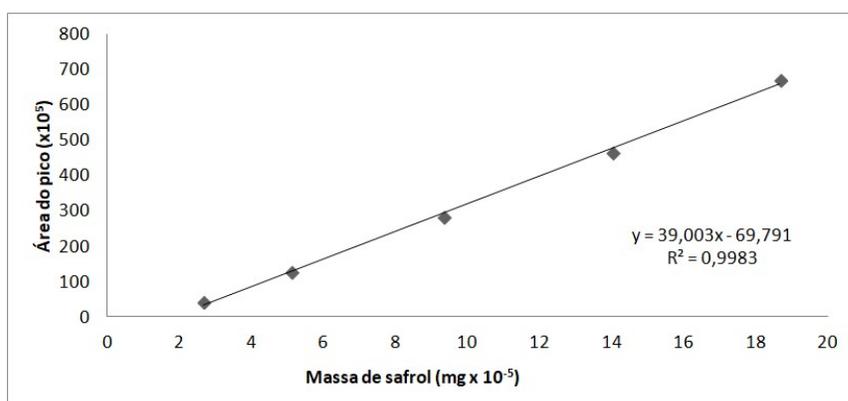


Figura 5.4: Curva de calibração para o padrão de safrol

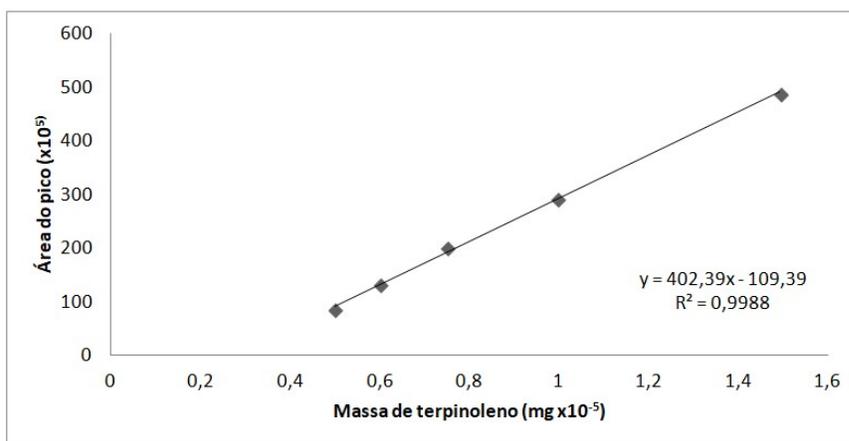


Figura 5.5: Curva de calibração para o padrão de terpinoleno

Tabela 5.5: % em massa de safrol e terpinoleno presente no óleo essencial da pimenta longa

Pressão Operacional	% em massa de Safrol	% em massa de Terpinoleno
1 atm	86,983 ± 2,783	4,237 ± 0,321
2 atm	85,356 ± 3,609	5,823 ± 0,032
3 atm	87,324 ± 3,764	4,134 ± 0,298

### 5.3. Fracionamento do óleo essencial da pimenta longa

O processo de fracionamento em batelada do óleo essencial de pimenta-longa foi realizado objetivando a obtenção de safrol com alto grau de pureza, bem como recuperar frações que contêm diferentes proporções mássicas dos compostos majoritários do óleo essencial (safrol e terpinoleno), devido à comprovada ação sinérgica entre estes dois compostos referente a atividades biológicas. A etapa de projeto e montagem estrutural da coluna de destilação em batelada foi realizada no escopo deste trabalho e o equipamento construído está apresentado na Figura 5.6.



Figura 5.6: Coluna de destilação fracionada que opera a vácuo, utilizada nos experimentos de fracionamento de óleo essencial de pimenta-longa.

Ensaio de validação utilizando água destilada foram realizados com o objetivo de verificar o funcionamento do equipamento, através do monitoramento do sistema de aquecimento, do controle da razão de refluxo e dos sensores de

temperatura e pressão, bem como a verificação da presença de vazamento. Os ensaios indicaram que equipamento estava apto para sua utilização em processos de destilação fracionada a vácuo de óleos essenciais.

### 5.3.1. Obtenção de parâmetros de processo da coluna de destilação

A obtenção de parâmetros de processo é uma etapa fundamental para realização da simulação computacional baseada no modelo matemático apresentado na seção 3.5. O *holdup* da coluna, obtido pela diferença entre o volume inicial da alimentação com o volume remanescente após o processo de destilação somado ao volume coletado no topo da coluna, resultou em  $2,12 \pm 0,11$  mL.

O número de pratos teóricos foi determinado utilizando 40 mL de uma mistura etanol/acetona (3:1 v/v) submetido ao processo de destilação na coluna projetada. Para o cálculo deste parâmetro foi utilizado o simulador descrito na seção 3.4.1, sendo necessária, previamente, a obtenção da composição do destilado no primeiro estágio de equilíbrio. Para isso, uma curva de calibração foi realizada utilizando amostras de uma mistura acetona/etanol com diferentes composições. A curva de calibração está apresentada na Figura 5.7 e a fração molar do destilado obtido no primeiro estágio de equilíbrio foi de 0,69 de acetona, resultando no número de pratos teóricos de 4 para coluna projetada.

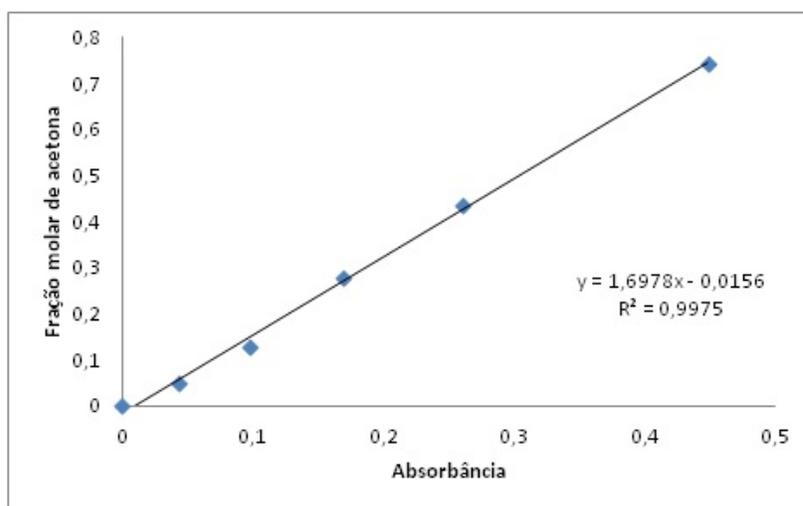


Figura 5.7: Curva de calibração para mistura acetona/etanol

### 5.3.2. Simulação computacional do processo de destilação em batelada

Visando à otimização do processo, a simulação computacional da destilação em batelada do óleo essencial de pimenta-longa foi realizada. Foi necessário previamente definir a mistura a ser separada, sendo baseada, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, no resultado da análise cromatográfica (seção 5.2). Foi realizada uma simplificação, considerando que o óleo essencial tivesse somente dez componentes, levando-se em conta os compostos majoritários. De posse das substâncias envolvidas, as moléculas foram criadas no software Avogadro, gerando um arquivo com as coordenadas espaciais de cada molécula envolvida.

O pacote semiempírico de química quântica MOPAC foi utilizado para interpretar as coordenadas espaciais e criar uma malha correspondente à distribuição de cargas na superfície molecular, gerando os perfis- $\sigma$ . O programa JCOSMO permite a visualização da distribuição de densidade de carga na superfície das moléculas. Na Figura 5.8 é apresentada a distribuição de densidade para as moléculas de safrol e terpinoleno, onde a região mais avermelhada representa um gradiente na densidade eletrônica, gerando possíveis não idealidades no comportamento da mistura.

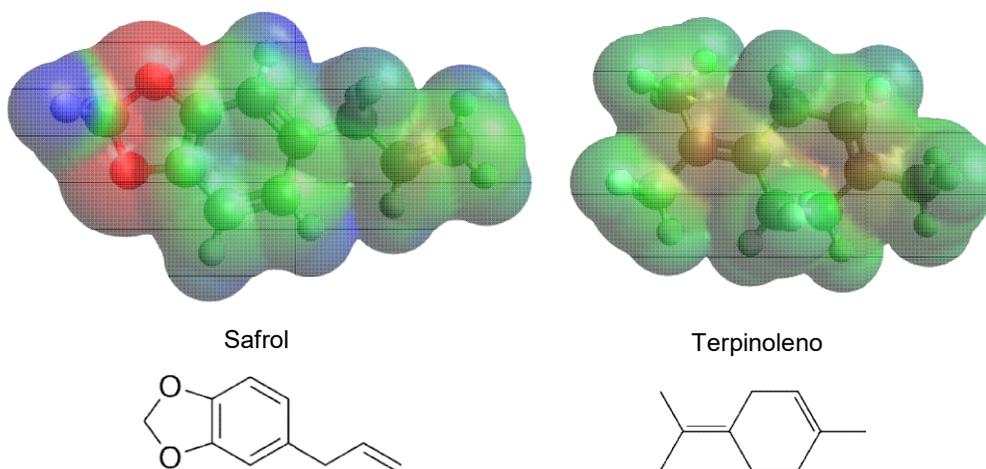


Figura 5.8: Imagens geradas pelo JCOSMO para visualização da distribuição de cargas.

Com a simulação foi possível obter um perfil de temperatura na coluna, calculado como consequência do equilíbrio termodinâmico de cada prato. Os patamares obtidos para temperatura de topo em relação ao tempo de processo (Figura 5.9) foram utilizados como tomada de decisão sobre quando o frasco de coleta de destilado deve ser trocado, permitindo assim a obtenção de diversos produtos por batelada, cada um com uma composição específica. Além disso, foi gerado um gráfico onde é possível avaliar a evolução da composição do destilado ao longo do tempo de batelada (Figura 5.10).

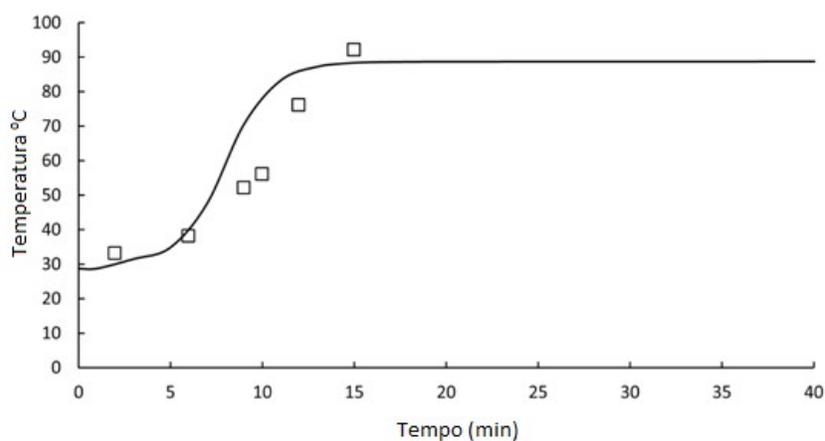


Figura 5.9: Temperatura de topo por tempo de destilação: simulação computacional (linha contínua); dados experimentais (marcação □).

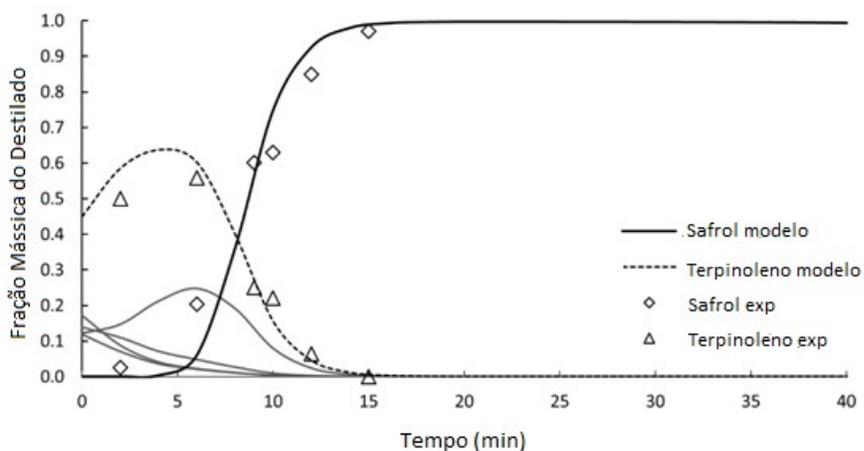


Figura 5.10: Fração mássica do destilado por tempo de destilação: simulação computacional e dados experimentais

Com os resultados da simulação computacional, foi possível estabelecer um tempo de operação de 5 min para obter uma composição de destilado rico em terpinoleno e de 15 min para obter um destilado contendo safrol com alto grau de pureza. Além disso, com a simulação foi possível estabelecer um paralelo entre a composição do destilado e a temperatura de topo da coluna, onde a fração rica em terpinoleno apresentou uma temperatura de topo de aproximadamente 34° C e a fração contendo safrol com alto grau de pureza apresentou uma temperatura de topo de 88° C.

### 5.3.3. Fracionamento experimental do óleo essencial da pimenta-longa

De posse dos dados da simulação computacional do processo de destilação do OE de pimenta longa, foi realizado o fracionamento experimental do óleo essencial na coluna projetada, utilizando 40 mL do OE de pimenta longa por batelada. O fracionamento teve como resultado a obtenção de frações com diferentes composições dos compostos majoritários safrol e terpinoleno, apresentado na Tabela 5.6. Com o processo foi possível obter frações ricas em terpinoleno, com uma composição de 55,90% em massa (Figura 5.5), bem como obter frações de safrol com alto grau de pureza, com composição de 97,09% em massa (Figura 5.4).

Tabela 5.6: Concentrações de safrol e terpinoleno das frações obtidas no processo de destilação em batelada a vácuo do óleo essencial de pimenta-longa

Fração	Temperatura (°C)	Safrol (%)	Terpinoleno (%)
1	33	2,63	50,07
2	38	20,40	55,90
3	52	60,08	25,03
4	56	63,04	22,04
5	76	84,90	6,45
6	92	97,09	0,04

Os resultados obtidos pela simulação estão de acordo com os dados obtidos experimentalmente, como apresentado na Figura 5.9 e 5.10. Este resultado demonstra que a simulação computacional aplicada ao processo é um método de confiável e preciso para prever o comportamento do fracionamento de óleos

essenciais, representando um importante avanço na aplicação de conceitos de engenharia no processamento de produtos naturais.

#### **5.4. Nanoemulsão do óleo essencial da pimenta-longa**

A etapa de preparação de nanoemulsões contendo o óleo essencial de pimenta-longa, a partir do método de dispersão e evaporação de solvente, foi realizada em triplicata e avaliada quanto à estabilidade pelo período de 5 meses após o processo de preparação. A determinação do diâmetro hidrodinâmico das gotículas, realizada por espalhamento de luz dinâmica (DLS), resultou num tamanho de partícula de  $178,21 \pm 6,32$  nm, indicando que a emulsão preparada possui dimensão nanométrica. A nanoemulsão apresenta reprodutibilidade quanto aos resultados, tendo em vista o baixo desvio padrão da análise, resultando num coeficiente de variação de 3,54%, considerado estatisticamente como dados homogêneos com baixa dispersão nos resultados (Tabela 4.1).

O índice de polidispersão obtido foi de  $0,151 \pm 0,013$ , caracterizando como um sistema monodisperso. Os resultados também apresentaram reprodutibilidade, apresentando um coeficiente de variação de 8,31%, considerado estatisticamente como dados homogêneos (Tabela 4.1). Além disso, a monodispersão apresentada é um indicativo de estabilidade, já que sistemas polidispersos são mais suscetíveis a coalescer.

O potencial zeta foi de  $-27,60 \pm 1,20$  mV, indicando que a nanoemulsão preparada apresenta estabilidade por carga gerada pelo efeito de repulsão eletrostática entre as gotículas. O coeficiente de variação obtido foi de 4,34%, também indicando uma boa reprodutibilidade nos resultados (Tabela 4.1).

Apesar de todos os resultados obtidos indicarem que a nanoemulsão preparada apresenta uma boa estabilidade, esta foi comprovada pela avaliação do diâmetro hidrodinâmico ao longo de 5 meses após o processo de preparação. A Figura 5.11 apresenta graficamente o perfil de distribuição do tamanho das gotículas, indicando que não houve variação significativa no período avaliado.

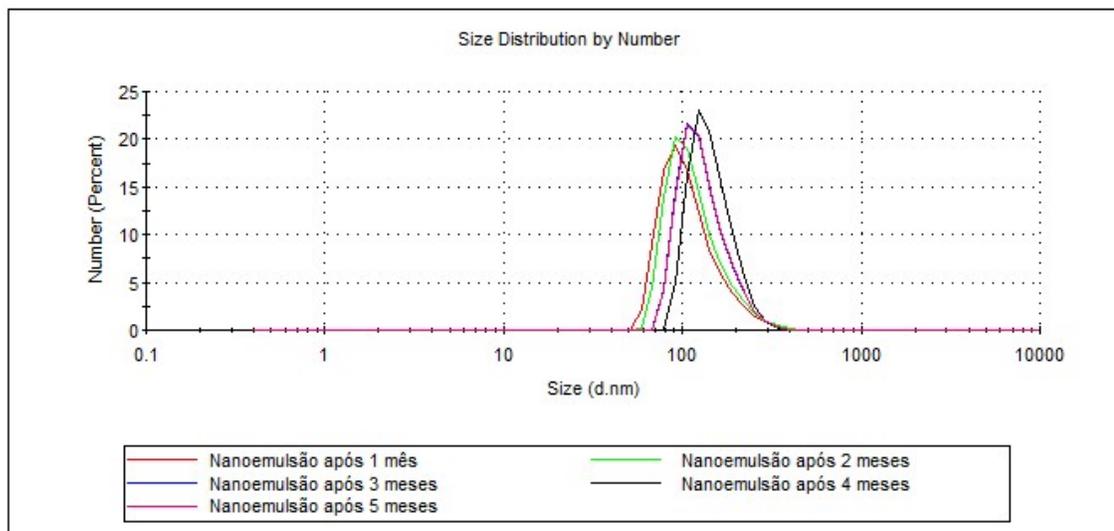


Figura 5.11: Distribuição do tamanho das gotículas da nanoemulsão do óleo essencial de pimenta-longa por DLS avaliadas, ao longo de 5 meses.

A quantificação da massa de óleo essencial perdida no processo de preparação da nanoemulsão também foi realizada, tendo em vista que a etapa de remoção do solvente no processo se dá à pressão reduzida, podendo acarretar na volatilização dos compostos terpênicos. Para isso, a análise da concentração de óleo essencial presente nas nanoemulsões foi realizada em triplicata por espectrofotometria. O comprimento de onda aplicado no experimento foi de  $\lambda = 285$  nm, obtido experimentalmente, utilizando um espectrofotômetro com varredura para uma solução contendo o óleo essencial de pimenta-longa em diferentes concentrações. A Figura 5.12 apresenta o resultado da análise por espectrofotometria com varredura, onde o pico próximo a  $\lambda = 285$  nm teve variação linear com a concentração de óleo essencial presente nas amostras, estando de acordo com referências encontradas na literatura (Archer, 1988; Saputri et al., 2014), onde é relatado que o composto majoritário do óleo essencial, o safrol, possui picos de absorvância na faixa de comprimento de onda entre 282 e 287 nm.

Após a definição do comprimento de onda foi construída a curva de calibração da concentração do óleo essencial *versus* absorvância, utilizando diferentes concentrações do óleo essencial diluídos em acetato de etila, realizado em triplicata, onde cada concentração foi analisada três vezes, visando à minimização do erro

experimental. A Figura 5.13 apresenta a curva de calibração gerada com um coeficiente de determinação de  $R^2 = 0,999$ .

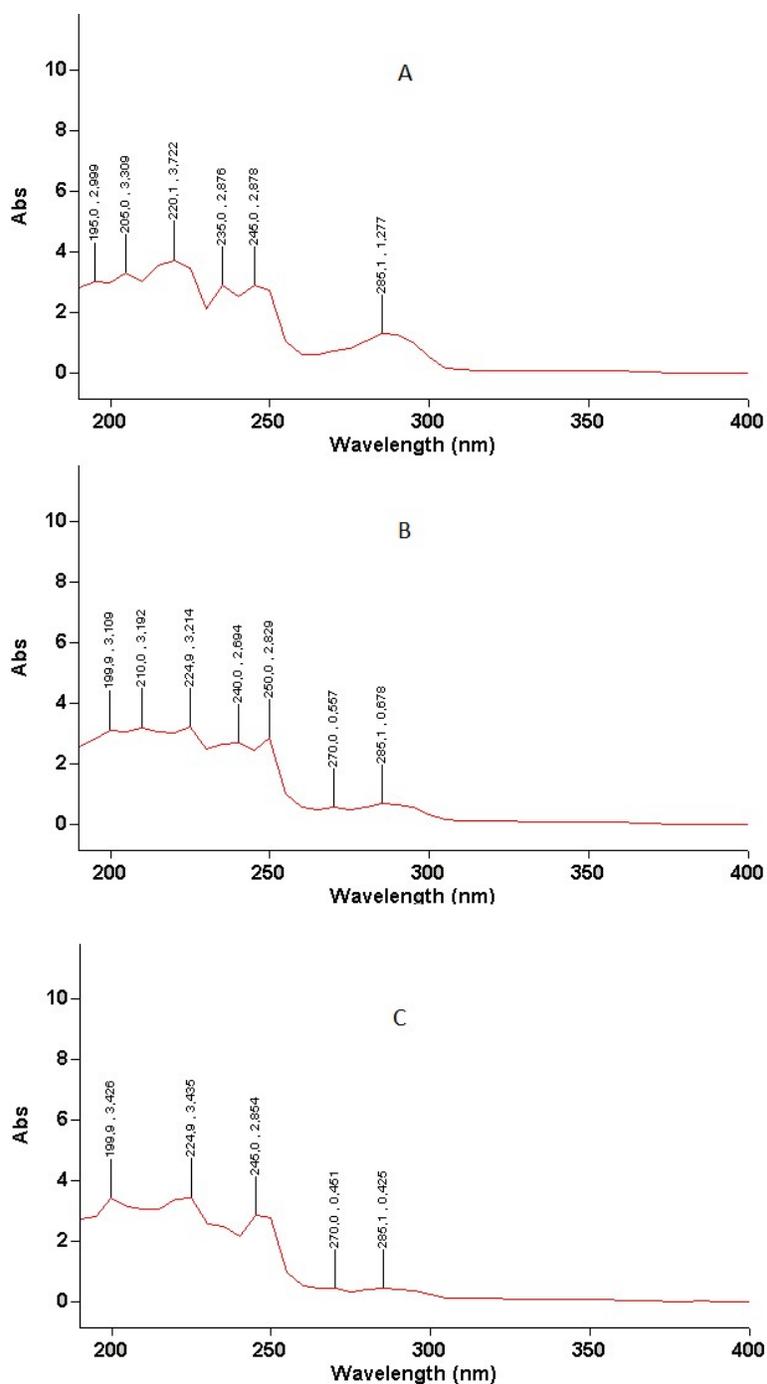


Figura 5.12. Resultados das análises espectrofotométricas com varredura para o óleo essencial de pimenta-longa: (A) concentração de 0,05 mg/mL; (B) concentração de 0,025 mg/mL; (C) concentração de 0,0125 mg/mL

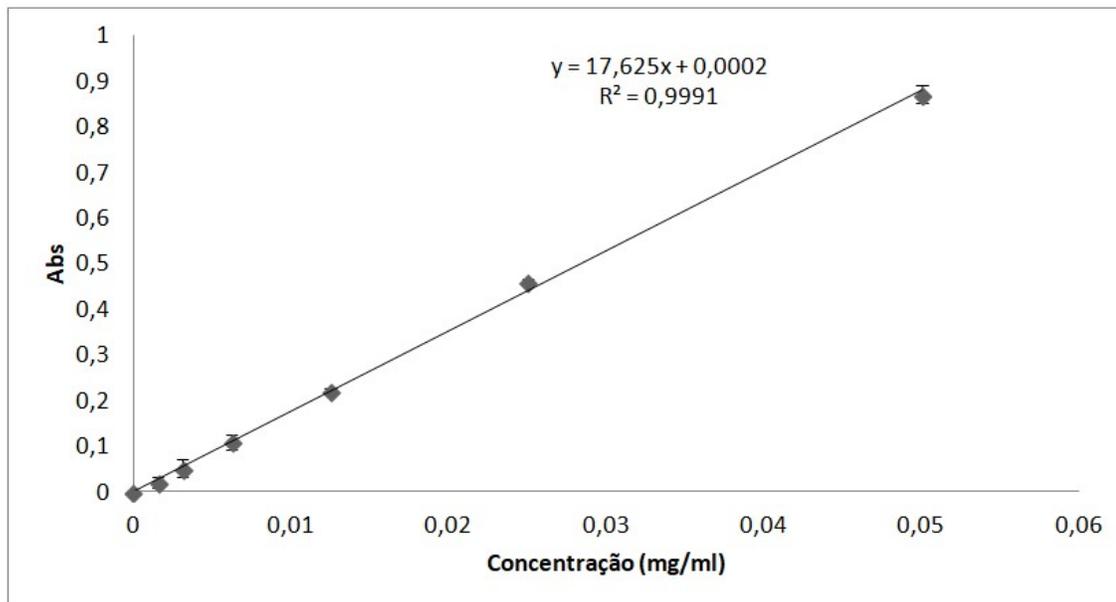


Figura 5.13: Curva de calibração da concentração do óleo essencial de pimenta-longa *versus* absorbância

O resultando da concentração média de óleo essencial de *P. hispidinervum* nas nanoemulsões preparadas foi de  $9,144 \pm 0,231$  mg/mL. Portanto, das 350 mg de óleo essencial utilizadas no processo, 75,68 mg evaporaram na etapa de remoção do solvente, resultando em uma perda de 21,62% do óleo essencial.

### 5.5. Nanoencapsulação do óleo essencial da pimenta longa

A preparação de nanopartículas poliméricas contendo o óleo essencial de pimenta-longa, através do método de nanoprecipitação, foi realizada em triplicata para diferentes formulações, variando a proporção mássica polímero/óleo essencial. As formulações denominadas F1 e F7 apresentaram um acúmulo de polímero (policaprolactona) no final do processo, sendo um indicativo que houve um excesso do material polimérico na formulação, não sendo nas demais etapas de análise. A análise do diâmetro hidrodinâmico das partículas, realizada por DLS, para as demais formulações, bem como o índice de polidispersão e potencial zeta, estão apresentados na Tabela 5.7. A partir de uma análise dos resultados foi possível observar que as formulações F2 – F6 geraram resultados semelhantes. Em relação ao tamanho de partícula, os resultados variam entre 205 nm a 230 nm, indicando a dimensão nanométrica, com coeficientes de variação considerados estatisticamente

baixos, de acordo com a Tabela 4.1. A exceção foi a formulação F5 que apresentou um coeficiente de variação com média dispersão entre as amostras, podendo considerar, mesmo assim, uma boa reprodutibilidade nos resultados. Na Figura 5.14 são apresentados os resultados da distribuição do tamanho das partículas para as formulações F2 – F6, evidenciando a similaridade nos valores obtidos.

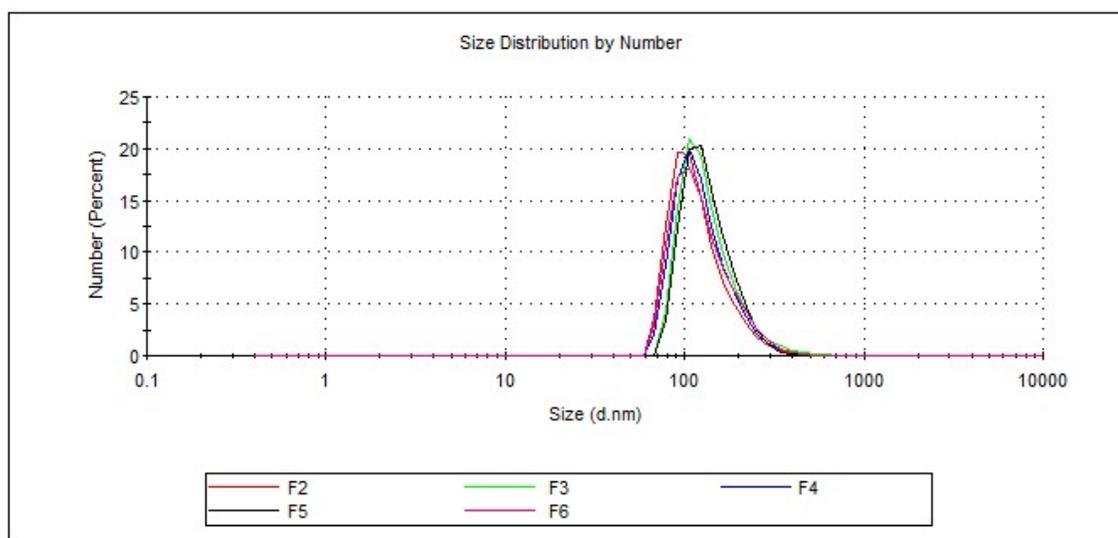


Figura 5.14. Distribuição do tamanho das partículas para as nanopartículas de policaprolactona contendo o óleo essencial de pimenta-longa, preparadas com diferentes razões mássica polímero/óleo e analisadas por espalhamento de luz dinâmica (DLS).

Tabela 5.7: Resultados da análise por espalhamento de luz dinâmica DLS para as formulações das nanopartículas de policaprolactona contendo o óleo essencial de pimenta-longa.

Formulação	Razão	Tamanho (nm)	Cv <sup>a</sup> (%)	Pdi	Cv <sup>b</sup> (%)	Potencial zeta (mV)	Cv <sup>c</sup> (%)
F2	1:1	205,93±12,64	6,11	0,141±0,022	15,61	-25,43±2,31	9,08
F3	1:2	215,35±8,19	3,80	0,167±0,022	13,36	-22,21±2,14	9,63
F4	1:3	229,63±23,05	10,04	0,198±0,012	6,10	-20,84±3,32	15,93
F5	1:4	232,60±39,02	16,77	0,196±0,019	9,59	-26,34±4,98	18,91
F6	1:5	221,067±11,55	5,23	0,155±0,016	10,05	-21,56±1,32	6,12

Legenda: Cv: coeficiente de variação; Pdi – índice de polidispersão; a – dados relacionado ao tamanho de partícula; b – dados relacionado ao índice de polidispersão; c – dados relacionado ao potencial zeta.

O índice de polidispersão das formulações preparadas (F2 – F6) variou entre 0,140 a 0,198, caracterizando os sistemas formulados como monodispersos, com boa reprodutibilidade nos resultados, avaliada a partir do coeficiente de variação  $Cv^b$ . Somente a formulação F2 obteve uma dispersão dos resultados considerado estatisticamente média (Tabela 4.1). Vale salientar que a monodispersão no tamanho das partículas é um indicativo de estabilidade, pois apresentam menor tendência a coalescência, quando comparados a sistemas com polidispersão.

O potencial zeta variou entre -20,84 a -26,34 mV, indicando estabilidade por carga, já que o sistema apresenta carga elétrica na superfície das partículas, proporcionando efeitos de repulsão eletrostática. Os resultados também apresentaram boa reprodutibilidade, avaliados a partir do coeficiente de variação  $Cv^c$ , onde apenas as formulações F4 e F5 apresentaram um coeficiente de variação que considera média dispersão dos dados, estatisticamente (Tabela 4.1).

O uso de uma sonda ultrassônica durante a etapa de preparação das nanopartículas foi aplicado para formulação F6 com o objetivo de avaliar o seu efeito no tamanho das partículas formadas, utilizando cinco diferentes amplitudes (0%, 20%, 30%, 40% e 50%). Na Figura 5.15 é apresentada a distribuição do tamanho do diâmetro hidrodinâmico das partículas formadas que passaram pelo tratamento ultrassônico. Pela imagem é possível concluir que o uso de ultrassom no preparo das partículas não influi no tamanho das mesmas, independentemente da amplitude utilizada.

A morfologia das partículas obtidas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEG-FEG) e as imagens obtidas são apresentadas na Figura 5.16. As partículas apresentaram uma morfologia esférica e homogênea, o que está de acordo com o esperado, visto que preparação das partículas parte de uma nanoemulsão com uso de tensoativo, onde o formato esférico corresponde à formação de micelas deste composto anfifílico.

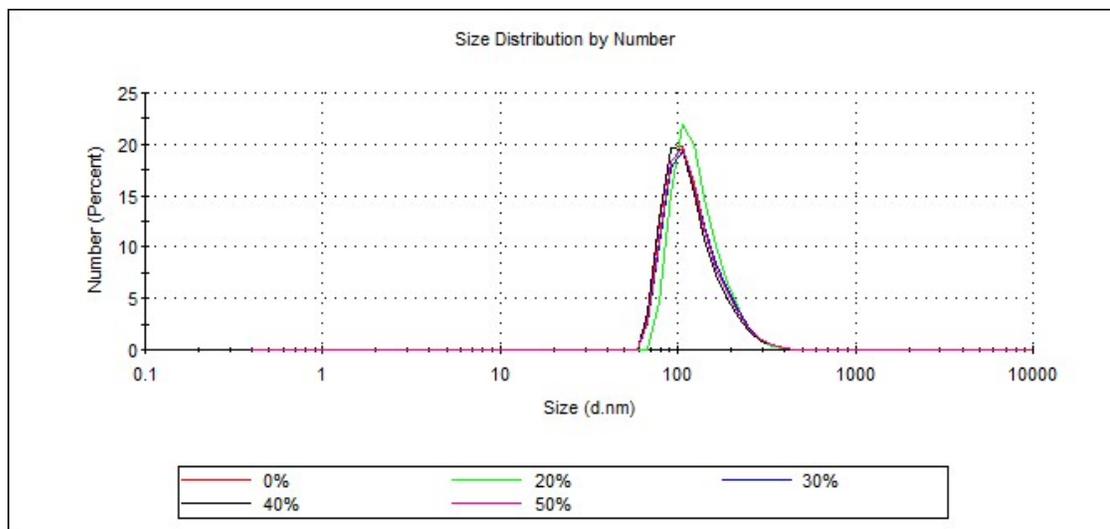


Figura 5.15 - Distribuição do tamanho do diâmetro hidrodinâmico das partículas formadas para cada amplitude aplicada na sonda.

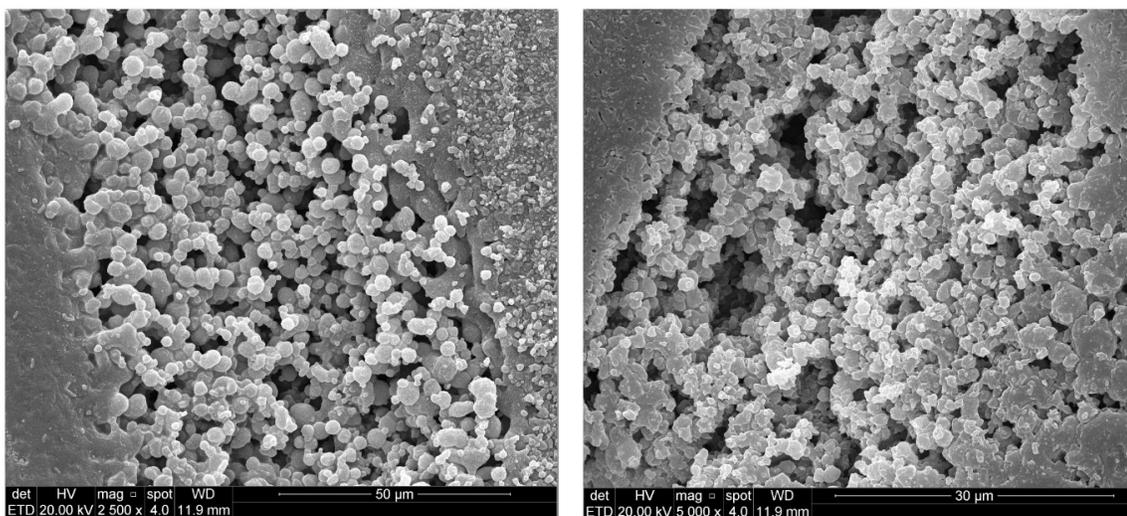


Figura 5.16 - Morfologia das partículas obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEG-FEG)

A eficiência do processo de encapsulação do óleo essencial de pimenta-longa nas nanopartículas de policaprolactona foi determinada por espectrofotometria, utilizando a curva de calibração apresentada na Figura 5.8. Na Tabela 5.7 são apresentados os resultados obtidos para cada uma das cinco formulações, onde foi quantificada a variação na concentração de óleo essencial durante o processo de preparação das nanopartículas, bem como a concentração do óleo livre presente na suspensão após o processo de filtração. Na literatura (Pinto et al., 2016; Christofoli

et al., 2015), valores de eficiência de encapsulação são calculados apenas pela diferença da concentração inicial pela concentração de óleo essencial livre remanescente do processo de filtração, não contabilizando a perda de massa de óleo essencial durante o processo de preparação, resultando em valores não fidedignos. Analisando a Tabela 5.7, pode-se concluir que a perda de massa no processo de preparação é significativa e altera os valores de eficiência, variando de 0,101 mg/mL (F2) até 1,885 mg/mL (F6), em média. Os resultados obtidos para concentração final de óleo essencial presente na suspensão das nanopartículas formadas apresentaram boa reprodutibilidade, considerados, estatisticamente, dados homogêneos pelo seu coeficiente de variação.

Já para os valores de concentração do óleo essencial livre das partículas, avaliados após o processo de filtração, apenas a formulação F2 não apresentou uma boa reprodutibilidade nos resultados, obtendo-se neste caso um coeficiente de variação que qualifica as amostras como heterogêneas (Tabela 4.1), que justifica a não apresentação do valor da eficiência de encapsulação para esta formulação na Tabela 5.8. Destaca-se que demais formulações apresentaram boa reprodutibilidade.

Tabela 5.8: Eficiência no processo de encapsulação do óleo essencial de pimenta longa em nanopartículas de policaprolactona

Formulação	Conc. Inicial de OE (mg/mL)	Conc. final de OE (mg/mL)	Cv <sup>a</sup> (%)	Conc. de OE filtrado (mg/mL)	Cv <sup>b</sup> (%)	Massa de óleo encapsulada (mg/mL)	Eficiência de Encapsulação
F2	2,430	2,329±0,171	7,34	0,358±0,147	41,06	-	-
F3	4,660	3,437±0,104	3,02	0,329±0,046	13,98	3,108	66,689
F4	7,000	5,094±0,924	18,14	0,522±0,031	5,94	4,572	65,309
F5	9,330	7,728±0,884	11,43	0,776±0,145	18,68	6,952	74,511
F6	11,760	9,875±0,437	4,42	0,635±0,049	7,72	9,240	78,571

Legenda: Cv<sup>a</sup>- coeficiente de variação referente à concentração final de óleo essencial; Cv<sup>b</sup>- coeficiente de variação referente à concentração de óleo essencial filtrado

A partir dos resultados obtidos, a eficiência do processo de encapsulação foi calculada, variando entre 66 a 78% para as demais formulações, sendo que a razão polímero/óleo de 5:1 (F6) é a que apresenta maior eficiência, indicando que esta

proporção é a mais indicada para o processo de nanoencapsulação do óleo essencial de pimenta-longa em policaprolactona, dentro das condições investigadas.

### **5.6. Avaliação do perfil de evaporação do óleo essencial de pimenta-longa nanoencapsulado em policaprolactona**

A avaliação do perfil de evaporação do óleo essencial de *P. hispidinervum* presente nas nanopartículas de policaprolactona foi realizada pelo período de 28 dias, utilizando uma célula de Arnold. O mesmo procedimento foi realizado para nanoemulsões formuladas, estabelecendo uma comparação entre os perfis de evaporação, objetivando verificar se de revestimento físico do óleo essencial retardou o seu processo difusivo.

O modelo matemático proposto para representar o fenômeno de difusão necessita de parâmetros (difusividade mássica do óleo essencial no ar; pressão de vapor do óleo essencial e a constante de Henry), os quais foram determinados a partir de dados experimentais.

A difusividade mássica do óleo essencial no ar foi calculada através do modelo pseudoestacionário (Equação 4.17), sendo obtida a partir de dados experimentais da variação da massa do óleo ao longo do tempo, no interior da célula de Arnold.

A pressão de vapor do óleo essencial é um parâmetro utilizado no cálculo da difusividade mássica através do modelo pseudoestacionário apresentado, sendo determinada pela análise por termogravimetria com análise térmica diferencial (TG-DTA). A equação de Langmuir (Equação 4.19) relaciona a pressão de vapor numa determinada temperatura com a taxa de perda de massa, sendo necessário determinar a constante  $k$  por calibração.

Padrões de limoneno e eucalipitol foram analisados no TG-DTA para determinação da constante  $k$ , resultando num valor de  $1,572 \pm 0,025 \cdot 10^6$  Pa.kg<sup>-1</sup>.

$0,5 \cdot \text{mol}^{-0,5} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{K}^{-0,5}$  em média. As Figuras 5.17 e 5.18 apresentam a análise por TG-DTA dos padrões de limoneno e eucalipitol, respectivamente.

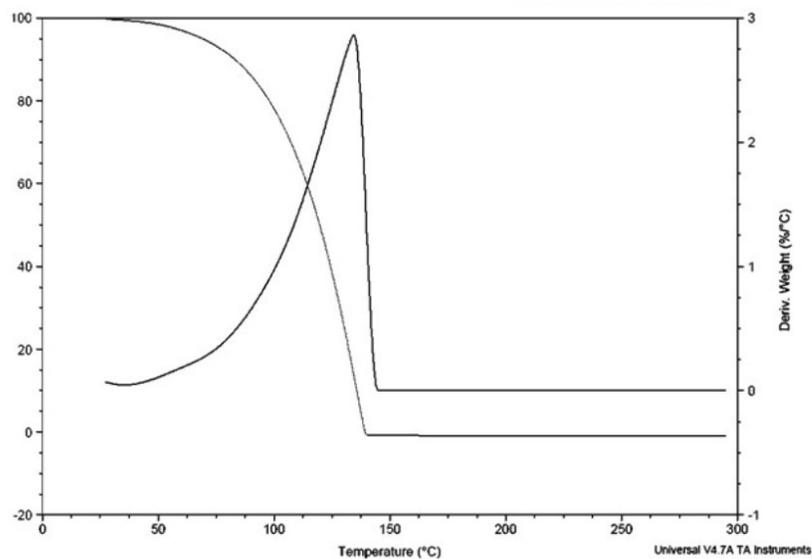


Figura 5.17. Análise por TG-DTA do limoneno

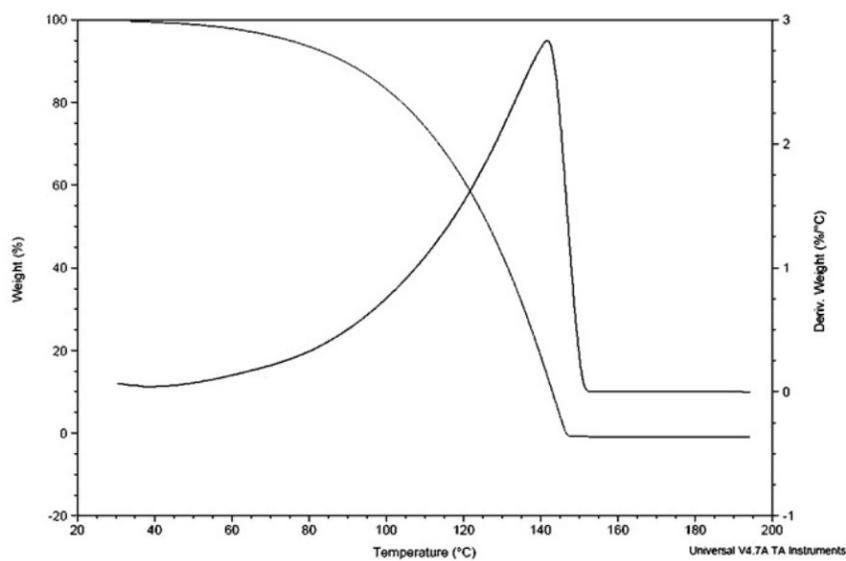


Figura 5.18. Análise por TG-DTA do eucalipitol

Após a obtenção da constante  $k$  da equação de Langmuir, tendo como referência os padrões de limoneno e eucalipitol, a análise por TG-DTA do óleo

essencial de pimenta-longa foi realizada (Figura 5.19) com o objetivo de determinar a pressão de vapor.

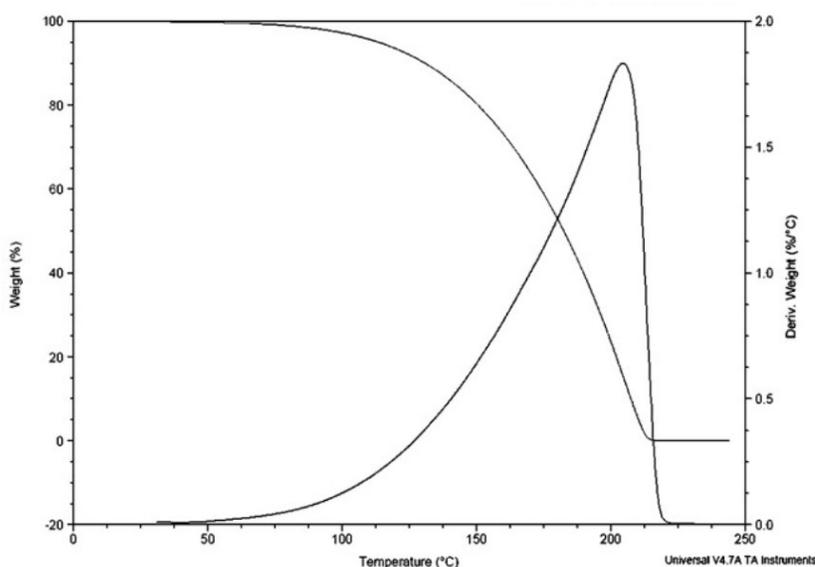


Figura 5.19: Análise por TG-DTA do óleo essencial de pimenta longa.

A massa molar média do óleo essencial de *P. hispidinervum*, calculado a partir da composição obtida por CG/EM, é de  $158,3 \text{ g.mol}^{-1}$ , possibilitando assim construir uma curva para pressão de vapor em função da temperatura pela equação de Langmuir (Equação 4.19), variando de 298 até 478 K. A partir da curva gerada, parâmetros da equação de Antoine foram ajustados por mínimos quadrados, resultando em  $A=15,60$ ;  $B= 1353,56$  e  $C= 194,28$ , gerando a equação 5.1 para o cálculo da pressão de vapor em função da temperatura para o óleo essencial de *P. hispidinervum*.

$$\ln p(\text{Pa}) = 15,60 - \frac{1353,56}{T(\text{K}) - 194,28} \quad (5.1)$$

A pressão de vapor do óleo essencial utilizada para o cálculo da difusividade mássica no ar foi de 12,81 Pa, correspondendo ao valor desta propriedade na temperatura de 298K. Este valor vai de encontro de dados da literatura para pressão

de vapor do safrol, composto majoritário do óleo, que apresenta valor de 11,60 Pa, muito próximo do valor obtido.

A partir da determinação da pressão de vapor do óleo essencial, o modelo pseudoestacionário foi aplicado aos dados obtidos pelo experimento na célula de Arnold, onde se constatou que a massa de óleo essencial evaporada, após 168h do início do processo difusivo, foi de  $0,014 \pm 0,002$  g, resultando numa difusividade mássica do óleo de pimenta-longa no ar de  $210,53 \pm 13,53$  cm<sup>2</sup> h<sup>-1</sup>.

A determinação da constante de Henry foi realizada através da análise da composição da fase vapor em equilíbrio com uma fase líquida que contém as nanocápsulas, preparadas com diferentes concentrações do óleo essencial de pimenta-longa. A mesma análise foi aplicada às nanoemulsões, para assim estabelecer uma comparação no perfil de evaporação do óleo essencial livre presente na nanoemulsão com o óleo essencial encapsulado presente na suspensão das nanopartículas. Os dados de equilíbrio líquido-vapor são apresentados na Figura 5.20, onde é perceptível a linearidade nos dados obtidos, comprovando a hipótese que a lei de Henry se aplica a baixas concentrações, condições características dos experimentos realizados.

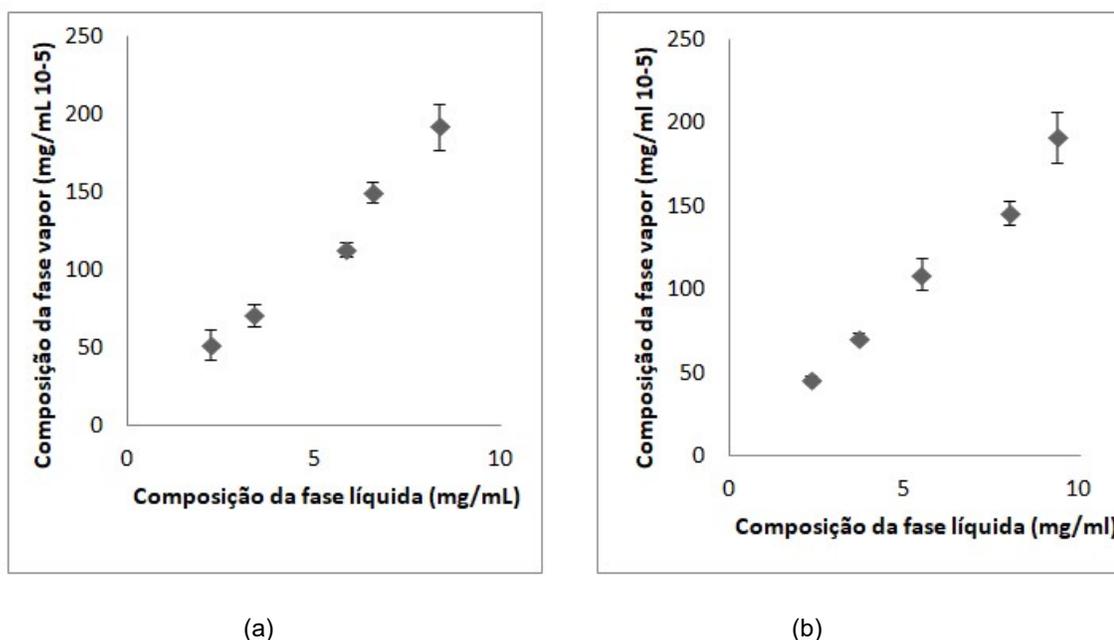


Figura 5.20. Dados do equilíbrio líquido-vapor do óleo essencial de pimenta-longa livre nanoemulsionado (a) e do óleo essencial de pimenta-longa encapsulado em policaprolactona (b).

Os valores das constantes de Henry para o óleo essencial de pimenta-longa presente nas nanoemulsões e para o óleo essencial de pimenta-longa encapsulado em policaprolactona estão apresentados na Tabela 5.9. Os resultados obtidos demonstram uma pequena variação no valor da constante de Henry, indicando que o revestimento físico promovido pelas nanocápsulas de policaprolactona resultou apenas numa pequena redução na volatilidade do óleo essencial.

Tabela 5.9: Constante de Henry para nanoemulsão e para as nanopartículas

Constante de Henry $\left(\frac{\text{mg/mL fase vapor}}{\text{mg/mL fase líquida}}\right)$	
Óleo nanoemulsionado (Nanoemulsão)	Óleo encapsulado (Nanopartículas)
$2,202 \pm 1,771 \cdot 10^{-4}$	$1,956 \pm 2,163 \cdot 10^{-4}$

Os perfis de evaporação da nanoemulsão e das nanocápsulas, determinado experimentalmente na célula de Arnold, são apresentados na Figura 5.21, juntamente com o modelo matemático proposto para representação do fenómeno estudado (Equação 4.12 e 4.13). Os dados experimentais obtidos comprovam que a alteração na volatilidade do óleo essencial promovida pelo revestimento físico das nanopartículas foi muito pequena, não demonstrando diferença significativa em relação ao perfil de evaporação do óleo emulsionado. Após 28 dias do início do processo difusivo, a massa de óleo essencial evaporada da nanoemulsão foi de  $88,89 \pm 4,98$  mg, comparado com  $83,03 \pm 0,55$  da nanopartículas.

Em relação à modelagem matemática proposta (Equação 4.12 e 4.13), obteve-se boa representação dos dados experimentais (Figura 5.16). A resolução do sistema de equações foi realizada numericamente, utilizando um passo temporal de 0,002 h e um passo no espaço de 1 cm, satisfazendo a análise de estabilidade de Van Neumann. O modelo em questão não possui nenhum parâmetro ajustável, sendo baseado apenas em dados obtidos experimentalmente (constante de Henry e a difusividade mássica do óleo essencial no ar) comprovando a veracidade dos resultados. A boa representação matemática dos dados experimentais comprova as hipóteses realizadas para a aplicação do modelo. É importante salientar que estas

hipóteses consistem em uma proposta deste trabalho para sistemas que envolvem nanoemulsão e nanocápsulas, tornando este modelo matemático uma ferramenta importante para simulações do fenômeno estudado.

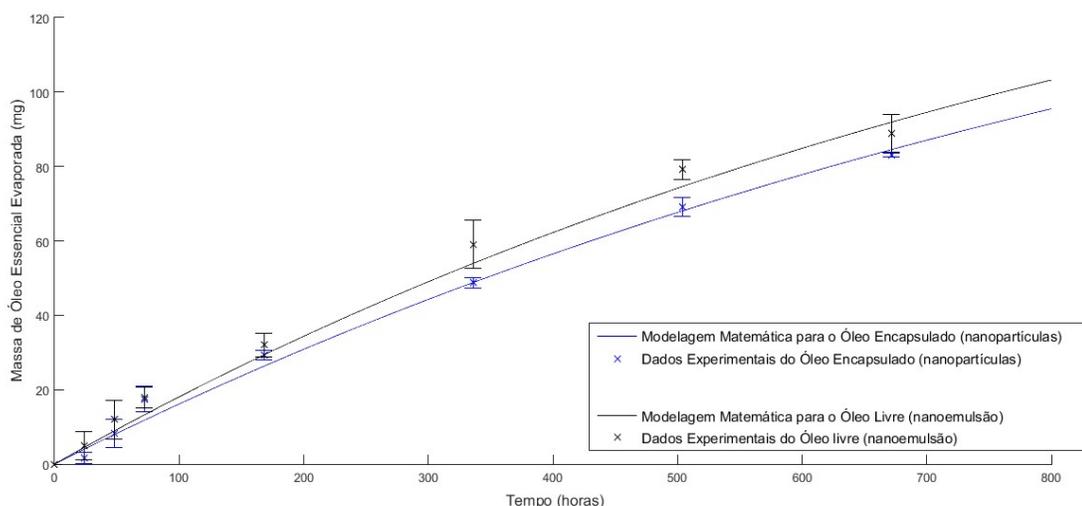


Figura 5.21: Dados experimentais e modelagem matemática do perfil de evaporação do óleo essencial de pimenta longa

## 5.7. Considerações finais

Este trabalho tem como proposta desenvolver uma metodologia para formulação de nanocápsulas e nanoemulsões contendo princípios ativos com capacidade carrapaticida comprovada (Cassel et al., 2016). O trabalho percorreu diversas etapas, partindo do uso da planta *in natura* como matéria-prima para obtenção do seu óleo essencial. Nesta etapa do trabalho foi realizado o estudo do processo de extração por arraste a vapor em diferentes pressões de operação e sua modelagem matemática. Uma modificação do modelo matemático de Reverchon (1996) foi proposta referente à adição da variável porosidade como uma função do tempo, o que representou uma modificação adequada do modelo original, permitindo uma representação mais fidedigna da fenomenologia presente no processo, visto que há variação da porosidade do leito extrativo ao longo do processo extrativo.

Outro escopo deste trabalho foi realizar o fracionamento do óleo essencial da pimenta longa por destilação em batelada, visando obter safrol com alto grau de

pureza, bem como recuperar frações que contêm diferentes proporções mássicas dos compostos majoritários do óleo essencial (safrol e terpinoleno), devido à comprovada ação sinérgica entre estes dois compostos referentes a atividades biológicas. Nesta etapa do trabalho foi realizado o projeto e montagem estrutural de uma coluna de destilação em batelada, simulação computacional do processo e ensaios experimentais, gerando resultados satisfatórios que representaram um importante avanço na aplicação de conceitos de engenharia no processamento de produtos naturais.

A seguinte etapa do trabalho consistiu na preparação de nanoemulsões contendo o óleo essencial da pimenta-longa, com o objetivo de produzir uma solução homogênea e estável, onde os compostos estariam dispersos de maneira homogênea e em concentrações adequadas para sua aplicação. A partir da análise por difração de luz dinâmica (DLS) pode-se concluir que a nanoemulsão preparada apresentou uma boa estabilidade, comprovada pela avaliação do diâmetro hidrodinâmico ao longo de 5 meses. Outra etapa consistiu na produção de nanopartículas de policaprolactona contendo o óleo essencial da pimenta-longa com o objetivo de proporcionar um revestimento físico aos compostos terpênicos do óleo essencial, de maneira a prolongar o tempo de permeância destes compostos no meio de ação por evitar sua volatilização. As nanopartículas foram preparadas em diferentes formulações, variando a razão mássica polímero/OE e obtiveram resultados satisfatórios quanto ao índice de polidispersão, tamanho de partícula, potencial zeta e eficiência de encapsulação.

Por fim foi realizada a avaliação do perfil de evaporação do óleo essencial de pimenta-longa com o objetivo de verificar se de fato o procedimento de revestimento físico do óleo essencial retardou o seu processo difusivo, através da comparação entre o perfil de evaporação do OE nas nanopartículas com o perfil de evaporação do OE nanoemulsionado. Os dados experimentais obtidos indicaram que a alteração na volatilidade do óleo essencial promovida pelo revestimento físico das nanopartículas foi muito pequena, não demonstrando diferença significativa em relação ao perfil de evaporação do óleo emulsionado.

A modelagem matemática proposta apresentou uma boa representação dos dados experimentais, comprovando as hipóteses realizadas para a aplicação da mesma. É importante salientar que é uma proposta deste trabalho as hipóteses aplicadas ao modelo matemático para sistemas que envolvem nanoemulsão e nanopartículas, bem como a realização de um estudo comparativo da cinética de liberação do OE entre os dois sistemas (nanopartícula e nanoemulsão).

Vale destacar que o trabalho em questão está diretamente vinculado ao pedido de patente intitulado “Formulação ixodicida a partir de *Piper hispidinervum* encapsulado” (Cassel et al, 2016), realizado em parceria com o Instituto de Ciências Agrárias do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICA-CSIC) de Madrid, bem como as publicações intituladas: “*Biocidal effects of piper hispidinervum (piperaceae) essential oil and synergism among its main components*” (Andrés et al., 2017) e “*Sequential extraction methods applied to Piper hispidinervum: an improvement in the processing of natural products*” (Rossa et al., 2018).

## 6. CONCLUSÃO

Com os resultados deste trabalho pode-se concluir que na etapa extração por arraste a vapor o efeito da variação da pressão de operação no rendimento do processo e na composição do óleo essencial não foi significativo. A adaptação do modelo matemático de Reverchon (1996) para o processo extrativo representou uma modificação adequada e obteve um bom ajuste aos dados experimentais.

O fracionamento do óleo essencial de pimenta-longa teve como resultado a obtenção de frações com diferentes composições dos compostos majoritários safrol e terpinoleno e a simulação computacional aplicada ao processo se mostrou precisa para prever o comportamento do fracionamento de óleos essenciais, representando um importante avanço na aplicação de conceitos de engenharia no processamento de produtos naturais.

As nanoemulsões preparadas contendo o óleo essencial da pimenta-longa apresentaram uma boa estabilidade, comprovada pela avaliação do diâmetro hidrodinâmico ao longo de 5 meses, e as nanocápsulas de policaprolactona contendo o OE de pimenta-longa obtiveram resultados satisfatórios quanto ao índice de polidispersão, tamanho de partícula, potencial zeta e eficiência de encapsulação.

Os perfis de evaporação da nanoemulsão e das nanocápsulas indicaram que a alteração na volatilidade do óleo essencial promovida pelo revestimento físico das nanopartículas foi muito pequena, não demonstrando diferença significativa em relação ao perfil de evaporação do óleo emulsionado. Já a modelagem matemática proposta apresentou uma boa representação dos dados experimentais, mesmo sem a utilização de uma função objetivo com ajuste de parâmetros, comprovando as hipóteses realizadas para a aplicação da mesma.

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

As propostas para trabalhos futuros estão descritas abaixo:

- Ensaio biológico *in vitro* das nanoemulsões e das nanocapsulas preparadas
- Ensaio biológico *in vivo* das nanoemulsões e das nanocapsulas preparadas

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Flávia OMS et al. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate polymers*, v. 89, n. 4, p. 1277-1282, 2012.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, v. 303, n. 5665, p. 1818-1822, 2004.

ALMEIDA, R. N. ; SOARES, R. P. ; CASSEL, E. . Fractionation process of essential oils by batch distillation. *Brazilian journal of chemical engineering*, v. 35, p. 1129-1140, 2018.

ALMEIDA, Rafael Nolibos. Processo de retificação de óleos essenciais por destilação em batelada: termodinâmica, modelagem e simulação. 2016.

AMRUTHA, Balagopal; SUNDAR, Kothandapani; SHETTY, Prathap Kumar Halady. Spice oil nanoemulsions: Potential natural inhibitors against pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. from fresh fruits and vegetables. *LWT-Food Science and Technology*, v. 79, p. 152-159, 2017.

ANDRÉS, M. F. et al. Biocidal effects of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil and synergism among its main components. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, p. 1086-1092, 2017.

ARCHER, A. W. Determination of safrole and myristicin in nutmeg and mace by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 438, p. 117-121, 1988.

ASBAHANI, A., MILADI, K., BADRI et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, v.483, p. 220-243, 2015.

BAKKALI, F, AVERBECK, S; AVERBECK, D; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, p. 446-475, 2008.

BEIRÃO-DA-COSTA, Sara et al. Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of Oregano essential oil. *Food Hydrocolloids*, v. 33, n. 2, p. 199-206, 2013.

BENYOUSSEF, E. H; HASNI, S; BELABBES, R; BESSIERE, J. M. Modélisation du transfert de matière lors de l'extraction de l'huile essentielle des fruits de coriandre. *Chemical Engineering Journal*, n.85, 2002.

BEYKI, M., ZHAVEH, S., Khalili, S. T. et al. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, v. 54, p. 310-319, 2014.

CALLIGARIS, I. B., OLIVEIRA, P. R., ROMA, G. C. et al. Action of the insect growth regulator fluazuron, the active ingredient of the acaricide Acatak®, in *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Microscopy research and technique*, v. 76, n. 11, p. 1177-1185, 2013.

CASSEL, E., Vargas, R. M. F., LUCAS, A. M., ROSSA, G. E., GONZALEZ-COLOMA, A., ANDRES, M. F., HERNANDEZ, C. E. D., ARTILES, M. R., GRACIA, A. S. O. Composição ixodicida e método para controle de carrapatos. 2016, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020160298830, título: "Composição ixodicida e método para controle de carrapatos", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 19/12/2016

CASSEL, E.; VARGAS, R.; MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Industrial Crops and Products*, v. 29, n. 1, p. 171-176, 2009.

CASTANGIA, I., MANCA, M. L., CADDEO, C. et al. Faceted phospholipid vesicles tailored for the delivery of *Santolina insularis* essential oil to the skin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.132, p.185–193, 2015.

CHITPRASERT, Pakamon; SUTAPHANIT, Polin. Holy basil (*Ocimum sanctum* Linn.) essential oil delivery to swine gastrointestinal tract using gelatin microcapsules coated with aluminum carboxymethyl cellulose and beeswax. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 62, n. 52, p. 12641-12648, 2014.

CHRISTOFOLI, Marcela et al. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. *Industrial Crops and Products*, v. 70, p. 301-308, 2015.

CORLEY, S. W., JONSSON, N. N., PIPER, E. K. et al. Mutation in the *RmβAOR* gene is associated with amitraz resistance in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 42, p. 16772-16777, 2013.

CRUZ, Breno Cayeiro et al. Susceptibility of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* to ivermectin (200, 500 and 630 µg/kg) in field studies in Brazil. *Veterinary parasitology*, v. 207, n. 3-4, p. 309-317, 2015.

CZEPAK, M. P.; BANDONI, A. Os Recursos Vegetais Aromáticos no Brasil: Seu Aproveitamento Para a Produção de Aromas e Sabores. 1. ed. Vitória: EDUFES, 624 p 2008.

DE OLIVEIRA CRUZ, E. M., COSTA-JUNIOR, L. M., PINTO, J. A. ET AL. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Veterinary parasitology*, v. 195, n. 1, p. 198-202, 2013.

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

DONSÌ, Francesco; FERRARI, Giovanna. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of biotechnology*, v. 233, p. 106-120, 2016.

FAZOLIN, M., ESTRELA, J. L. V., CATANI. et al. Insecticidal properties of essential oils of *Piper hispidinervum* C. DC., *Piper aduncum* L. and *Tanaecium nocturnum*, p. 113-120, 2007.

FERNANDES, Regiane Victória et al. Cashew gum and inulin: New alternative for ginger essential oil microencapsulation. *Carbohydrate polymers*, v. 153, p. 133-142, 2016.

FERREIRA, Paulo Vanderlei. *Estatística experimental aplicada à agronomia*. Edufal, 1991.

FESSI, H. P. F. D., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J. P et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International journal of pharmaceutics*, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

GRAF, J. F., GOGOLEWSKI, R., LEACH-BING, N. et al. Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, v. 129, n. S1, p. S427-S442, 2004.

GRISI, L., LEITE, R. C., MARTINS, J. R. D. S. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

Gross, A. D., Temeyer, K. B., Day, T. A. et al. Pharmacological characterization of a tyramine receptor from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 2015.

GUENTHER, E. *The essential oil*. Florida: Krieger Publishing Company, V 1, 2, 3 e 4, p. 507, 1976.

GUERRERO, F. D., LOVIS, L., & MARTINS, J. R. et al. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2012.

HAZRA, Anasuya; DOLLIMORE, David; ALEXANDER, Kenneth. Thermal analysis of the evaporation of compounds used in aromatherapy using thermogravimetry. *Thermochimica Acta*, v. 392, p. 221-229, 2002.

IANNITELLI, Antonio et al. Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, n. 8, p. 5039-5051, 2011.

ISKANDAR, F. Nanoparticle processing for optical applications – a review. *Advanced Powder Technology*. v. 20, p. 283–292, 2009.

KHOEE, S.; YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *European journal of medicinal chemistry*, v. 44, n. 6, p. 2392-2399, 2009.

LEIMANN, Fernanda V. et al. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials Science and Engineering: C*, v. 29, n. 2, p. 430-436, 2009.

LEMETTER, C. Y. G.; MEEUSE, F. M.; ZUIDAM, N. J. Control of the morphology and the size of complex coacervate microcapsules during scale-up. *Alche Journal*, v. 55, n. 6, p. 1487-1496, 2009.

LEPELTIER, E.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. *Advanced drug delivery reviews*, v. 71, p. 86-97, 2014.

LI, A. Y., CHEN, A. C., MILLER, R. J. et al. Acaricide resistance and synergism between permethrin and amitraz against susceptible and resistant strains

of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pest management science*, v. 63, n. 9, p. 882-889, 2007.

LIMA, R. K., CARDOSO, M. G., MORAES J. C. et al. Insecticidal activity of long-pepper essential oil (*Piper hispidinervum* C. DC.) on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amazonica*, v. 39, n. 2, p. 377-382, 2009.

LÓPEZ, A. et al. Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil. *Industrial Crops and Products*, v. 53, p. 209-216, 2014.

Mapholi, N. O., Marufu, M. C., Maiwashe, A. et al. Towards a genomics approach to tick (Acari: Ixodidae) control in cattle: A review. *Ticks and tick-borne diseases*, v. 5, n. 5, p. 475-483, 2014.

MARRIOT, P.J.; SHELIE, R.; CORNWELL, C. Gas chromatography technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, v. 936, p. 1-22. 2001.

MILLER, R. J., DAVEY, R. B., GEORGE J. E. First report of permethrin-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected within the United States. *Journal of medical entomology*, v. 44, n. 2, p. 308-315, 2007.

MILLER, R. J., LI, A. Y., TIJERINA, M. et al. Differential response to diazinon and coumaphos in a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected in Mexico. *Journal of medical entomology*, v. 45, n. 5, p. 905-911, 2008.

MUJTABA, I.M. Batch distillation: design and operation. Vol. 3. World Scientific Publishing Company, 2004.

NANDIYANTO, A.B.D.; OKUYAMA, K. Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. *Advanced Powder Technology*. v. 22, p. 1-19, 2011.

NASCIMENTO, F. R., CARDOSO, M. G., SOUZA, P. E. et al. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi Hyphomycetes). *Acta Amaz*, v. 38, p. 503-508, 2008.

PENG, Ding-Yu; ROBINSON, Donald B. A new two-constant equation of state. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*, v. 15, n. 1, p. 59-64, 1976.

PINTO, Náyra de Oliveira Frederico et al. Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Industrial Crops and Products*, v. 86, p. 279-288, 2016.

PRAKASH, Bhanu et al. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control*, v. 89, p. 1-11, 2018.

QUINTANAR-GUERRERO, D., FESSI, H., ALLÉMANN et al. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D, L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 143, n. 2, p. 133-141, 1996.

RAJABI, H., GHORBANI, M., JAFARI, S. M. et al. Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. *Food Hydrocolloids*, v. 51, p. 327-337, 2015.

REVERCHON, E. Mathematical modeling of supercritical extraction of sage oil. *AIChE Journal*, 42: 1765, 1996.

ROSSA, Guilherme E. et al. Sequential extraction methods applied to *Piper hispidinervum*: An improvement in the processing of natural products. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 96, n. 3, p. 756-762, 2018.

RUGGIERI, Luz et al. Air filled porosity measurements by air pycnometry in the composting process: a review and a correlation analysis. *Bioresource technology*, v. 100, n. 10, p. 2655-2666, 2009.

SAPUTRI, Febrina Amelia et al. Determination of Safrole in Ethanol Extract of Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt) Using Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Chemistry*, v. 6, n. 3, p. 14, 2014.

SARTOR, R.B., SECCHI, A.R., SOARES, R. DE P., CASSEL, E. Dynamic simulation of rosemary essential oil extraction in an industrial steam distillation unit. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 3955–3959, 2011.

SAUTER, I. P., ROSSA, G. E., LUCAS, A. M. et al. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products*, v. 40, p. 292-295, 2012.

SESSA, M.; FERRARI, G.; DONSI, F. Novel edible coating containing essential oil nanoemulsions to prolong the shelf life of vegetable products. *Chem. Eng. Trans*, v. 43, p. 55-60, 2015.

SILVA, E. K.; MEIRELES, M. A.. Encapsulation of food compounds using supercritical technologies: applications of supercritical carbon dioxide as an antisolvent. *Food and Public Health*, v. 4, n. 5, p. 247-258, 2014.

SIMÕES, C.M.O. ; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS. p. 467-485, 2007.

Soares, R. de P.; A. R. Secchi. EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimisation. *Computer Aided Chemical Engineering* 14. P. 947-952. 2003.

SOVOVA, H. H.; ALEKSOVSKI, S. Mathematical model for hydrodistillation of essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 21, p. 881 – 889, 2006.

VAN WYLEN, Gordon J.; SONNTAG, Richard E.; BORGNAKKE, Claus. Fundamentals of classical thermodynamics. John Wiley & Sons, 2013.

WADT, L.H.O. Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) visando seu uso e conservação. Embrapa Acre-Teses/dissertações, 2004.

WORANUCH, Sarekha; YOKSAN, Rangrong. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, v. 96, n. 2, p. 578-585, 2013.

XAVIER, V. B.; VARGAS, R. M. F.; CASSEL, E.; LUCAS, A. M.; SANTOS, M. A.; MONDIM, C. A.; SANTAREM, E. R.; ASTARITA, L. V.; SARTOR, T. Mathematical modeling for extraction of essential oil from *Baccharis* ssp. by steam distillation. *Industrial Crops and Products*, 33: 599-604. 2011.

ZACARONI, L. M., CARDOSO, M. G., SOUZA, P. E. et al. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Amazonica*, v. 39, n. 1, p. 193-198, 2009.

ZAHI, Mohamed Reda et al. Enhancing the antimicrobial activity of d-limonene nanoemulsion with the inclusion of  $\epsilon$ -polylysine. *Food chemistry*, v. 221, p. 18-23, 2017.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)