

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

FELIPHE JORDÃO NÓBREGA

ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO
CARVACROL

JOÃO PESSOA – PB

2019

FELIPHE JORDÃO NÓBREGA

**ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO
CARVACROL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar

JOÃO PESSOA – PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N754e Nóbrega, Felipe Jordão.

Estudo de caracterização de nanopartículas contendo carvacrol / Felipe Jordão Nóbrega. - João Pessoa, 2019.

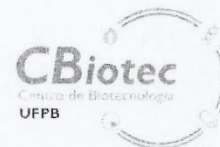
46 f. : il.

Orientação: Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Nanotecnologia. 2. Nanocápsulas. 3. Polímero biodegradável. 4. Monoterpenos. I. Kretzschmar, Elisângela Afonso de Moura. II. Título.

UFPB/BC

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos dezanove dias do mês de setembro de 2019, às 16:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar (DB/CBIOTEC/UFPB) e composta pelos avaliadores: 1. Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (DB/CBIOTEC/UFPB); 2. M.a Rayanne Maira Felix Ribeiro Alves (PMPGCF/UFPB), o discente Felipe Jordão Nobrega, matrícula 11504800, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO CARVACROL”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela Aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pelo discente.

Presidente da Banca Examinadora

Avaliador 1

Discente

Avaliador 2

João Pessoa/PB, 19 de setembro de 2019.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

– Sir Isaac Newton

RESUMO

Carvacrol (5-Isopropil-2-metilfenol), monoterpeneo presente nos óleos essenciais de plantas, principalmente as da família Lamiaceae como o orégano e o tomilho, possui ações biológicas e farmacológicas, incluindo ação antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antitumoral e anti-inflamatória. Entretanto, essa molécula é pouco solúvel em água, facilmente oxidada e rapidamente metabolizada e excretada sendo, portanto, de difícil administração em sistemas biológicos. Baseando-se neste fato, o presente estudo procurou realizar a nanoencapsulação do carvacrol pelo método de nanoprecipitação (ou deposição interfacial do polímero pré-formado) utilizando a poli- ϵ -caprolactona (PCL), um polímero alifático sintético biocompatível e biodegradável. As nanocápsulas atuam como sistemas de carreamento de fármacos e de liberação controlada, permitindo melhorar a eficácia terapêutica de um bioativo ao melhorar a solubilidade da molécula nanoencapsulada. Elas proporcionam a liberação em locais específicos e diminuem a frequência de administração do fármaco, desta forma, reduzindo a toxicidade e efeitos colaterais. O objetivo do estudo foi preparar nanocápsulas contendo carvacrol, como também nanocápsulas contendo óleo de soja e nanoesferas a fim de atuarem como controles, e avaliar parâmetros físico-químicos de estabilidade e de caracterização para observar o desempenho do método de nanoprecipitação na preparação dessas nanopartículas. Sob observação macroscópica, todas as formulações obtidas apresentaram as características esperadas de cor branca perolada, ausência de odor, não houve separação de fases e nem presença de precipitado. Mesmo após 4 meses de armazenamento as preparações mantiveram o aspecto e qualidades, indicando estabilidade. O pH também foi monitorado durante 60 dias para as formulações de nanocápsulas, mantendo-se entre a faixa prevista de 5,5 a 6,5, apresentando o decréscimo gradual esperado, sendo este resultado mais um indício de estabilidade e adequação à liberação prolongada. As nanopartículas foram avaliadas quanto ao seu diâmetro médio, superfície de partícula e taxa de polidispersão pelas técnicas de *laser diffraction* (LD) e *dynamic light scattering* (DLS), além do potencial zeta. As preparações de nanopartículas obtiveram populações com diâmetro médio de 312 e 279 nm na LD e $25,81 \pm 0,21$ nm e $31,46 \pm 0,07$ nm na DLS, dentro da faixa esperada e apropriados para a aplicação terapêutica. Entretanto, os resultados atingidos mostraram alta taxa de dispersão ($0,378 \pm 0,005$ e $0,401 \pm 0,015$ PdI na DLS e com potencial zeta levemente baixo ($-8,78 \pm 0,08$ e $-12,1 \pm 1,12$). As preparações demonstraram estabilidade adequada, porém serão realizados mais ensaios para finalizar a caracterização físico-química e biológica.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanocápsulas. Polímero biodegradável. Monoterpenos.

ABSTRACT

Carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol), a monoterpene present in plant essential oils, mainly those of the Lamiaceae family such as oregano and thyme, has biological and pharmacological actions, including antioxidant, antibacterial, antifungal, anti-tumor and anti-inflammatory action. However, this molecule is poorly soluble in water, easily oxidized and rapidly metabolized and excreted and therefore difficult to administer in biological systems. Based on this fact, the present study sought to perform carvacrol nanoencapsulation by the nanoprecipitation method (or interfacial deposition of preformed polymer) using poly- ϵ -caprolactone (PCL), a biocompatible and biodegradable synthetic aliphatic polymer. Nanocapsules act as drug delivery and controlled release systems, allowing to improve the therapeutic efficacy of a bioactive by improving the solubility of the nanoencapsulated molecule. They provide release in specific locations and decrease the frequency of drug administration, thus reducing toxicity and side effects. The aim of the study was to prepare nanocapsules containing carvacrol, as well as nanocapsules containing soybean oil and nanospheres to act as controls, and to evaluate physicochemical stability parameters to observe the performance of the nanoprecipitation method in the preparation of these nanoparticles. Under macroscopic observation, all formulations obtained had the expected characteristics of pearly white color, absence of odor, no phase separation and no precipitation. Even after 4 months of storage the preparations maintained their appearance and qualities, indicating stability. The pH was also monitored for 60 days for nanocapsule formulations, remaining within the expected range of 5.5 to 6.5, showing the expected gradual decrease, which is a further indication of stability and adequacy to prolonged release. The nanoparticles were evaluated for their average diameter, particle surface and polydispersity rate by the laser diffraction (LD) and dynamic light scattering (DLS) techniques, as well as zeta potential. The nanoparticle preparations obtained populations with a mean diameter of 312 and 279 nm in LD and 25.81 ± 0.21 nm and 31.46 ± 0.07 nm in DLS, within the expected range and appropriate for therapeutic application. However, the results achieved showed a high dispersion rate (0.378 ± 0.005 and 0.401 ± 0.015 PdI in DLS and with slightly low zeta potential (-8.78 ± 0.08 and -12.1 ± 1.12). The preparations demonstrated adequate stability, but further tests will be performed to finalize the physicochemical and biological characterization.

Keywords: Nanotechnology. Nanocapsules. Biodegradable polymer. Monoterpenes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Concentração plasmática ao longo do tempo de um princípio ativo administrado sob liberação (A) controlada e (B) convencional.....	17
Figura 2 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas	20
Figura 3 – Estrutura molecular da poli- ϵ -caprolactona	21
Figura 4 – Estrutura molecular do carvacrol	23
Figura 5 – Formulação de nanocápsulas pronta	25
Figura 6 – Curva de Calibração do carvacrol	29
Figura 7 – Demonstração do efeito Tyndall presente na formulação de nanoesferas brancas diluídas (direita) e ausente na água destilada (esquerda)	30
Figura 8 – pH das nanocápsulas brancas e nanocápsulas com Carvacrol	31
Figura 9 – Distribuição de diâmetro de partículas das nanocápsulas brancas (NB).....	33
Figura 10 – Distribuição de diâmetro de partículas das nanocápsulas contendo carvacrol (NC)	34
Figura 11 – Distribuição de diâmetro de partículas das nanoesferas brancas (NE)	35
Figura 12 – Diâmetro médio e índice de polidispersão (PdI) das nanocápsulas contendo carvacrol (A) e nanoesferas brancas (B)	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da difração laser para nanocápsulas com carvacrol (NC), nanocápsulas brancas (NB) e nanoesferas brancas (NE)	32
Tabela 2 – Diâmetro médio e índice de polidispersão (PdI) das nanocápsulas contendo carvacrol (NC) e nanoesferas brancas (NB).	36
Tabela 3 – Potencial Zeta (mV) das nanocápsulas com carvacrol (NC) e nanoesferas brancas (NB).	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
CE	<i>Communauté Européenne</i>
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégias do Nordeste
CS	Superfície específica
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
EPR	<i>Enhanced permeability and retention</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IBM	<i>International Business Machines</i>
LD	<i>Laser diffraction</i>
MA	Diâmetro médio da distribuição de área
MN	Diâmetro médio da distribuição numérica
MV	Diâmetro médio da distribuição de volume
NB	Nanocápsulas Brancas, sem carvacrol
NC	Nanocápsulas com Carvacrol
NE	Nanoesferas
N&N	Nanociência e nanotecnologia
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido polilático
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PdI	Índice de Polidispersão
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
STM	<i>Scanning tunneling microscope</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	Nanômetros
°C	Graus celsius
C₆H₁₄O	5-Isopropil-2-metilfenol
g	Gramas
ml	Militros
%	Porcentagem
µg	Microgramas
λ	Comprimento de onda
M²	Metros quadrados
cm³	Centímetros cúbicos
R²	Coefficiente de determinação
mV	Milivolts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Geral	14
2.2	Específicos.....	14
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1	NANOTECNOLOGIA	15
3.2	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	16
3.3	NANOPARTÍCULAS	18
3.3.1	Nanocápsulas e nanoesferas	19
3.4	POLICAPROLACTONA	21
3.5	CARVACROL.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	25
4.2	ELABORAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	26
4.3	ESTUDO DE ESTABILIDADE	26
4.4	ANÁLISE DO pH.....	26
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	26
4.5.1	Difração laser.....	26
4.5.2	Espectroscopia de correlação de fótons	27
4.5.3	Análise do potencial zeta	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1	CURVA DE CALIBRAÇÃO	29
5.2	ESTUDO DE ESTABILIDADE	29
5.3	ANÁLISE DO pH.....	30
5.4	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	32
5.4.1	Difração laser.....	32
5.4.2	Espectroscopia de correlação de fótons	35
5.4.3	Análise do potencial zeta	37
6	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

Monoterpenos são os principais compostos de óleos essenciais de plantas aromáticas, sendo considerados agente importantes na indústria alimentícia e medicinal. O carvacrol (5-Isopropil-2-metilfenol) está presente em óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae, especialmente nos gêneros *Origanum* e *Thymus*, que incluem o orégano e o tomilho. Atualmente, o carvacrol é usado em baixas concentrações como um flavorizante e conservante alimentício e como fragrância na indústria cosmética (SUNTRES et al., 2015). Recentemente, têm atraído a atenção da comunidade científica que tenta estabelecer as ações biológicas do carvacrol pelo seu potencial uso em aplicações clínicas. Tais estudos, *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que o carvacrol possui uma variedade de propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo ação antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, cardioprotetora, neuroprotetora, espasmolítica, vasorelaxante, analgésica, entre outras (BASER, 2008; FAN et al., 2015; FRIEDMAN, 2014; CHAILLOT et al., 2015; CHEN et al., 2015, CRISTANI et al., 2007, SUNTRES et al., 2015, SHARIFI-RAD et al., 2018).

Apesar de apresentar grande potencial para o uso na terapêutica, o carvacrol apresenta barreiras para a sua implementação e administração em organismos. Sua estabilidade física e química é seriamente prejudicada em função da temperatura, pH e por condições de armazenamento, por ser facilmente oxidado. Foi demonstrado que o carvacrol é rapidamente metabolizado e excretado, obtendo concentração plasmática máxima após 1,39 horas da administração oral em suínos (MICHIEL et al., 2008) e sendo possível observar apenas quantidades muito pequenas do carvacrol e seus metabólitos na urina de ratos 24 horas após a administração, indicando uma excreção quase completa ao fim de um dia (SUNTRES et al., 2015; AUSTGULEN et al., 1987).

Sistemas de nanopartículas coloidais atraíram a atenção da comunidade científica nas últimas décadas devido às suas propriedades como carregadoras de fármacos e aplicações terapêuticas. Elas são capazes de modificar a distribuição no corpo humano de um princípio ativo associado e, portanto, podem ser usadas para melhorar a eficácia terapêutica e reduzir efeitos tóxicos, além de aumentar a solubilidade de moléculas e proporcionar a liberação em locais de aplicação específicos, diminuindo os efeitos sistêmicos da droga (LINCE et al., 2008; ZELENKOVÁ et al., 2014). O uso de polímeros biodegradáveis é de grande interesse para a aplicação em carregadores de fármacos por causa da sua habilidade de ser reabsorvido ou excretado pelo organismo. A aplicação de materiais poliméricos biodegradáveis é buscada pois

permite a liberação controlada no local-alvo, são estáveis e geralmente não possuem efeitos colaterais tóxicos, imunogênicos ou inflamatórios, sendo assim bons candidatos para sofisticar o valor terapêutico de várias drogas e moléculas bioativas (SHAKERI et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2015). A poli- ϵ -caprolactona (PCL) é um poliéster sintético alifático, comumente utilizado em aplicações biomédicas por ser biocompatível, não-tóxico e aceita a incorporação de biofármacos, mantendo a sua atividade farmacológica. O produto de degradação do PCL, o ácido 6-hidróxicaproico, pode ser absorvido pelo corpo ou removido através do metabolismo, sendo assim um polímero interessante para a fabricação de nanocápsulas (LINCE et al., 2008; POHLMANN et al., 2013).

Em vista disso, a nanoencapsulação do carvacrol em nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona apresenta-se como uma forma de carreamento dessa molécula com possibilidade de melhorar os aspectos de solubilidade, estabilidade e toxicidade do carvacrol, aprimorando sua competência terapêutica e potencialmente tornando-se uma nova forma de administração desse bioativo.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Preparar e caracterizar nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo carvacrol pelo método de nanoprecipitação.

2.2 ESPECÍFICOS

- Preparar uma curva de calibração do carvacrol;
- Caracterizar as nanopartículas sob parâmetros físico-químicos;
- Analisar a estabilidade do sistema ao longo do tempo;
- Preparar formulações de nanoesferas e nanocápsulas contendo óleo de soja através do mesmo método a fim de atuarem como controles;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 NANOTECNOLOGIA

A nanociência e nanotecnologia (N&N) é uma área da ciência que trabalha criando estruturas utilizando a manipulação individual de átomos e moléculas na escala nanométrica. Um nanômetro (nm) equivale à bilionésima parte de um metro, ou à milionésima parte de um milímetro. A modificação de matéria nesse nível requer a utilização de equipamentos adequados para a visualização, confecção e manuseio das partículas, equipamentos esses que só foram concebidos em 1981, com a criação do microscópio de tunelamento (*scanning tunneling microscope* – STM) por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, dos laboratórios da *International Business Machines* (IBM) em Zurique, capital da Suíça. Esse fato dá à nanotecnologia a característica de ser uma ciência relativamente recente (CHOI; MODY, 2009; DIMER et al., 2013; QUINA, 2004).

Segundo Laurent e Mahmoudi (2011), nessa escala, propriedades mecânicas, químicas, elétricas, ópticas, magnéticas, eletro-ópticas e magneto-ópticas dessas nanopartículas são diferentes das suas propriedades no material de origem e dependem do tamanho da partícula. Tais características garantem às nanopartículas a capacidade de formação de materiais compactos, mais leves, com maior resistência química, física e térmica, mais adaptáveis e compatíveis ao organismo humano e adequáveis aos objetivos pretendidos nas pesquisas que as utilizam (LAURENT; MAHMOUDI, 2011; QUINA, 2004). Isso tem atraído a atenção de físicos, químicos, biólogos e engenheiros para a fabricação e exploração das propriedades únicas dos nanomateriais (MELO; PIMENTA, 2010).

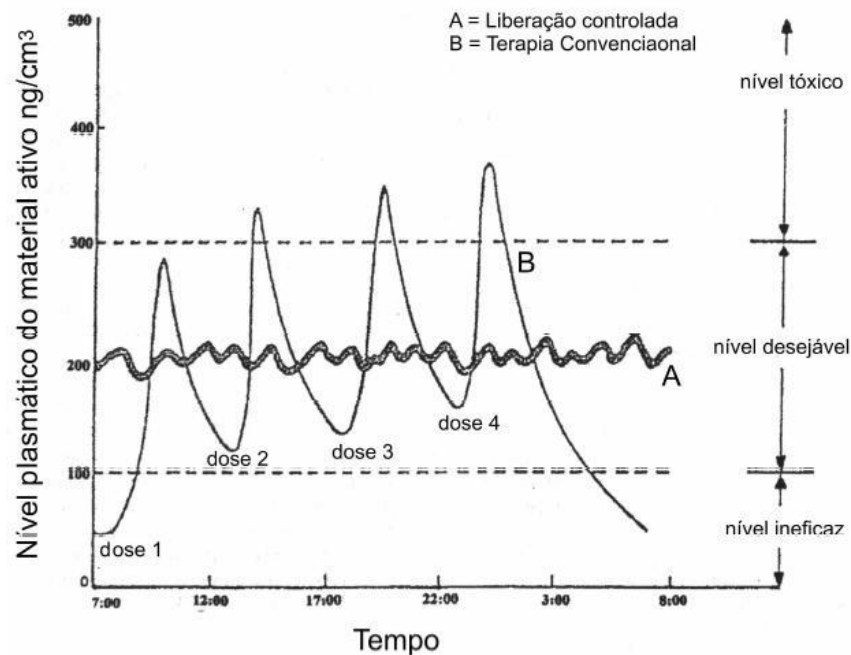
Pela sua versatilidade, a nanotecnologia possui potencial de aplicação em diversas áreas, incluindo agricultura, geração de energia, preservação ambiental, cosmética e, em destaque, a saúde e farmácia (DIMER et al., 2013; DAUDT et al., 2013). Dentro da nanomedicina, algumas das principais aplicações sob pesquisa são: na engenharia de tecidos, o desenvolvimento de implantes e próteses a partir de arcabouços artificiais para o crescimento de células (os chamados *scaffolds*), permitindo a criação de órgãos artificiais ou materiais com maior biocompatibilidade; no desenvolvimento de nanosensores que permitem diagnósticos e análises diversas mais rápidas, mais sensíveis e usando menor quantidade de amostra biológica; e nos sistemas de liberação controlada, permitindo potencializar o efeito terapêutico de fármacos através da manipulação da quantidade, localização e liberação de uma molécula bioativa no organismo (ROSSI-BERGMANN, 2008).

3.2 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

O efeito de um fármaco depende da sua concentração no organismo. Levando em consideração que os fármacos possuem uma concentração mínima para que obtenham eficácia e uma concentração onde começam a apresentar-se efeitos tóxicos, o intervalo entre essas duas concentrações é tido como a faixa terapêutica, assim como ilustrado na Figura 1. Nota-se que a faixa terapêutica para um fármaco não deve ser considerada em termos absolutos, já que ela representa uma combinação de probabilidades (EVANS, 2006). Ao calcular-se a posologia adequada e intervalo entre doses de um fármaco fatores como depuração, tempo de meia-vida e a faixa terapêutica são levados em consideração (BUXTON, 2018). Se o tempo entre as administrações da droga forem muito curtos ou muito longos, a concentração do fármaco pode, respectivamente, ultrapassar o limite seguro e apresentar efeitos tóxicos ou ficar abaixo do nível terapêutico (Figura 1) e, em alguns casos, causar resistência ao fármaco (BIZERRA; SILVA, 2016, CARONI, 2009). É um desafio reduzir o risco de toxicidade sem comprometer a eficácia e aumentar a eficácia sem atingir toxicidade inapropriada.

Os sistemas de liberação controlada apresentam-se como uma nova forma de incorporação de fármacos que vem atraindo a atenção da comunidade científica. Esses sistemas atuam como carreadores de uma molécula bioativa e proporcionam sua liberação de forma gradual. Desse modo, a concentração de um fármaco pode ser controlada de forma que ela se mantenha na faixa terapêutica e distante o bastante do limite tóxico, onde os efeitos colaterais são mais prováveis (DAS; DAS, 2003; UHRICH, 1999; LOPES, 2005; BIZERRA; SILVA, 2016).

Figura 1 – Concentração plasmática ao longo do tempo de um princípio ativo administrado sob liberação (A) controlada e (B) convencional



Fonte: Graham (1978)

O uso de sistemas de liberação controlada altera parâmetros de farmacocinética e farmacodinâmica buscando otimizar o efeito terapêutico de uma droga. A aplicação de tais sistemas permitiu que tratamentos antes impossíveis se tornassem triviais (UHRICH et al., 1999). Ao diminuir a concentração das doses e diminuir a frequência de administração de uma droga a liberação gradual obtém o potencial de aumentar a eficácia terapêutica do bioativo, reduzir os efeitos sistêmicos e melhorar a aderência de pacientes ao tratamento (LEE; YEO, 2015, LINCE et al., 2008; ZELENKOVÁ et al., 2014). Além disso há um maior controle da liberação do princípio ativo, podendo-se direcionar o fármaco a alvos específicos e controlar a razão entre a concentração no local de aplicação e a concentração sistêmica (BIZERRA; SILVA, 2016). A liberação controlada também pode ser vantajosa quando a droga possui baixa absorção pelo organismo, quando a dosagem requerida para efeito terapêutico é muito próxima da dosagem tóxica ou o preço de uma droga é elevado e a terapia com a dose efetiva mínima é desejada (BUXTON, 2006).

Entre as estratégias de liberação controlada estão incluídos os lipossomas, as bombas osmóticas, os revestimentos entéricos, os sistemas transdérmicos, os pró-fármacos, e os sistemas matriciais poliméricos (LOPES et al., 2005). Os mecanismos de moderação da liberação comumente atrasam a dissolução da droga através da inibição da difusão da molécula para fora do sistema através de sua matriz, por uma barreira que envolva o sistema, ou através

da degradação ou relaxamento da matriz (LEE; YEO, 2015; UHRICH et al., 1999) Há ainda a possibilidade de desenhar o sistema para que a liberação do ativo seja feita apenas sob a presença de um gatilho, sendo os métodos dominantes para isso a variação de pH e os sistemas foto-controlados (BRUNEAU et al., 2018).

3.3 NANOPARTÍCULAS

Nanopartículas são tipicamente referidas como partículas microscópicas com tamanho entre 1 nm e 100 nm (LAURENT; MAHMOUDI, 2011). Na medicina, a *European Medicines Agency* (2019) define a nanotecnologia como a aplicação de estruturas menores do que 1000 nanômetros de diâmetro projetadas para terem propriedades específicas. Algumas das características das partículas como tamanho, área superficial da partícula, composição química da superfície, dosagem e produção de radicais livres têm papel importante no comportamento, estabilidade e nanotoxicidade das nanopartículas (AI et al., 2011; LAURENT; MAHMOUDI, 2011). Uma redução no tamanho dessas partículas aumenta a superfície de contato e, portanto, mais moléculas químicas podem se ligar a essa superfície, aumentando sua reatividade e/ou seus efeitos tóxicos.

A literatura reporta que: nanopartículas menores que 100 nm são absorvidas pelas células do intestino, mas não as partículas maiores (300 nm); a absorção de nanopartículas menores (100 nm) no tecido linfático é maior do que nas células intestinais; células intestinais não conseguem absorver partículas maiores que 400 nm; e somente partículas menores que 500 nm podem entrar no sistema circulatório (AI et al., 2011).

As características químicas e físicas das partículas podem ser modificadas para aumentar sua reatividade com os tecidos do corpo. Mudanças químicas na superfície das partículas podem vetorizá-las a um local de liberação específico (*targeting*) ou modificar sua toxicidade (CLIFT et al., 2008; LAURENT; MAHMOUDI, 2011; SINGH; LILLARD, 2009; TROIANO et al., 2016). Estudos realizados por Singh et al. (2007) mostraram que o tratamento com partículas ultrafinas (20-80 nm) de TiO₂ e partículas finas (40-300 nm) metiladas de TiO₂ causaram em células epiteliais pulmonares de humanos reações inflamatórias consideravelmente mais fortes quando comparadas com doses iguais de partículas finas não-metiladas. O grau de hidrofobicidade e hidrofiliidade é a principal característica utilizada para estimar a toxicidade (AI et al., 2011). A absorção de nanopartículas produzidas com polímeros hidrofóbicos é maior do que aquela das partículas produzidas com polímeros hidrofílicos (SINGH et al., 2007).

As nanopartículas usadas na liberação vetorizada de fármacos podem ser classificadas como passivas ou ativas. Na liberação passiva, as nanopartículas são planejadas de modo que seu tamanho ou características da superfície facilitem a acumulação das partículas no órgão-alvo passivamente. Por exemplo, nanopartículas podem alvejar tumores através do efeito de permeabilidade e retenção aprimoradas (*EPR effect*). Para a vetorização ativa as nanopartículas são conjugadas com moléculas-ligantes ou sistemas carregadores que interajam com receptores associados no tecido-alvo (SINGH; LILLARD, 2009; BERTRAND et al., 2014; TROIANO et al., 2016; LEE; YEO, 2015).

Além disso, a efetividade das partículas depende também da dosagem prescrita e das substâncias utilizadas. Pesquisas demonstram que uma dose elevada de nanopartículas, em partículas pequenas ou grandes, pode ser prejudicial à saúde (SINGH et al., 2007).

3.3.1 Nanocápsulas e nanoesferas

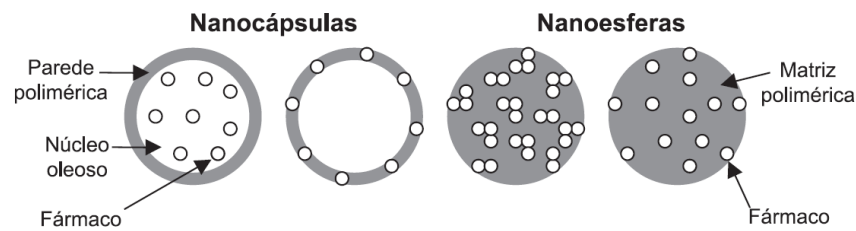
A nanoencapsulação consiste na compartimentalização de substâncias em carreadores (DAUDT et al., 2013) como os sistemas coloidais de lipossomas ou nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas). Entre esses dois sistemas, as nanopartículas são mais estáveis do que os lipossomas nos fluidos biológicos e durante a armazenagem (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As nanopartículas, como uma forma de liberação controlada de fármacos, são utilizadas para carrear substâncias ativas a fim de melhorar sua funcionalidade e potencial terapêutico, como, por exemplo, melhorando a disponibilidade ou estabilidade quando comparada com o mesmo material na forma molecular (DAUDT et al., 2013; DIMER et al., 2013).

As nanocápsulas são caracterizadas como sistemas nanovesiculares, compostas de uma parede polimérica envolvendo um núcleo oleoso. Os bioativos podem ser transportados dissolvidos no núcleo oleoso e/ou adsorvidos ou impregnados na matriz polimérica. Essas partículas geralmente apresentam-se na faixa de aproximadamente 100 a 500 nm (SCHAFFAZICK et al., 2003; DAUDT et al., 2013).

Já as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica maciça, não possuindo óleo em sua composição. Nessas partículas a substância ativa pode ser carreada retida ou adsorvida na matriz polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003). Ambos os tipos de nanopartículas estão ilustrados na Figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas



Fonte: Adaptado de Schaffazick et al. (2003)

Um sistema matricial, em ambas nanopartículas, pode ser definido como sistema que controla a liberação de moléculas bioativas que estão dispersas ou dissolvidas num suporte resistente à desintegração, podendo ser um polímero ou agente formador da matriz (LOPES et al., 2005). A liberação do bioativo nas nanopartículas pode ser realizada por difusão da molécula através da matriz ou da barreira envolvente, por degradação e/ou relaxamento da cadeia polimérica ou ainda por clivagem da interação entre molécula e polímero (LEE; YEO, 2015).

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas. Essas técnicas podem ser divididas em duas classificações: a polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados. A primeira técnica tem como exemplo de polímero utilizado o cianoacrilato de alquila e a segunda tem como exemplos o ácido polilático (PLA), o ácido poliglicólico (PGA), o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), e a poli- ϵ -caprolactona (PCL) (SCHAFFAZICK et al., 2003; WU; GUY, 2009).

A técnica do deslocamento de solvente, um dos métodos de precipitação interfacial de polímeros pré-formados, conforme descrita por Fessi et al. (1989), possui como vantagens a reprodutibilidade do tamanho de partículas na escala nanométrica e a possibilidade de utilização de reagentes com baixo potencial tóxico. Essa técnica possui duas etapas-chave: a dissolução do polímero e da substância ativa em um solvente (a exemplo da acetona) e a mistura dessa solução em um antissolvente (como a água) que é completamente miscível com o solvente. A mistura de fases leva à formação espontânea das nanopartículas. Os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas (FESSI et al., 1989; LINCE et al., 2008; SCHAFFAZICK et al., 2003).

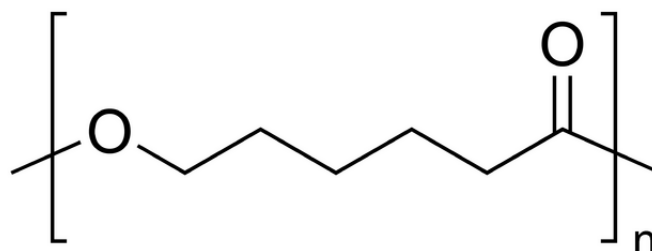
3.4 POLICAPROLACTONA

Polímeros biodegradáveis, ou seja, que são naturalmente excretados ou reabsorvidos pelo corpo, são desejáveis para a aplicação em sistemas de liberação de fármacos. Eles podem ser degradados diretamente pelos rins ou biodegradados em moléculas menores e então excretados ou reabsorvidos (UHRICH et al., 1999; LINCE et al., 2008). Sua aplicação possui as vantagens de permitir a liberação controlada no local-alvo, eles são estáveis e geralmente não possuem efeitos colaterais tóxicos, imunogênicos ou inflamatórios, sendo assim bons candidatos para sofisticar o valor terapêutico de várias drogas e moléculas bioativas (SHAKERI et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2015). Nanopartículas, quando formadas por polímeros biodegradáveis, possuem maior estabilidade durante a armazenagem e quando nos fluidos biológicos do que os lipossomas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Alguns dos exemplos de polímeros que possuem essas características e são comumente usados na formulação de sistemas carregadores de drogas são o ácido polilático (PLA), o ácido poliglicólico (PGA), o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), e a poli- ϵ -caprolactona (PCL) (SCHAFFAZICK et al., 2003; WU et al., 2000). Os polímeros sintéticos, como esses listados, possuem maior pureza e melhor reprodutibilidade do que os polímeros naturais (MORA-HUERTAS et al., 2010).

A poli- ϵ -caprolactona (PCL) é um polímero sintético alifático semicristalino com baixo ponto de fusão (59–64°C), com temperatura de transição vítrea de -60°C e que possui alta capacidade de combinar-se com outros polímeros (LABET; THIELEMANS, 2008; SINHA et al., 2004; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). Sua estrutura molecular é ilustrada na Figura 3. Algumas de suas atuais aplicações são na fabricação de *scaffolds* na engenharia de tecidos, na microeletrônica como adesivos e na manufatura de embalagens. Nos sistemas de liberação controlada, ele é especialmente usado no carregamento de contraceptivos (LABET; THIELEMANS, 2008).

Figura 3 – Estrutura molecular da poli- ϵ -caprolactona



Fonte: Cortez Tornello (2015)

O PCL é naturalmente hidrolisado em ácido 6-hidróxicaproico, um metabólito farmacologicamente inativo que pode ser absorvido ou excretado pelo corpo (WU et al., 2000; POHLMANN et al., 2013), conferindo a esse polímero uma vantagem no uso em sistemas terapêuticos. Como os organismos de animais e humanos não possuem as enzimas adequadas a catalisar essa reação (VERT, 2008), esse processo é lento, beneficiando os sistemas de liberação de fármacos que utilizam o PCL, conferindo-os a capacidade de manterem-se ativos por mais de um ano (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

A biorreabsorção da poli- ϵ -caprolactona ocorre quando seu produto de hidrólise, o ácido 6-hidróxicaproico, é oxidado em acetil coenzima A (Acetil-CoA) e incorporado no ciclo do ácido tricarboxílico, ou ciclo de Krebs (SILVA, 2009).

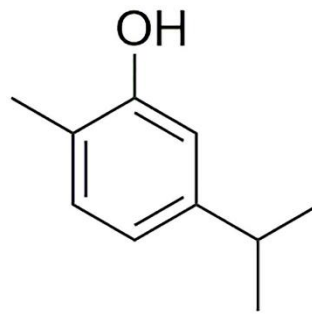
Os sistemas de carregamento de fármacos que utilizam o PCL permitem a adição de grupos funcionais para deixá-lo mais hidrofílico, adesivo ou biocompatível e muitos desses sistemas já possuem aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e marcação CE (LEE; YEO, 2015; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

3.5 CARVACROL

As plantas são uma grande fonte de moléculas bioativas, apresentando na composição de seus óleos essenciais grandes concentrações de hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas e terpenos (DAUDT et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2008; SIMÕES et al., 2004). Entre os monoterpenos há o carvacrol (5-Isopropil-2-metilfenol) (Figura 4), um isômero do timol (2-isopropil-5-metil-fenol). Essa molécula está presente em óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae, especialmente nos gêneros *Origanum* e *Thymus*, que incluem o orégano (*Origanum vulgare*), a manjerona (*Origanum majorana*) e o tomilho (*Thymus vulgaris* e *Thymus zygis*) (SUNTRES et al., 2015; SHARIFI-RAD et al., 2018).

O carvacrol possui fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ e sua estrutura molecular é ilustrada na Figura 4. Ele apresenta-se em temperatura ambiente (25 °C) como um óleo amarelo escuro de densidade 0,976 g/ml e pouco solúvel em água (seu coeficiente de solubilidade é 0,04%) porém levemente solúvel em etanol, acetona e éter etílico (CARVALHO et al., 2003; MENDES, 2012; YADAV; KAMBLE, 2009). O carvacrol comercial atualmente é sintetizado por métodos químicos e biotecnológicos (YADAV; KAMBLE, 2009).

Figura 4 – Estrutura molecular do carvacrol



Fonte: Adaptado de Spalletta et al. (2018)

Atualmente, o carvacrol é usado industrialmente em baixas concentrações como um flavorizante e conservante alimentício ou como fragrância na indústria cosmética (SUNTRES et al., 2015). Recentemente, têm atraído a atenção da comunidade científica já que é crescente a quantidade de trabalhos que demonstram seu potencial para aplicações terapêuticas. Tais estudos, *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que o carvacrol possui uma variedade de propriedades biológicas e farmacológicas (BASER et al., 2008; FRIEDMAN, 2014; SUNTRES et al., 2015; SHARIFI-RAD et al., 2018), incluindo ação antioxidante (FONSECA et al., 2019; SOMENSI et al., 2019), antibacteriana (CRISTANI et al., 2015; HE et al., 2019; RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2019), antifúngica (CHAILLOT et al., 2015; SCHLEMMER et al., 2019; SHEMESH et al., 2019), antiviral (SANCHÉZ; AZNAR; SANCHÉZ, 2015), antitumoral (CHEN et al., 2015; FAN et al., 2015; HOU et al., 2019), anti-inflamatória (SOMENSI et al., 2019), imunoestimulante (BOSKABADY; MAHTAJ, 2015), hepatoprotetora (KHAN et al., 2019; SAMARGHANDIAN et al., 2016), cardioprotetora (HOU et al., 2019), neuroprotetora (DATI et al., 2017; TIEFENSEE, 2018; MANOUCHEHRABADI et al., 2019), antiespasmolítica (CHAMORRO MONAGO; MAMANI; CAROLINA, 2019), vasorelaxante (PEIXOTO-NEVES et al., 2010), analgésica (GUIMARÃES et al., 2015), radioprotetora (MAHRAN et al., 2019) e antidepressiva/ansiolítica (MELO et al., 2010).

Entretanto, existem barreiras para que o potencial terapêutico do carvacrol seja aproveitado completamente. Em seu estado bruto, o carvacrol possui alta instabilidade físico-química, podendo ser facilmente oxidado. Sua estabilidade é prejudicada em função da temperatura, pH e por condições de armazenamento (SUNTRES et al., 2015). Em ratos, foi demonstrado que o carvacrol é rapidamente excretado e metabolizado, sendo possível observar apenas quantidades muito pequenas da molécula e seus metabólitos na urina dos animais 24 horas após a administração, e após 48 e 72 horas não houve detecção de metabólitos, indicando

uma excreção quase completa ao fim de um dia. Os metabólitos excretados eram majoritariamente moléculas de carvacrol com um grupo metil oxidado ou na forma de conjugados de sulfato ou glicuronídeo (AUSTGULEN et al., 1987). Em porcos, estudos por Michiels et al. (2008) apontam que o carvacrol é quase completamente absorvido no intestino delgado proximal e no estômago, apontando também 29% de degradação na porção inicial do intestino grosso. As concentrações plasmáticas da molécula livre e conjugada obtiveram pico após 1,39 horas, seguida de altas concentrações na urina (MICHIELS et al., 2008). Além disso, essa substância pode ser tóxica para células de mamíferos quando em altas concentrações (BIMCZOCK et al., 2008).

O uso de sistemas de liberação controlada é altamente benéfico para drogas que são rapidamente metabolizadas e excretadas (UHRICH et al., 1999), e nanopartículas oferecem a possibilidade de encapsular moléculas pouco solúveis (BERTRAND et al., 2014), como é o caso do carvacrol. Neste contexto, a nanotecnologia pode ser utilizada para a estabilização de diferentes compostos, aumentando também a estabilidade dos produtos (DAUDT et al., 2013; SCHAFFAZICK et al., 2003). Tendo isso em vista, esse trabalho objetivou estudar a estabilidade e caracterizar nanocápsulas de PCL contendo carvacrol criadas pelo método de nanoprecipitação comparando-as com nanocápsulas contendo óleo de soja e nanoesferas criadas pelo mesmo método.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Nanocápsulas de Poli- ϵ -caprolactona (PCL) contendo carvacrol foram obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado conforme descrito por Fessi et al. (1989), em uma proporção entre fase orgânica e fase aquosa de 1:2. O processo é dividido em quatro partes: preparação da fase aquosa, preparação da fase oleosa, mistura de fases e rotaevaporação.

A fase aquosa foi formada pela dissolução do tensoativo hidrofílico Tween® 80 (polisorbato 80) em água destilada. A fase orgânica foi formada pela dissolução do tensoativo lipofílico Span® 80 (monooleato de sorbitano), do PCL e do óleo escolhido em propanona. Para as nanocápsulas contendo carvacrol (NC), esse óleo é o próprio carvacrol e para as nanocápsulas sem o princípio ativo, chamadas nanocápsulas brancas (NB) o óleo escolhido é o óleo de soja de grau analítico. Para a formulação de nanoesferas brancas (NE) nenhum óleo é utilizado. As nanocápsulas brancas e nanoesferas brancas foram utilizadas como controle para comparação com as nanocápsulas com carvacrol.

A fase oleosa foi vertida por gotejamento sob agitação na fase aquosa e, ao fim, a preparação é colocada em um balão volumétrico apropriado e levada ao rotaevaporador (Buchi® Rotavapor® R-3), onde foi mantida em banho-maria com temperatura de 37 °C e agitação de 110 RPM constantes. O processo é mantido até que se atinja um volume final de 10 ml.

Figura 5 – Formulação de nanocápsulas pronta



Fonte: Nóbrega (2019)

4.2 ELABORAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para a elaboração da curva de calibração foi preparada uma solução-padrão de carvacrol diluído em metanol numa concentração de 1 mg/ml. A partir dessa solução foram feitas diluições até as concentrações de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 µg/ml. Cada solução diluída foi lida em triplicata em um espectrofotômetro IL-0082-Y-BI (IonLab, Brasil) no comprimento de onda de $\lambda=275$ nm e os resultados obtidos foram utilizados para a composição da curva de calibração.

4.3 ESTUDO DE ESTABILIDADE

As formulações de nanopartículas foram analisadas macroscopicamente quanto à cor, odor, presença de precipitação, separação de fases e efeito Tyndall.

4.4 ANÁLISE DO pH

Os potenciais hidrogeniônicos (pH) nas nanocápsulas contendo carvacrol (NC) e das nanocápsulas brancas (NB) foram aferidos à temperatura ambiente utilizando um medidor de pH de bancada (MS TECNOPON LUCA-210). O medidor de pH foi calibrado com soluções tampão de pHs 4,0 e 7,0. Foram feitas aferições imediatamente após a preparação das formulações e após 15, 30, 45 e 60 dias.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.5.1 Difração laser

Amostras das formulações foram submetidas à análise no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), através da técnica de difração laser (DL), ou *laser diffraction*. Amostras de nanoesferas brancas, nanocápsulas contendo carvacrol e nanocápsulas brancas foram analisadas sob temperatura de 25 °C. Foram analisados os seguintes parâmetros:

- a) Diâmetro Médio da Distribuição de Volume (MV), que mede a distribuição das partículas em determinado volume, em nanômetros (nm), e

representa o centro de gravidade da distribuição. O cálculo do MV é um tipo de média de tamanho das partículas ou tendência central que dá peso à contribuição do volume de cada partícula para o volume total da amostra, assim sendo ponderada para as partículas maiores;

b) Diâmetro Médio da Distribuição Numérica (MN), em nm, que é calculado usando os dados de distribuição de volume e é ponderado para as pequenas partículas, já que nessa média leva em consideração o número de partículas total com determinado valor de diâmetro médio. Este tipo de tamanho médio de partícula é relacionado às populações e contagem de partículas;

c) Diâmetro Médio da Distribuição de Área (MA), em nm, que é calculado a partir da distribuição de volume. A área média é um tipo de medida que é menos influenciada e sensível que o MV à presença de partículas pouco aperfeiçoadas e, portanto, apresenta menor tamanho de partícula. Esse diâmetro médio representa uma medição da superfície da partícula;

d) Superfície específica (CS), em M^2/cm^3 , que fornece uma indicação da área de superfície específica. O cálculo da CS pressupõe partículas esféricas lisas e sólidas. A área superficial específica calculada não reflete a porosidade ou características topográficas únicas das partículas;

4.5.2 Espectroscopia de correlação de fótons

Amostras das formulações foram submetidas à análise através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons, também conhecida como *dynamic light scattering* (DLS). Valores de diâmetro médio e índice de polidispersão (PdI), uma indicação da variância na distribuição de tamanhos, foram obtidos para amostras de nanoesferas brancas e nanocápsulas contendo carvacrol através do equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Reino Unido), com ângulo de dispersão fixo em 90° e sob temperatura de $25^\circ C$. Os resultados foram analisados através do programa Zetasizer 7.13 (Malvern Panalytical, Reino Unido).

4.5.3 Análise do potencial zeta

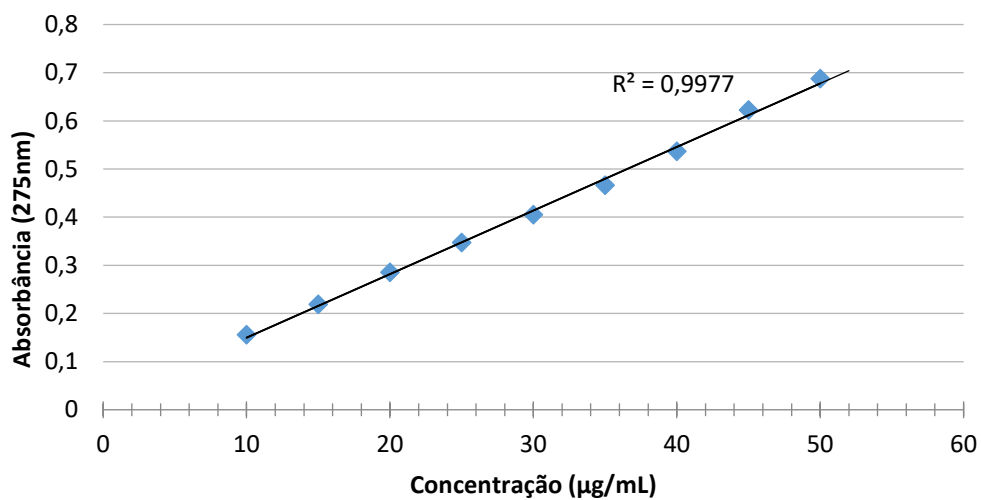
Amostras das formulações de nanoesferas brancas e nanocápsulas contendo carvacrol foram analisadas quanto ao potencial zeta no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Reino Unido). Os resultados foram obtidos por meio da média da leitura das triplicatas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

A curva de calibração confeccionada e utilizada como base para as análises obteve $R^2 = 0,9977$ e como equação de reta $y = 0,013x + 0,017$. A curva está apresentada na Figura 6.

Figura 6 – Curva de calibração do carvacrol



Fonte: Nóbrega (2019)

5.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE

As formulações preparadas nesse estudo imediatamente após sua preparação não apresentaram odor, exibiam cor branca leitosa e perolada assim como esperado e não apresentaram separação de fases, continuando a apresentar a mesma aparência após 4 meses de armazenagem em refrigerador a 4 °C. Além disso, também não apresentaram sedimentação visível, sinais de que possuem boa estabilidade e não sofreram alterações ao longo do tempo em sua composição. A ausência de precipitação e separação de fases em suspensões coloidais são esperadas e tidas como indicadores de estabilidade, já que o processo de sedimentação de partículas submicrométricas é lento e minimizado pelo movimento Browniano característico dessas suspensões (SCHAFFAZICK et al., 2003). No mais, apresentam também a presença do efeito Tyndall (Figura 7), outro indicador de que uma solução se trata de um sistema coloidal (SCHAFFAZICK et al., 2002).

Figura 7 – Demonstração do efeito Tyndall presente na formulação de nanoesferas brancas diluídas (direita) e ausente na água destilada (esquerda)

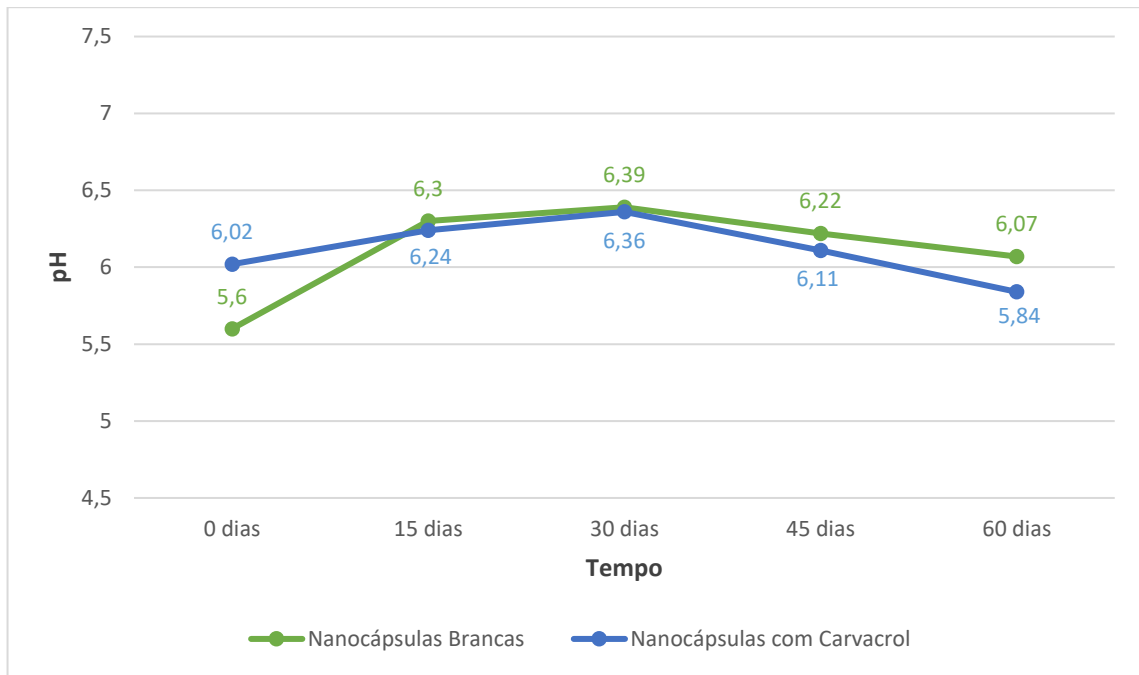


Fonte: Nóbrega (2019)

5.3 ANÁLISE DO pH

Foram aferidos os potenciais hidrogeniônicos (pHs) das formulações de nanocápsulas contendo carvacrol (NC) e nanocápsulas brancas (NB) imediatamente após a sua preparação e após 15, 30, 45 e 60 dias. Os resultados das medições de pHs estão apresentados na Figura 8.

Figura 8 –pH das nanocápsulas brancas e nanocápsulas com carvacrol



Fonte: Nóbrega (2019)

Informações importantes sobre a estabilidade das formulações de nanopartículas podem ser adquiridas através do monitoramento do pH em função do tempo. O pH nos sistemas nanoparticulados é um indicador da estabilidade físico-química do sistema, visto que variações nesse parâmetro podem indicar degradação do polímero ou liberação do composto ativo, entre outros efeitos (SCHAFFAZICK et al., 2003). No presente estudo os pHs de ambas as formulações se mantiveram entre a faixa de pH de 5.5 e 6.5, o que está de acordo com os valores de 3.0-7.5 apontados por Mora-Huertas et al. (2009) como a faixa geral de pH das formulações criadas pelo método de nanoprecipitação. Durante os primeiros 30 dias houve um aumento no pH de ambas as formulações atingindo 6,39 e 6,36; seguido de uma diminuição nesses valores até 6,07 e 5,84.

O aumento de pH durante os primeiros dias pode ser devido à liberação do óleo no meio pelas nanocápsulas (POHLMANN et al., 2002). Na pesquisa realizada por Schaffazick et al. (2002), suspensões de nanopartículas de PCL sofreram redução no pH após um período de 75 dias, fenômeno atribuído à exposição de maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais, em função do tempo, promovida pela e degradação do polímero e relaxação das cadeias terminais. Como o PCL é degradado através da hidrólise em um processo autocatalítico (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010, WU et al., 2000), a desidratação através da liofilização

ou da aspersão pode aumentar a estabilidade desses nanosistemas. A desidratação também pode contribuir diminuindo a agregação de partículas e a liberação prematura da droga, além de impedir a proliferação microbiana na formulação (SCHAFFZICK et al., 2003).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

5.4.1 Difração laser

As nanopartículas foram analisadas através do programa Microtrac FLEX 10.6.2 (Microtrac, EUA). A partir dele foram obtidos resultados de diâmetro médio da distribuição de volume (MV), diâmetro médio da distribuição numérica (MN), diâmetro médio da distribuição de área (MA) e superfície específica (CS).

Esses resultados para as nanocápsulas contendo carvacrol (NC), nanocápsulas brancas (NB) e nanoesferas brancas (NE) estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados da difração laser para nanocápsulas brancas (NB), nanocápsulas com carvacrol (NC) e nanoesferas brancas (NE)

	NB	NC	NE
Parâmetros:			
MV	147900 nm	87060 nm	271300 nm
MN	229 nm	187 nm	258 nm
MA	866 nm	537 nm	6630 nm
CS	6,93 m ² /cm ³	11,17 m ² /cm ³	0,9050 m ² /cm ³

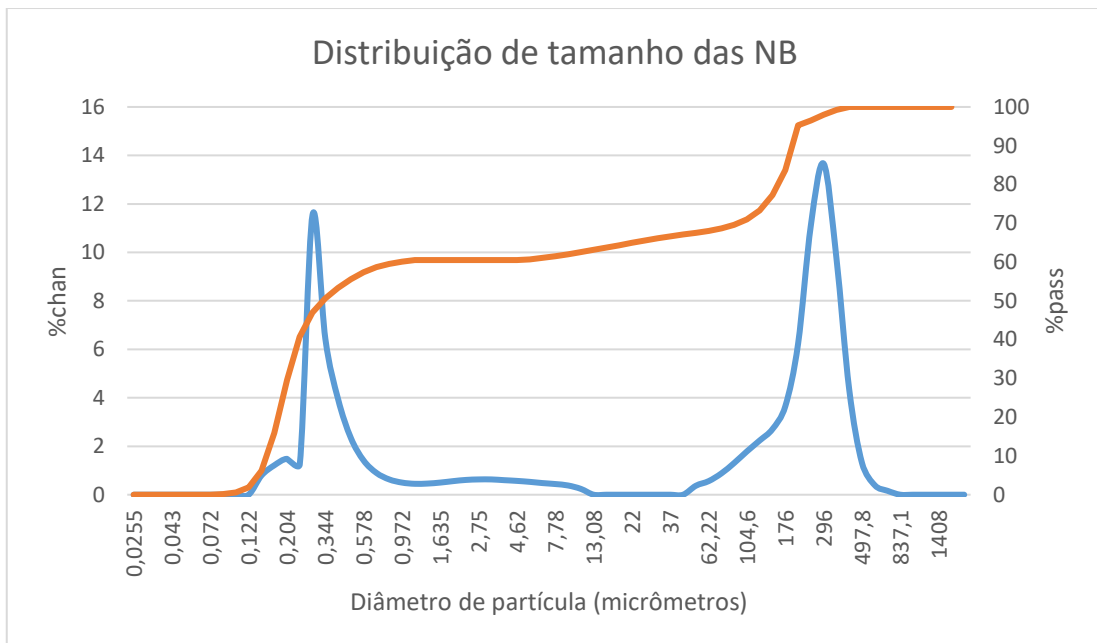
Legenda: Diâmetro médio da distribuição de volume (MV), diâmetro médio da distribuição numérica (MN), diâmetro médio da distribuição de área (MA), superfície específica (CS) nanocápsulas brancas (NB), nanocápsulas contendo carvacrol (NC) e nanoesferas brancas (NE).

Fonte: Nóbrega (2019)

Além disso, foram obtidos dados da distribuição de tamanho das partículas, utilizados para gerar os gráficos apresentados nas Figuras 8, 9 e 10. O equipamento faz a medição em canais de tamanho fixo definidos pelo operador. O eixo vertical da esquerda nos gráficos é lido como porcentagem de volume no canal (%chan) e indica quanto do volume total da amostra

está entre o diâmetro indicado no eixo horizontal e o próximo valor de diâmetro de partícula. O eixo vertical da direita (%pass) indica a porcentagem acumulada dos dados. O instrumento não apresenta dados de partículas com tamanho menor ou maior do que a capacidade de detecção do aparelho, portanto tais dados não entram na distribuição ou outros resultados.

Figura 9 – Distribuição de diâmetro de partículas das nanocápsulas brancas (NB)

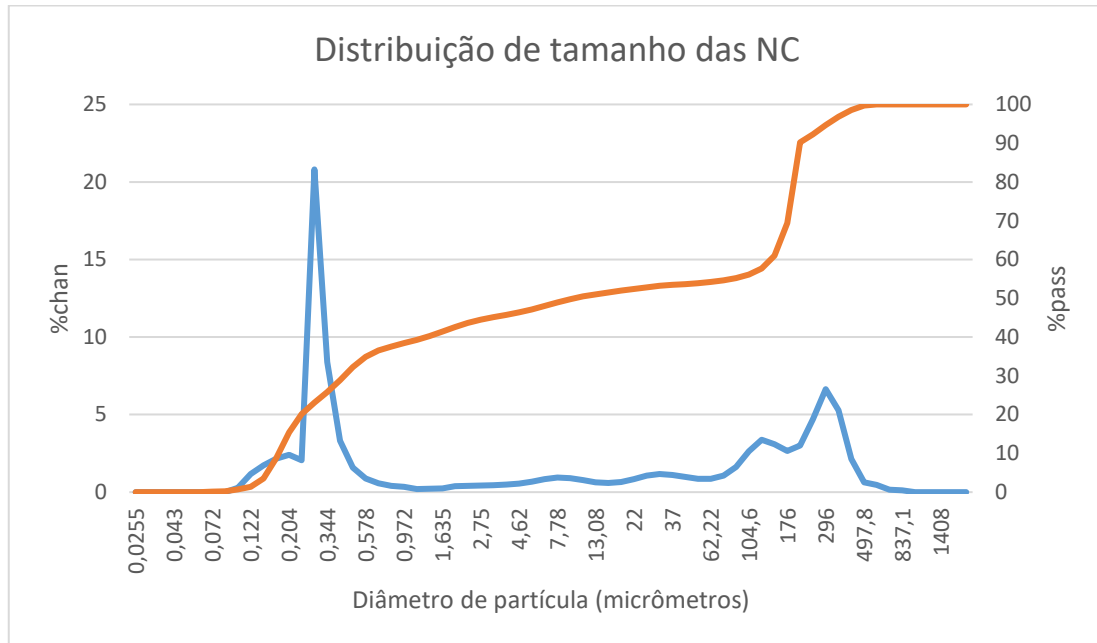


Legenda: Linha azul (intensidade) e linha laranja (porcentagem acumulada).

Fonte: Nóbrega (2019)

As nanocápsulas brancas obtiveram um gráfico de distribuição de diâmetros bimodal, exposto na Figura 9. Um pico correspondente a 39,5% do volume total da distribuição com partículas de diâmetro médio de 312 nm e outro pico correspondente a 60,5% do volume total da distribuição com partículas de diâmetro médio de 246,800 μm .

Figura 10 – Distribuição de diâmetro de partículas das nanocápsulas contendo carvacrol (NC)



Legenda: Linha azul (intensidade) e linha laranja (porcentagem acumulada).

Fonte: Nóbrega (2019)

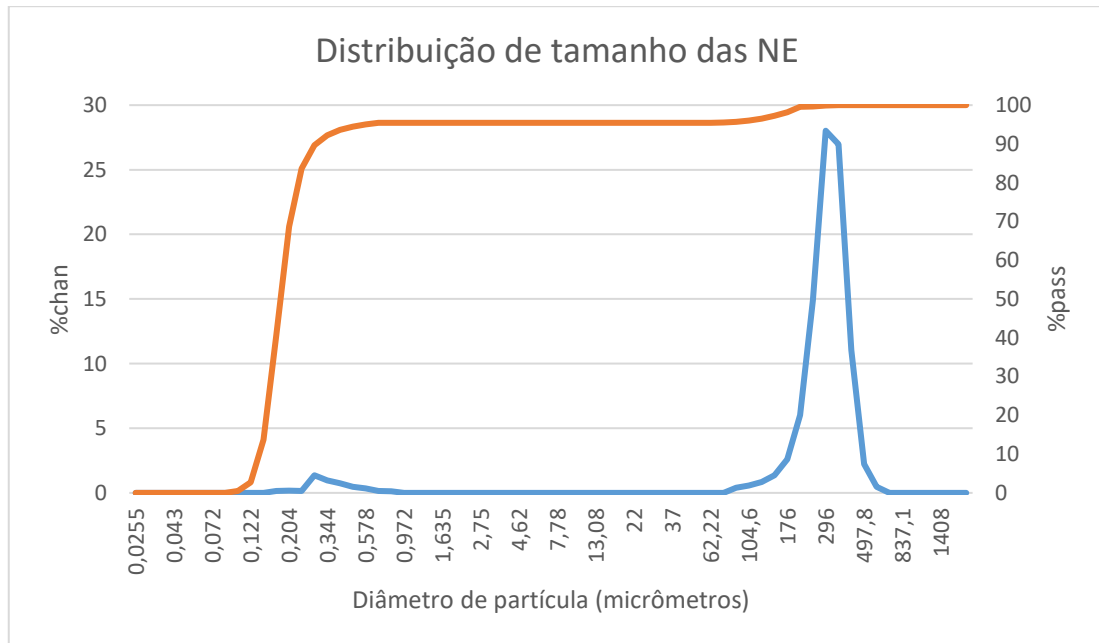
Já as nanocápsulas contendo carvacrol obtiveram como resultado um gráfico multimodal, como exposto na Figura 10. O primeiro pico corresponde a 7,8% da distribuição e tem partículas com diâmetro médio de 153 nm. O segundo pico corresponde a 37,6% do volume total da distribuição e tem partículas com diâmetro médio de 279 nm. O terceiro pico corresponde a 6,8% do volume total e tem diâmetro médio de 21,70 μm . O quarto pico corresponde a 7,5% do volume e possui partículas com diâmetro médio de 4,10 μm . O quinto pico tem volume correspondente a 14,5% do volume da distribuição e possui diâmetro médio de 99,98 μm . O último pico possui volume correspondente a 25,8% do volume e tem diâmetro médio de 266,4 μm .

Na aplicação da técnica de nanoprecipitação, a natureza e concentração do polímero na fase orgânica, polaridades dos solventes, a natureza das fases internas e externas e a natureza e concentração dos surfactantes são fatores determinantes para o tamanho médio de partícula (MORA-HUERTAS et al., 2009; SOUTO et al., 2012).

As formulações de nanocápsulas brancas e as de nanocápsulas contendo carvacrol apresentaram distribuição de tamanho de partículas com picos significativos em diâmetros médios de 312 nm e 279 nm, respectivamente. Ambas as formulações apresentaram diâmetro

médio adequado, abaixo de 400 nm (SCHAFFAZICK et al., 2002). Entre as nanocápsulas, as diferenças de diâmetro das partículas podem ser atribuídas à influência de características do óleo usado, entre elas a viscosidade, hidrofobicidade e tensão interfacial (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Figura 11 – Distribuição de diâmetro de partículas das nanoesferas brancas (NE)



Legenda: Linha azul (intensidade) e linha laranja (porcentagem acumulada).

Fonte: Nóbrega (2019)

As nanoesferas brancas obtiveram um gráfico bimodal (Figura 11) com um pico no diâmetro médio de 312 nm possuindo 4,6% do volume total, e outro pico com 284,3 μm de diâmetro médio, com 95,4% do volume total.

Os valores de superfície específica para as NC e NB podem indicar competência de reatividade com tecidos biológicos, já que alta área de superfície específica é correlacionada com respostas biológicas (FRANK et al., 2015). Uma maior superfície específica está relacionada com uma diminuição do pH (SUTTIPONPARNIT et al., 2011).

5.4.2 Espectroscopia de correlação de fótons

Amostras das formulações de nanocápsulas contendo carvacrol (NC) e nanoesferas brancas (NB) foram analisadas através do programa Zetasizer 3.30 (Malvern Panalytical, Reino

Unido). A partir dele foram obtidos valores de diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI), expostos na Tabela 2, e os gráficos de distribuição, expostos na Figura 12.

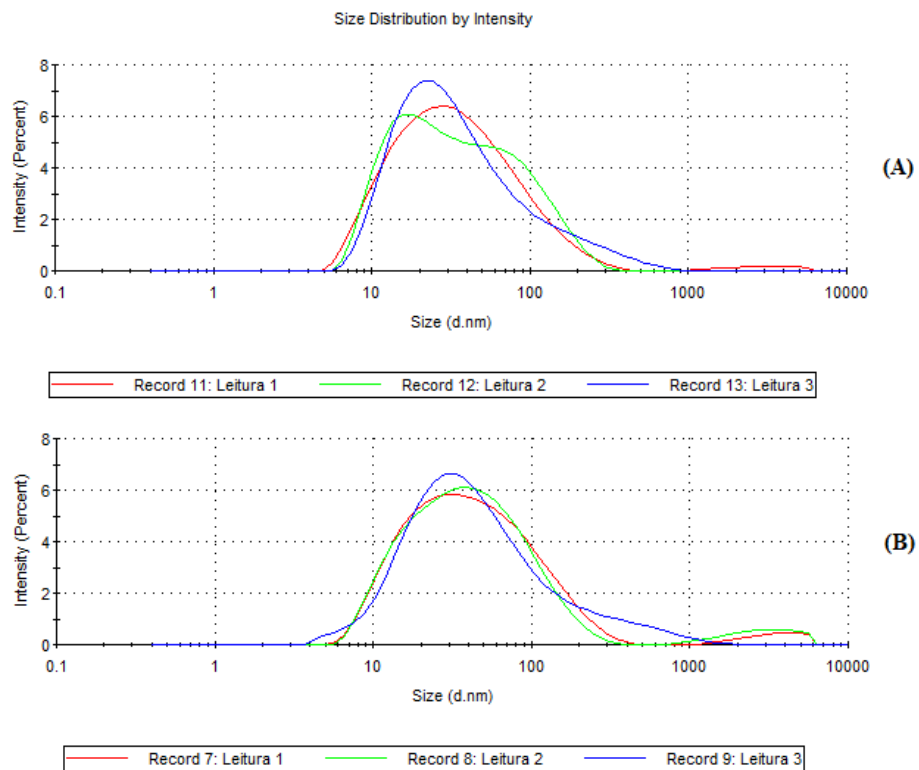
Tabela 2 – Diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI) das nanocápsulas contendo carvacrol (NC) e nanoesferas brancas (NE)

	NC	NE
Parâmetros:		
Diâmetro médio (nm)	25,81 ± 0,21	31,46 ± 0,07
PDI	0,378 ± 0,005	0,401 ± 0,015

Legenda: Índice de polidispersão (PDI), nanocápsulas com carvacrol (NC) e nanoesferas brancas (NB).

Fonte: Nóbrega (2019)

Figura 12 – Diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI) das nanocápsulas contendo carvacrol (A) e nanoesferas brancas (B)



Legenda: Gráfico de dispersão das nanocápsulas contendo carvacrol (A) e gráfico de dispersão das nanoesferas brancas (B)

Fonte: Zetasizer 3.30 (2019)

O índice de polidispersão (PdI) é um valor sem unidade que mede a amplitude da distribuição do tamanho de partícula (TEIXEIRA et al., 2005; STELLA et al., 2007). Um PdI de 0,1 indica uma alta homogeneidade na população de partículas, enquanto valores mais altos indicam uma população polidispersa ou mesmo várias populações (GAUMET et al., 2008).

O diâmetro médio encontrado para as nanocápsulas com carvacrol indica que elas seriam capazes de distribuírem-se na medula, baço e nos capilares sinusoides do fígado, e poderiam permear o microambiente tumoral ou o endotélio hepático (DANAEI et al., 2018). O alto valor de PdI encontrado para essas partículas, juntamente da análise dos gráficos, nos indica que a formulação se encontra altamente dispersa e possivelmente com mais de uma população, com valores de diâmetros médios indo de 10 nm até acima de 1 μ m. Além disso, o valor de diâmetro médio encontrado para as nanoesferas brancas também se mostrou contrário do que o encontrado na literatura (LUCENA et al., 2018; POHLMANN et al., 2002; STELLA et al., 2007), onde as nanoesferas geralmente possuem diâmetro menor do que as nanocápsulas.

5.4.3 Análise do potencial zeta

Os valores do potencial zeta para as formulações de nanocápsulas contendo carvacrol (NC) e de nanoesferas brancas (NE) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Potencial Zeta (mV) das nanocápsulas com carvacrol (NC) e nanoesferas brancas (NB)

Formulações	Potencial Zeta (mV)
Nanocápsulas com carvacrol (NC)	-8,78 \pm 0,08
Nanoesferas brancas (NE)	-12,1 \pm 1,12

Fonte: Nóbrega (2019)

Em uma solução de nanopartículas carregadas, existe uma camada de íons fortemente ligadas à sua superfície (a camada de Stern) e outra camada mais difusa de íons fracamente ligados. Essas camadas sofrem mudanças na interface com o meio dispersante, e o potencial eletrostático no limiar dessas camadas é chamado de potencial zeta. O potencial zeta é medido

utilizando técnicas de eletroforese e está relacionado com a carga de superfície da partícula (CLOGSTON; PATRI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). Esse parâmetro é tido como um dos indicadores de estabilidade de uma solução de nanopartículas, sendo valores mais altos considerados um indício de maior estabilidade, já que as partículas se repelem com mais vigor, diminuindo as chances de aglomeração (FRANCO et al., 2013; SCHAFFAZICK et al., 2003). O potencial zeta foi também reportado como tendo um efeito sobre a toxicidade das nanopartículas sobre as células (PAIVA et al., 2013).

Os tensoativos utilizados, o pH do meio, concentração, força iônica da solução e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta (CRUCHO; BARROS, 2017). Os poliésteres como o PCL, em particular, conferem um valor negativo ao potencial zeta devido à presença dos grupos carboxílicos terminais, enquanto os poloxamers tendem a reduzir esse valor absoluto (MORA-HUERTAS et al., 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). A presença de droga livre no meio dispersante pode diminuir o potencial zeta das partículas (FONTE; REIS; SARMENTO, 2016).

Nos estudos feitos por Lucena et al. (2018) o potencial zeta para nanocápsulas e nanoesferas mostraram valores próximos. No estudo conduzido por Teixeira et al. (2005), a presença do óleo em nanocápsulas e nanoemulsões conferiu à essas preparações um valor mais negativo de potencial zeta do que quando comparadas com as nanoesferas, que não possuem fase oleosa em sua composição, diferindo dos dados encontrados no trabalho atual.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho estudou a preparação de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo carvacrol através do método de nanoprecipitação (deposição interfacial de polímeros pré-formados) e avaliou a efetividade desse método para tal finalidade através do estudo de caracterização e avaliação da estabilidade dos produtos.

De posse dos dados obtidos nesta pesquisa, é possível concluir que:

- No estudo de estabilidade as formulações de nanopartículas apresentaram as características esperadas de uma boa formulação, entre elas: cor branca perolada, ausência de odor, não houve separação de fases e nem presença de precipitado. Tais atributos mantiveram-se após 4 meses, um indicativo da estabilidade das formulações.
- O pH das nanocápsulas manteve-se dentro da faixa esperada para preparações utilizando o polímero PCL. Isso indica que o polímero de tais nanopartículas não se degradou além do esperado, sendo mais um indício de estabilidade e adequação à liberação prolongada.
- As preparações de nanopartículas obtiveram populações com diâmetro médio dentro da faixa esperada para o método aplicado e apropriados para a aplicação terapêutica. Entretanto, os resultados atingidos mostraram alta taxa de dispersão e com potencial zeta levemente baixo.
- As preparações demonstraram estabilidade adequada em relação aos parâmetros analisados, porém serão realizados mais ensaios para finalizar a caracterização físico-química e biológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSTGULEN, L-T.; SOLHEIM, E.; SCHELIN, R. R. Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 61, n. 2, p. 98-102, 1987
- BASER, K. H. C. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 29, p. 3106-3119, 2008.
- BERTRAND, N.; WU, J.; XU, X.; KAMALY, N.; FAROKHZAD, O. C. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 66, p. 2-25, 2014.
- BIMCZOK, D.; RAU, H.; SEWEKOW, E.; JANCZYK, P.; SOUFFRANT, B. W.; ROTHKOTTER, H-J. Influence of carvacrol on proliferation and survival of porcine lymphocytes and intestinal epithelial cells in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 3, p. 652 – 658, 2008.
- BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016.
- BOSKABADY, M. H.; MAHTAJ, L. G. Lung inflammation changes and oxidative stress induced by cigarette smoke exposure in guinea pigs affected by *Zataria multiflora* and its constituent, carvacrol. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 39, 2015.
- BRUNEAU, M.; BENNICI, S.; BRENDLE, J.; DUTOURNIE, P.; LIMOUSY, L.; PLUCHON, S. Systems for stimuli-controlled release: Materials and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 294, n. 1, p. 355-371, 2018.
- BUXTON, I. L. O. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição, metabolismo e eliminação dos fármacos. In: BRUNTON, L. L.; KNOLLMANN, B. C., **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 13. ed. Porto alegre: Artmed Editora, 2018. cap 2, p. 31-33.
- CARONI, A. L. P. F. **Estudos de Adsorção de Tetraciclina em Partículas de Quitosana**. 2009. 145 p. Tese de Doutorado (Pós-graduação em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2009.
- CARVALHO U. F. A.; MELO M. M. V.; CRAVEIRO A. A.; MACHADO L. I. M.; BANTIM B. M.; RABELO F. E. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* cham. against *Aedes aegypti* linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569 – 571, 2003.
- CHAILLOT, J.; TEBBJI, F.; REMMAL, A.; BOONE, C.; BROWN, G. W.; BELLAOUI, M.; SELLAM, A. The monoterpene carvacrol generates endoplasmic reticulum stress in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4584-4592, 2015.

CHAMORRO MONAGO, J. M.; MAMANI, P.; CAROLINA, D. **Efectividad del orégano (*origanum vulgare*) en el tratamiento de los espasmos abdominales en personas de 15–30 años que viven en el Pueblo Joven Columna Pasco Enero – abril del 2018**. 2019. 60 f. Monografía (Graduação em Enfermería). Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. 2019.

CHEN, W-L. ; BARSZCZYK, A.; TURLOVA, E. ; DEURLOO, M.; LIU, B. ; YANG, B. B. ; RUTKA, J. T. ; FENG, Z-P. ; SUN, H. S. Inhibition of TRPM7 by carvacrol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, p. 16321, 2015.

CHOI, H; MODY, C. CM. The long history of molecular electronics: Microelectronics origins of nanotechnology. **Social Studies of Science**, v. 39, n. 1, p. 11-50, 2009.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. In: **Characterization of nanoparticles intended for drug delivery**. Humana Press, 2011. p. 63-70.

CORTEZ TORNELLO, P. R. **Sistemas poliméricos biocompatibles para la liberación controlada de embelina**. 2017. Tese de Doutorado (Facultad de Ingeniería) Universidad Nacional de Mar del Plata. 2019.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D.; VICENZA, D.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, 2007.

CRUCHO, C. IC; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 771-784, 2017.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DATI, L. M.; ULRICH, H.; REAL, C. C.; FENG, Z. P.; SUN, H. S.; BRITTO, L. R. Carvacrol promotes neuroprotection in the mouse hemiparkinsonian model. **Neuroscience**, v. 356, p. 176-181, 2017.

DAUDT, R. M.; EMANUELLI, J.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 28-31, 2013.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química nova**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-. Vol. 36, n. 10, (2013), p. 1520-1526, 2013.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Nanotechnology**. 2019. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/glossary/nanotechnology>. Acesso em: 02 set. 2019.

EVANS, W. E., General Principles of Clinical Pharmacokinetics. In: BURTON, M. E.; SHAW, L. E.; SCHENTAG, J. J.; EVANS, W. E. **Applied Pharmacokinetics &**

Pharmacodynamics: principles of therapeutic drug monitoring. 4. ed. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. cap. 1, p. 4.

FAN, K.; LI, X.; CAO, Y.; QI, H.; LI, L.; ZHANG, Q.; SUN, H. Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. **Anti-cancer Drugs**, v. 26, n. 8, p. 813-823, 2015.

FESSI, H. P. F. D. ; PUISIEUX, F. ; DEVISSAGUET, J. P. ; AMMOURY, N. ; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour Frag J**, v. 23, p. 213–226, 2008.

FONSECA, L. M.; DOS SANTOS CRUXEN, C. E.; BRUNI, G. P.; FIORENTINI, Â. M.; DA ROSA ZAVAREZE, E.; LIM, L. T.; DIAS, A. R. G. Development of antimicrobial and antioxidant electrospun soluble potato starch nanofibers loaded with carvacrol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 1182-1190, 2019.

FONTE, P.; REIS, S.; SARMENTO, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 225, p. 75-86, 2016.

FRANCO L. T.; BOCHI L. D. C. S. Produção e caracterização de diferentes formulações tópicas semissólidas contendo meloxicam na forma nanoestruturada. **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 9, n. 16, p. 209 – 231, 2013.

FRANK, L. A.; CONTRI, R. V.; BECK, R. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 5, p. 623-639, 2015.

FRIEDMAN, M. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 31, p. 7652-7670, 2014.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GRAHAM, N. B. Polymeric inserts and implants for the controlled release of drugs. **British Polymer Journal**, v. 10, n. 4, p. 260-266, 1978.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, M. A.; DOS SANTOS ALVES, R.; DOS PASSOS MENEZES, P.; SERAFINI, M. R.; DE SOUZA ARAÚJO, A. A.; BEZERRA, D. P.; JÚNIOR, L. J. Q. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-biological Interactions**, v. 227, p. 69-76, 2015.

HE, J.; HUANG, S.; SUN, X.; HAN, L.; CHANG, C.; ZHANG, W.; ZHONG, Q. Carvacrol Loaded Solid Lipid Nanoparticles of Propylene Glycol Monopalmitate and Glyceryl Monostearate: Preparation, Characterization, and Synergistic Antimicrobial Activity. **Nanomaterials**, v. 9, n. 8, p. 1162, 2019.

HOU, N.; MAI, Y.; QIU, X.; YUAN, W.; LI, Y.; LUO, C.; LIU, Y.; ZHANG, G.; ZHAO, G.; LUO, J. D. Carvacrol Attenuates Diabetic Cardiomyopathy by Modulating the PI3K/AKT/GLUT4 Pathway in Diabetic Mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 998, 2019.

KHAN, Imran et al. Carvacrol inhibits cytochrome P450 and protects against binge alcohol-induced liver toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, p. 110582, 2019.

LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**, v. 125, p. 75-84, 2015.

LINCE, F.; MARCHISIO, D. L.; BARRESI, A. A. Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 322, n. 2, p. 505-515, 2008.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LUCENA, P. A. et al. In Vivo Vaginal Fungal Load Reduction After Treatment with Itraconazole-Loaded Polycaprolactone-Nanoparticles. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 14, n. 7, p. 1347-1358, 2018.

MAHRAN, Y. F. et al. Carvacrol and Thymol Modulate the Cross-Talk between TNF- α and IGF-1 Signaling in Radiotherapy-Induced Ovarian Failure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

MANOUCHEHRABADI, M. et al. Carvacrol Protects Against 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in In Vivo and In Vitro Models of Parkinson's Disease. **Neurotoxicity Research**, p. 1-15, 2019.

MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 9, n. 18, p. 09-22, 2010.

MELO, F. H. C. et al. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 4, p. 437-443, 2010.

MENDES, Y. C. **Ação do óleo essencial de *Lippia sidoides*, e seus constituintes timol, catvacrol e p- cimeno sobre os parâmetros eletrofisiológicos do nervo ciático de ratos.** 2012. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2012.

MICHIELS, J. et al. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 13, p. 2371-2381, 2008.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

PAIVA, A. M. et al. Development of noncytotoxic PLGA nanoparticles to improve the effect of a new inhibitor of p53–MDM2 interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 394-402, 2013.

PEIXOTO-NEVES, D. et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 341-350, 2010.

POHLMANN, A. R. et al. Poly (ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.

POHLMANN, A. R. et al. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 4-5, p. 305-312, 2002.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

RIBEIRO, C. T. **Efeitos da administração oral do complexo carvacrol/beta ciclodextrina na denervação dopaminérgica induzida por 6-hidroxidopamina em ratos Wistar.** Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (Biotecnologia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2018.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M. I. et al. Evaluation of monoterpene-cyclodextrin complexes as bacterial growth effective hurdles. **Food Control**, p. 106814, 2019.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Protective effects of carvacrol against oxidative stress induced by chronic stress in rat's brain, liver, and kidney. **Biochemistry Research International**, v. 2016, 2016.

SÁNCHEZ, C.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. The effect of carvacrol on enteric viruses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 192, p. 72-76, 2015.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova. São Paulo**. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737, 2003.

SCHLEMMER, K. B. et al. In vitro activity of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol combined with antifungals against *Malassezia pachydermatis*. **Journal de Mycologie Médicale**, 2019.

SHAKERI, F.; SHAKERI, S.; HOJJATOLESLAMI, M. Preparation and characterization of carvacrol loaded polyhydroxybutyrate nanoparticles by nanoprecipitation and dialysis methods. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, 2014.

SHARIFI-RAD, Mehdi et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1675-1687, 2018.

SHEMESH, R. et al. Active packaging containing encapsulated carvacrol for control of postharvest decay. **Postharvest Biology and Technology**, v. 118, p. 175-182, 2016.

SILVA, E. C. S. V. **Síntese, caracterização e estudo das propriedades biocompatíveis do poli(ϵ -caprolactona) com topologia estrela**. 2009. 150 f. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2009.

SINGH, R.; LILLARD JR, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, n. 3, p. 215-223, 2009.

SINHA, V. R. et al. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1-23, 2004.

SOMENSI, N. et al. Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF- κ B pathway. **International Immunopharmacology**, v. 75, p. 105743, 2019.

SOUTO, E. B. et al. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SPALLETTA, S. et al. Carvacrol reduces adipogenic differentiation by modulating autophagy and ChREBP expression. **PloS One**, v. 13, n. 11, p. e0206894, 2018.

STELLA, B. et al. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, n. 1-2, p. 71-77, 2007.

SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 304-318, 2015.

SUTTIPONPARNIT, K. et al. Role of surface area, primary particle size, and crystal phase on titanium dioxide nanoparticle dispersion properties. **Nanoscale Res Lett**, v. 6, n. 1, p. 27, 2011.

TEIXEIRA, M. et al. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, n. 3, p. 491-500, 2005.

TROIANO, G. et al. A quality by design approach to developing and manufacturing polymeric nanoparticle drug products. **The AAPS journal**, v. 18, n. 6, p. 1354-1365, 2016.

VERT, M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 437-446, 2009.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer— Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217-1256, 2010.

WU, C. et al. A heterogeneous catalytic kinetics for enzymatic biodegradation of poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles in aqueous solution. **Polymer**, v. 41, n. 10, p. 3593-3597, 2000.

Wu, X.; Guy, R. H. “Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics”. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, vol.19, n°371. 2009.

ZELENKOVÁ, T. et al. Size Control in Production and Freeze-Drying of Poly- ϵ -Caprolactone Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 6, p. 1839-1850, 2014.