INCORPORAÇÃO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E AVALIAÇÃO E ATIVIDADE BIÓLOGICA

Letícia Ramalho Xavier[1], Rebeca Ribeiro Gonçalves[2], Jaqueline Rodrigues Cindra de Lima Souza[3], Tércio da Silva de Souza[4]

[1]Universidade Federal do Espírito Santo/Campus de Alegre, Alto Universitário, s/n, Guararema, 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, lr.ramalhoxavier@gmail.com.
[2]Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo/Campus de Alegre, BR 482, Rodovia Cachoeiro/Alegre, Km 47, Distrito de Rive - 29520-000 - Alegre-ES, Brasil, rebecaribeirogolcbio@gmail.com
[3]Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo/Campus Vila Velha, Av. Ministro Salgado Filho, n 1000, Soteco/Vila Velha 29106-010- Vila Velha-ES, Brasil, jrsouza@ifes.edu.br
[4]Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo/Campus Vitória, Av. Vitória, n 1729, Jucutuquara/Vitória, 29040-780 Vitória-ES, Brasil,tssouza@ifes.edu.br

Resumo
Com o intuito de mitigar as limitações inerentes aos óleos essenciais (OE) e expandir suas possibilidades de aplicação, propõe-se a encapsulação como estratégia. Essa técnica permite a incorporação e proteção dos princípios ativos, aumentando sua estabilidade, reduzindo a taxa de migração para o meio externo e prolongando o tempo de ação. O presente trabalho visou extrair, caracterizar, encapsular o óleo essencial de cravo-da-Índia (OECI) em quitosana, avaliar a eficiência de encapsulamento e suas atividades funcionais. O OECI foi extraído por hidrodestilação e apresentou rendimento (3,31%), densidade (1,0072 g/cm³), índice de refração (1,4863), cor amarelo claro, aspecto límpido e aroma característico, com predominância de eugenol (81,82%). A quitosana utilizada teve grau de desacetilação de 83,3%. A eficiência de encapsulamento foi de 94,5±0,1%, obtida na concentração de 0,43 g L^{-1} de OECI, que corresponde à relação 1:4 (OECI:Quitosana) e a cinética de liberação do OECI foram avaliadas, mostrando liberação progressiva de 0,3% a cada 15 dias e eficácia na inibição de *Staphylococcus aureus* e *Fusarium guttiliforme*.

Palavras-chave: Nanocápsula. Atividade biológica. Encapsulação. Cinética de liberação.
Área do Conhecimento: Ciências Biológicas**/**Bioquímica

Introdução

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) é uma planta arbórea, de odor fortemente aromático, sabor ardente e característico muito utilizado na medicina popular e na culinária, especialmente na produção de doces. O óleo essencial (OE) do cravo-da-índia é amplamente reconhecido por suas distintas propriedades biológicas, sendo extraído dos botões florais secos da planta. Diversos estudos destacam suas atividades biológicas, como anestésico, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (antibacteriano e antifúngico) que o tornam valioso para aplicações terapêuticas e industriais (El-Saber Batiha *et al*., 2020; Idowu *et al.,* 2021).

Apesar de suas diversas aplicações o OE de cravo da índia, bem como os demais OEs, apresentam limitações na sua aplicação, o que pode restringir seu uso. Suas limitações estão relacionadas à alta volatilidade dos seus compostos, o que pode comprometer a eficácia dos princípios ativos ao longo do tempo; a sua baixa solubilidade em água, o que dificulta sua formulação em produtos aquosos e a variabilidade de sua composição química, que pode mudar devido a fatores ambientais, genéticos e sazonais, impactando na homogeneidade entre diferentes lotes de produção (Sousa *et al*., 2022).

Com intuito de mitigar os efeitos das limitações e ampliar a gama de possibilidade de aplicação para os OEs podem ser utilizadas diferentes técnicas, dentre elas a encapsulação. Esta permite a incorporação e proteção dos princípios ativos, aumentando a sua estabilidade, reduzindo a taxa de migração para o meio externo e prolongando o tempo de ação (Aguiar, 2022). As técnicas mais comuns de encapsulamento incluem: Spray Drying, Coacervação Complexa, Encapsulação Lipídica e a Encapsulação em Nanopartículas, esta última, utiliza de materiais poliméricos biodegradáveis para criar

nanopartículas que encapsulam o OE, oferecendo uma liberação controlada e prolongada (Mehta *et al.,* 2022).

No processo de encapsulação em nanopartículas diferentes agentes encapsulantes utilizados, dentre estes encontra-se a quitosana, copolímero biodegradável formado de unidades β-(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranose e β-(1,4)-2-acetamido-2-desoxi-glicopiranose. Obtida pelo processo da desacetilação da quitina (Vieira *et al.,* 2018). A quitosana destaca-se por apresentar propriedades benéficas aos processos biológicos, biodegradabilidade e biocompatibilidade. É amplamente utilizada na formulação de sistemas de liberação controlada de fármacos, sua estrutura pode ser modificada para formar nanopartículas que encapsulam os compostos ativos presentes no OE, além disto, com as modificações estruturais é possível direcioná-las para alvos específicos no organismo, melhorando a biodisponibilidade e reduzindo os possíveis efeitos colaterais (Mohammed *et al.,* 2017; Torres *et al*., 2023).

Para verificar a eficácia do encapsulamento e a liberação dos princípios ativos dos OEs são realizados: Ensaios de liberação in vitro (difusão em membrana e sistema de dissolução em meios e solventes diferentes); Análises cromatográficas (CG e HPLC) para qualificar e quantificar os compostos voláteis dos OEs; Espectroscopia de UV-Vis, FTIR e RMN para monitorar a concentração do OE no meio de liberação; Testes de estabilidade (estabilidade acelerada e ciclagem térmica) para verificar a eficácia da encapsulação na proteção dos OEs; Modelagem matemática da cinética de liberação dos princípios ativos; e a Microscopia (MEV e microscopia confocal). Além destes, são realizados testes biológicos in vitro e in vivo para avaliar a eficácia da liberação controlada em um ambiente real (Sarfraz *et al*., 2020).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi extrair e caracterizar o óleo essencial de Cravo-da-Índia, promover sua encapsulação em quitosana e avaliar a eficiência de encapsulação e as atividades funcionais do biofilme.

Metodologia

O OECI foi extraído dos botões florais desidratados do cravo-da-Índia (adquirido no comércio local Rive-Alegre/ES) por hidrodestilação como preconiza a Farmacopeia brasileira (Brasil, 2022). A identificação dos compostos químicos presentes no OECI foi realizada por cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama (CG-DIC) (Shimadzu GC-2010 Plus) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) (Shimadzu GC-MS-2010) de acordo com metodologia proposta por De Souza *et al.* (2017). Também foram mensurados as características físico-químicas densidade (De Jesus e Palma, 2008) e índice de refração (IAL, 2008) e sensoriais cor, aroma e aspecto (ISSO, 1997). O estudo do comportamento espectral do OECI foi realizado por espectrometria de UV-Vis (AGILENT CARY 60 UV-VIS) (Veloz *et al.* 2024).

A Quitosana foi caracterizada quanto o seu grau de desacetilação (GD), que indica a proporção de grupos acetil (-$COCH_3$) removidos da quitina para formar quitosana. Esse parâmetro influencia diretamente a solubilidade, viscosidade, carga catiônica, capacidade de formar filmes e géis, e a reatividade do polímero (Vieira *et al.,* 2018). A avaliação do GD da quitosana foi realizada por titulação potenciométrica (pHmetro - MS TECNOPON, mPA-210) conforme descrito por Abreu *et al*. (2013).

As nanocápsulas de quitosana com diferentes concentrações de OECI (0 a 4 g L^{-1}) foram preparadas conforme metodologia proposta por Ahmadii *et al.* (2018), com modificações. A quitosana (GD: 75,0 - 85%) foi dissolvida em ácido acético 1% (v v^{-1}) na concentração de 2 g L^{-1} sob agitação a 550 rpm, seguido da adição de Tween 80 (0,24% m v^{-1}) como estabilizante/surfactante, OECI e tripolifosfato de sódio (TPP) 4 g L^{-1} como agente complexante. A eficiência do encapsulamento foi determinada por meio de análise de espectroscopia na região do UV-Vis a 280 nm, conforme a metodologia utilizada por Ahmadi *et al*. (2018). As nanocápsulas foram congeladas e liofilizadas para obtenção do produto final.

Para avaliação da cinética de liberação do OECI, o material encapsulado foi ressuspendido em água na proporção de 1%, à 30°C, sob agitação a 200 rpm por 30 dias. O teor de OECI liberado foi analisado no 1º, 15º e 30º dias utilizando espectroscopia UV-Vis a 280 nm.

Foram realizados testes de atividade bactericida e fungicida nas nanocápsulas de quitosana com as concentrações de OECI (0 e 0,43 g L^{-1}) utilizando *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 25923) e *Fusarium guttiforme* (estirpe F449), respectivamente. Para o ensaio bactericida utilizou-se método por difusão em disco (Broth de Soy Tryptic - TSB) (Nandhini, 2022) e suspensão de 0,6 g L^{-1} das

.

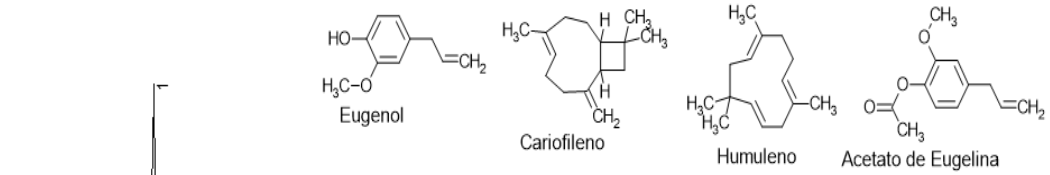
nanocápsulas em etanol aplicada sob os discos, com a leitura dos halos de inibição após 24 h de incubação. Já o ensaio fungicida foi realizado em meio sólido (Kohanmoo; Jamali, 2013) utilizando Ágar Batata Dextrose – PDA, amoxicilina e 6 g L^{-1} das nanocápsulas, com a leitura dos halos de crescimento micelial após 7 dias de incubação.

Os resultados foram obtidos com base em três repetições experimentais e submetidos à análise descritiva, de variância (ANOVA). As diferenças significativas entre as médias indicadas pelo teste de t-*Student* para amostras independentes com variâncias iguais, sendo consideradas diferenças significativas para $p<0.05$ e os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão, calculados em ambiente R (R, 2023).

Resultados

O OECI obtido dos botões florais do cravo-da-índia comercializados localmente apresentou rendimento de extração R = 3,31±0,80 % (m m^{-1}), densidade d = 1,0722 ±0,0098 g cm^{-3}, índice de refração IR = 1,4863±0,0321, coloração amarelo claro, aspecto límpido e aroma intenso e ardente característicos do cravo-da-índia.

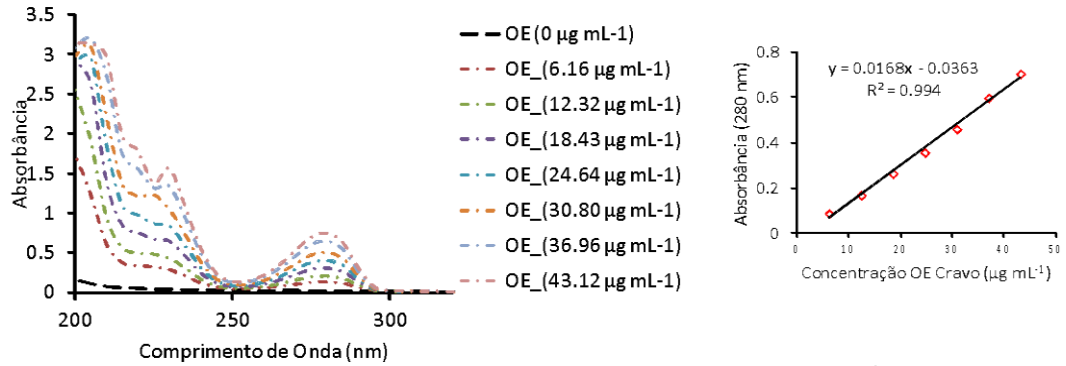
Figura 1. Cromatograma do OE dos botões florais do Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*). Composição (CG-FID/MS) e Estruturas químicas dos compostos presentes.



Peak	RT(min)	IRCal	IRTab	Componentes	Identificação	A%	RRF%
1	27.759	1366	1366[a]	Eugenol	IRand MS	79,96	81,82
2	29.934	1417	1419[b]	Cariofileno	IRand MS	12,47	10,12
3	31.304	1451	1456[c]	Humuleno	IRand MS	1,12	0,91
4	34.559	1532	1524[d]	Acetato de Eugelina	IRand MS	6,45	7,15
						100,00	100,00

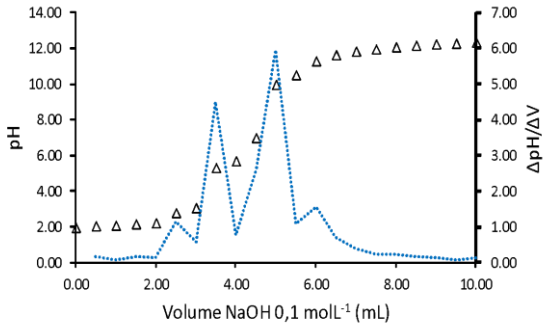
RT: Tempo de retenção em minuto; IRcal: índice de retenção calculado; IRTab: índice de retenção tabulado. RRF%: área relativa ajustada; A%: Área relativa; MS: Espectrometria de massa. Fonte: o autor (2024)

Figura 2. Espectros padrão de UV-Visível presente no OECI



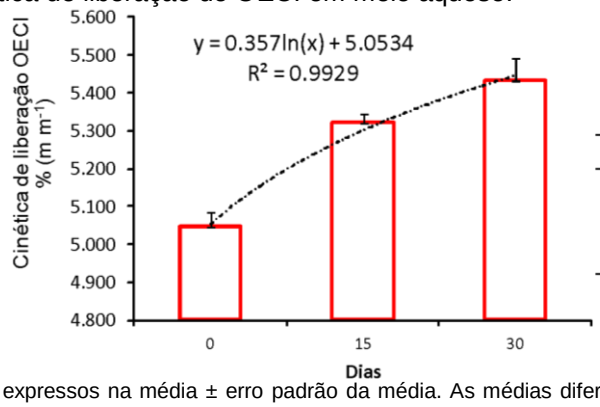
Absorbância máxima (λ máx. = 279 nm). Curva de calibração (eugenol) para quantificação de do óleo essencial do Cravo-da-Índia. Fonte: o autor (2024)

Figura 3. Comportamento da quitosana submetidas à titulação potenciométrica para obtenção de informações para cálculo do grau de desacetilação (GD).



Primeira derivada da curva de titulação (ΔpH/ΔV) para definição dos pontos de viragem. Fonte: o autor (2024)

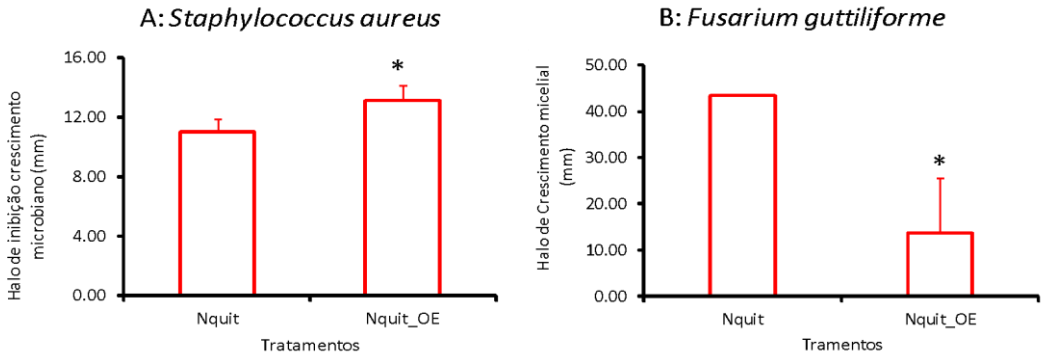
Figura 4. Cinética de liberação do OECI em meio aquoso.



DIAS	% LIBERAÇÃO	
0	5.046	0.039
15	5.320	0.025
30	5.584	0.057

Os valores estão expressos na média ± erro padrão da média. As médias diferentes foram comparadas pelo teste t-Student (p<0,05). Fonte: o autor (2024)

Figura 5. Atividade antimicrobiana das nanopartículas de OECI/quitosana.



Os valores estão expressos na média ± erro padrão da média. As médias diferentes foram comparadas pelo teste t-Student (*p<0,05*). Fonte: o autor (2024)

Discussão

O rendimento da extração foi semelhante ao reportado por Barro Gomes *et al.,* 2018) R = 3,63% (m m^{-1}), e densidade obtida está em conformidade com a ISO (1997) para OE de botões florais de cravo-da-índia (1,042-1,063 g cm^{-1}), já o valor do IR foi inferior aos preconizados pela ISSO (1997) (1,528-1,538) fato este que pode estar relacionado grau de pureza da matéria prima. Os aspectos sensoriais observados são adequados para indústrias cosméticas, farmacêuticas e alimentícias, que prezam pela qualidade visual e aromática dos produtos preparados a partir dos óleos essenciais (Do *et al*., 2010). Os principais compostos químicos presentes no OECI são mostrados na Figura 1. Com predominância do Eugenol (81,82%), Cariofileno (10,12%), Humuleno (0,91%), Acetato de eugenila (7,15%). Dentre os compostos identificados tem-se uma predominância de terpenos hidrocarbonetos (88,95%).

O comportamento espectral do OECI na região UV-VIS (Figura 2) revelou um padrão definido para diferentes concentrações, especialmente a 280 nm, característica do eugenol, usado na curva de calibração para quantificação em sistemas aquosos. Este comportamento também foi observado por Martins *et al.* (2022) para quantificação de OECI em tecidos funcionalizados.

A quitosana foi caracterizada quanto ao grau de desacetilação (GD), que foi de 83,3±0,5%, conforme registrado na Figura 3. Quitosanas que apresentam GD ≥ 70% apresentam-se solúveis em soluções aquosas ácidas e se comportam como um polieletrólito catiônico (Penha et al., 2020).

A eficiência de encapsulamento (EE) foi de 94,5±0,1%, obtida na concentração de 0,43 g L^{-1} de OECI, que corresponde à relação 1:4 (OECI:Quitosana). Resultado semelhante aos obtidos por Mohammadi *et al*. (2015) e Ma *et al.* (2022), usando diferentes OEs, estes apontaram que existe um limite máximo de eficiência de encapsulação que está relacionado a proporção OE/Encapsulante. Este limite pode estar relacionado a saturação dos sítios de ligação no meio. No estudo da cinética de liberação do OECI (Figura 4) foi observado um aumento gradual na liberação do OECI, regido pela equação Y = 0,357ln(x) + 5,0534 R^2 = 0,99, com acréscimo de 0,3 % de OECI a cada 15 dias na solução.

A Figura 5 apresenta o comparativo entre o efeito bactericida (*Staphylococcus aureus*) e antifúngico (*Fusarium guttiliforme*) das nanocápsulas de quitosana com e sem a presença do OECI. Pode-se observar em ambos os casos que o maior efeito inibitório sobre o desenvolvimento dos microrganismos na presença do OECI encapsulado em quitosana, indicando o princípio ativo está sendo está sendo liberado no meio de crescimento.

Conclusão

O OECI obtido dos botões florais do cravo-da-índia comercializados localmente apresentou rendimento de extração R = 3,31±0,80 % (m m^{-1}), densidade = 1,0072 ± 0,0098 g cm^{-3}, índice de refração = 1,4863±0,0321, coloração amarelo claro, aspecto límpido e aroma intenso e ardente característicos do cravo-da-índia. Apresentou em sua composição química predominância de Eugenol (81,82%). A quitosana utilizada no encapsulamento apresentou grau de desacetilação (GD = 83,3±0,5 %) com comportamento de um polieletrólito catiônico. A eficiência de encapsulamento foi de 94,5±0,1%, obtida na concentração de 0,43 g L^{-1} de OECI, que corresponde à relação 1:4 (OECI:Quitosana). O estudo da cinética de liberação do OECI pela nanocápsula indicou sistema progressivo, com liberação média de 0,3 % do OECI a cada 15 dias, fato este que pode ser confirmado nos ensaios comparativos de atividade antimicrobiana, as cápsulas contendo OECI mostraram-se mais eficazes na inibição do desenvolvimento da bactéria *Staphylococcus aureu*s e do fungo *Fusarium guttiliforme*.

Referências

ABREU, F.O.M.S. *et al*. Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas. **Polímeros**, v. 23, p. 630-635, 2013. https://doi.org/10.4322/polimeros.2013.042

AHMADI, Z. *et al*. *Achillea millefolium* essential oil and chitosan nanocapsules with enhanced activity against *Tetranychus urticae*. **Journal of pest science**, v. 91, p. 837-848, 2018. https://doi.org/10.1007/s10340-017-0912-6

BARROS GOMES, P.R. *et al.* Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 47, n. 1, p. 37-52, 2018. https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v47n1.70657

BRASIL. Farmacopéia Brasileira, 6ª Ed. Vol. 1 / Brasília, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2022. 546p., il. p. 198, 199. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira> Acesso em: 14 de mar. de 2024.

DE JESUS, V.L.B.; PALMA, D.A. Medição da densidade do óleo: uma discussão sobre sua otimização e diminuição dos custos via incerteza relativa da medição. Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 30, n. 3, p.3302.1-3302.6. 2008. https://doi.org/10.1590/S1806-11172008005000002

DE SOUZA, T.S. *et al.* Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38-44, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.026

DO, T.K.T.; HADJI-MINAGLOU, F.; ANTONIOTTI, S.; FERNANDEZ, X. Authenticity of essential oils. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p.146-157. 2015. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.007

EL-SABER BATIHA, G. *et al. Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 202, 2020. https://doi.org/10.3390/biom10020202

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ, I. A. L. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed., 1020p 2008. Disponível em https://wp.ufpel.edu.br/nutricaobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf Acessado em 30 de mai. de 2023.

IDOWU, S. *et al*. Clove (*Syzygium aromaticum*) spices: A review on their bioactivities, current use, and potential application in dairy products. Journal of Food Measurement and Characterization, v. 15, p. 3419-3435, 2021. https://doi.org/10.1007/s11694-021-00915-9

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 3142:2997(E). Oil of clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.)]. Geneva: ISO, 1997. Disponível em: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/8312/5cec7962addf4d23b800a26b69ed855b/ISO-3142-1997.pdf>. Acesso em 18 de ago. de 2024.

KOHANMOO, M.; JAMALI, F. Antifungal activities of some medicinal plant essential oils against *Fusarium oxysporum* F. sp. Lycopersici. **Biological Control of Pests and Plant Dise**ases, v. 2, n. 1, p. 27-33, 2013. https://doi.org/10.22059/jbioc.2013.35504

MARTINS, Q. *et al.* Funcionalização de tecidos com óleo essencial de cravo encapsulado em matrizes de quitosana e alginato. 2022. Disponível em <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/233258> Acesso em 15 de agostos de 2024.

MEHTA, N. *et al*. Microencapsulation as a noble technique for the application of bioactive compounds in the food industry: A comprehensive review. Applied Sciences, v. 12, n. 3, p. 1424, 2022. https://doi.org/10.3390/app12031424

MOHAMMADI, A., HASHEMI, M., HOSSEINI, S.M. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 28, 73–80. 2015. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.12.011

MOHAMMED, M.A. *et al*. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 53, 2017. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040053

NANDHINI, P. *et al.* Recent developments in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) treatment: A review. **Antibiotics**, v. 11, n. 5, p. 606, 2022. https://doi.org/10.3390/antibiotics11050606

PENHA, V.C.S. *et al.* Produção de microesferas de quitosana para fins farmacêuticos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 55941-55973, 2020. https://doi.org/10.34117/bjdv6n8-129

SOUSA, V. *et al*. Microencapsulation of essential oils: A review. **Polymers**, v. 14, n. 9, p. 1730, 2022. https://doi.org/10.3390/polym14091730

TORRES, J. L. *et al.* Associação entre biomateriais à base de quitosana e óleos essenciais de *Thymus vulgaris* L. e *Origanum vulgare* L. como alternativa no combate a infecções orais. **Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro**, v. 14, n. 1, 2023. https://doi.org/10.61164/rmnm.v14i1.2078

SARFRAZ, J. *et al*. Nanocomposites for food packaging applications: An overview. **Nanomaterials**, v. 11, n. 1, p. 10, 2020. https://doi.org/10.3390/nano11010010

VELOZ, V. A. *et al.* Nanopartículas de ZEÍNA/PVA incorporadas com eugenol e óleo essencial do cravo-da-Índia: otimização da síntese e validação analítica para quantificação do eugenol. **Química Nova**, v. 47, n. 5, p. e-20230137, 2024. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20230137

VIEIRA, A.J. *et al*. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 97-106, 2018. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.007

Agradecimentos

Á FAPES, pelo apoio financeiro e institucional.