

Daniele Ziglia de Freitas

**NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA E QUITOSANA CONTENDO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum gratissimum* L. QUIMIOTIPOS  
EUGENOL E GERANIOL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto

Florianópolis  
2016

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

Freitas, Daniele Ziglia de

Nanopartículas de zeína e quitosana contendo óleo essencial de *Ocimum gratissimum* l. quimiotipos eugenol e geraniol / Daniele Ziglia de Freitas ; orientador, Pedro Luiz Manique Barreto - Florianópolis, SC, 2016.

157 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Ciência dos Alimentos. 3. Nanoencapsulação óleos essenciais. 4. *Ocimum gratissimum*. I. Barreto, Pedro Luiz Manique. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Daniele Ziglia de Freitas

**NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA E QUITOSANA CONTENDO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum gratissimum* L. QUIMIOTIPOS  
EUGENOL E GERANIOL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 29 de fevereiro de 2016.

---

Prof.<sup>a</sup> Roseane Fett, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

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

---

Prof.<sup>a</sup>. Jane Mara Block, Dr.<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Edna Regina Amante, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Pesquisador Fabiano Cléber Bertoldi, Dr.  
EPAGRI Estação Experimental Itajaí, SC



Dedico este trabalho às pessoas que mais amo:  
Meus pais, Ricardo e Patrícia, meus irmãos Bruno e Sarah e a  
minha querida sobrinha “Cricri”.  
Obrigada pelos valiosos ensinamentos, incentivo, apoio e amor.



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto pela oportunidade, orientação, ensinamentos, amizade e principalmente por ter acreditado na realização deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Fabiano Cléber Bertoldi, da EPAGRI Estação Experimental Itajaí, SC, pela disponibilidade dos óleos essenciais da *Ocimum gratissimum* L. que possibilitaram a execução deste trabalho.

Aos membros da banca por aceitarem o convite de participação e pelas contribuições fornecidas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos - PGCAL pela oportunidade dada na realização do Mestrado e apoio na pesquisa, e à CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos os (as) professores (as) do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, por permitirem a utilização de equipamentos em seus laboratórios.

A Cleonice, Matheus e Carolina por toda ajuda, paciência, amizade, orientações e ensinamentos transmitidos ao longo desta trajetória. Em especial a Cleo que além de todo auxílio acadêmico e amizade, sempre esteve disponível nas dificuldades encontradas neste caminho. Aos demais amigos do “labirinto” Aline, Ana Mello, Ana Z., Bianca, Bruna, Giovana, Michele e Rhaysa pelo apoio, sugestões, conselhos e amizade. Vocês foram importantes para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Departamento de Ciência dos Alimentos, pelo convívio e amizade durante o tempo que passamos juntos.

A todos os amigos que mesmo distantes estiveram sempre presentes, vocês são especiais em minha vida.

A Priscila, por toda ajuda, ensinamentos e amizade ao longo destes anos. Teu acolhimento e incentivo foram essenciais neste tempo!

A todas as pessoas que tive a felicidade de ter a amizade ao longo destes dois anos: Biluca e Roberta, por toda amizade que transcendeu a qualquer parceria. A Bru, por tudo, principalmente pelo companheirismo nesta jornada!

Ao meu querido Giô e sua família (Magali, Leonardo e Bruno) por todo amparo e carinho, a presença de vocês tornaram os dias mais leves.

À minha família pelo amor, em especial aos meus pais Patrícia e Ricardo, pelo incentivo e apoio, que, mesmo distantes,

souberam se fazer sempre presentes. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho!

Meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo, desenvolver e caracterizar nanopartículas contendo óleo essencial de Alfavaca Africana (*Ocimumgratissimum*L.), quimiotipo eugenol e quimiotipo geraniol, assim como seus compostos principais, na forma pura, tendo como material de parede zeína com e sem revestimento de quitosana. As suspensões nanoparticuladas foram obtidas pela técnica de nanoprecipitação, com a finalidade de caracterização físico-química e de estabilidade das partículas obtidas, análises de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação e atividade antioxidante, foram realizadas nos tempos 1, 30 e 60 dias de armazenamento. As partículas apresentaram diâmetro médio entre 145 e 245 nm, com índice de polidispersão inferiores a 0,226. O potencial zeta variou de + 21 à + 43 mV, possuindo em todas as formulações carga positiva. A eficiência de encapsulação foi de 89 a 99%. A atividade antioxidante das partículas foi avaliada pela capacidade dos compostos presentes nas amostras, em inibir o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), as partículas contendo eugenol em sua composição apresentaram valores acima de 99%, enquanto partículas contendo geraniol obtiveram atividade entre 50 e 10%. Com exceção às partículas contendo geraniol em sua formulação, que obtiveram redução em sua capacidade antioxidante no transcorrer do armazenamento, as partículas demonstraram estabilidade em função do tempo (até 60 dias) em relação às metodologias avaliadas. A morfologia e distribuição de tamanho foram realizadas por microscopia eletrônica de transmissão, demonstrando formato esférico, borda regular e bem definida. Análises termogravimétricas e de espectroscopia no infravermelho também foram realizadas e evidenciaram que as nanopartículas carregadas apresentaram características distintas aos óleos essenciais e aos compostos puros utilizados na composição das nanopartículas, e comprovaram a encapsulação dos compostos ativos. Através do estudo, pode-se verificar que as partículas apresentam características para uma possível aplicação em alimentos.

**Palavras-chave:** Alfavaca Africana. Encapsulação. Nanoprecipitação.



## ABSTRACT

This study aimed to develop and characterize nanoparticles containing essential oil of African Basil (*Ocimum gratissimum* L.) eugenol and geraniol chemotypes, as well as its main compounds in pure form. Taking as wall material zein with and without chitosan coating. The nanoparticule suspensions were obtained by nanoprecipitation technique. For the purpose of physical-chemical characterization and stability of the obtained particles, the average diameter, polydispersity index, zeta potential, encapsulation efficiency and antioxidant activity analyzes were performed on days 1, 30 and 60 of storage. The particles had an average diameter of between 145 and 245 nm with a polydispersity index below 0.226. The zeta potential ranged from + 21 to + 43 mV, having positive charge in all formulations. The encapsulation efficiency varied from 89% to 99%. The antioxidant activity of the particles was assessed by the ability of the compounds present in the samples in inhibiting DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picrilhidrazila), the particles containing eugenol in its composition had values above 99%, while particles containing geraniol obtained activity between 50 and 10%. Except for the particles containing geraniol in its formulation, which obtained a reduction in its antioxidant capacity in the course of storage, the particles showed stability for the time (60 days) in relation to the assessed methodologies. The morphology and size distribution were performed by transmission electron microscopy, showing spherical shape, regular and well-defined edge. Thermogravimetric and spectroscopic analysis in infrared were also performed and showed that the loaded nanoparticles presented distinct characteristics to essential oils and pure compounds used in the composition of the nanoparticles, and confirmed the encapsulation of active compounds. Through the study it can be seen that the particles have characteristics for possible use in food.

**Keywords:** Brazil African. Encapsulation. Nanoprecipitatio



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Equações envolvidas no mecanismo de antioxidantes primários.....	33
Figura 2 - (A) Topos floridos da <i>Ocimum gratissimum</i> L.; (B) Ilustração da planta inteira <i>Ocimum gratissimum</i> L. ....	34
Figura 3 - Estrutura química eugenol .....	36
Figura 4 - Estrutura química geraniol .....	37
Figura 5 - Método de nanoprecipitação de polímeros pré- formados .....	39
Figura 6 - Esquema ilustrativo para a formação de zeína revestida por quitosana para o encapsulamento de um composto lipofílico .....	43
Figura 7 - Micrografias obtidas por MET para as partículas PEU. Onde A, C e D estão em uma magnificação de 30.000 vezes, B 100.000 vezes e E e F 15.000 e 150.000 vezes, respectivamente .....	82
Figura 8 - Micrografias obtidas por MET para as partículas PEU Q. Onde B, C, D e E estão em uma magnificação de 30.000 vezes, A e F em 8.000 e 200.000 vezes, respectivamente .....	83
Figura 9 - Micrografias obtidas por MET para as partículas ALEU. Onde A e C estão com uma magnificação de 8.000 vezes, B, D e E em 30.000 vezes e F de 150.000 vezes ....	84
Figura 10 - Micrografias obtidas por MET das partículas ALEU Q. Sendo que A e C estão com uma magnificação de 8.000 vezes, B, D e E em 30.000 vezes e F de 200.000 vezes .....	85
Figura 11 - FTIR de zeína, tween 20, eugenol, alfavaca africana, Peu, Peu Q, Aleu e Aleu Q .....	89

Figura 12 - Micrografias obtidas por MET para as partículas PGE. Onde A está com uma magnificação de 5.000 vezes, B e C em 30.000 vezes e D de 200.000 vezes .....	121
Figura 13 - Micrografias obtidas por MET para as partículas PGE Q. Onde A está com uma magnificação de 5.000 vezes, B e C em 30.000 vezes e D de 200.000 vezes .....	122
Figura 14 - Micrografias obtidas por MET para as partículas ALGE. Onde A está com uma magnificação de 5.000 vezes, B e C em 30.000 vezes e D de 200.000 vezes .....	122
Figura 15 - Micrografias obtidas por MET para as partículas ALGE Q. Onde A está com uma magnificação de 5.000 vezes, B e C em 30.000 vezes e D de 200.000 vezes .....	123
Figura 16 - Micrografias obtidas por MET para as partículas PGE, com magnificação de 200.000 vezes .....	124
Figura 17- Micrografias obtidas por MET para as partículas PGE Q, com magnificação de 200.000 vezes ....	124
Figura 18 - Micrografias obtidas por MET para as partículas ALGE, com magnificação de 200.000 vezes .....	125
Figura 19 - Micrografias obtidas por MET para as partículas ALGE Q, com magnificação de 200.000 vezes ..	125
Figura 20 - Histograma de distribuição de tamanho pela frequência das nanopartículas de geraniol encapsuladas por zeína (PGE) .....	127
Figura 21 - Histograma de distribuição de tamanho pela frequência das nanopartículas de geraniol encapsuladas por zeína revestidas com quitosana (PGE Q) .....	127

Figura 22 - Histograma de distribuição de tamanho pela frequência das nanopartículas de óleo essencial <i>Ocimum gratissimum</i> L. encapsuladas por zeína (ALGE) .....	128
Figura 23 - Histograma de distribuição de tamanho pela frequência das nanopartículas de óleo essencial alavaca africana ( <i>Ocimumgratissimum</i> L.) encapsuladas por zeína revestidas com quitosana (ALGE Q) .....	128
Figura 24 - Espectro infravermelho com transformada de Fourier das partículas contendo geraniol e óleo essencial <i>Ocimum gratissimum</i> L. quimiotipo geraniol encapsuladas com zeína e zeína revestidas por quitosana, assim como seus compostos na forma pura. Onde A é referente a zeína, B a quitosana, C tween 20, D geraniol, E óleo essencial da <i>Ocimum gratissimum</i> L. quimiotipo geraniol, F as partículas PGE, G as partículas PGE Q, H as partículas ALGE e I referente as partículas ALGE Q .....	129



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais compostos encontrados no óleo essencial <i>Ocimum gratissimum</i> L. quimiotipo eugenol determinados por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas .....	67
Tabela 2 - Formulações das partículas de eugenol e óleo essencial da <i>Ocimum gratissimum</i> L. quimiotipo eugenol desenvolvidas .....	70
Tabela 3 - Estudo da estabilidade das nanopartículas de zeína com e sem revestimento de quitosana carregadas com óleos essenciais, compostos puros e partículas em branco .....	76
Tabela 4 - Parâmetros do DSC para zeína, compostos e óleos puros .....	86
Tabela 5 - Transições térmicas referentes as partículas e seus constituintes .....	87
Tabela 6 - Principais compostos encontrados no óleo essencial da <i>Ocimum gratissimum</i> quimiotipo geraniol determinados por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas .....	106
Tabela 7 - Formulações das partículas de geraniol, óleo essencial da <i>Ocimum gratissimum</i> L quimiotipo geraniol e partículas em branco desenvolvidas .....	109
Tabela 8 - Diâmetro médio das partículas obtidos por DLS no período de 60 dias .....	115
Tabela 9 - Índice de polidispersão das partículas obtidos por DLS no período de 60 dias .....	117
Tabela 10 - Potencial zeta das partículas obtidos por DLS no período de 60 dias .....	118

ela 11 - Eficiência de encapsulação para partículas .....egadas de geraniol e óleo essencial da <i>Ocimum gratissimum</i> L. quimiotipogeraniol .....	119
Tabela 12 - Atividade antioxidante para partículas carregadas de geraniol e óleo essencial da alfavaca africana ( <i>Ocimum gratissimum</i> L.) quimiotipogeraniol .....	120
Tabela 13 - Diâmetro médio das partículas no tempo inicial (1 dia) por DLS e MET .....	126
Tabela 14 - Parâmetros do DSC para zeína, quitosana, geraniol e óleo essencial da <i>Ocimum gratissimum</i> L. quimiotipo geraniol .....	129
Tabela 15 - Parâmetros do TGA para zeína, quitosana, geraniol e óleo essencial da <i>Ocimum gratissimum</i> L. quimiotipo geraniol assim como suas partículas .....	130

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
OBJETIVO GERAL .....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
 <b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>29</b>
1.1 ÓLEOS ESSENCIAIS .....	31
1.1.1 Ação antibacteriana e antioxidante dos OE .....	32
1.2 <i>Ocimum gratissimum</i> L. ....	34
1.3 EUGENOL .....	35
1.4 GERANIOL .....	37
1.5 NANOENCAPSULAÇÃO .....	38
1.5.1 Polímeros naturais: zeína e quitosana .....	40
1.5.2 Estabilidade e caracterização das nanopartículas .....	43
1.5.2.1 Distribuição do tamanho médio e morfologia ..	44
1.5.2.2 Índice de polidispersão (IP) .....	45
1.5.2.3 Potencial Zeta .....	46
1.5.2.4. Eficiência de encapsulação (EE) .....	46
1.5.2.5 Atividade antioxidante por ensaio de DPPH ....	47
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
 <b>CAPITULO 2 - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA COM E SEM REVESTIMENTO DE QUITOSANA CONTENTO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocimum gratissimum</i> L. QUIMIOTIPO EUGENOL E COMPOSTO EUGENOL</b>	
<b>RESUMO .....</b>	<b>61</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
2.1 MATERIAL .....	67
2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES ....	67
2.3 QUANTIFICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA <i>Ocimum gratissimum</i> L. QUIMIOTIPO EUGENOL E EUGENOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA	

EFICIÊNCIA .....	68
2.4 OBTENÇÃO DAS PARTÍCULAS .....	68
2.5 DIÂMETRO MÉDIO DA PARTÍCULA, POTENCIAL ZETA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO .....	71
2.6 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) .....	71
2.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR DPPH .....	72
2.8 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE .....	72
2.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) .....	72
2.10 ANÁLISES TÉRMICAS .....	73
2.10.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	73
2.10.2 Análises termogravimétricas .....	73
2.11 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO .....	73
2.12 ANÁLISES ESTATÍSTICA .....	74
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
3.1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE .....	75
3.1.1 Diâmetro médio das partículas (Z-ave) e índice de polidispersão (IP) .....	77
3.1.2 Potencial zeta ( $\zeta$ -mV) .....	78
3.1.3 Eficiência de encapsulação (EE) .....	79
3.1.4 Atividade antioxidante (AA) por DPPH .....	80
3.2 MORFOLOGIA .....	81
3.3 ANÁLISES TÉRMICAS .....	85
3.3.1 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	86
3.3.2 Análise termogravimétrica (TGA) .....	86
3.4 Infravermelho por transformada de Fourier .....	87
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>93</b>

**CAPITULO 3 - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA COM E SEM REVESTIMENTO DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE Ocimimgratissimum L. QUIMIOTIPO GERANIOL E COMPOSTO GERANIOL**

<b>RESUMO .....</b>	<b>101</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>103</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>105</b>
2.1 MATERIAL .....	105
2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E	

DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES ....	105
2.3 QUANTIFICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA <i>Ocimum gratissimum</i> L. QUIMIOTIPO EUGENOL E EUGENOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	106
2.4 OBTENÇÃO DAS PARTÍCULAS .....	107
2.5 TAMANHO DA PARTÍCULA, POTENCIAL ZETA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO.....	110
2.6 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) .....	110
2.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	111
2.8 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE .....	111
2.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) .....	111
2.10 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO .....	112
2.11 ANÁLISES TÉRMICAS .....	112
2.11.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	112
2.11.2 Análises termogravimétricas .....	112
2.12 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO .....	113
2.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	113
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>115</b>
3.1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE .....	115
3.1.1 Diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão .....	115
3.1.2 Potencial Zeta .....	118
3.1.3 Eficiência de encapsulação .....	119
3.1.4 Atividade antioxidante por DPPH .....	120
3.2 MORFOLOGIA .....	121
3.3 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO .....	126
3.4 ANÁLISES TÉRMICAS .....	129
3.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	129
3.4.2 Análises termogravimétricas .....	129
3.5 Infravermelho por transformada de Fourier .....	130
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>133</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>135</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>139</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>135</b>
<b>ANEXO A:</b> Cromatograma do óleo essencial da <i>Ocimum gratissimum</i> L. quimiotipo eugenol .....	143
<b>ANEXO B:</b> Transições térmicas referentes ao óleo essencial <i>Ocimum gratissimum</i> L. quimiotipo eugenol,	

eugenol, quitosana e zeína .....	145
<b>ANEXO C:</b> Termogramas de análise termogravimétrica (tga) referentes a zeína, quitosana, eugenol, óleo essencial <i>Ocimum gratissimum</i> quimiotipo eugenol, partículas de eugenol e óleo essencial quimiotipo eugenol..	147
<b>ANEXO D:</b> Cromatograma óleo essencial <i>Ocimum gratissimum</i> L. quimiotipo geraniol .....	151
<b>ANEXO E:</b> Transições térmicas referentes ao óleo essencial <i>Ocimum gratissimum</i> L. quimiotipo geraniol, geraniol, quitosana e zeína .....	153
<b>ANEXO F:</b> Termogramas de análise termogravimétrica (TGA) referentes a zeína, quitosana, geraniol, óleo essencial <i>Ocimum gratissimum</i> L. quimiotipo geraniol, partículas de geraniol e óleo essencial <i>Ocimum gratissimum</i> L. quimiotipo geraniol .....	155

## INTRODUÇÃO

Atualmente há uma crescente demanda pela utilização de produtos naturais em diferentes setores, incluindo as indústrias alimentícias e farmacêuticas (BURT, 2004), impulsionando a pesquisa científica em torno de plantas medicinais utilizadas pela cultura popular. Considerando esta tendência, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incentiva seus países membros, a produzir e explorar plantas que tenham sua eficácia, qualidade e segurança comprovadas cientificamente (LORENZI; MATTO, 2008). Uma alternativa de compostos naturais a serem utilizados pela indústria são os óleos essenciais.

O óleo essencial pode ser definido como uma mistura complexa de compostos de baixo peso molecular, formado pelo metabolismo secundário das plantas, possuem entre outras funções, a proteção contra patógenos e herbívoros (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004). Eles podem apresentar composição variada de acordo com aspectos relacionados a fisiologia da planta, clima e “stress” a que estas são submetidas (BAKKALI et al., 2008).

A *Ocimum gratissimum* L., vulgarmente conhecida como alfavaca africana, é uma planta pertencente à família Labiatae (PRABHU et al., 2009; PANTON, 1992) e acredita-se que tenha sido introduzida no Brasil pelos escravos africanos, com o intuito de preservar e manter a tradicional medicina africana (PANTON, 1992). As propriedades da *Ocimum gratissimum* L. podem ser atribuídas a composição de seu óleo essencial. Os compostos majoritários normalmente encontrados nos óleos essenciais da *Ocimum gratissimum* L. são o eugenol e o timol (PEREIRA; MAIA, 2007), havendo relatos de outros compostos como o geraniol.

O eugenol é um composto fenólico (FRANCO et al., 2007) que apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antibacterianas. Em alimentos, é empregado como aromatizante e intensificador de sabor, sendo também utilizado em perfumes, produtos farmacêuticos, cosméticos, sabonetes, detergentes, repelente de insetos e antisséptico bucal (KAMATOU et al., 2012; ROJO et al., 2008). O geraniol é um monoterpeno, e assim como o eugenol, apresenta propriedades

antibacterinas, antioxidantes e antiinflamatórias. Ambos os compostos são reconhecidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) como seguros. Contudo, eles podem perder parte de sua funcionalidade quando expostos a fatores como luz, umidade, oxigênio e temperaturas elevadas (KARMAKAR et al., 2012; CARRASCO et al., 2008).

Com a finalidade de reparar a susceptibilidade e melhorar a estabilidade dos compostos bioativos, durante o processamento e armazenamento, a tecnologia de nano/microencapsulação, vem sendo aplicada pelas indústrias de alimentos e nutracêuticos, pois além de, proporcionar proteção contra as condições de processamento e armazenamento em situações adversas, os compostos bioativos encapsulados podem alcançar a entrega direcionada e liberação controlada de compostos encapsulados para um determinado sítio ou aplicação específica (LUO et al., 2011).

Entre as diferentes técnicas de encapsulação, a nanoencapsulação por precipitação destaca-se por sua de baixa complexidade, fácil execução (HORNIG et al., 2009), formação imediata e reprodutível, permitindo ampla aplicação (HORNIG et al., 2009; FESSI et al. 1989). A escolha do polímero a ser utilizado como material encapsulante, deve ser realizada levando em consideração propriedades como: atuar como barreira e capacidade de estabilizar a emulsão formada com o composto a ser encapsulado (FESSI et al., 1989). Por apresentarem boa biocompatibilidade e biodegradabilidades, os biopolímeros representam uma classe de interesse crescente como agentes encapsulantes em técnicas de nanoencapsulação.

A zeína é um polímero biodegradável pertencente ao grupo das prolaminas (principais proteínas de armazenagem em grãos de milho), tem sido estudada por sua aptidão em formar nanopartículas para encapsulação de compostos bioativos (da ROSA et al, 2015; REDDY; YANG, 2011; LAI, 2011; LUO et al., 2010; SHUKLA; CHERYAN, 2001;). WU e colaboradores (2012) encapsularam timol e carvacrol em nanopartículas de zeína, utilizando metodologia de dispersão líquido-líquido. A encapsulação melhorou a solubilidade dos óleos essenciais, sem alterar sua capacidade antioxidante. Evidenciando que a nanoencapsulação pode aumentar o potencial de aplicação dos óleos essenciais em diferentes matrizes.

A combinação de dois ou mais polímeros pode ser utilizada como uma maneira de aperfeiçoar as características de um sistema nanoparticulado. As interações que ocorrem entre os polímeros, podem melhorar as propriedades das partículas quando comparadas às que apenas possuem um agente encapsulante (LUO; WANG, 2014). Em estudo realizado por Luo, Teng e Wang (2011), foram desenvolvidas nanopartículas tendo zeína como material de parede e revestimento de carboximetilquitosana (CMCS) para encapsular vitamina D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>). Após o revestimento com CMCS ocorreu um aumento na eficiência de encapsulação (EE), chegando a 87,9 %, enquanto que as partículas sem revestimento obtiveram EE de 52,2 %. O revestimento com CMCS proporcionou ainda, melhor liberação controlada da VD<sub>3</sub> em meio gastrointestinal simulado, a fotoestabilidade contra a luz UV também foi significativamente superior após o encapsulamento.

A quitosana é um polímero policatiônico obtido comercialmente através da desacetilação da quitina (KUMAR, 2000). Considerado como um polímero versátil, a quitosana, tem sido utilizada em aplicações farmacêuticas e nutracêuticos como material de parede para o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados, de liberação controlada, devido às suas características químicas, tais como, biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade (SAHOO et al., 2009).

Tendo em vista os aspectos abordados, a encapsulação com zeína revestida por quitosana pode ser conveniente para melhorar a estabilidade e solubilidade de compostos bioativos como os óleos essenciais e seus principais constituintes. Com a finalidade de possibilitar e potencializar o uso de óleos essenciais em alimentos, o presente estudo objetivou desenvolver e caracterizar nanopartículas do óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipos eugenol e geraniol e seus compostos majoritários na forma pura encapsulados em zeína com e sem revestimento por quitosana.

Neste sentido, este trabalho está estruturado em 3 capítulos. O primeiro capítulo, denominado Capítulo 1 apresenta revisão bibliográfica sobre os aspectos abordados neste estudo: óleos essenciais, *Ocimum gratissimum* L., eugenol, geraniol, nanoencapsulação, zeína, quitosana e análises utilizadas para caracterizar nanopartículas; Capítulo 2: é descrita a obtenção e caracterização físico-química e térmica das partículas

desenvolvidas, tendo o eugenol e o óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca africana) quimiotipo eugenol como princípio ativo. Sendo apresentados os materiais e metodologias utilizadas, assim como, os resultados, discussão e conclusões obtidas; Capítulo 3: é descrito o desenvolvimento e caracterização das partículas contendo geraniol e o óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca africana) quimiotipo geraniol encapsuladas em zeína com e sem revestimento de quitosana.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar nanopartículas de zeína com e sem revestimento de quitosana, contendo óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* L. quimiotipos eugenol e geraniol e seus compostos majoritários na forma isolada.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter diferentes formulações de nanopartículas de zeína com e sem revestimento de quitosana, contendo óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. quimiotipos eugenol e geraniol, assim como os compostos eugenol e geraniol;
- Caracterizar e verificar a estabilidade físico-química das nanopartículas desenvolvidas;
- Verificar a influência do revestimento de quitosana nas características físico-químicas e estabilidade das partículas desenvolvidas;
- Investigar se as nanopartículas desenvolvidas com os óleos essenciais apresentam características semelhantes aos seus compostos majoritários: eugenol e geraniol;
- Analisar, por calorimetria exploratória diferencial e análise termogravimétrica, as propriedades térmicas das nanopartículas;

- Avaliar as interações dos compostos nas nanopartículas através de espectroscopia no infravermelho;
- Caracterizar a morfologia das partículas desenvolvidas por microscopia eletrônica de transmissão.

## **CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OE) são compostos voláteis de origem vegetal, formados por misturas complexas de hidrocarbonetos, álcoois e compostos carbonílicos (ARAÚJO, 2011). Podem ser definidos como o produto obtido por hidrodestilação, destilação à vapor, destilação seca ou por um processo físico adequado sem aquecimento (para frutas cítricas) de uma planta ou algumas partes dela (RUBIOLO et al., 2010). Provenientes do metabolismo secundário das plantas, desempenham, entre outras funções, ação antibacteriana, antiviral, antioxidante e inseticida (BAGHERI; MANAP; SOLATI, 2014). Por apresentarem tais características, sua aplicação em produtos farmacêuticos e alimentares está sendo explorada como alternativa a produtos químicos sintéticos (BAKALLI et al., 2008).

Os OE podem ser sintetizados em diferentes partes da planta (brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, entre outros), possuindo composição variada de acordo com a parte extraída (BAKKALI et al., 2008; BART, 2004). Clima, idade vegetativa, fase do ciclo da planta, composição do solo, técnica de secagem e método de extração utilizado são outras características que também alteram a composição dos OE nas plantas (SANTOS; NOVALES, 2011).

Além das técnicas de extração mencionadas anteriormente, a extração da parte volátil da planta pode ser realizada pelo uso de outras técnicas como: extração por microondas, extração por solvente com destilação, extração por fluido supercrítico. No entanto, os produtos obtidos através destas técnicas não podem ser denominados “óleos essenciais” (RUBIOLO et al., 2010). Para aplicação em alimentos, os métodos de extração mais utilizados são destilação por arraste com vapor de água e destilação a pressão reduzida. A técnica de extração também pode influenciar a composição do OE extraído (BAKALLI et al., 2008). A determinação da composição dos OE é comumente realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (DELAQUIS et al., 2002).

A composição dos OE apresenta variada composição em diferentes concentrações, podendo apresentar mais de um componente em elevada concentração (20-70 %). Os compostos com maior concentração são denominados majoritários. As propriedades biológicas dos OE podem ser atribuídas ao composto majoritário ou a sinergia de dois ou mais de seus constituintes (BANDONI; CZEPAK, 2008). A atividade inerente de um óleo pode ser atribuída à configuração dos seus componentes, proporções em que estão presente e às interações que os envolvem (DELAQUIS et al., 2002). Como exemplos de compostos majoritários e suas plantas de origem, tem-se: Linalol e *E*-2-decanal são principais constituintes do coentro (*Coriandrum sativum*), timol e carvacrol no orégano (*Origanum vulgare*), o  $\gamma$ -terpineno no alecrim (*Rosmarinus officinalis*), o eugenol e acetato de eugenila no cravo (*Syzygium aromaticum*) e timol, carvacrol,  $\gamma$ -terpineno e *p*-cimeno no tomilho (*Thymus vulgaris*) (BURT, 2004).

Os constituintes dos óleos essenciais podem ser divididos em três grupos principais, quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos (compostos aromáticos) e alcalóides (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004). Estando a ação antimicrobiana e antifúngica associada aos terpenos e compostos fenólicos (BAKKALI et al., 2008).

### 1.1.1 Ação antibacteriana e antioxidante dos OE

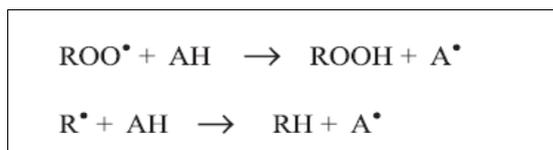
Devido aos OE apresentarem uma matriz complexa de diferentes compostos em variadas concentrações, acredita-se que seja mais de um mecanismo responsável por sua atividade antibacteriana (BURT, 2004). Os possíveis mecanismos de ação dos OE, nas células bacterianas podem ser: pela característica hidrofóbica dos OE, que geram a partição lipídica da membrana celular bacteriana, desestruturando suas estruturas e tornando-a mais permeável; após a alteração na membrana bacteriana, ocorre a perda dos íons da célula. Outros mecanismos estariam associados aos compostos fenólicos presentes nos OE, envolvendo mecanismos comuns a estes compostos, como: perturbação da membrana citoplasmática, força próton motora, fluxo de elétrons transporte ativo e coagulação do conteúdo das células (BURT, 2004). A ação dos OE, frente às bactérias, pode apenas inibir o crescimento bacteriano (efeito bacteriostático) ou

pode, em concentrações mais elevadas, apresentar um declínio em número de células bacterianas (efeito bactericida) (FALEIRO, 2011).

A ação antioxidante dos OE esta relacionada, principalmente, à presença de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura um ou mais grupamentos hidroxila (OH) ligados a um anel aromático (CASTRO et al., 2004) e sua ação antioxidante esta associada a sua capacidade redutora (MORAIS et al., 2009).

Os compostos fenólicos são classificados como antioxidantes primários, pois sua ação ocorre na fase inicial da reação de oxidação. Os radicais livres alquil e peroxil ( $R\bullet$  ou  $ROO\bullet$ ) removem o átomo de hidrogênio ativo do antioxidante (AH), tendo como consequência espécies inativas para a propagação das reações em cadeia e um radical inerte ( $A\bullet$ ), oriundo do antioxidante (Figura 1). O radical inerte, proveniente do antioxidante, é estabilizado por ressonância, não tendo capacidade de ação pro-oxidante (RAMALHO; JORGE, 2006).

Figura 1 - Equações envolvidas no mecanismo de antioxidantes primários



Fonte: Ramalho e Jorge, 2006.

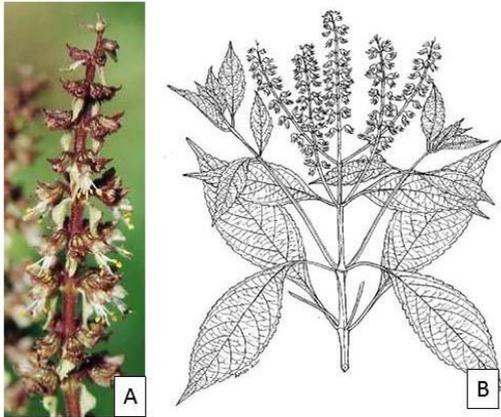
Onde  $ROO\bullet$  e  $R\bullet$  são os radicais livres alquil e peroxil, respectivamente. O AH antioxidante com átomo de hidrogênio e  $A\bullet$  radical antioxidante, com baixa energia para atuar como pró-oxidante (RAMALHO; JORGE, 2006).

Diferentes estudos avaliaram a atividade antioxidante de óleos essenciais a partir de plantas aromáticas. Estudos realizados por Trevisan e colaboradores (2006) verificaram que havia uma correlação entre a capacidade antioxidante e altas quantidades de compostos fenólicos na composição de OE extraídos de *Ocimum gratissimum* e outras plantas da espécie *Ocimum*.

## 1.2 *OCIMUM GRATISSIMUM* L.

A *Ocimum gratissimum* L. pertence ao gênero *Ocimum* e à família Labiatae, planta herbácea é um arbusto que mede até 1,9 metros de altura, com astes ramificadas (Figura 2A e 2B ) (PRABHU et al.,2009). Sua origem no Brasil, não é completamente elucidada. Uma das teorias é de que foi introduzida no Brasil pelos escravos africanos. Adaptando-se, rapidamente a região, por ser cultivada em regiões tropicais e subtropicais (PANTON, 1992).

Figura 2 – (A) Topos floridos da *Ocimum gratissimum* L.; (B) Ilustração da planta inteira *Ocimum gratissimum* L.



Fonte: Adaptado de Prabhu et al. (2009).

Usos etnofarmacológicos tradicionais das plantas *Ocimum gratissimum* L. são relatados para tratamento de epilepsia, doenças mentais, infecções fúngicas, febre, dor de cabeça (PRABHU et al., 2009).

Diferentes estudos relacionados aos óleos essenciais da *Ocimum gratissimum* L. indicam sua ação antifúngica, antioxidante (PEREIRA; MAIA, 2007; TREVISAN et al., 2006) e antibacteriana (PRABHU et al., 2009). Lemos e colaboradores (2005) analisaram em experimento *in vitro*, a capacidade

antifúngica do OE da *Ocimum gratissimum* L. (quimiotipo eugenol) em *Cryptococcus neoformans*, fungo responsável por causar criptococose. Os resultados obtidos indicaram potencial uso do OE desta planta como agente antifúngico frente ao *Cryptococcus neoformans*.

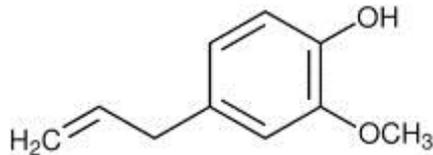
Prabhuet e colaboradores (2009) listaram compostos biologicamente ativos que foram isolados a partir da *Ocimum gratissimum* L. por diferentes autores. Entre os compostos citados estão: eugenol, timol, metil chavicol, pipeno, linolol, geraniol, metil eugenol, limoneno,  $\gamma$ - terpineno, entre outros.

Os compostos majoritários comumente encontrados em *Ocimum gratissimum* L. são timol e eugenol. O quimiotipo da *Ocimum gratissimum* L. que possui alto teor de eugenol tem seu óleo destilado no Brasil, Taiti e Indonésia. Experimentos realizados no Brasil demonstraram que plantas deste quimiotipo com cultivos seletivos têm resultado em bons rendimentos do óleo essencial com aproximadamente 80 % de eugenol (PEREIRA; MAIA, 2007). Charles e Simon (1992) identificaram pela primeira vez o geraniol como o principal composto em plantas *Ocimum gratissimum* L., propondo tratar-se de um novo quimiotipo.

### 1.3 EUGENOL

Os compostos fenólicos provenientes das plantas (também chamados polifenóis) possuem alta capacidade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígenas. O eugenol ( $C_{10}H_{12}O_2$ ; 4-alil-2-metoxifenol), é um polifenól natural (MAJEED et al., 2016), encontrado em óleos essenciais de diferentes plantas aromáticas (Figura 3) (ITO; MURAKAMI; YOSHINO, 2005). Presente nos óleos essenciais de canela, cravo da Índia e noz moscada (SHAN et al., 2005), o eugenol se destaca por ser o composto natural com maior atividade antibacteriana frente ao carvacrol, cinamaldeído, citral e geraniol (BURT, 2004).

Figura 3 - Estrutura química eugenol



Fonte: Saran e colaboradores (2013).

Reconhecido pela *Food and Drug Administration* (FDA) como seguro, o eugenol pode ser utilizado em concentrações de até 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em alimentos, é tradicionalmente empregado como aditivo natural aromatizante e intensificador de sabor, sendo também utilizado em perfumes, farmacêuticos, cosméticos, sabonetes, detergentes, repelente de insetos e antisséptico bucal (ROJO et al., 2008).

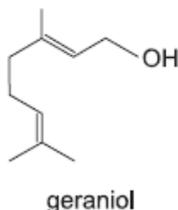
A sua utilização como possível agente antimicrobiano foi avaliada em um estudo realizado por Ghosh e colaboradores (2014), onde o eugenol foi capaz de promover uma redução significativa de bactérias heterotróficas no suco de laranja no qual foi incorporado. Em outro estudo, o eugenol apresentou maior atividade, frente ao óleo de hortelã pimenta, EDTA e quitosana (nome, reduzindo a oxidação lipídica e o crescimento microbiano, em macarrão de frango (KHARE; BISWAS; SAHOO, 2014). Com relação a capacidade antioxidante, Pereira e Maia (2007), comprovaram a ação antioxidante do extrato bruto e do óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo eugenol através do método de tiocianato férrico. Os autores obtiveram inibição lipídica de 96,89 % e 92,44 % para extrato bruto e óleo essencial, respectivamente. Em outro estudo realizado por Chatterjee e Bhattacharjee (2013), os autores relataram que tanto o eugenol encapsulado, como na forma livre, foram capazes de inibir a formação de radicais livres em óleo de soja. Lee e colaboradores (2005) propuseram que a ação antioxidante do composto fenólico eugenol (oriundo dos óleos essenciais) é similar a ação do  $\alpha$ -tocoferol, antioxidante primário natural permitido pela legislação. Entretanto por possuir um radical hidroxila em sua molécula, o eugenol, apresenta-se instável a presença de fatores como luz, umidade, ar e altas temperaturas. Por possuir estas características sua aplicação direta em

matrizes complexas pode ser comprometida (KARMAKAR et al., 2012; CARRASCO et al., 2008).

#### 1.4 GERANIOL

Encontrado como composto majoritário em óleos essenciais de rosa, gengibre, palmarosa e citronela, o geraniol (trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) é um monoterpene acíclico (Figura 4). Os terpenos formam diferentes classes, de acordo com sua estrutura e funcionalidade. Os monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>) e diterpenos (C<sub>20</sub>) são os compostos mais frequentes em OE. Os monoterpenos são formados a partir de duas unidades de isopreno (C<sub>10</sub>) e estas moléculas podem constituir 90 % dos óleos essenciais, possibilitando uma variedade de estruturas (FALEIRO, 2010).

Figura 4 - Estrutura química geraniol



Fonte: Burt, 2004.

Por apresentar aroma agradável, é tradicionalmente utilizado em agentes aromatizantes, produtos cosméticos e perfumes. Outras propriedades biológicas, tais como: antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatório e inseticida são relacionadas a este composto (YEGIN et al., 2015). Chen e Viljoen (2010) relataram que o geraniol apresentou ação repelente contra insetos, sendo usado em produtos comerciais em vários países como repelentes naturais. O geraniol também tem sido estudado como uma nova classe de agentes quimiopreventivos contra o câncer (CHEN; VILJOEN, 2010).

Além da sua utilização como aromatizante e flavorizante, em alimentos suas propriedades estão voltadas a sua ação antibacteriana e antifúngica (SINGH et al, 2009). Reconhecido

como seguro pela FDA (LAPCZYNSKI et al., 2008) pode ser aplicado como ingrediente natural aos alimentos e farmacêuticos. No entanto, os óleos essenciais e seus componentes, tais como o eugenol e geraniol devido a pouca solubilidade e baixa biodisponibilidade, natureza volátil e instabilidade a fatores como luz e oxigênio faz com que sua aplicação em alimentos seja limitada.

Uma alternativa para as limitações de empregabilidade dos óleos essenciais da *Ocimum gratissimum* e seus constituintes, como o eugenol e geraniol, é o encapsulamento destes compostos.

## 1.5 NANOENCAPSULAÇÃO

A nanoencapsulação pode ser definida como o carregamento de compostos ativos em matrizes, ou seja, um procedimento de empacotamento em partículas (NEDOVIC et al., 2011), tendo como característica fundamental o tamanho, que deve estar em escala nanométrica (1 até 1000 nm). Embora, em sua maioria, sejam obtidos tamanhos entre 100 e 500 nm (QUINTANAR et al., 1998).

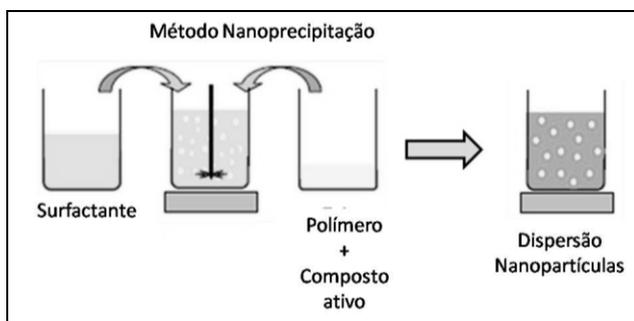
Entre as vantagens existentes nos sistemas nanoparticulados estão: melhora da estabilidade de substâncias ativas (OURIQUE et al., 2008); capacidade de liberação controlada do composto ativo (AMARAL et al., 2007); elevada eficiência de encapsulação do composto ativo; além de fornecer proteção contra fatores de degradação, como pH, oxigênio e luz, por exemplo (PINTO et al., 2006).

Entre os métodos de obtenção de nanopartículas, destaca-se a nanoprecipitação, técnica de baixa complexidade, fácil execução, permitindo vasta aplicação (HORNIG et al., 2009). Outra característica associada a este método é a formação imediata e reprodutível de nanopartículas, sendo possível estreita distribuição de tamanho (FESSI et al. 1989).

No método de nanoprecipitação, as nanocápsulas são obtidas quando uma suspensão coloidal (fase orgânica) é adicionada lentamente ou com agitação moderada a uma fase aquosa, ocasionando uma emulsificação espontânea da fase oleosa. Provocando migração dos solventes para uma única fase e o polímero (insolúvel na fase aquosa e no núcleo oleoso) é

dissolvido na interface destes dois componentes imiscíveis, onde se deposita formando a membrana das nanopartículas (FESSI et al., 1989). O método segue basicamente três etapas: solubilização do composto ativo e material de parede em uma fase orgânica; adição de fase orgânica a uma fase não orgânica (geralmente solução aquosa) contendo um agente tensoativo; e a última fase, em que o solvente resultante da fase orgânica, é evaporado, e em alguns casos, pode se centrifugar ou filtrar a suspensão, para se obter as partículas (Figura 5) (FANG; BHANDARI, 2010).

Figura 5 - Método de nanoprecipitação de polímeros pré-formados



Fonte: Adaptado de da Rosa et al. (2015)

A escolha do polímero, é de grande importância na aplicação desta técnica, uma vez que, este método demonstra a propriedade do polímero em atuar como barreira e estabilizar a emulsão formada pelo material central (FESSI et al., 1989).

Nanopartículas poliméricas, são constituídas por polímeros biodegradáveis e destacam-se por suas potencialidades terapêuticas, boa estabilidade ao armazenamento e a fluídos biológicos. As nanocápsulas poliméricas são compostas por um envoltório organizado ao redor de um núcleo, podendo o composto ativo estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. O núcleo pode ser lipofílico ou hidrofóbico, dependendo do método de preparação e matérias-primas utilizadas (KHOEE; YAGHOUBIAN, 2008).

### 1.5.1 Polímeros naturais: zeína e quitosana

Os polímeros naturais ou polímeros biodegradáveis representam uma classe de interesse crescente em decorrência de sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. Segundo Saltzman (2011), polímeros biodegradáveis são definidos como aqueles que sofrem degradação química *in vivo* (ação enzimática ou hidrólise) originando produtos não tóxicos e biocompatíveis, capazes de ser metabolizados e excretados por vias fisiológicas normais.

Entre os polímeros naturais, destacam-se as proteínas, que apresentam pouca ou nenhuma toxicidade, custo relativamente baixo e farta disponibilidade (REDDY; YANG, 2011). As proteínas também possuem propriedades funcionais como material encapsulante: boa solubilidade, viscosidade, emulsificação e propriedades de formação de filmes (MADENE et al, 2005; PÉREZ-ALONSO et al. 2003). As proteínas e alguns oligossacarídeos (amidos e maltodextrinas) são também digeríveis e suscetíveis ao ambiente ácido do estômago e enzimas intestinais, de modo que, com estes materiais, a biodisponibilidade pode ser prevista (KAUSHIK et al., 2014).

Proteínas vegetais hidrofóbicas, como zeína e gliadina, em comparação às proteínas de origem animal, apresentam menor custo e reduzem o risco de propagação de doenças, como por exemplo, a encefalopatia espongiiforme bovina (AHMED; ELZOGHBY, 2012).

A zeína, uma das principais proteínas de armazenamento do milho, é excelente meio para produção de nanopartículas (WANG; YIN; PÁDUA, 2008). Sendo utilizada na formação de nanopartículas para a encapsulação de óleos essenciais (PARRIS; COOKE; HOCKS, 2005); vitaminas (LUO; TENG; WANG, 2012); agente quimioterapêutico (LAI.; GUO, 2011) entre outros compostos. Apresentam reconhecida capacidade de revestimento para compostos bioativos (LAWTON, 2002; SHUKLA; CHERYAN, 2001; HAMAKAR et al., 1995).

Cerca de 50 % do total de aminoácidos presentes na zeína são de caráter não polar (leucina, alanina e prolina). Dando a esta, comportamento anfifílico, mais especificamente, como uma proteína hidrófoba e, por conseguinte, solúvel em etanol, acetona ou acetil acetona e insolúvel em água (SHUKLA;CHERYAN, 2001; HAMAKAR et al., 1995). Essa

característica serve como uma excelente barreira à água, possibilitando utilizá-la como um material de revestimento em micro e nanopartículas. Outra característica relevante da zeína, é sua resistência às enzimas digestivas, resultando em uma digestibilidade mais lenta no trato gastrointestinal. Esta propriedade pode ser explorada para liberação controlada de componentes funcionais (LUO; WANG, 2014).

A zeína apresenta-se como importante material de revestimento, por possuir características como: fonte natural e renovável, biodegradabilidade, baixo custo, biodisponibilidade, longo histórico de uso (PATEL; VELIKOV, 2011; LIN et al., 2011; LUO et al., 2010; SHUKLA; CHERYAN, 2001) hidrofobicidade, bioadesão, alta capacidade formadora de filme, boa capacidade de ligação com fármacos, elasticidade e potencial de absorção celular (LUO et al., 2013; PATEL; VELIKOV, 2011; QUISPESCONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011; HAWKINS; SOONSHIONG; DESAI, 2008; WANG et al., 2005; SHUKLA; CHERYAN, 2001).

Sistemas de distribuição, como as nanocapsulas, obtidos com mais de um polímero, vem recebendo atenção crescente. A combinação de mais de um polímero pode trazer vantagens como: liberação mais lenta, retardo na digestão, reforçamento na propriedade mucoadesiva. Estão envolvidos na formação de sistemas poliméricos diferentes mecanismos de forças de condução, incluindo ligações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações de Van der Waals. A zeína sendo um polieletrólito fraco, forma complexos com outros biopolímeros pela força motriz de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Interações que podem melhorar as características das partículas quando comparadas às que apenas possuem zeína como agente encapsulante (LUO; WANG, 2014).

Em um estudo sobre a formação de nanopartículas, contendo  $\alpha$ -tocoferol (vitamina hidrofóbica) encapsuladas em zeína com e sem revestimento de quitosana, realizado por Luo e colaboradores (2011) demonstraram que as partículas revestidas proporcionaram uma proteção de lançamento do  $\alpha$ -tocoferol contra doenças gastrointestinais. O revestimento com quitosana não alterou a eficiência de encapsulação do composto e a microscopia eletrônica de varredura revelou partículas esféricas com superfície lisa do complexo. O perfil da cinética de liberação

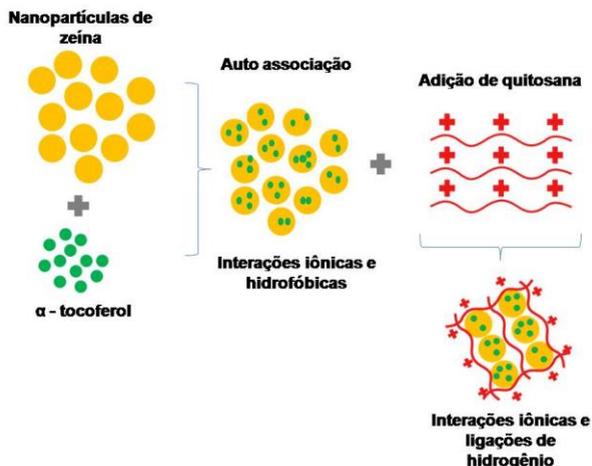
do composto ativo mostrou efeito de ruptura seguido por liberação lenta, demonstrando ser um sistema interessante para a suplementação de entrega, tratamento de nutrientes ou de medicamentos hidrofóbicos. Este estudo demonstra que nanopartículas obtidas por zeína associada a outro biopolímero, pode resultar em melhores propriedades de estabilidade para a dispersão das nanopartículas.

A quitosana é um polímero policatiônico, obtido comercialmente através da desacetilação da quitina. Um importante uso da quitosana consiste na sua aplicação em sistemas de liberação controlada, normalmente utilizado em nano e micropartículas (CHEN et al., 2006).

Atributos como não toxicidade, baixo custo, produto natural e em abundância, biodegradabilidade e biocompatibilidade permitem que este composto possa ser utilizado em diversas áreas ( KUMAR, 2000; BODMEIER, 1997). A quitosana oferece uma extensa gama de aplicações exclusivas na indústria alimentar, entre elas estão a formação de películas biodegradáveis (SINGH; RAY, 1998), preservação de alimentos contra deterioração microbiana (KANATT; CHANDER; SHARMA, 2008), formação de micropartículas (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; AZEREDO, 2005), função de fibra dietética (atuando como um ingrediente funcional) (ARANAZ et al., 2009). Na indústria farmacêutica e alimentícia, são largamente aplicadas como transportadoras para liberação de drogas e compostos bioativos (ALEXAKIS et al., 1995; JAMEELA; JAYAKRISHNAN, 1995).

Luo e colaboradores (2011) descreveram uma das possíveis associações da zeína com quitosana (Figura 6), em um esquema onde as nanopartículas de zeína, contendo compostos bioativos hidrofóbicos são revestidos por quitosana. Segundo os autores, à medida que o agente bioativo (lipofílico) é adicionado à solução de zeína, as moléculas de zeína tendem a envolver o composto ativo, formando uma película em torno de sua superfície, as ligações de hidrogênio e atração hidrofóbica entre a moléculas induziriam a formação das nanopartículas. Com a adição de quitosana ao sistema, a carga positiva (da quitosana) iria interagir com as nanopartículas de zeína/composto ativo, formando um revestimento em torno da superfície das partículas, dispersando-os de forma mais uniforme.

Figura 6 - Esquema ilustrativo para a formação de zeína revestida por quitosana para o encapsulamento de um composto lipofílico



Fonte: Adaptado de Luo e colaboradores (2011)

Após a obtenção das nanopartículas (em suspensões coloidais) é necessário caracterizá-las físico-quimicamente, para verificar se as partículas irão atender a finalidade de sua aplicação. Além disso, traçar um perfil da estabilidade destas suspensões é importante, pois, a estabilidade físico-química limitada em função do tempo, estabelece um obstáculo para a aplicabilidade industrial destas suspensões (SCHAFFAZICK et al., 2003). Os sistemas coloidais podem ainda, para minimizar os problemas de estabilidade limitada, serem submetidas a secagem das suspensões utilizando liofilização por exemplo.

### 1.5.2 Estabilidade e caracterização das nanopartículas

A caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulados envolve distribuição de tamanho das partículas, determinação do potencial zeta, índice de polidispersão,

eficiência de encapsulação e avaliação morfológica (SCHAFFAZICK et al., 2003; SCHAFFAZICK, 2002). A agregação das nanopartículas no meio, resultando na formação de precipitados, problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas, são alguns dos problemas que podem ocorrer durante o armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Segundo Mora-Huertas e colaboradores (2010) diferentes pesquisadores estudaram a estabilidade de sistemas nanoencapsulados e procuraram identificar propriedades que indicassem a instabilidade destes sistemas. A aparência visual e tamanho de partícula destacam-se por refletir presença de agregação.

Estabilidade pode ser definida como o tempo em que uma matéria-prima consegue manter, em condições adequadas de estocagem, os limites especificados em um período de armazenamento ou uso, sem perder suas propriedades iniciais (quando foi fabricada) (SILVA et al., 2009). Sendo assim, verificar outras características, além dos parâmetros físico-químicos pode ser necessário, afim de avaliar se as partículas desenvolvidas possuem a funcionalidade proposta. Como exemplo, pode-se citar, avaliar, utilizando técnicas adequadas, a capacidade antioxidante e ação microbiológica de nanopartículas carregadas com óleos essenciais ou compostos que aleguem estas funções.

#### 1.5.2.1 Distribuição do tamanho médio e morfologia

Uma das mais importantes caracterizações físico-químicas das suspensões coloidais é a distribuição do seu tamanho, por ser possível que estas apresentem tendência a sedimentação durante o período de armazenamento, portanto, o monitoramento da distribuição do seu tamanho se faz necessário. Duas técnicas são amplamente utilizadas para a medida do tamanho médio e polidispersão de nanopartículas: a espectroscopia de correlação de fótons (PCS), também denominada espalhamento de luz dinâmico (DLS), que permite através do movimento difuso das partículas na suspensão, a determinação do seu tamanho; e a observação da morfologia das partículas através das micrografias geradas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de

transmissão (TEM) (BOOTZ et al., 2003; GUINEBRETIERE et al., 2002).

Para a determinação do diâmetro médio e polidispersões das partículas através do TEM é necessária a contagem de um número grande de partículas, para obtenção de um valor representativo. Podendo existir interferências nas micrografias pela produção de contraste e modificações que podem ocorrer na secagem das partículas durante o preparo da amostra para a reprodução da análise (BOOTZ et al., 2003; GUINEBRETIERE et al., 2002). A técnica utilizando DLS possui vantagens como rapidez na realização das medidas, no entanto, como se baseia na análise do movimento browniano das partículas, a camada de hidratação e adsorção dos agentes tensoativos podem alterar a determinação do tamanho real das partículas. Sendo na maioria das vezes os resultados obtidos por DLS superiores aos encontrados por MEV ou TEM (AGENHEIM; BENITA, 1991).

A morfologia das partículas pode ser obtida por diferentes técnicas de microscopia, sendo MEV, TEM e microscopia de força atômica amplamente utilizadas. Além de fornecer informações relacionadas ao tamanho das partículas, pode-se verificar a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas, possibilitando, inclusive, a determinação da espessura da parede das nanocápsulas. Utilizando microscopia de força atômica, obtêm-se também, informações com alta resolução em três dimensões (em escala nanométrica), possibilitando o entendimento de detalhes de superfície em nível atômico (SCHAFFAZICK et al., 2003).

#### 1.5.2.2 Índice de polidispersão (IP)

Valores altos de índice de polidispersão indicam heterogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão; variações nos valores de polidispersão em função do tempo indicam formação de populações de partículas com diâmetros que não existiam inicialmente, podendo ser decorrente de agregação ou quebra/degradação de partículas (MORAES, 2009). Índices de polidispersão menores que 0,3 sugerem que a distribuição do diâmetro das partículas se encontra em uma estreita faixa de diâmetros.

Segundo Liakos e colaboradores (2016) valores de IP menores que 0,05 são de sistemas altamente monodispersos. Valores superiores a 0,7 indicam distribuição de tamanho amplo da amostra e portanto, inadequado.

### 1.5.2.3 Potencial Zeta

O potencial zeta é a diferença de tensão elétrica entre a superfície da partícula e sua suspensão líquida, permitindo inferir sobre a estabilidade do sistema, pois a repulsão eletrostática imposta pelas cargas do sistema irá determinar a estabilidade física das dispersões. Segue-se a regra de que potenciais zeta superiores a  $\pm 30$  mV indicam partículas altamente carregadas negativa ou positivamente, proporcionando dispersões fisicamente estáveis (MEHNERT; MÄDER, 2012). Os valores do potencial zeta são influenciados pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão, podendo este potencial alterar a resposta biológica do composto ativo (SCHAFFAZICK et al., 2003).

### 1.5.2.4. Eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação é a característica fundamental para compor a identidade das suspensões de nanopartículas obtidas por nanoprecipitação, pode ser verificada através da ultrafiltração-centrifugação que possibilita a separação entre a fração de nanopartículas e a fase aquosa dispersante, sendo a diferença entre o total de composto ativo contido na suspensão e a quantidade de composto livre contido no ultrafiltrado, a quantificação do encapsulado (FESSI et al., 1989). Para a identificação e quantificação dos compostos, podem ser empregadas técnicas como cromatografia de alta eficiência (CLAE) ou técnicas de identificação e quantificação por espectroscopia do UV-visível (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2011).

### 1.5.2.5 Atividade antioxidante por ensaio de DPPH

O 2,2-difenil-1-picrilhidrazina comumente conhecido como DPPH, é disponível comercialmente como um pó cristalino de cor escura, constituído por moléculas de radicais livres estáveis. Uma das suas possíveis utilizações está no monitoramento de reações químicas envolvendo a eliminação dos radicais livres para a determinação do potencial antioxidante de uma molécula. Considerando um dos métodos colorimétricos normalizados de fácil execução para a avaliação de propriedades antioxidantes de compostos puros. O DPPH é amplamente utilizado para medir o teor de antioxidante de grãos de trigo e farelo, vegetais, ácido linoléico conjugado, óleos de sementes e farinhas em diferentes sistemas de solventes, incluindo etanol, solução aquosa de acetona, metanol, álcool e benzeno (CHENG; MOORE; YU, 2006). Segundo Alves e colaboradores (2010) é atribuído a este método facilidade na execução metodológica, precisão e reprodutibilidade para a avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonóides e terpenóides.

Este ensaio mede a capacidade antioxidante de um determinado composto em seqüestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Conforme o composto age como doador de hidrogênio aos radicais da solução de DPPH (cor roxo púrpura), a sua forma reduzida (hidrazina) é obtida simultaneamente para coloração amarelo pálido, com uma concomitante diminuição na absorvância (ALVES et al., 2010). Segundo Lima (2008) as concentrações utilizadas por diferentes autores apresentam variações ( $0,025 \text{ g L}^{-1}$  a  $0,415 \text{ g L}^{-1}$ ), sem que se tenha uma padronização do método. O tempo de reação é outra característica que pode apresentar variação. No entanto, 30 minutos é o tempo necessário que se leva para alcançar o estado de equilíbrio da reação (LIMA, 2008).

O ensaio utilizando DPPH é amplamente empregado por ser de simples execução, alta sensibilidade, disponibilidade comercial na forma de radicais que garantem sua estabilidade (MIGUEL, 2010; LIMA, 2008) e evitam sua formação por diferentes formas (o que ocorre no método ABTS) (LIMA, 2008). Por apresentar estas características, alguns estudos utilizam apenas este ensaio para avaliar a atividade antioxidante em óleos essenciais ou o utilizam primeiramente com a finalidade de

verificar se existe a necessidade de realizar outros ensaios que avaliem a capacidade antioxidante dos compostos. Outra característica que faz alguns autores optarem por este ensaio é pelo fato de poderem avaliar a atividade antioxidante de os óleos essenciais através da sua capacidade de eliminar os radicais livres (MIGUEL, 2010). Estudos apresentados por Rosa e colaboradores (2015) e Chen e colaboradores (2009) são exemplos de pesquisas que utilizaram apenas o ensaio de DPPH para obter um perfil antioxidante em nanopartículas contendo óleos essenciais como composto ativo.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, O. et al. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 38-49, 2012.
- ALEXAKIS, T. et al. Microencapsulation of DNA within alginate microspheres and crosslinked chitosan membranes for in vivo application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.50, p. 93 - 106, 1995.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, Vol. 33, N. 10, pg 2202-2210, 2010.
- AMARAL, E. et al. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. **Life Scienc**, v. 80, p. 1327–1334, 2007.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos Teoria e Prática**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2011.
- AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.
- BAGHERI, H.; MANAP, M.Y.B.A.; SOLATI, Z. Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and hydro-distillation. **Talanta**, v.121, p.220-228, 2014.
- BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil .Vitoria: Edufes, 624p., 2008.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. A review. **Food Chemistry Toxicology**, v.26, p 446-475, 2008.
- BOOTZ, A. et al. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.57, p.369-375, 2003.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. **International Journal Food Microbiology**. v. 94, p 223-253, 2004.

CARRASCO, H.A. et al. Eugenol and its synthetic analogues inhibit cell growth of human cancer cells (Part I). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, p.543-548, 2008.

CHAMPAGNE, C. P., & FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, 184-190, 2007.

CHARLES, D. J., SIMON, J. E. A new geraniol chemotype of *Ocimum gratissimum* L. **Journal of Essential Oil Research**, v.4, p.231-234, 1992.

CHATTERJEE, D.; BHATTACHARJEE, P. Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: Shelf-life and frying stability of soybean oil. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 545-550, 2013.

CHEN,W.; VILJOEN, A. Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v.76, nº. 4, p. 643–651, 2010.

CHEN, X.G. et al. Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 269 - 274, 2006.

CHEN, F. et al. Antioxidant and Antibacterial Activities of Eugenol and Carvacrol-Grafted Chitosan Nanoparticles. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 104, nº. 1, p. 30-39, 2009.

CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical assay. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. v. 54, p. 7429–7436, 2006.

DA ROSA, C. G. et al. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and**

**Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** v 481 pg. 337–344. 2015.

DELAQUIS, P.J. et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology.** v. 74, p. 101–109, 2002.

FALEIRO, M. L. The mode of antibacterial action of essential oils. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances,** v. 2, p. 1143-1156, 2011.

FANG, Z. X.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - a review. **Trends in Food Science & Technology,** v. 21, n. 10, p. 510-523, 2010.

FRANCO, A. L.P. et al. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc.(Alfazema), *Ocimum gratissimum* L.(Alfavaca-Cravo) e *Curcuma longa* L.(Açafrão). **Revista Eletrônica de Farmácia,** v. 4, n. 2, 2007.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against microbial spoilage. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,** v. 114, p. 392-397, 2014.

GUINEBRETIERE, S. et al. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. **Materials Science and Engineering** , v. 21, p. 137-142, 2002.

HAMAKAR, B.R. et al. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemical,** v.72, p. 583–588, 1995.

HAWKINS, M.J. et al. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 876–885, 2008.

HORNIG, S. et al. Synthetic polymeric nanoparticles by nanoprecipitation. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 23, p. 3838-3840, 2009.

ITO, M.; MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 3, p. 461-466, 2005.

JAMEELA, S. R., & JAYAKRISHNAN, A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. **Biomaterials**, v. 16, p. 769 -775, 1995.

KAMATOU, G.P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A.M. Eugenol From the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v.17, p.6953-6981, 2012.

KANATT, S. R., CHANDER, R., & SHARMA, A. Chitosan glucose complex e a novel food preservative. **Food Chemistry**, v.106, p. 521-528, 2008.

KARMAKAR, S. et al. Clove (*Syzygium aromaticum* Linn) extract rich in eugenol and eugenol derivatives shows bone-preserving efficacy. **Natural Product Research**, v.26, p.500-509, 2012.

KAUSHIK, P. et al. Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. **Journal of Functional Foods**, p. 1-14, 2014.

KHARE, A. K.; BISWAS, A. K.; SAHOO, J. Comparison study of chitosan, EDTA, eugenol and peppermint oil for antioxidant and antimicrobial potentials in chicken noodles and their effect on colour and oxidative stability at ambient temperature storage. **Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 286-293, 2014.

KHOEE, S., YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **Europe Journal Medicinal Chemichal**, v. 44, p. 2392–2399 2008.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p.1-27, 2000.

LAI, L. F.; GUO, H. X. Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 317-323, 2011.

LAPCZYNSKI, A. et al. Fragrancematerial review on geraniol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 160–170, 2008.

LEE, S.-J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LEMOS, J. A. et al. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. v. 100, p 55-58, 2005.

LIAKOS, I. L. et al. All natural cellulose acetate—Lemongrass essential oil antimicrobial nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 510, p 508–515, 2016.

LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) . **Tese (doutorado)** – Faculdade de Ciências Farmaceuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição experimental. 182 p. 2008.

LIN, T. et al. The biodegradation of zein in vitro and in vivo and its application in implants. **Pharma Science Technolgy**, v.12 , p.172–176, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.H. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. ed. 2. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, p. 544, 2008.

LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 60, p. 836–843, 2011.

LUO, Y. et al. Cellular uptake and transport of zein nanoparticles: effects of sodium caseinate. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 61, p. 7621–7629, 2013.

LUO, Y. *et al.* Development of Zein Nanoparticles Coated with Carboxymethyl Chitosan for Encapsulation and Controlled Release of Vitamin D3. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 836-843, 2012.

LUO, Y.; WANG, Q. Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: a review. **Journal Appl Polymers Scienc**, v. 131, 2014;

LUO, Y. et al. Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. **Carbohydrates and Polymers**, v.82, p.942–951, 2010.

MADENE, A. et al. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1–21, 2005.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**, v. 15, p 9252- 9287, 2010.

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

MORAES, C. M. Preparo, caracterização físico-química e avaliação da estabilidade de nanopartículas poliméricas contendo anestésicos locais . Dissertação (mestrado)

Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular,  
2009.

MORAIS, S.M. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.1, p. 315-320, 2009.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. **11th International Congress on Engineering and Food (Icef11)**, v. 1, p. 1806-1815, 2011.

OURIQUE, A.F. et al. Tretionoin-loaded nanocapsules: preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal pharmaceutical** . v. 352, p. 1–4, 2008.

PANTON, A. A Synopsis of *Ocimum L.* (Labiatae) in África. **Royal Botanic Gardens**, v. 47, n.3, p. 403-435, 1992.

PARRIS, N.; COOKE, P. H.; HICKS, K. B. Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4788-4792, 2005.

PATEL, R. R., & PATEL, J. K. Novel technologies of oral controlled release drug delivery system. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v.1, 128-132, 2011.

PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 624-632, 2007.

PÉREZ-ALONSO, C. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v.53, n.2, p.197-203, 2003.

PINTO, C. et al.. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**. v. 2, p. 8–21, 2006.

PRABHU, K. S et al. *Ocimum gratissimum*: A Review of its Chemical, Pharmacological and Ethnomedicinal Properties. **The Open Complementary Medicine Journal**, v. 1, p. 1-15, 2009

QUINTANAR, D. et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 24, p.1113–1128, 1998.

QUISPE-CONDORI, S.; SALDAÑA, M.D.A.; TEMELLI, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1880 – 1887, 2011.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755-760, 2006.

REDDY, N.; YANG, Y. Potential of plant proteins for medical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 490-498, 2011.

ROJO, L. et al. Eugenol functionalized poly(acrylic acid) derivatives in the formation of glass-ionomer cements. **Dental Materials**, v.24, p.1709-1716, 2008.

**RUBIOLO, P. et al. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis.** Flavour and Fragrance Journal. **v.25, p 282-290, 2010.**

SANTOS B.A. *et al.* Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca<sup>2+</sup> current blockade. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 539-543, 2011.

SHAN, B. et al. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.7749-7759, 2005.

SILVA, K. E. *et al.* Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SINGH, H.P.; MITTAL, S.; KAUR, S. *et al.* Characterization and antioxidant activity of essential oils from fresh and decaying leaves of *Eucalyotus tereticornis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6962-6, 2009.

SCHAFFAZICK, A. R. *et al.* Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farmacéutica 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**, Vol. 26, No. 5, 726-737, 2003.

SHUKLA, R.; CHERIYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v.13, p. 171–192, 2001.

TREVISAN, M. T. S. *et al.* Characterization Of The Volatile Pattern And Antioxidant Capacity Of Essential Oils From Different Species Of The Genus *Ocimum*. *J.Agric. Food Chemistry*, v. 54, n. 12, p. 378-4382, 2006.

WANG, H.J. *et al.* Heparin-loaded zein microsphere film and hemocompatibility. **Journal Control Release**, v. 105, p. 120–13, 2005.

WANG, Q.; YIN, L.; PÁDUA, G. W. Effect of hydrophilic and lipophilic compounds on zein microstructures. **Food Biophysics**, v. 3, n. 2, p. 174-181, 2008.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. **Food Science and Technology**, v.48, p.283-290, 2012.

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

**CAPITULO 2 - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO  
DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA COM E SEM  
REVESTIMENTO DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Ocimum gratissimum* L. QUIMIOTIPO  
EUGENOL E COMPOSTO EUGENOL**



## RESUMO

Considerando a atual demanda pela substituição de compostos sintéticos por naturais em alimentos, este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar nanopartículas de zeína com ou sem revestimento de quitosana, contendo óleo essencial da planta *Ocimum gratissimum* L. e seu composto majoritário eugenol na forma pura. Foram desenvolvidas cinco formulações de partículas: partículas de zeína encapsulando óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. sem revestimento de quitosana (ALEU) e partículas com revestimento (ALEU Q), partículas de zeína contendo eugenol na forma pura (PEU), partículas de zeína com eugenol revestidas com quitosana (PEU Q) e partículas sem adição de composto ativo, tendo como material de parede zeína revestidas por quitosana (partículas branco ou vazias). As partículas foram caracterizadas por análises de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação e atividade antioxidante, tendo-se monitorado através destas análises a estabilidade das partículas pelo período de 60 dias. As partículas foram analisadas ainda com relação à sua morfologia por microscopia eletrônica de transmissão. As análises térmicas de calorimetria exploratória diferencial e análises termogravimétricas foram realizadas a fim de verificar a estabilidade térmica das partículas. As partículas possuem morfologia esférica, lisa e bem definida. Nas propriedades relacionadas a sua estabilidade apresentaram diâmetro médio entre 145 e 244 nm, sendo que o revestimento com quitosana não influenciou de forma significativa o tamanho das partículas, o índice de polidispersão foi inferior a 0,3 nas diferentes formulações e no decorrer do seu armazenamento. O potencial zeta foi positivo, apresentando-se em uma faixa de +21 e +43 mV. A eficiência de encapsulação foi superior a 89 %, demonstrando forte afinidade entre o material encapsulado e material de parede. A capacidade antioxidante, tanto das partículas contendo o eugenol quanto o óleo essencial demonstraram capacidade redutora do radical DPPH em 99 %.

**Palavras-chave:** Eugenol. Alfavaca africana. Nanopartículas.



## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Ocimum* pertencente à família Labiatae, é uma fonte de diferentes óleos essenciais utilizados pela medicina popular (VIEIRA; SIMON, 2000). A *Ocimum gratissimum* L. (popularmente conhecida como alfavaca africana) é uma planta herbácea, que apresenta principalmente os compostos de eugenol e timol como majoritários, sendo o quimiotipo eugenol amplamente encontrado em países como o Brasil, Haiti e Indonésia (PEREIRA; MAIA, 2007).

Os óleos essenciais (OE) são compostos orgânicos, oriundos do metabolismo secundário das plantas. Com variada composição, possuem três grupos principais quimicamente distintos: alcoloídes, terpenos e fenóis. Devido a sua composição os OE apresentam propriedades biológicas de interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica como substituintes a compostos sintéticos (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004). Entre as propriedades atribuídas aos óleos essenciais, destacam-se para uso em alimentos, sua ação antioxidante e antimicrobiana.

O eugenol é um composto fenólico, que possui alta capacidade antimicrobiana e antioxidante (BURT, 2004). Por ser o composto majoritário do OE do cravo da Índia, é associado a este composto as propriedades biológicas do cravo da Índia (AYOOLA, 2008). Lee e colaboradores (2005) analisaram a capacidade antioxidante de 12 diferentes compostos aromáticos extraídos de manjeriço e tomilho, nos quais destacaram-se por seu alto potencial antioxidante: o eugenol, timol, carvacrol, e 4-alilfenol. No estudo os autores relataram que estes compostos são comparáveis aos conhecidos antioxidantes, hidroxitolueno butilado (BHT) e  $\alpha$ -tocoferol. Os autores sugerem ainda que a ingestão destes compostos possa auxiliar na prevenção *in vivo* de danos oxidativos, como a peroxidação lipídica, que esta associada ao câncer, envelhecimento precoce, aterosclerose e diabetes.

Entretanto, os óleos essenciais e seus constituintes, como o eugenol, apresentam baixa solubilidade e biodisponibilidade, sensibilidade a luz, UV e oxidação, o que dificulta sua utilização em matrizes complexas, como os alimentos (KARMAKAR et al., 2012; CARRASCO et al., 2008). A microencapsulação e nanoencapsulação são possíveis soluções para as limitações físico-químicas dos OE.

A encapsulação em matrizes poliméricas tem sido estudada como proteção à degradação dos OE (ASBAHANI et al., 2015). Entre as diferentes formas de encapsulação que utilizam polímeros, destaca-se a nanoencapsulação. A nanoencapsulação pode ser definida como um envoltório polimérico (natural ou sintético) envolto ao redor de um núcleo, onde o composto ativo pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido ao material encapsulante (polímero) (ASSIS et al., 2012). Esta metodologia possui como vantagens: liberação controlada, melhor estabilidade das substâncias ativas, elevada eficiência de encapsulação do composto bioativo, proteção contra fatores de degradação como pH e luz (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Uma das suas características fundamentais dos nanocompostos é o tamanho, que deve ser nanométrico (5-10nm com limite de tamanho de aproximadamente 1000 nm) (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Em relação ao material encapsulante a combinação de mais de um material pode ser aplicada, uma vez que, apenas um composto pode não abranger todas as necessidades buscadas (GHARSALLAOUI et al., 2007). A zeína (principal proteína de reserva do milho) e a quitosana (polissacarídeo linear) são polímeros naturais amplamente utilizados em técnicas de encapsulação (LUO et al., 2011). Estes polímeros apresentam como principais características: baixo custo, alta biodisponibilidade e biodegradabilidade. Tornando-os atrativos como materiais de parede na obtenção de nanopartículas poliméricas.

A zeína é aplicada em micro e nanoencapsulação em sistemas de entrega, principalmente para fármacos hidrofóbicos. Geralmente, os compostos bioativos são dissolvidos juntamente com a zeína em sistema binário de solventes (etanol/água), em seguida adicionado a um anti-solvente (água), para co-precipitar os compostos juntamente com a zeína. Neste processo as partículas hidrofóbicas migram rapidamente para as frações de zeína por fortes interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Entretanto, as propriedades das suspensões coloidais formadas pela zeína, podem ser melhoradas através da adição de outro polímero (LUO; WANG, 2014). Em estudos realizados por Luo e colaboradores (2011) e Luo, Teng e Wang (2011) demonstram que nanopartículas obtidas por zeína associada a outro

biopolímero, como a quitosana, pode resultar em melhores propriedades de estabilidade para a dispersão das nanopartículas.

Desta forma, considerando a necessidade de melhorar a utilização dos óleos essenciais para uma possível aplicação em alimentos e, tendo em vista, poucas informações na literatura com relação à nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo OE e seus constituintes, o presente trabalho objetivou desenvolver e caracterizar nanopartículas de óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo eugenol, assim como seu composto majoritário, eugenol, na forma isolada em partículas de zeína e zeína revestida com quitosana.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

A zeína, quitosana, Tween® 20 e eugenol foram obtidos da Sigma Aldrich. O óleo essencial da alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) quimiotipo eugenol foi extraído e doado pelo pesquisador Fabiano Cléber Bertoldi, da EPAGRI Estação Experimental Itajaí, SC.

### 2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES

A extração do óleo essencial foi realizada em aparelho tipo Clevenger através de hidrodestilação durante quatro horas. Na quantificação dos principais compostos do óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. o composto majoritário encontrado foi o eugenol, representando um percentual de 56,08 % do total dos compostos (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais compostos encontrados no óleo essencial *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo eugenol determinados por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas

Nome do composto	Numero do pico	Tempo de retenção (min.)	Área (%)
Alfa – pineno	1	9,160	28,36
Eugenol	2	17,260	56,08
Copaeno	3	17,861	1,88
Beta – cariofileno	4	18,852	2,76
Beta – cubebeno	5	20,162	10,91

Fonte: EPAGRI – Fabiano Cléber Bertoldi.

A determinação dos seus principais componentes foi desempenhada por cromatografia gasosa (marca Shimadzu modelo GCMS - QP2010) acoplada à espectrometria de massas.

O óleo essencial foi diluído 200x em hexano e injetado no equipamento, utilizando capilar ZB-5MS, 30m x 0,25mm x filme 0,25 um. A temperatura inicial do forno de capilar foi de 60 oC (4 minutos), com rampa de aquecimento de 6oC/minuto até atingir a temperatura de 210 oC, permanecendo por 6 minutos, sendo o tempo total da corrida cromatográfica de 35 minutos. A temperatura do injetor foi de 250 oC e o fluxo de gás hélio no capilar de 1,0 mL/minuto.

### 2.3 QUANTIFICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA E O ÓLEO ESSENCIAL DA *Ocimum gratissimum* L. QUIMIOTIPO GERANIOL QUIMIOTIPO EUGENOL E EUGENOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo eugenol foi quantificado utilizando padrão externo em relação ao seu conteúdo de eugenol. A quantificação e caracterização foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando o equipamento Shimadzu (modelo LC – 20AT, Tóquio Japão), equipado com um controlador de sistema CBM-20A, um sistema de bomba LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A, um forno CTO-20A, e um amostrador automático SIL-20<sup>a</sup>, com uma coluna analítica BDS – Hypersil C18 (250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm tamanho de partícula; Thermo Scientific, EUA), que foi mantida a 50 °C, e uma pré coluna BDS Hypersil C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm tamanho de partícula; Thermo Scientific, EUA). A medição quantitativa do teor de eugenol foi efetuado em  $\lambda = 283$  nm, com fase móvel de metanol: água (75:25) (v / v) a um fluxo de  $1,0 \text{ mL/min}^{-1}$ , o volume de injeção foi de 20 µL. Com um coeficiente de correlação  $R^2$  de 0,997. A equação de regressão da curva de calibração com meios ( $n = 3$ ) foi:  $y = 3 \cdot 10^7 x + 34707$ .

### 2.4 OBTENÇÃO DAS PARTÍCULAS

O preparo das partículas foi realizado seguindo a combinação de duas metodologias: na fase orgânica foi realizado o processo seguindo a metodologia sugerida por Luo e colaboradores (2011) com modificações. A zeína na concentração de 10 mg/mL foi previamente dissolvida em

solução binária de solventes etanol/água (75:25 v/v) permanecendo em agitação magnética por 15 horas. Posteriormente, nesta solução de zeína, ainda sob agitação magnética (aproximadamente 600 rpm), foi adicionado por gotejamento com auxílio de pipeta de Pasteur o composto a ser encapsulado (previamente dissolvido em etanol puro) continuando em agitação por 60 minutos. A quitosana foi dissolvida em ácido acético a 1 % e então adicionada gota a gota à solução anterior, permanecendo sob agitação magnética durante mais 60 minutos, seguida pela adição de solução Tween® 20 (1 % em etanol) também adicionado por gotejamento com agitação magnética por 60 minutos. A concentração final de Tween® 20 foi de 0,45 % do volume total da solução na fase orgânica.

Na segunda etapa seguiu-se o método sugerido por da Rosa e colaboradores (2015) com alterações. Onde a fase orgânica (descrita anteriormente) foi então dispersa em uma fase aquosa, sob velocidade de 10000 rpm em um homogeneizador Ultra Turrax (Modelo T25, IKA-Works, Inc., Cincinnati) por três minutos. A fase aquosa era composta por 1:3 volume fase orgânica/volume fase aquosa na presença de surfactante Tween® 20 (1,5 % da fase aquosa). Posteriormente a dispersão de ambas as fases, o etanol foi evaporado em capela com exaustão por 15 h. Resultado em um volume aproximado ao da fase aquosa.

Foram preparadas partículas de zeína contendo eugenol (Peu) e óleo essencial da e o óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo eugenol (Aleu), sendo estas partículas consideradas como controle. Foram desenvolvidas também partículas de zeína revestidas com quitosana com ambos compostos, eugenol (Peu Q) e óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L quimiotipo eugenol (Aleu Q). Como branco e/ou partículas vazias foram preparadas partículas de zeína revestidas com quitosana sem composto bioativo. As diferentes formulações preparadas e suas concentrações são apresentadas na Tabela 2. Após o preparo das partículas estas foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas a 7 °C.

Tabela 2 - Formulações das partículas de eugenol e óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo eugenol desenvolvidas

Amostra	Fase orgânica		Composto			TW 20*		Fase aquosa	
	Zeína (mg/mL)	Composto	em relação a zeína (%)	Proporção zeína/quitosana	Vol.Total F.O (%)	Proporção F.A/F.O (v/v)	TW 20 F.A(%)		
Peu	10	Eugenol padrão	20	--	0,45	3:1	1,5		
Peu Q	10	Eugenol padrão	20	1:100	0,45	3:1	1,5		
Aleu	10	Eugenol alfavaca africana	20	--	0,45	3:1	1,5		
Aleu Q	10	Eugenol alfavaca africana	20	1:100	0,45	3:1	1,5		
Branco	10	--	--	1:100	0,45	3:1	1,5		

TW 20 = Tween 20; F.O = Fase orgânica; F.A = Fase aquosa; Peu = Nanopartículas de zeína contendo eugenol; Peu Q = Nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo eugenol; Aleu = Nanopartículas de zeína contendo óleo essencial de alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) quimiotipo eugenol; Aleu Q = Nanopartículas de zeína revestidas por quitosana contendo óleo essencial de alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) quimiotipo eugenol e Branco = nanopartículas de zeína revestidas por quitosana sem composto ativo.  
 Fonte: Próprio autor.

## 2.5 DIÂMETRO MÉDIO DA PARTÍCULA, POTENCIAL ZETA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO

O potencial zeta ( $\zeta$ , mV), índice de polidispersão (IP) e tamanho das partículas (Z-ave, nm) foram determinados empregando espalhamento de luz dinâmico (DLS). Para esta análise foi utilizado um Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. As amostras foram dispostas em célula de eletroforese e as análises realizadas a 25 °C e a um ângulo de 173°.

## 2.6 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE)

A EE foi calculada pela diferença entre a quantidade total de agente ativo retido na matriz polimérica (encapsulado) e o agente ativo livre (não encapsulado), conforme a Equação 1.

$$EE(\%) = 100 - (100 * \text{agente ativo livre} / \text{agente ativo total}) \quad (1)$$

De modo que, o agente ativo total corresponde à fração total dos óleos adicionados às partículas. Para a obtenção destes compostos na forma livre seguiu-se a metodologia de separação por membrana, utilizando filtros para centrifuga com membrana 30k Ultracel (Ultra Amicon Filtros Centrifugos com uma membrana 30k Ultracel (Millipore, Irlanda). Um total de 500  $\mu\text{L}$  das nanopartículas foram adicionados aos filtros e posteriormente centrifugadas a 9000 rpm por 30 minutos. Os compostos encapsulados continuaram retidos na membrana do filtro, enquanto os compostos não encapsulados (agente ativo livre) permearam pela membrana. A quantificação do eugenol livre foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando comprimento de onda de 283 nm, onde a quantidade de eugenol foi calculada pela curva de calibração apropriada ( $R^2 = 0,997$ ), conforme descrito no item 2.3.

## 2.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR DPPH

Seguindo a metodologia proposta por Brand-Williams e colaboradores (1995) a atividade antioxidante das partículas foi caracterizada pelo poder destas em inibir o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Um volume de 500  $\mu$ L das diferentes formulações foi adicionado a 500  $\mu$ L de etanol 75%, posteriormente submetidas a sonicação por 30 minutos e mantidas em repouso por 15 horas. Após o repouso uma alíquota de 100  $\mu$ L das partículas foi adicionada a 3,9 mL de DPPH (0,1 mM) e analisadas após 30 e 60 minutos em espectrofotômetro Hitachi, L-1800 (Tóquio, Japão), com comprimento de onda de 517 nm. Os resultados foram expressos conforme a equação 2, em percentagem de inibição (PI) do radical DPPH.

$$PI = ( Abs\ inicial - Abs\ final / Abs\ inicial ) * 100 \quad (2)$$

Onde “Abs inicial” e “Abs final” correspondem, respectivamente, a absorbância inicial e absorbância final.

## 2.8 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

A estabilidade físico-química foi efetuada nos tempos 1, 30 e 60 dias quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta (conforme descrito no item 2.5), à eficiência de encapsulação (segundo o item 2.6) e atividade antioxidante (item 2.7). As partículas foram armazenadas a uma temperatura 7 °C ao abrigo de luz (em vidros âmbar de 30 mL) durante todo o armazenamento.

## 2.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A morfologia das partículas foi obtida por MET utilizando um microscópio JEOL modelo JEM -1011 (Tóquio, Japão) operando a 80 kV. As soluções contendo as nanopartículas foram previamente diluídas em água ultrapura Milli-Q® (1:5

respectivamente), cerca de 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi depositada sobre *grids* de cobre (200 mesh) revestidas sobre uma fina camada de carbono. Após secagem à temperatura ambiente por 24 h, os *grids* foram observados no microscópio.

## 2.10 ANÁLISES TÉRMICAS

### 2.10.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas para as nanopartículas, amostras controle (não revestidas com quitosana), óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L quimiotipo eugenol, eugenol e demais compostos utilizados na formação das partículas na forma pura, em equipamento Multi-Cell DSC (TA instruments, New Castle, Estados Unidos). A análise foi executada com uma referência e três amostras simultâneas, em cadinhos de Hastelloy® com tampa, selados por anéis de vedação para evitar a perda de voláteis. Para cada amostra, 100 mg foram aquecidas nos cadinhos a uma taxa de 2 °C/min com rampa de aquecimento de - 20 a 150 °C. Para as partículas em solução aquosa o cadinho de referência continha água, para os demais compostos o cadinho de referência estava vazio.

### 2.10.2 Análises termogravimétricas

A análise foi realizada em equipamento TGA-50 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Aproximadamente 10 mg das amostras, previamente secas, foram aquecidas em panela de platina a uma taxa de 10°C/min entre 25 e 600 °C, com um fluxo de nitrogênio de 40mL. min<sup>-1</sup>.

## 2.11 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Os espectros no infravermelho foram obtidos na região entre 4000 e 650  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 1  $\text{cm}^{-1}$  utilizando um instrumento Frontier FT-IR/NIR (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). Todas as leituras foram realizadas a temperatura ambiente.

## 2.12 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão das determinações realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos a análise de variância e posteriormente foi aplicado Teste de Tukey para a comparação de médias, valores de  $p$  menores que 0.05 foram considerados significativamente diferentes. As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o software STATISTICA (versão 7.0, 2004 StatSoft Inc. EUA).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

Parâmetros como tamanho de partícula, potencial zeta, e eficiência de encapsulação são primordiais para caracterizar as nanopartículas e permitir a segmentação em aplicações nutricionais e medicinais (LUO et al., 2011). A avaliação da estabilidade das partículas foi realizada nos períodos de 1, 30 e 60 dias, a temperatura de 7 °C em frascos de 30 mL de cor âmbar. Os parâmetros utilizados para verificar a estabilidade físico-química das partículas foram: diâmetro médio das partículas ( $Z_{ave-nm}$ ), índice de polidispersão (IP), potencial zeta ( $\zeta-mV$ ), eficiência de encapsulação (EE) (Tabela 3). As suspensões coloidais das nanopartículas não apresentaram durante o tempo de armazenamento alterações de cor, presença de precipitados ou separação de fases visualmente perceptíveis, sendo classificadas como suspensões macroscopicamente normais.

Tabela 3 - Estudo da estabilidade das nanopartículas de zeína com e sem revestimento de quitosana carregadas com óleos essenciais, compostos puros e partículas em branco

<b>Z-ave (nm)</b>	1 dia	30 dias	60 dias
Peu	157,56 ± 6,8 <sup>a,A,B</sup>	184,5 ± 9,3 <sup>b,A</sup>	193,36 ± 8,0 <sup>b,A</sup>
Peu Q	159,9 ±11,30 <sup>a,A,B</sup>	190,56±9,74 <sup>b,A</sup>	193,13±12,7 <sup>b,A</sup>
Aleu	182,9±14,31 <sup>a,B</sup>	243,83 ±11,07 <sup>b,B</sup>	227,9 ± 4,19 <sup>a,b,A</sup>
Aleu Q	145,4 ± 4,7 <sup>b,A</sup>	200,7±8,05 <sup>a,A</sup>	204,0±13,24 <sup>a,A</sup>
Branco	208,93±5,44 <sup>b,C</sup>	187,23±3,4 <sup>a,A</sup>	186,35±8,89 <sup>a,A</sup>
<b>IP</b>	1 dia	30 dias	60 dias
Peu	0,155 ±0,019 <sup>a,A,B</sup>	0,157± 0,02 <sup>a,A,B</sup>	0,147± 0,011 <sup>a,A</sup>
Peu Q	0,192±0,004 <sup>a,A</sup>	0,213± 0,003 <sup>a,C</sup>	0,204± 0,013 <sup>a,B</sup>
Aleu	0,130± 0,02 <sup>a,B</sup>	0,137± 0,01 <sup>a,A</sup>	0,152±0,009 <sup>a,A</sup>
Aleu Q	0,190±0,02 <sup>a,A</sup>	0,188± 0,01 <sup>a,B,C</sup>	0,189± 0,007 <sup>a,B</sup>
Branco	0,210±0,0014 <sup>a,C</sup>	0,220±0,012 <sup>a,C</sup>	0,225±0,011 <sup>a,C</sup>
<b>ζ (mV)</b>	1 dia	30 dias	60 dias
Peu	+31,5 ± 2,8 <sup>a,C</sup>	+31,3± 1,4 <sup>a,A,B</sup>	+28,9± 2,3 <sup>a,A,B</sup>
Peu Q	+38,4 ±2,9 <sup>a,A</sup>	+33,2± 2,6 <sup>a,B</sup>	+34,9± 2,02 <sup>a,A</sup>
Aleu	+24,23±1,1 <sup>a,B</sup>	+21,63± 2,6 <sup>a,A</sup>	+23,1± 3,2 <sup>a,B</sup>
Aleu Q	+43,8 ± 0,9 <sup>b,A</sup>	+31,96± 1,4 <sup>a,A</sup>	+31,1± 4,3 <sup>a,A,B</sup>
Branco	+32,2 ± <sup>a,C</sup>	+36,8± <sup>a,B</sup>	+37,2± <sup>a,B</sup>
<b>EE (%)</b>	1 dia	30 dias	60 dias
Peu	97,46± 0,01 <sup>b,A</sup>	97,34± 0,69 <sup>b,A</sup>	93,78 ± 1,68 <sup>a,A</sup>
Peu Q	99,30± 0,79 <sup>a,B</sup>	95,61± 0,28 <sup>a,B</sup>	90,26 ± 1,42 <sup>a,A</sup>
Aleu	94,17±0,05 <sup>c,A</sup>	96,67± 0,43 <sup>b,B</sup>	90,2± 1,02 <sup>a,A</sup>
Aleu Q	99,13± 3,5 <sup>a,A</sup>	95,41± 0,13 <sup>b,B</sup>	89,17 ± 0,26 <sup>c,A</sup>
<b>AA (%)</b>	1 dia	30 dias	60 dias
Peu	99,90 ± 0,001 <sup>b,A</sup>	99,93 ±0,009 <sup>a,A</sup>	99,94 ± 0,001 <sup>a,A</sup>
Peu Q	99,90 ± 0,002 <sup>b,A</sup>	99,93 ±0,008 <sup>a,A</sup>	99,94 ± 0,006 <sup>a,A</sup>
Aleu	99,90 ± 0,005 <sup>b,A</sup>	99,93 ±0,003 <sup>a,A</sup>	99,93 ±0,003 <sup>a,A</sup>
Aleu Q	99,89 ± 0,008 <sup>b,A</sup>	99,92 ± 0,0006 <sup>a,A</sup>	99,93 ± 0,003 <sup>a,A</sup>
Branco	4,02 ± 1,22 <sup>a,B</sup>	2,51 ± 0,33 <sup>a,B</sup>	2,30 ± 0,89 <sup>a,B</sup>

<sup>a</sup> Letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes (p <0,05). <sup>A</sup> Letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes (p <0,05). Os resultados são expressos como médias de três determinações ± desvio padrão. Z-ave (nm) = diâmetro médio das partículas; IP= índice de polidispersão ζ =potencial zeta, EE =eficiência de encapsulação e AA= atividade antioxidante. Peu Q = Nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo eugenol; Aleu = Nanopartículas de zeína contendo óleo essencial de alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) quimiotipo eugenol; Aleu Q = Nanopartículas de zeína revestidas por quitosana contendo óleo essencial de alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) quimiotipo eugenol

e Branco = nanopartículas de zeína revestidas por quitosana sem composto ativo.

Fonte:Próprio autor.

### 3.1.1 Diâmetro médio das partículas (Z-ave) e índice de polidispersão (IP)

O diâmetro médio das partículas pode ser influenciado por diferentes fatores: natureza e a concentração de monômeros, núcleo, concentração de tensoativos, razão entre o solvente orgânico para o solvente aquoso, a concentração de óleo na solução orgânica (CHOUINARD et al., 1991). Em relação a partículas obtidas por nanoprecipitação, à natureza e concentração do polímero na fase orgânica, polaridades dos solventes, origem e proporção entre as fases internas / externas e a características e concentração dos surfactantes são fatores essenciais na determinação do tamanho das nanocápsulas (MORO-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Monitorar a variação do diâmetro médio (tamanho) das partículas ao longo do tempo se faz necessário, pois, uma variação deste parâmetro, pode indicar uma tendência a agregação e a sedimentação das nanopartículas dispersas (BOUCHEMAL et al., 2004). Outro fator que indica uma tendência a aglomeração em suspensões de nanopartículas é o índice de polidispersão (IP). Valores de IP inferiores a 0,3 (relativamente baixos), indicam uma distribuição monodispersa e consequentemente resulta em partículas mais estáveis (DOBRYNIN; LEIBLER, 1997).

O diâmetro médio das partículas estudadas apresentou valores entre 145 e 244 nm durante os 60 dias de observação (Tabela 3). Medidas semelhantes foram encontradas por Wu e colaboradores (2012), que obtiveram nanopartículas de zeína carregadas com timol com diâmetro médio em torno de +/- 269,4 nm. Nas formulações que continham composto ativo, após 30 dias de armazenamento foi observado um aumento de tamanho ( $p < 0,05$ ), que se manteve estável após esse período ( $p < 0,05$ ). Estes resultados indicam que inicialmente (primeiros 30 dias) pode ter ocorrido uma aglomeração entre as partículas. Entretanto, nos seguintes 30 dias de armazenamento não ocorreu aumento ( $p < 0,05$ ) das partículas, indicando estabilidade

na suspensão. Estes parâmetros estão em concordância com o perfil de polidispersão das partículas onde todas as formulações apresentaram IP inferiores a 0,3, em todo período avaliado, sem alterações significativas ( $p < 0,05$ ) deste índice, revelando monodispersão das nanopartículas (LIAKOS et al., 2016).

Em relação a influencia do tipo de material encapsulado no tamanho da partícula verificou-se que, tanto as partículas que continham eugenol ou óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo eugenol não apresentaram diferença de tamanho ( $p < 0,05$ ) ou comportamento distinto durante o armazenamento. Evidenciando que a utilização do óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo eugenol não altera as características de diâmetro médio destas partículas ( $p < 0,05$ ).

As partículas com revestimento de quitosana contendo óleo essencial apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) no tempo inicial. Entretanto, a partir do tempo 30 dias, ocorreu um aumento no diâmetro médio das diferentes formulações fazendo com que elas não apresentassem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao longo do restante armazenamento. Os resultados indicaram que o revestimento de quitosana (concentração 1:100 zeína/quitosana) não alterou ( $p < 0,05$ ) o diâmetro médio das partículas após 30 dias de armazenamento.

Em relação ao IP as nanopartículas contendo revestimento com quitosana obtiveram valores superiores ( $p < 0,05$ ) as sem revestimento. Este aumento no índice de polidispersão pode ser elucidado pelo fato da adição de quitosana ter promovido uma heterogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão. Todavia, valores de IP inferiores a 0,2 sugerem que a distribuição se encontra em uma estreita faixa de diâmetros e que embora ocorra um aumento nos valores do IP para as partículas revestidas com quitosana, as mesmas são consideradas estáveis (LIAKOS et al., 2016).

### 3.1.2 Potencial zeta ( $\zeta$ -mV)

O potencial zeta avalia a repulsão eletrostática entre as partículas em suspensão. Valores iguais ou superiores a +/- 30 mV são associados a soluções estáveis. Fatores como natureza química do polímero, agente estabilizante e pH do meio são importantes para as medidas do potencial zeta (MARCATO, 2009; TEERANACHAIDEEKUL; MULLER; JUNYAPRASERT,

2007). Conforme descrito na tabela 3, as diferentes formulações das nanopartículas apresentaram valores de  $\zeta$  entre +21,63 e +43,8 mV, todos as amostras apresentaram potencial positivo. Esses valores indicam que as partículas possuem alta estabilidade, sem que ocorresse diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do potencial ao longo do armazenamento. Pode se observar que as partículas contendo revestimento de quitosana apresentaram valores maiores de  $\zeta$ , diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) das demais partículas em seu tempo inicial. Isso evidencia que a quitosana contribuiu para maiores valores deste potencial e conseqüentemente, para uma maior estabilidade das partículas. Os valores encontrados são semelhantes aos apresentados por Luo e colaboradores (2011), no estudo apresentado por eles, após revestimento com quitosana em partículas de zeína contendo  $\alpha$ - tocoferol, o potencial zeta do complexo tornou-se altamente positivo chegando em torno de +40,9 mV. Este aumento de potencial, segundo os autores, confirmam que a quitosana foi depositada na superfície das partículas de zeína por interações eletrostáticas.

As partículas sem revestimento de quitosana apresentaram valores aproximados aos encontrados por da Rosa e colaboradores (2015), que obtiveram potencial zeta entre +9 e +30 mV em partículas de zeína contendo óleos essenciais de tomilho e oregano e seus compostos majoritários carvacrol e timol, respectivamente.

### 3.1.3 Eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação das partículas apresentou valores na faixa de 89,17 a 99,30 % (Tabela 3).

As partículas contendo o eugenol sem adição de quitosana apresentaram EE sem alterações significativas ( $p < 0,05$ ) por pelo menos 30 dias de armazenamento, no tempo de 60 dias observou-se que houve uma diminuição ( $p < 0,05$ ) em cerca de 10 % da EE destas partículas. As partículas contendo o eugenol com revestimento de quitosana, não apresentaram alteração significativa ( $p < 0,05$ ) perante o armazenamento.

Partículas contendo o óleo essencial, Aleu e Aleu Q, apresentaram comportamento semelhante com relação a EE. Em ambas as partículas ocorreu uma diminuição ( $p < 0,05$ ) de EE no

transcorrer do armazenamento, onde cada intervalo estudado diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ).

Ao final dos 60 dias de armazenamento as partículas não demonstraram diferença ( $p < 0,05$ ) entre as nanopartículas desenvolvidas. Os valores superiores a 89 % para a EE demonstraram uma forte afinidade dos compostos com a zeína e zeína revestida com quitosana, evidenciando bons materiais de parede. Woranuch e Yoksan (2012) obtiveram nanopartículas de quitosana contendo eugenol como agente ativo e apresentaram EE em torno 1,11 a 20,17 % entre as diferentes formulações estudadas, valores inferiores aos encontrados neste estudo. Luo, Zi e Qin (2011) apresentaram valores de EE entre 52,2 e 87,9 % para partículas de zeína revestidas com CMCS carregadas com vitamina D3.

#### 3.1.4 Atividade antioxidante (AA) por DPPH

Conforme a Tabela 3, durante o período de armazenamento investigado todas as formulações, com exceção das partículas vazias, possuíram capacidade de inibir os radicais DPPH em 99%. Um aumento ( $p < 0,05$ ) da inibição dos radicais DPPH foi observado após 30 dias de armazenamento. Esse aumento pode ser explicado pela liberação dos compostos bioativos para o meio no decorrer do tempo, fazendo com que ocorra um acúmulo do composto ativo na solução (da ROSA et al., 2015).

As partículas apresentaram o mesmo comportamento em relação a sua atividade antioxidante pela técnica de DPPH, sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as partículas contendo eugenol e as com óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo eugenol. Estes resultados demonstram que a utilização deste OE pode ser substituído por seu composto majoritário na forma isolada. Resultados obtidos por Woranuch e Yoksan (2012) mostram que as percentagens de eliminação de radicais contendo eugenol livre e contendo nanopartículas de quitosana carregadas com eugenol foram respectivamente de 14,13 e 52,63 %, indicando que a encapsulação melhorou a AA do eugenol. Pereira e Maia (2007) avaliaram a capacidade antioxidante do extrato bruto e o óleo essencial de alfavaca *Ocimum gratissimum* L. através do método do tiocianato férrico, os resultados apresentados foram de 96,39 % de inibição da oxidação lipídica para o óleo bruto da alfavaca e 92,44 % de

inibição para seu óleo essencial. Em ambos os estudos os resultados para a AA foram inferiores aos encontrados para as nanopartículas de zeína e zeína/quitosana carregadas com eugenol e o óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. Nas partículas vazias foi observada uma pequena atividade antioxidante o que demonstra que a zeína e/ou quitosana apresentam uma certa capacidade em inibir o radical DPPH (WU; LUO; WANG, 2012).

### 3.2 MORFOLOGIA

A microscopia eletrônica de transmissão fornece de forma direta a informação visual da morfologia das partículas, arranjo dos sistemas particulados, o tamanho e sua dispersão, sendo assim, uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de nanopartículas (MARINI, 2014). As partículas apresentaram em suas diferentes formulações formas esféricas sólidas, com bordas bem definidas, nas Figuras 7,8,9 e 10 estão as micrografias obtidas por MET para as partículas Peu, Peu Q, Aleu e Aleu Q, respectivamente.

As partículas apresentaram algumas aglomerações que podem estar associadas um excesso de surfactante.

As partículas contendo revestimento com quitosana apresentaram durante a realização da micrografia melhor contraste, o que sugere que estas nanopartículas apresentam maior densidade.

Figura 7 - Micrografias obtidas por MET para as partículas PEU. Onde A, C e D estão em uma magnificação de 30.000 vezes, B 100.000 vezes e E e F 15.000 e 150.000 vezes, respectivamente.

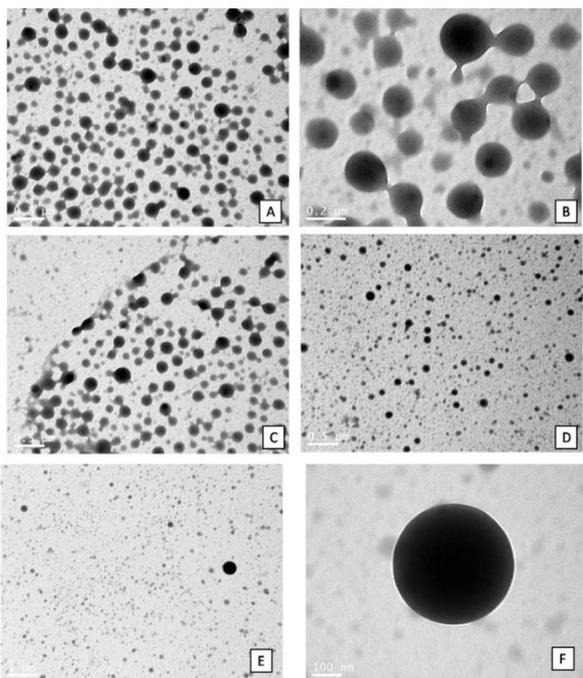


Figura 8 - Micrografias obtidas por MET para as partículas PEU Q. Onde B, C, D e E estão em uma magnificação de 30.000 vezes, A e F em 8.000 e 200.000 vezes, respectivamente.

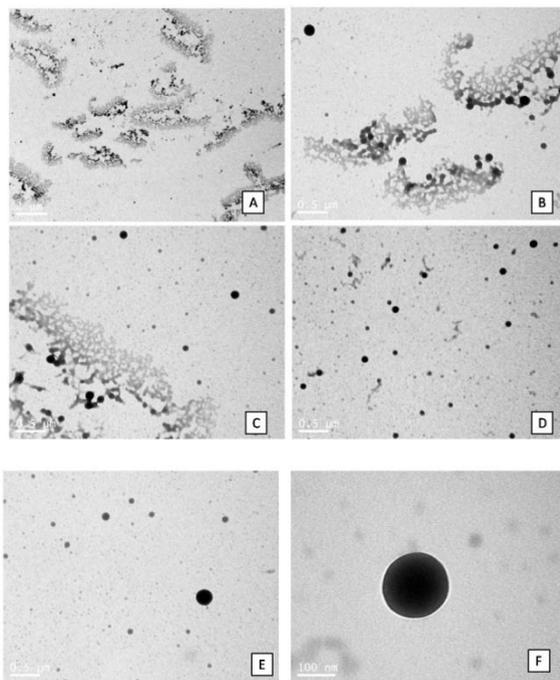


Figura 9 - Micrografias obtidas por MET para as partículas ALEU. Onde A e C estão com uma magnificação de 8.000 vezes, B, D e E em 30.000 vezes e F de 150.000 vezes.

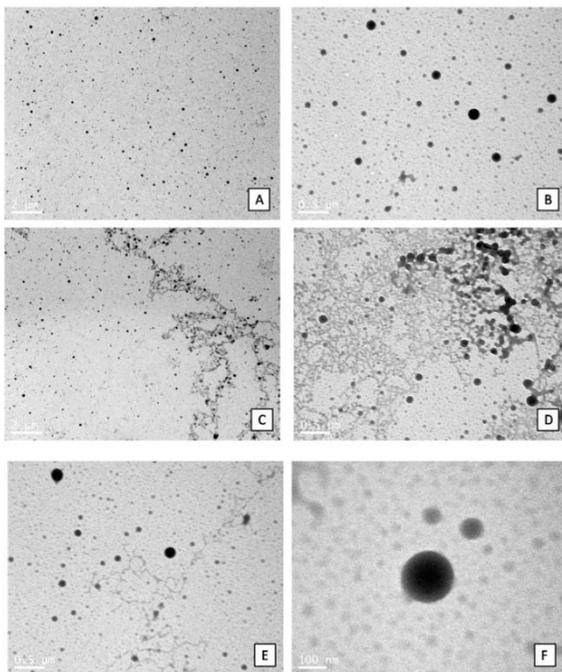
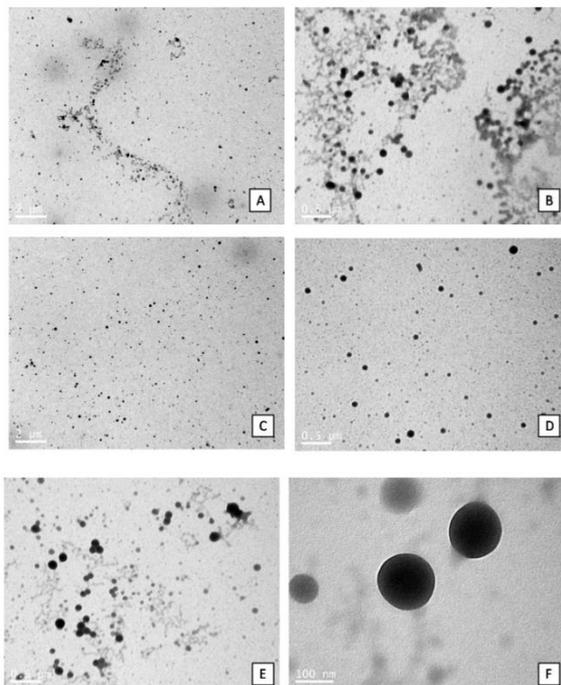


Figura 10 - Micrografias obtidas por MET das partículas ALEU Q. Sendo que A e C estão com uma magnificação de 8.000 vezes, B, D e E em 30.000 vezes e F de 200.000 vezes.



### 3.3 ANÁLISES TÉRMICAS

Foram realizadas análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA) (itens 3.4.1 e 3.4.2 respectivamente) nos compostos zeína, quitosana, tween 20, eugenol, óleo essencial *Ocimum gratissimum* L, partículas branco e partículas em solução aquosa, afim de, verificar as alterações termogravimétricas que podem ocorrer nas partículas.

### 3.3.1 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Empregada para confirmar a encapsulação de um composto ativo, as análises de calorimetria exploratória diferencial podem também, pelo deslocamento ou modificações em picos de fusão, cristalização ou outras transições térmicas indicar as interações que podem ocorrer ou ocorreram entre diferentes compostos. Nas análises realizadas, não foram encontradas transições térmicas que pudessem confirmar as possíveis interações entre os compostos formadores das partículas carregadas e vazias. Uma justificativa para tal comportamento pode ser atribuída a alguma limitação de sensibilidade do equipamento, uma vez que, nas análises termogravimétricas (item 3.5.6) foram observadas interações térmicas entre os compostos. Na Tabela 4 e Anexo B estão listadas as transições térmicas obtidas nos compostos puros formadores das partículas obtidas neste estudo.

Tabela 4 - Parâmetros do DSC para zeína, compostos e óleos puros.

Amostra	$T_f$ (°C)	$Onset$ (°C)	Endset (°C)	$\Delta H_f$ (Jg <sup>-1</sup> )
Zeína	53,83	45,87	61,31	1,717
Quitosana	58,67	58,33	60,44	--
Eugenol	-18,03	-19,23	-12,90	0,878
OE Alfavaca africana	-15,05	-18,78	-8,49	0,6453

Fonte: Próprio autor.

### 3.3.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é uma técnica em que a massa de uma substância é monitorada em função da temperatura ou tempo em que a amostra é submetida em um programa de temperatura e atmosfera controlada (WORANUCH; YOKSAN, 2012). A DTG é a derivada primeira da TGA, ou seja, um acondicionamento matemático onde a derivada da variação de massa em relação ao tempo ( $dm/dt$ ) é registrada em função do tempo ou temperatura. Essas técnicas podem ser utilizadas para verificar decomposição, desidratação e oxidação dos

compostos. Conforme ilustrado na Tabela 5 e Anexo C pode-se observar que tanto o material encapsulado (óleo essencial e o composto puro eugenol) quanto as partículas apresentaram apenas um pico de perda de massa. A encapsulação pode ser comprovada pela maior perda de massa dos compostos puros em relação às partículas carregadas, outra característica que pode confirmar a encapsulação dos compostos é o aumento de temperatura das partículas em relação à temperatura da zeína pura, demonstrando que houve interação entre os compostos (da ROSA et al., 2015). Entretanto, as partículas apresentaram valores de temperatura inferiores ao óleo essencial da alfavaca e eugenol na forma pura, o que pode indicar segundo Woranuch e Yoksan (2012) que houve uma perda na estabilidade térmica dos compostos encapsulados.

Tabela 5 - Transições térmicas referentes as partículas e seus constituintes

Amostra	Transições térmicas			
	Primeiro estágio de perda de massa (°C)	Segundo estágio de perda de massa (°C)	Perda de massa 1 (%)	Perda de massa 2 (%)
Zeína	44,57	304,20	4,71	70,92
Quitosana	86,33	307,37	21,49	41,181
Eugenol	143,70	0	91,25	0
OE alfavaca	145,9	0	90,92	0
Peu	62,89	0	84,27	0
Peu Q	70,22	0	83,62	0
Aleu	69,76	0	84,46	0
Aleu Q	65,82	0	90,19	0

Fonte: Próprio autor.

### 3.4 INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Com a finalidade de observar as interações estruturais das partículas foi realizada a espectroscopia no infravermelho (ir), das partículas obtidas em solução aquosa, assim como de seus principais constituintes, representados na figura 11.

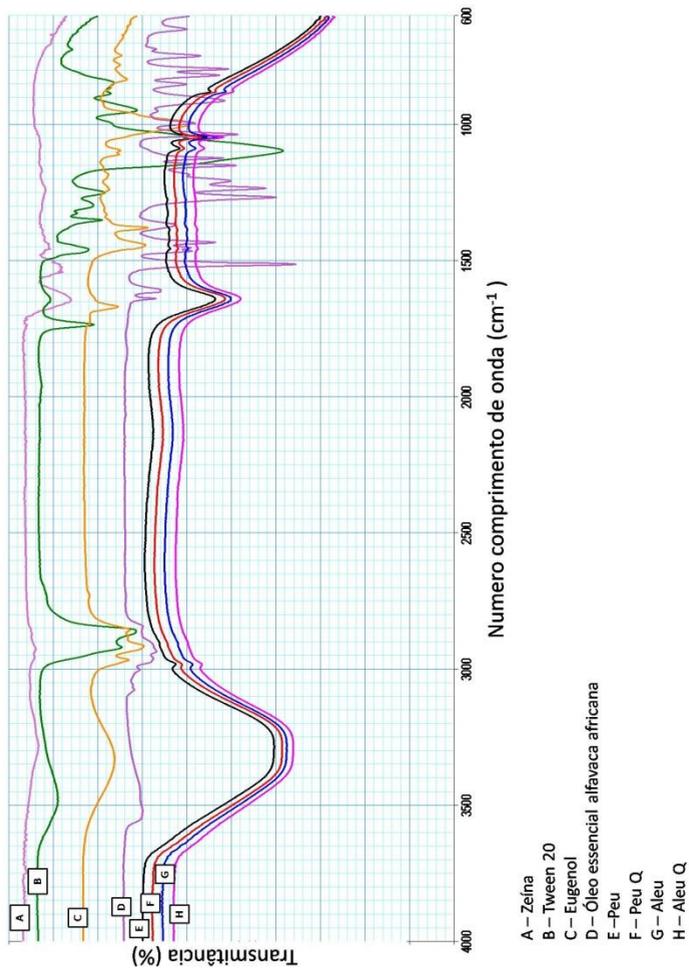
O espectro da zeína (Figura 11 A) apresentou bandas em  $3200\text{ cm}^{-1}$  características de grupamentos OH, na região de  $2964\text{ cm}^{-1}$  -  $2926\text{ cm}^{-1}$  referentes à  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ . As bandas em  $1647\text{ cm}^{-1}$  são referentes a amida, C-H e N-H (FORATO; BICUDO; COLNAGO, 2013).

No espectro do eugenol (Figura 11 C) observou-se bandas em  $3380\text{ cm}^{-1}$  característica de grupamentos fenólicos OH, referentes a CH foram observadas bandas em  $2969\text{ cm}^{-1}$  (WORANUCH; YOKSAN 2012).

O óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. químiotipo eugenol (Figura 11 D) apresentou bandas em  $3376$  a  $3372\text{ cm}^{-1}$  indicativos a grupamentos de OH fenólicos, bandas em  $2840$  –  $2845\text{ cm}^{-1}$  referentes a estiramentos CH. Comprimentos de onda em  $1639$ ,  $1610$ ,  $1513$ ,  $1466$  e  $1451$  estão relacionadas à presença C=C do anel aromático. As bandas  $1265$  e  $1207$  estão associadas a presença de C-O de ésteres (ésteres aromáticos e vinílicos).

No espectro das partículas em solução aquosa (Peu, Peu Q, Aleu e Aleu Q, demonstrada na Figura 11 E,F,G e H respectivamente), observa-se o deslocamento de banda característico da zeína fundindo-se com grupamentos fenólicos (OH) do eugenol e óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L em um comprimento de onda de  $3306\text{ cm}^{-1}$ . A partir deste deslocamento pode se confirmar a encapsulação, uma vez que as partículas carregadas sobrepuseram à frequência vibracional do composto puro e do óleo essencial, expondo apenas sinais dos mesmos, sugerindo interações entre zeína e os compostos encapsulados.

Figura 11 - FTIR de zeína, tween 20, eugenol, OE *Ocimum gratissimum* L, Peu, Peu Q, Aleu e Aleu Q





## 4 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho foi possível obter, caracterizar e avaliar a estabilidade das partículas de zeína com e sem revestimento de quitosana, carregadas com óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo eugenol e eugenol, obtidas pelo método de nanoprecipitação.

As partículas revestidas com quitosana apresentaram valores semelhantes às partículas controle (partículas sem revestimento) para propriedades como diâmetro médio, IP, AA e EE, apresentando valores superiores em relação ao potencial zeta. Estes resultados indicam que o revestimento com quitosana na concentração estudada, aumentou o potencial zeta das partículas, sem alterar as outras características das suspensões nanoparticuladas, atribuindo melhor estabilidade às partículas desenvolvidas.

As análises de TGA e espectroscopia no infravermelho indicaram ter ocorrido a encapsulação dos compostos ativos, tendo as partículas apresentado comportamentos distintos ao óleo essencial e compostos puros.

As partículas apresentaram, ainda, alta capacidade em reduzir o radical DPPH em cerca de 99 %, comprovando sua atividade antioxidante durante o período de armazenamento, assim como ficou evidenciado que as partículas contendo óleo essencial *Ocimum gratissimum* L. podem ser utilizadas como substitutas das partículas contendo apenas eugenol.

O presente estudo apontou que do ponto de vista físico-químico, os resultados encontrados, indicam que as partículas de zeína e zeína revestidas com quitosana carregadas com óleos essenciais são estáveis. Sendo possível com otimizações do seu desenvolvimento e avaliação na liberação desses compostos da matriz polimérica, prever possíveis aplicações em matrizes alimentícias.



## 5 REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.;REZAEI, M.; FARZI, G. Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. **International Journal of Food Science and Technology**,v. 47, nº 4, p. 847–853, 2012.

ASSIS, L.M. et al. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technenology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

AYOOLA, G.A. et al.Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzigium aromaticum* (clove). **African Journal of Microbiology Research**, v.2, p.162-166, 2008.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. A review. **Food Chemstry Toxicology**, v.26, p 446-475, 2008.

BLANK, G.; ADEJUMO, A. A.; ZAWISTOWSKI, J. Eugenol induced changes in the fatty acid content of two *Lactobacillus* species.**LWT - Food Science and Technology**., v. 24, n. 3, p. 231-235, 1991.

BOUCHEMAL, K et al. Synthesis and characterization of polyurethane and poly (ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**. v.269, p. 89–100, 2004.

BRAND-WILLIAMS, M.E.; CUVELIER, C.; BERSER, Use of a free radical method to evaluate antioxidant, **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foodssA review. *Int. J. Food Microbiol.* v. 94, p. 223-253, 2004.

CARRASCO, H et al. Eugenol and its synthetic analogues inhibit cell growth of human cancer cells (Part I). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, p.543-548, 2008.

CHEN, X. et al. Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 269 - 274, 2006.

CHOUINARD, F. et al. Preparation and purification of polyisohexylcyanoacrylate nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**. v.72, p. 211–217, 1991.

COSTA, L. C. B. et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Ocimum selloi* Benth. sob condições de luz, temperatura e tempo de armazenamento. **Ciência Agrotécnica, Lavras**, v.34, n.3, p. 675-680, 2010.

DA ROSA, C. G. et al. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v 481, p.337–344, 2015.

FISCHER, I. U.; DENGLER, H. J. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for the determination of eugenol in body fluids. **Journal of Chromatography**, v. 525, n. 2, p. 369-377, 1990.

FORATO, L. A.; BICUDO, T. C.; COLNAGO, L. A. Conformation of  $\alpha$  zeins in solid state by Fourier transform IR. **Biopolymers**, v. 72, n. 6, p. 421-426, 2003.

GHARSALLAOUI, A et al. Applications of spray-dryerr in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**, v. 40 p. 1107–1121, 2007.

ITO, M.; MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.461-466, 2005.

KAMATOU, G.P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A.M. Eugenol From the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v.17, p.6953-6981, 2012.

KARMAKAR, S. et al. Clove (*Syzygium aromaticum* Linn) extract rich in eugenol and eugenol derivatives shows bone-preserving efficacy. **Natural Product Research**, v.26, p.500-509, 2012.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, 1-27, 2000.

KUMARAVELU, P.; et al. The antioxidant effect of eugenol on CCl<sub>4</sub> induced erythrocyte damage in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 1, p. 23-28, 1996.

LAI, L. F.; GUO, H. X. Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 317-323, 2011.

LEE, S.-J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LIAKOS, I. L. et al. All natural cellulose acetate—Lemongrass essential oil antimicrobial nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 510, pg 508–515, 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.H. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. ed. 2. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, p. 544, 2008.

LUO, Y. et al. Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. **Carbohydrates and Polymers**, v.82, p.942–951, 2010.

LUO, Y. et al. Preparation and characterization of zein/ chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.85:,p.145–152, 2011.

LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 60, p.836–843, 2011.

LUO, Y.; WANG, Q. Zein-Based Micro- and Nano-Particles for Drug and Nutrient Delivery: A Review. **Journal of Applied Polymer Science**, v, 131, 2014.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, p. 01-37, 2009.

MARINI, V. G. **Tese**: Nanopartículas de zeína: preparação, caracterização e desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de terpinen-4-ol. Programa de Pós Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

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

PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 624-632, 2007.

REBOUÇAS, F.S. Cultivo *in vitro* de Plantas Medicinais: *Ocimum basilicum* L e *Cissus sicyoides* L., 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2009.

REDDY, N.; YANG, Y. Potential of plant proteins for medical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 490-498, 2011.

ROJO, L. et al. Eugenol functionalized poly(acrylic acid) derivatives in the formation of glass-ionomer cements. **Dental Materials**, v.24, p.1709-1716, 2008.

SHAN, B. et al. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.7749-7759, 2005.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; MÜLLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC): Effects of formulation parameters on physicochemical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, p. 198-206, 2007.

WORANUCH, S.; YOKSAN, R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v 96, p. 578–585, 2012.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 283-290, 2012.

VIEIRA, R. F.; SIMON, J. E. Chemical characterization of basilc(*Ocimum spp.*) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Economic Botany**, v. 54, n. 2, p. 207-216,c 2000.

ZHONG, Q.; JIN, M. Zein nanoparticles produced by liquid–liquid dispersion. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2380-2387, 2009



**CAPITULO 3 - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO  
DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA COM E SEM  
REVESTIMENTO DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Ocimum gratissimum* L. QUIMIOTIPO  
GERANIOL E COMPOSTO GERANIOL**



## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar nanopartículas contendo óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. e seu composto majoritário geraniol na forma pura, encapsulados por zeína com e sem revestimento de quitosana. Foram desenvolvidas cinco formulações de partículas em triplicata: partículas contendo óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo geraniol encapsuladas com zeína com revestimento de quitosana (Alge Q), partículas do óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. sem o revestimento (Alge), partículas contendo geraniol na forma pura tendo como material de parede a zeína (Pge), partículas de geraniol na forma pura encapsuladas por zeína e revestidas com quitosana (Pge Q) e partículas sem adição de composto bioativo encapsuladas por zeína e revestidas por quitosana (partículas branco ou vazias). As partículas foram caracterizadas físico-quimicamente, por suas características de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação e atividade antioxidante, monitorando a estabilidade das mesmas pelo período de 60 dias. As partículas foram avaliadas em relação a sua morfologia e distribuição de tamanho por microscopia eletrônica de transmissão. Calorimetria exploratória diferencial e análises termogravimétricas foram realizadas a fim de verificar a estabilidade térmica das partículas. Espectroscopia no infravermelho foi utilizada a fim de qualificar as interações ocorridas após formação das partículas. As partículas apresentaram morfologia esférica, lisa e bem definida. Nas propriedades relacionadas a sua estabilidade possuíam diâmetro médio em torno de  $200 \pm 30 \text{ nm}$ , índice de polidispersão inferior a 0,3 nas diferentes formulações e no decorrer do seu armazenamento. O potencial zeta foi positivo, apresentando-se em uma faixa de +22 e +37 mV. A eficiência de encapsulação foi superior a 95 %, demonstrando forte afinidade entre o material encapsulado e material de parede. A capacidade antioxidante, tanto das partículas contendo o eugenol quanto o óleo essencial da alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) quimiotipo geraniol abrangeu entre 50 e 2,30 % na capacidade de reduzir o radical DPPH. As análises termogravimétricas, assim como o espectro no infravermelho permitiram constatar a encapsulação dos compostos ativos.

**Palavras-chave:** Geraniol. Óleo essencial. Alfavaca africana. Nanopartículas.

## 1 INTRODUÇÃO

A eficácia dos componentes presentes em óleos essenciais (como, por exemplo, timol, carvacrol, geraniol, limoneno, etc) para inibir o crescimento de agentes patógenos bacterianos de origem alimentar vem sendo cada vez mais estudada (DAVIDSON et al., 2013). Entretanto, sua utilização em matrizes alimentares pode ser limitada por apresentar baixa solubilidade em fase aquosa ou por seus impactos sobre as propriedades sensoriais dos alimentos em níveis suficientes para inibir o crescimento microbiano (BURT, 2004; WEISS et al., 2009).

O geraniol é um monoterpeneo, presente naturalmente presente em diferentes OE, reconhecido como seguro pela *Food and Drug Administration* (LAPCZYNSKI et al., 2008), é utilizado em diferentes áreas: como flavorizante na indústria alimentícia por seu odor e sabor característicos; no tratamento de doenças infecciosas (SOLÓRZANO- SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012); repelente de insetos; ação antimicrobiana; antioxidante; anti-inflamatório e anticancerígeno (CHEN; VILJOEN, 2010). No entanto, por apresentar-se naturalmente volátil, sua aplicação em algumas matrizes torna-se um desafio. Uma solução funcional para estas limitações é o encapsulamento (HILL et al., 2013; SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006).

A encapsulação pode ser descrita como um procedimento de empacotamento em partículas e consiste no carregamento desses compostos em matrizes, mantendo sua estabilidade química e podendo promover a liberação no momento e taxa desejada (NEDOVIC et al., 2011). A encapsulação de compostos bioativos melhora a estabilidade desses compostos e sua biodisponibilidade, por reduzir a reatividade dos compostos com o ambiente (água, luz e oxigênio) e por diminuir a evaporação ou a taxa de transferência para o ambiente exterior, proporcionando proteção dos compostos à oxidação, fotólise ou interação com outros componentes de formulação do meio. São denominados de núcleo ou recheio o(s) composto(s) a ser encapsulado, já o material que forma a partícula, pode ser chamado de encapsulante, cobertura ou parede. De acordo com seu tamanho as partículas encapsuladas podem ser denominadas em macro, micro ou nanopartículas (NEDOVIC et al., 2011). As nanopartículas resumidamente são partículas individuais com um diâmetro menor do que 1000 nm (REIS et al., 2006). Por

possuírem tamanho reduzido, as propriedades de liberação dos compostos bioativos são mais eficientes, tais como, aumento da solubilidade, tempo prolongado de resistência no trato gastrointestinal, entre outras características (SOZER; KOKINI, 2009).

O material de parede deve possuir características que associadas ao método de produção de nanopartículas e ao núcleo de interesse que permitam a produção de partículas estáveis físico-quimicamente. Entre os polímeros naturais utilizados atualmente em nanoencapsulações, estão a zeína (prolamina proveniente do milho) e quitosana (polímero policatiônico), ambas apresentam características como biodegradabilidade, biodisponibilidade, baixa toxicidade, além de apresentarem a possibilidade de liberação controlada de componentes funcionais, como os óleos essenciais (LUO; WANG, 2014).

Levando em consideração tais fatores, este estudo tem como objetivo desenvolver e caracterizar nanopartículas contendo óleo essencial de alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) quimiotipo geraniol e seu composto majoritário, geraniol, na forma isolada tendo como material de parede zeína e zeína revestida com quitosana.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

A zeína, quitosana, Tween® 20 e geraniol foram obtidos da Sigma Aldrich. O óleo essencial da alfavaca africana (*Ocinum gratissimum*L.) quimiotipo geraniol foi extraído e doado pelo pesquisador Fabiano Cléber Bertoldi., da EPAGRI Estação Experimental Itajaí, SC.

### 2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES

A extração do óleo essencial foi realizada em aparelho tipo Clevenger através de hidrodestilação durante quatro horas.

A determinação dos seus principais componentes foi desempenhada por cromatografia gasosa (marca Shimadzu modelo GCMS - QP2010) acoplada à espectrometria de massas. O óleo essencial foi diluído 200x em hexano e injetado no equipamento, utilizando capilar ZB-5MS, 30m x 0,25mm x filme 0,25um. A temperatura inicial do forno de capilar foi de 60 °C (4 minutos), com rampa de aquecimento de 6 °C/minuto até atingir a temperatura de 210 °C, permanecendo por 6 minutos, sendo o tempo total da corrida cromatográfica de 35 minutos. A temperatura do injetor foi de 250 °C e o fluxo de gás hélio no capilar de 1,0 mL/minuto.

A quantificação dos principais compostos do óleo essencial da *Ocinum gratissimum* L. quimiotipo geraniol, o composto majoritário representou um percentual de 87% do total dos compostos (Tabela 6 e ANEXO D).

Tabela 6 - Principais compostos encontrados no óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo geraniol determinados por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas

Nome do composto	Numero do pico	Tempo de retenção (min.)	Área (%)
Limoneno	1	8,98	1,68
Geraniol	2	14,8	84,19
Alfa – Copaeno	3	17,96	2,23
Beta – cariofileno	4	18,85	3,91
Beta – cubebeno	5	20,16	8,59

Fonte: EPAGRI – Fabiano Cléber Bertoldi.

### 2.3 QUANTIFICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *ocimum gratissimum* L. QUIMIOTIPO EUGENOL E EUGENOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A quantificação e caracterização dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando o equipamento Shimadzu (modelo LC – 20AT, Tóquio Japão), equipado com um controlador de sistema CBM-20A, um sistema de bomba LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A, um forno CTO-20A, e um amostrador automático SIL-20<sup>a</sup>, com uma coluna analítica BDS – Hypersil C18 (250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm tamanho de partícula; Thermo Scientific, EUA), que foi mantida a 50 °C, e uma pré coluna BDS Hypersil C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm tamanho de partícula; Thermo Scientific, EUA).

O óleo essencial da alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) quimiotipo geraniol foi quantificado utilizando padrão externo em relação ao seu conteúdo de geraniol. Onde a medição quantitativa do teor de geraniol foi efetuado em  $\lambda = 275$  nm, com fase móvel de metanol: água (75:25) (v / v) a um fluxo de 1,0 mL/min<sup>-1</sup>, o volume de injeção foi de 20 µL. Com um coeficiente de correlação R<sup>2</sup> de 0,9996. A equação de regressão da curva de calibração com meios (n = 3) foi:  $Y = 1000000 X - 1093$ .

## 2.4 OBTENÇÃO DAS PARTÍCULAS

O preparo das partículas foi realizado seguindo a técnica de nanoprecipitação, sendo constituída em três etapas: na primeira etapa obteve-se a fase orgânica, seguindo a metodologia aludida por Luo e colaboradores (2011) com modificações. A zeína na concentração de 10 mg/mL foi previamente dissolvida em solução binária de solventes etanol/água (75:25 v/v) permanecendo em agitação magnética por 15 horas. Posteriormente, nesta solução de zeína, ainda sob agitação magnética (600 rpm), foi adicionado por gotejamento (com auxílio de pipeta de Pasteur/Paster) o óleo a ser encapsulado (previamente dissolvido em etanol puro) continuando em agitação por 60 minutos. A quitosana, previamente dissolvida em ácido acético a 1 %, é então adicionada gota a gota à solução anterior, permanecendo sob agitação magnética durante mais 60 minutos. Transcorrido os 60 minutos de agitação é repetido o processo para adição de solução de Tween® 20 (1 % em etanol) permanecendo em agitação magnética por mais 60 minutos.

A segunda etapa consiste na mistura da fase orgânica à fase aquosa, seguindo método sugerido por da Rosa e colaboradores (2015) com alterações. Preparada a fase orgânica, esta é então dispersa sobre a solução aquosa (que corresponde a 1:3 volume fase orgânica/volume fase aquosa) na presença de surfactante Tween® 20 (1,5 % da fase aquosa) sob velocidade de 10000 rpm em um homogeneizador Ultra Turrax (Modelo T25, IKA-Works, Inc., Cincinnati) por três minutos.

Como última etapa, o solvente é eliminado por evaporação em capela com exaustão por 15 h. Conforme tabela 6 foram preparadas partículas de zeína contendo geraniol (PGE) e óleo essencial da alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L) quimiotipo geraniol (ALGE), sendo estas partículas consideradas como controle. Foram desenvolvidas também partículas de zeína revestidas com quitosana com ambos compostos, geraniol (PGE Q) e óleo essencial da alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L) quimiotipo geraniol (ALGE Q). Como branco e/ou partículas vazias foram preparadas partículas de zeína revestidas com quitosana sem composto bioativo. As diferentes formulações preparadas e suas concentrações são apresentadas na Tabela 7.

Após o preparo as partículas foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas a 7 °C, para posteriores análises.

Tabela 7 - Formulações das partículas de geraniol, óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L quimiотipo geraniol e partículas em branco desenvolvidas

Amostra	Fase orgânica		Composto em relação a zeína (%)	Proporção zeína/quitosana	TW 20* Vol.Total F.O (%)	Fase aquosa	
	Zeína (mg/mL)	Composto				Proporção F.A/F.O (v/v)	TW 20 F.A(%)
PGE	10	Geraniol padrão	20	--	0,45	3:1	1,5
PGE Q	10	Geraniol padrão	20	1:100	0,45	3:1	1,5
ALGE	10	Geraniol alfavaca africana	20	--	0,45	3:1	1,5
ALGE Q	10	Geraniol alfavaca africana	20	1:100	0,45	3:1	1,5
Branco	10	--	--	1:100	0,45	3:1	1,5

TW 20 = Tween 20; F.O = Fase orgânica; F.A = Fase aquosa; PGE = Nanopartículas de zeína contendo geraniol; PGE Q = Nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo geraniol; ALGE = Nanopartículas de zeína contendo óleo essencial de alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) quimiотipo geraniol; ALGE Q = Nanopartículas de zeína revestidas por quitosana contendo óleo essencial de alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) quimiотipo geraniol e Branco = nanopartículas de zeína revestidas por quitosana sem composto ativo.

Fonte: Próprio autor

## 2.5 TAMANHO DA PARTÍCULA, POTENCIAL ZETA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO

O potencial zeta ( $\zeta$ , mV), índice de polidispersão (IP) e tamanho das partículas (Z-ave, nm) foram determinados empregando espalhamento de luz dinâmico (DLS). Para esta análise foi utilizado um Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. As amostras foram dispostas em célula de eletroforese e as análises realizadas a 25 °C e a um ângulo de 173°.

## 2.6 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE)

A EE foi calculada pela diferença entre a quantidade total de agente ativo retido na matriz polimérica (encapsulado) e o agente ativo livre (não encapsulado), conforme a Equação 3.

$$EE (\%) = 100 - ( 100 * \text{agente ativo livre} / \text{agente ativo total} ) \quad (3)$$

De modo que o agente ativo total corresponde à fração total dos óleos adicionados às partículas. Para a obtenção destes compostos na forma livre seguiu-se a metodologia de separação por membrana utilizando filtros para centrifuga com membrana 30k Ultracel (Ultra Amicon Filtros Centrifugos com uma membrana 30k Ultracel (Millipore, Irlanda). Um total de 500  $\mu$ L das nanopartículas foram adicionadas aos filtros de membrana e posteriormente centrifugadas a 9000 rpm por 30 minutos. Os compostos encapsulados continuaram retidos na membrana do filtro, enquanto os compostos não encapsulados (agente ativo livre) permearam pela membrana. A quantificação do eugenol livre foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando comprimento de onda de 275 nm, onde a quantidade de eugenol foi calculada pela curva de calibração apropriada ( $R^2 = 0,9996$ ), conforme descrito no item 2.3.

## 2.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Seguindo a metodologia proposta por Brand-Williams e colaboradores (1995) a atividade antioxidante das partículas foi determinada pelo poder em inibir o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Um volume de 500 µL das diferentes formulações foi adicionado a 500 µL de etanol 75%, posteriormente submetidas a sonicação por 30 minutos e mantidas em repouso por 15 horas. Após o repouso uma alíquota de 100 µL das partículas foi adicionada a 3,9 mL de DPPH (0,1 mM) e analisadas após 30 e 60 minutos em espectrofotômetro Hitachi, L-1800 (Tóquio, Japão), com comprimento de onda de 517 nm. Os resultados foram expressos conforme a Equação 4, em percentagem de inibição (PI) do radical DPPH.

$$PI = (Abs\ inicial - Abs\ final / Abs\ inicial) * 100 \quad (4)$$

Onde “Abs inicial” e “Abs final” correspondem respectivamente a absorbância inicial e absorbância final.

## 2.8 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

A estabilidade físico-química foi avaliada nos tempos 1, 30 e 60 dias quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta (conforme descrito no item 2.5), à eficiência de encapsulação (segundo o item 2.6) e atividade antioxidante (item 2.7). As partículas foram armazenadas a temperatura 7 °C ao abrigo de luz (em vidros âmbar de 30 mL).

## 2.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A morfologia das partículas foi obtida por MET utilizando um microscópio JEOL modelo JEM -1011 (Tóquio, Japão) operando a 80 kV. As soluções contendo as nanopartículas foram previamente diluídas em água ultrapura Milli-Q® (1:5 respectivamente), cerca de 5 µL de cada amostra foi depositada sobre *grids* de cobre (200 mesh) revestidas sobre uma fina

camada de carbono. Após secagem à temperatura ambiente por 24 h, os *grids* foram observados no microscópio.

## 2.10 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO

A distribuição de tamanho foi obtida por análise das micrografias com auxílio do *software Quantikov Image Analyzer* e através da análise por DLS em equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), conforme descrito no item 2.5.

## 2.11 ANÁLISES TÉRMICAS

### 2.11.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas para as nanopartículas, amostras controle (não revestidas com quitosana), óleo essencial da alfavaca africana quimiotipo geraniol, geraniol e demais compostos utilizados na formação das partículas na forma pura, em equipamento Multi-cell DSC (TA instruments, New Castle, Estados Unidos). A análise foi executada com uma referência e três amostras simultâneas, em cadinhos de Hastelloy® com tampa selados com anéis de vedação para evitar a perda de voláteis. Para cada amostra, 100 mg foram aquecidas nos cadinhos a uma taxa de 2 °C/min com rampa de aquecimento de -20 a 150 °C. Para as partículas em solução aquosa o cadinho de referência continha água, para os demais compostos o cadinho de referência estava vazio.

### 2.11.2 Análises termogravimétricas

As análises foram realizadas em equipamento TGA-50 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Aproximadamente 10 mg das amostras, previamente secas, foram aquecidas em panela de platina a uma taxa de 10 °C/min entre 25 e 600 °C, com um fluxo de nitrogênio de 40 mL. min<sup>-1</sup>.

## 2.12 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Os espectros no infravermelho foram obtidos na região entre 4000 e 650  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 1  $\text{cm}^{-1}$  utilizando um instrumento Frontier FT-IR/NIR (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). Todas as leituras foram realizadas à temperatura ambiente.

## 2.13 ANÁLISES ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o software STATISTICA (versão 7.0, 2004 StatSoft Inc. EUA). Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de cada tratamento. Sendo aplicada análise de variância e posteriormente, Teste de Tukey para determinar as diferenças entre as médias. Os valores de  $p$  menores do que 0.05 foram considerados significativamente diferentes.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

Diferentes fatores interferem na estabilidade das suspensões coloidais, por isso, é relevante que se tenha conhecimento de características como diâmetro médio das partículas, potencial zeta, índice de polidispersão, eficiência de encapsulação e outros parâmetros físico- químicos que possam ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais (SCHAFFAZICK et al., 2003). A estabilidade das partículas foi alcançada monitorando-se o tamanho das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação e atividade antioxidante nos tempos 1, 30 e 60 dias. As partículas foram armazenadas a temperatura de 7 °C em frascos de cor âmbar.

##### 3.1.1 Diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão

O diâmetro médio das partículas foi monitorado no transcorrer de 60 dias de armazenamento, através da técnica de DLS, onde obteve-se valores entre 173 a 229,9 nm (Tabela 8).

Tabela 8 - Diâmetro médio das partículas obtidos por DLS no período de 60 dias

<b>Amostra</b>	<b>1 dia (nm)</b>	<b>30 dias (nm)</b>	<b>60 dias (nm)</b>
PGE	188,3±19,15 <sup>b,A</sup>	218,6±26,6 <sup>a,A</sup>	228,8±8,08 <sup>a,b,A</sup>
PGE Q	174,3±3,2 <sup>a,A</sup>	197,8±3,45 <sup>a,A</sup>	193,8±19,23 <sup>a,A</sup>
ALGE	173 ±14,7 <sup>b,A</sup>	225,9±18,3 <sup>a,A</sup>	229,9±13,15 <sup>a,A</sup>
ALGE Q	177 ±16 <sup>a,A</sup>	198,6±0,91 <sup>a,A</sup>	197,0 ±24,7 <sup>a,A</sup>
Branco	208,93±5,44 <sup>a,A</sup>	187,23±3,4 <sup>a,A</sup>	186,35±8,89 <sup>a,A</sup>

<sup>a</sup> Letras diferentes nas linhas são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). <sup>A</sup> Letras diferentes em colunas são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Os resultados são expressos como médias de três determinações ± desvio padrão.

Fonte: Próprio autor.

Partículas sem revestimento de quitosana contendo geraniol (PGE) apresentaram aumento de tamanho ( $p < 0,05$ ) no decorrer

do dia 1 ao dia 30 de armazenamento. Entretanto, dos 30 aos 60 dias de armazenamento não houve alteração ( $p < 0,05$ ) no diâmetro médio das partículas. As partículas contendo geraniol com revestimento de quitosana (PGE Q) não evidenciaram aumento de tamanho ( $p < 0,05$ ) durante o período de armazenamento estudado. Comportamento análogo foi observado nas partículas contendo óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo geraniol (ALGE e ALGE Q) que não demonstraram uma diferença de tamanho ( $p < 0,05$ ) ao longo do armazenamento.

Nas diferentes formulações verificou-se que em cada tempo de armazenamento (1, 30 e 60 dias) não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no diâmetro médio entre si. O revestimento com quitosana e a utilização do óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. não alteraram ( $p < 0,05$ ) o tamanho das partículas.

Yegin e colaboradores (2015) desenvolveram nanopartículas de geraniol, pelo método de nanoprecipitação, usando o copolímero tribloco Pluronic F-127. No estudo apresentado por estes autores, diferentes quantidades de geraniol foram avaliadas, onde obtiveram diâmetros variando de 25 a 412 nm. Tendo formulações com diâmetro médio das partículas entre 155 a 290 nm, valores semelhantes ao do presente trabalho. Essa variação de tamanho pode ser explicada pelo fato de no método de nanoprecipitação fatores como: a natureza e concentração do polímero na fase orgânica, polaridade do solvente, natureza e proporção de fases interna/externa serem relevantes na determinação do tamanho das nanopartículas (ZILLI; SFAR; FESSI, 2005).

Tabela 9 - Índice de polidispersão das partículas obtidos por DLS no período de 60 dias

Amostra	1 dia	30 dias	60 dias
PGE	0,138± 19,15 <sup>a,A,B</sup>	0,157±26,6 <sup>a,A,B</sup>	0,162±8,08 <sup>a,A,B</sup>
PGE Q	0,183±3,2 <sup>a,A</sup>	0,192±3,45 <sup>a,A</sup>	0,202± 19,23 <sup>a,C</sup>
ALGE	0,131 ± 14,7 <sup>a,B</sup>	0,150± 18,3 <sup>a,B</sup>	0,160± 13,15 <sup>a,A,B</sup>
ALGE Q	0,184 ± 16 <sup>a,A</sup>	0,197± 0,91 <sup>a,A</sup>	0,194± 24,7 <sub>a,B,C</sub>
Branco	0,210±0,0014 <sup>a,C</sup>	0,220±0,012 <sup>a,C</sup>	0,225±0,01 <sup>a,C</sup>

<sup>a</sup> Letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). <sup>A</sup> Letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Os resultados são expressos como médias de três determinações ± desvio padrão. Fonte: Próprio autor.

Para os resultados de IP das nanopartículas (Tabela 9) obteve-se, valores inferiores a 0,250, variando de 0,131 a 0,224, o que demonstra uma dispersão estreita. Segundo Calvo e colaboradores (1997) o índice de polidispersão é um parâmetro empregado com a finalidade de conferir a homogeneidade na distribuição do tamanho das partículas, valores de IP inferiores a 0,200 indicam dispersões colidais sem formação de aglomerados ou precipitados, garantindo assim a estabilidade das partículas. No presente estudo foram encontrados valores dentro deste intervalo, com exceção das partículas vazias (1 dia, 30 dias e 60 dias de armazenamento) e PGE Q com 60 dias de armazenamento. As partículas não obtiveram diferença ( $p < 0,05$ ) em seus valores de IP no transcorrer do armazenamento.

Quando comparadas as diferentes formulações no mesmo período de armazenamento, não se verificou diferença ( $p < 0,05$ ) entre as partículas com composto ativo nos primeiros 30 dias. Aos 60 dias de armazenamento ocorreu um aumento no IP das partículas que continham revestimento de quitosana ( $p < 0,05$ ). Através dos valores obtidos pode-se verificar que as partículas vazias apresentaram valores mais altos de IP, diferindo ( $p < 0,05$ ) das demais formulações durante os 30 dias de armazenamento, ratificando que a presença tanto do composto puro, geraniol, como o óleo essencial colaboraram para uma melhor polidispersão das partículas. Valores de IP inferiores a 0,200 sugerem também que as dispersões são monodispersas.

### 3.1.2 Potencial Zeta

O potencial zeta das partículas apresentaram valores positivos em uma faixa entre +22 e 37 mV (Tabela 10).

Tabela 10 - Potencial zeta das partículas obtidos por DLS no período de 60 dias

<b>Amostra</b>	<b>1 dia (mV)</b>	<b>30 dias (mV)</b>	<b>60 dias (mV)</b>
Pge	+28,2±19,15 <sup>a,A,B</sup>	+28,5±26,6 <sup>a,A,B</sup>	+23,63±8,08 <sup>b,A</sup>
Pge Q	+36,2 ±3,2 <sup>a,C</sup>	+32,3±3,4 <sup>a,A,B</sup>	+36,10± 19,23 <sup>a,B</sup>
Alge	+26,43 ± 14,7 <sup>a,A</sup>	+22,6± 18,3 <sup>b,A</sup>	28,3± 13,15 <sup>a,A</sup>
Alge Q	+35,26±16 <sup>a,B,C</sup>	+31,6± 0,9 <sup>a,B</sup>	36,13± 24,7 <sup>a,B,C</sup>
Branco	+36,2 ± 5,4 <sup>a,C</sup>	36,8± 8,9 <sup>a,C</sup>	+37,2± 8,9 <sup>a,C</sup>

<sup>a</sup> Letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). <sup>A</sup> Letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Os resultados são expressos como médias de três determinações ± desvio padrão  
Fonte: Próprio autor.

As partículas contendo revestimento de quitosana apresentaram valores superiores ( $p < 0,05$ ) às sem revestimento em nos tempos 1 e 60 dias. Os valores do potencial zeta destas partículas foram superiores a +30mV, demonstrando maior estabilidade, uma vez que, potenciais superiores a ±30 mV certificam uma boa estabilidade coloidal de suspensões, devido à barreira de alta energia entre as partículas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Com relação aos valores apresentarem cargas positivas, desempenho semelhante foi encontrado por Luo e colaboradores (2011) que obtiveram valores positivos após revestimento de quitosana em partículas de zeína contendo  $\alpha$ -tocoferol. Segundo os autores, o aumento do potencial zeta após revestimento por quitosana confirma o revestimento do mesmo.

### 3.1.3 Eficiência de encapsulação

Os resultados para eficiência de encapsulação estão expressos na Tabela 11, e apresentaram valores superiores a 95 %, o que demonstra forte afinidade entre o material de parede e o encapsulado.

Tabela 11 - Eficiência de encapsulação para partículas carregadas de geraniol e óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo geraniol

Amostra	1 dia (%)	30 dias (%)	60 dias (%)
Pge	98,61 ± 0,36 <sup>a,A</sup>	98,11±2,54 <sup>a,C</sup>	99,34±0,35 <sup>a,A</sup>
Pge Q	97,21 ± 2,03 <sup>b,A</sup>	95,05±0,4 <sup>a,A,B</sup>	99,72±0,26 <sup>b,A</sup>
Alge	98,07 ± 1,14 <sup>a,A</sup>	97,7±0,24 <sup>a,A</sup>	99,54± 0,7 <sup>a,A</sup>
Alge Q	99,8 ± 0,23 <sup>a,A</sup>	97,15±0,10 <sup>b,A,B</sup>	99,81± 0,34 <sup>a,A</sup>

<sup>a</sup> Letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). <sup>A</sup> Letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Os resultados são expressos como médias de três determinações ± desvio padrão  
Fonte: Próprio autor

A relação entre os valores do tempo de armazenamento inicial (1 dia) e final (60 dias), implicam, que as diferentes formulações não demonstraram diferença quando comparadas entre si. Ocorreu uma diminuição na eficiência de encapsulação ( $p < 0,05$ ) das partículas Pge Q e Alge Q aos 30 dias de armazenamento. Entretanto, nos tempos 1 e 60 dias não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em relação a sua EE.

Algumas propriedades físico-químicas dos compostos envolvidos na nanoencapsulação podem afetar de forma direta a encapsulação. Polaridade e lipofilicidade do composto a ser encapsulado, são exemplos de alguns fatores interferentes (STELLA et al., 2007; AMELLER et al, 2003). Levando em consideração tais aspectos e que os resultados obtidos para a EE no presente estudo não diferiram ( $p < 0,05$ ) entre as formulações no tempo inicial e final de armazenamento, pode-se pressupor que as diferenças estruturais existentes entre as formulações não afetaram de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a EE das partículas.

### 3.1.4 Atividade antioxidante por DPPH

Na Tabela 12 estão os valores obtidos para a atividade antioxidante por DPPH das nanopartículas vazias e carregadas de óleo essencial e seu composto majoritário, tendo-se os valores expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH.

Tabela 12 - Atividade antioxidante para partículas carregadas de geraniol e óleo essencial da alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) quimiotipo geraniol

<b>Amostra</b>	<b>1 dia (%)</b>	<b>30 dias (%)</b>	<b>60 dias (%)</b>
Pge	48,6 ± 3,13 <sup>b,B,C</sup>	10,8 ± 0,58 <sup>a,A</sup>	10 ± 0,48 <sup>a,A</sup>
Pge Q	50,19 ± 4,20 <sup>b,C</sup>	12,11 ± 0,97 <sup>a,A</sup>	11,8 ± 1,22 <sup>a,A</sup>
Alge	31,59 ± 5,93 <sup>b,A,B</sup>	12,50 ± 0,72 <sup>a,A</sup>	10,7 ± 0,95 <sup>a,A</sup>
Alge Q	23,13 ± 9,05 <sup>b,A</sup>	12,98 ± 0,55 <sup>a,A</sup>	11,55 ± 1,73 <sup>a,A</sup>
Branco	4,02 ± 1,22 <sup>c,D</sup>	2,51 ± 0,33 <sup>c,B</sup>	2,30 ± 0,89 <sup>c,B</sup>

<sup>a</sup> Letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). <sup>A</sup> Letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Os resultados são expressos como médias de três determinações ± desvio padrão  
Fonte: Próprio autor.

Os valores obtidos para atividade antioxidante nas partículas carregadas, no tempo inicial, foram superiores ( $p < 0,05$ ) às mesmas partículas nos tempos 30 e 60 dias. Uma explicação para esse comportamento seria o fato de, no tempo inicial, a dispersão apresentar mais compostos ativos na forma livre ainda com sua estrutura ativa, com o decorrer do tempo os compostos não encapsulados perderiam sua atividade antioxidante. Obtendo-se como resultado ao longo do armazenamento (30 e 60 dias) percentuais de inibição do radical DPPH apenas dos compostos encapsulados.

Pode-se observar que no tempo inicial, onde as partículas apresentam maior atividade antioxidante, as partículas contendo geraniol na forma isolada possuem maior capacidade em reduzir os radicais livres ( $p < 0,05$ ). A capacidade inibitória dos radicais DPPH das diferentes formulações foram superiores aos encontrados por Scherer e colaboradores (2009), que verificaram a ausência na capacidade de inibição do radical DPPH em óleo essencial de palma rosa (que possuía geraniol como composto

majoritário), mesmo na maior concentração final avaliada (800 g mL<sup>-1</sup>).

### 3.2 MORFOLOGIA

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é amplamente empregada para a obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas, podendo permitir também a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas (SCHAFFAZICK et al., 2003). Através das micrografias (Figuras 12, 13, 14 e 15) observou-se que as morfologias das partículas apresentaram formato esférico, com bordas bem definidas e sem rugosidades. Nas diferentes nanopartículas algumas regiões apresentam “redes” de menor contraste que uniam as nanopartículas, estas redes possivelmente indicam excesso de surfactante, condição que pode ser melhorada em novas formulações.

Figura 12 - Micrografias obtidas por MET para as partículas PGE. Onde A está com uma magnificação de 5.000 vezes, B e C em 30.000 vezes e D de 200.000 vezes.

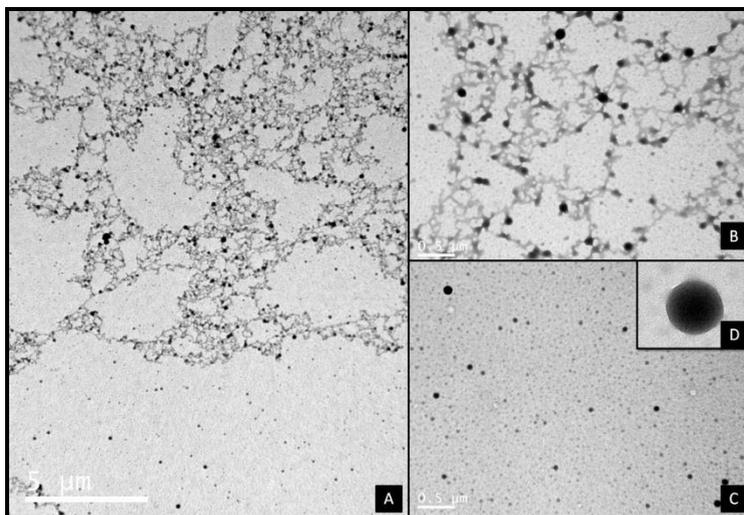


Figura 13 - Micrografias obtidas por MET para as partículas PGE Q. Onde A está com uma magnificação de 5.000 vezes, B e C em 30.000 vezes e D de 200.000 vezes

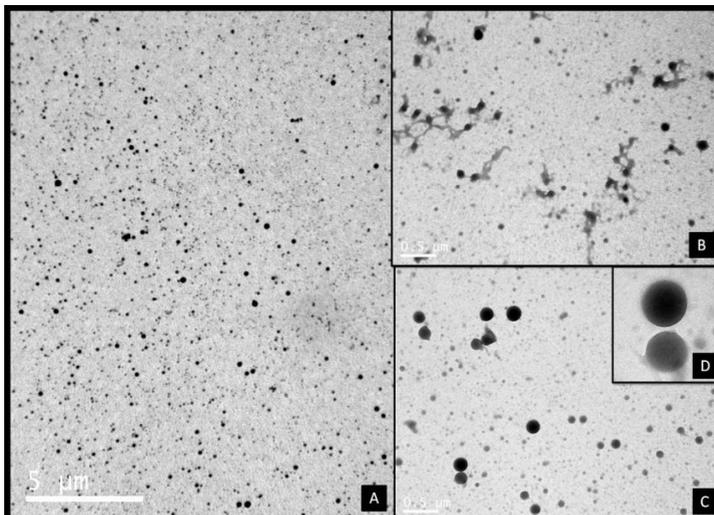


Figura 14 - Micrografias obtidas por MET para as partículas ALGE. Onde A está com uma magnificação de 5.000 vezes, B e C em 30.000 vezes e D de 200.000 vezes

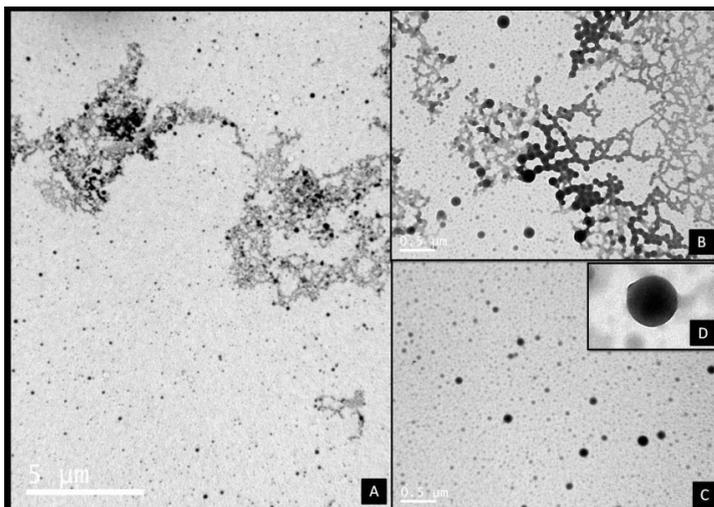
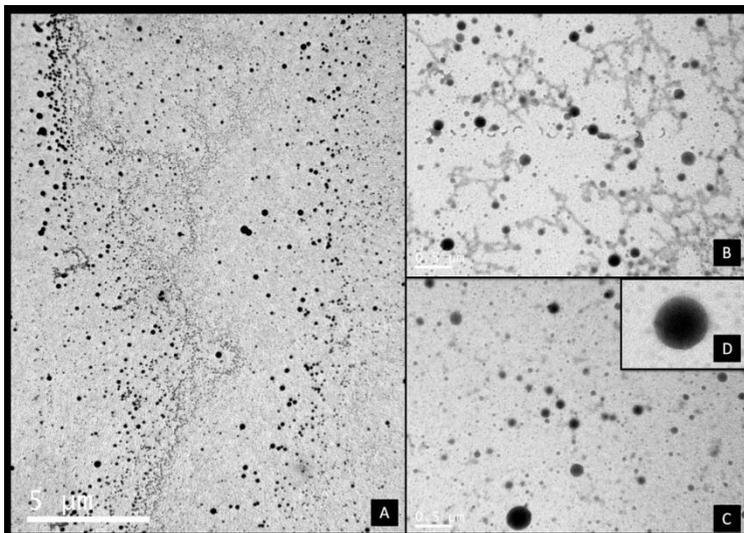


Figura 15 - Micrografias obtidas por MET para as partículas ALGE Q. Onde A está com uma magnificação de 5.000 vezes, B e C em 30.000 vezes e D de 200.000 vezes



As micrografias com maior magnificação, cerca de 150.000 a 200.000 vezes, indicam que as partículas apresentam uma borda e um núcleo, o que pode ser interpretado que as nanopartículas possam ser do tipo nanocapsulas, como pode ser observado nas Figuras 16,17,18 e 19 que representam as partículas PGE, PGE Q, ALGE e ALGE Q, respectivamente.

Figura 16 - Micrografias obtidas por MET para as partículas PGE, com magnificação de 200.000 vezes

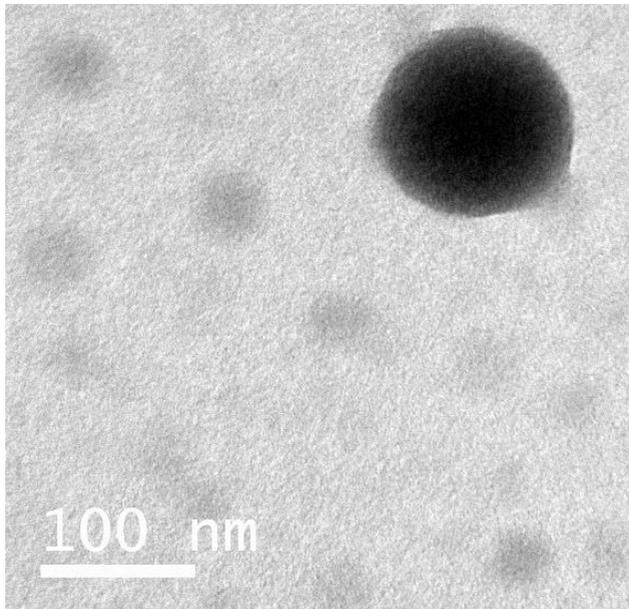


Figura 17- Micrografias obtidas por MET para as partículas PGE Q, com magnificação de 200.000 vezes

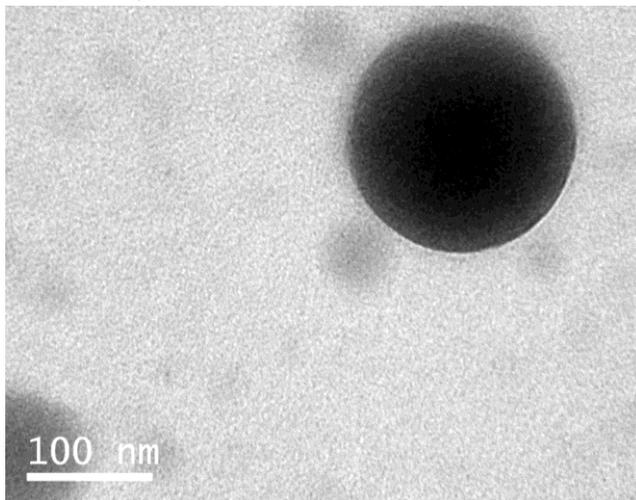


Figura 18 - Micrografias obtidas por MET para as partículas ALGE, com magnificação de 200.000 vezes

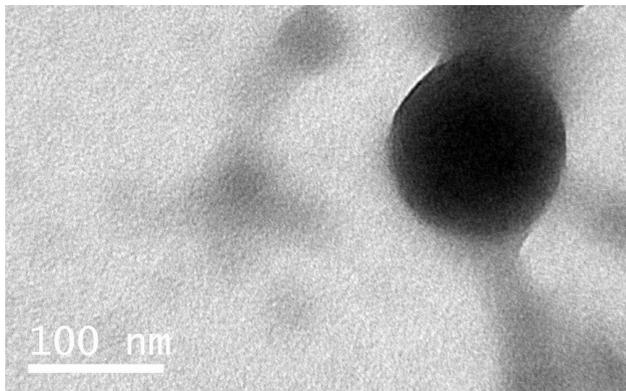
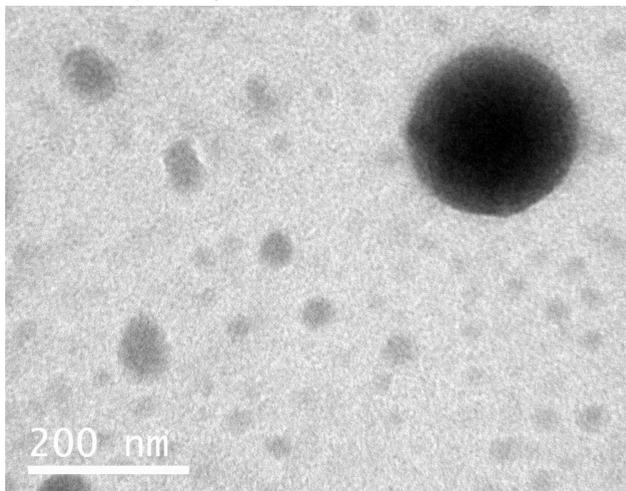


Figura 19 - Micrografias obtidas por MET para as partículas ALGE Q, com magnificação de 200.000 vezes



### 3.3 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO

As distribuições das partículas determinadas por MET e DLS demonstraram que em ambas as técnicas, as partículas se encontram em escala nanométrica (Tabela 8).

Tabela 13 - Diâmetro médio das partículas no tempo inicial (1 dia) por DLS e MET

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro médio (nm) DLS</b>	<b>Diâmetro médio (nm) MET</b>
Pge	188,3± 19,15	112,8 ± 93,6
Pge Q	174,3±3,2	101,7±150,4
Alge	173 ± 14,7	117,31±142
Alge Q	177 ±16	95,07±115,75

Fonte: Próprio autor.

Comparando as médias obtidas pelas diferentes técnicas pode-se verificar que as médias do diâmetro médio das partículas por MET apresentam tamanhos inferiores para todas as formulações, quando comparadas às obtidas por DLS. O mesmo pode ser verificado no estudo realizado por Bootz e colaboradores (2003) que obtiveram diâmetro médio de 190 nm pela técnica de DLS e 167 nm quando analisadas por MEV, em nanopartículas de poli -cianoacrilato de butila. Essa diferença de tamanho pode ser atribuída ao fato de a microscopia eletrônica de transmissão ou varredura fornecem uma imagem da partícula isolada do meio, enquanto a espectroscopia de correlação de fótons possibilita a determinação do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão.

As Figuras 20, 21, 22 e 23 ilustram os histogramas de diâmetro médio das nanopartículas obtidas por TEM, através da medição manual utilizando *software Quantikov Image Analyzer*, onde foram medidas em diferentes micrografias 215 nanopartículas de cada formulação (PGE, PGE Q, ALGE e ALGE Q). Através das imagens pode-se observar que as diferentes formulações apresentaram comportamento de distribuição de probabilidade unimodal, ou seja, apresentam uma única moda o que demonstra uma homogeneidade na distribuição de frequência.

Figura 20 - Histograma de distribuição de tamanho pela frequência das nanopartículas de geraniol encapsuladas por zeína (PGE)

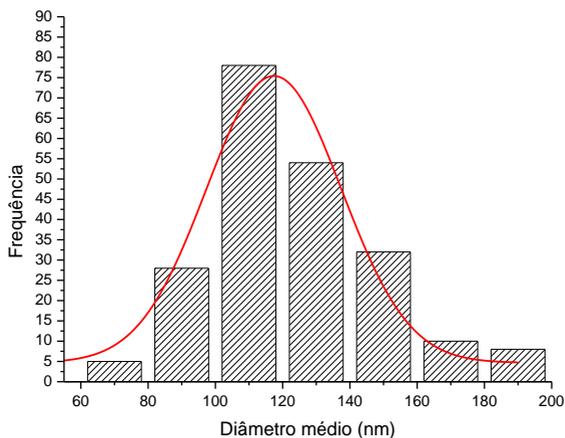


Figura 21 - Histograma de distribuição de tamanho pela frequência das nanopartículas de geraniol encapsuladas por zeína revestidas com quitosana (PGE Q)

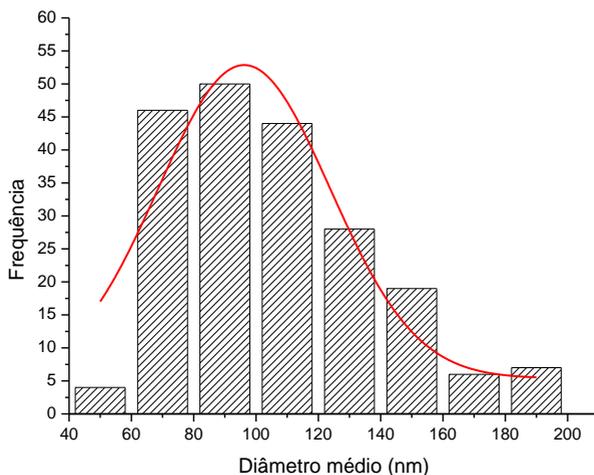


Figura 22 - Histograma de distribuição de tamanho pela frequência das nanopartículas de óleo essencial alavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) encapsuladas por zeína (ALGE)

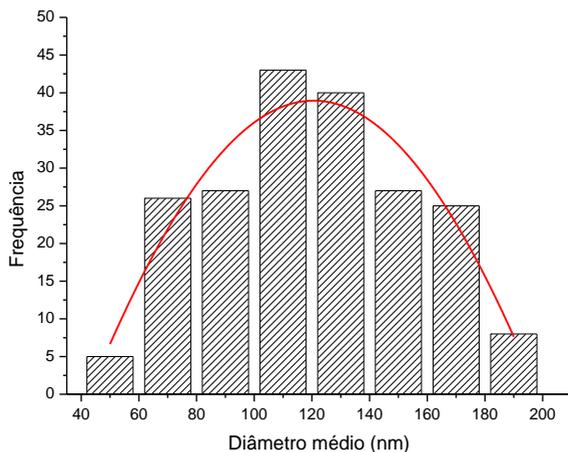
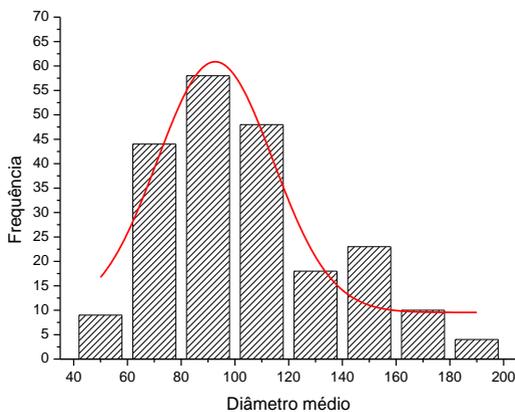


Figura 23 - Histograma de distribuição de tamanho pela frequência das nanopartículas de óleo essencial alavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) encapsuladas por zeína revestidas com quitosana (ALGE Q)



### 3.4 ANÁLISES TÉRMICAS

#### 3.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Nos termogramas das partículas carregadas e vazias não foram encontradas transições térmicas relevantes que pudessem confirmar tais interações, uma justificativa para tal comportamento pode ser atribuída a alguma limitação de sensibilidade do equipamento, uma vez que, nas análises termogravimétricas (item 3.5.6) foram observadas interações térmicas entre os compostos. Na Tabela 13 e anexo F estão listadas as transições térmicas obtidas nos compostos puros formadores das partículas obtidas neste estudo.

Tabela 14 - Parâmetros do DSC para zeína, quitosana, geraniol e óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo geraniol

Amostra	$T_f$ (°C)	Onset (°C)	Endset (°C)	$\Delta H_f$ (Jg <sup>-1</sup> )
Zeína	53,83	45,87	61,31	1,717
Quitosana	58,67	58,33	60,44	--
Geraniol	- 15,06	-16,84	-9,26	0,717
OE geraniol P1*	- 20,24	-20,90	-15,14	0,177
OE geraniol P2*	- 11,86	-15,14	-7,30	0,1697

P1\* e P2\* são referentes ao pico 1 e pico 2, respectivamente.

Fonte: Próprio autor.

#### 3.4.2 Análises termogravimétricas

As análises térmicas estudam a perda de massa das amostras em função da temperatura, possibilitando a avaliação da estabilidade térmica das mesmas. Conforme a Tabela 14 e ANEXO E pode-se observar que tanto o material encapsulado (óleo essencial *Ocimum gratissimum* L quimiotipo geraniol e o geraniol na forma isolada) quanto as partículas recheadas com estes compostos apresentaram apenas um pico de perda de massa. A encapsulação pode ser comprovada pelo aumento de

temperatura das partículas em relação à temperatura da zeína pura, evidenciando que ocorreram interações entre os compostos (da ROSA et al., 2015). As partículas apresentaram temperatura inferiores ao óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L quimiotipo geraniol e geraniol na forma pura, o que pode indicar segundo Woranuch e Yoksan (2012) uma perda na estabilidade térmica dos compostos encapsulados.

Tabela 15 - Parâmetros do TGA para zeína, quitosana, geraniol e óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo geraniol assim como suas partículas.

Amostra	Transições térmicas			
	Primeiro estágio de perda de massa (°C)	Segundo estágio de perda de massa (°C)	Perda de massa 1 (%)	Perda de massa 2 (%)
Zeína	44,57	304,20	4,71	70,92
Quitosana	86,33	307,37	21,49	41,181
Geraniol	200	--	86,73	--
OE ALGE	186	--	82,80	--
PGE	126	--	87,52	--
PGE Q	116,6	413,38	71,9	17,65
ALGE	113,06	--	87,5	--
ALGE Q	111,6	--	88,9	--

Fonte: Próprio Autor

### 3.5 INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

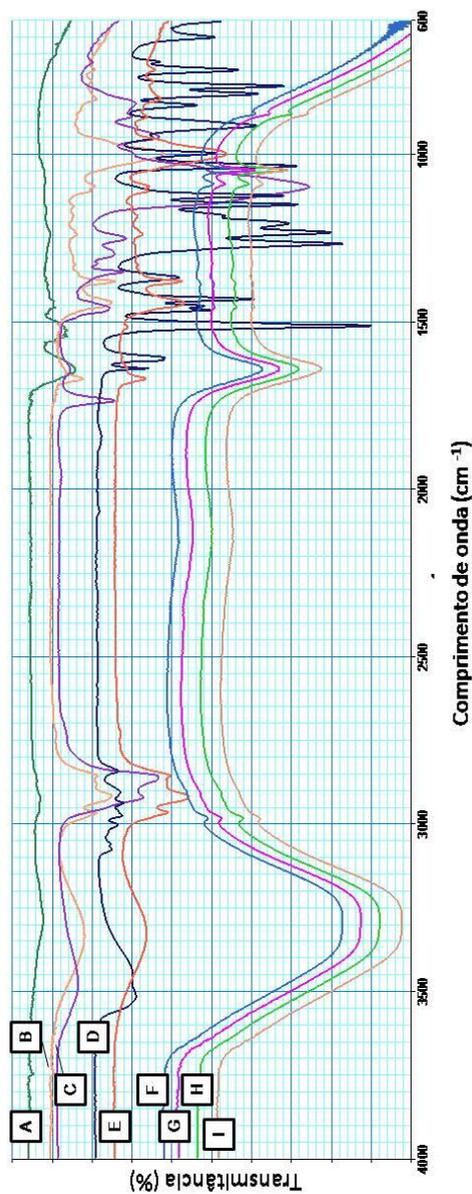
Com a finalidade de observar as interações estruturais das partículas e confirmar a encapsulação do geraniol e óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L quimiotipo geraniol, foram realizadas as espectroscopias no infravermelho (IR) das partículas em suspensão, assim como de seus principais constituintes, representados na Figura 24.

Nos espectros da zeína (Figura 24A), quitosana (Figura 24B), geraniol (Figura 24C) e óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L quimiotipo geraniol (Figura 24C) as bandas de hidrogênio são observadas em 3200, 3480, 3680 e 3500  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Entretanto, após a formação das partículas, houve mudança nas bandas referentes às ligações de hidrogênio

apresentando picos em  $3307\text{ cm}^{-1}$  para as diferentes formulações. As ligações de hidrogênio podem ter sido formadas entre o grupamento amida relacionados à glutamina da zeína e grupos hidroxila existentes no geraniol e óleo essencial *Ocimum gratissimum* L quimiotipo geraniol. Como a quitosana apresenta ambos grupamentos, amina e hidroxila, as ligações de hidrogênio podem ser facilmente formadas entre o geraniol, óleo essencial, zeína e quitosana (LUO et al., 2011).

Outra região de interesse foi a situada entre as bandas  $1500$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  relacionadas aos grupos amina I e II. O espectro da zeína apresentou banda em  $1642\text{ cm}^{-1}$ , quitosana  $1670\text{ cm}^{-1}$ ,  $1630$  e  $1670\text{ cm}^{-1}$  para geraniol e óleo essencial quimiotipo geraniol, respectivamente. Essas bandas foram deslocadas para  $1640\text{ cm}^{-1}$ , evidenciando a interação eletrostática entre a zeína, quitosana e os compostos encapsulados (LUO et al., 2011).

Figura 24 - Espectro infravermelho com transformada de Fourier das partículas contendo geraniol e óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo geraniol encapsuladas com zeína e zeína revestidas por quitosana, assim como seus compostos na forma pura. Onde A é referente a zeína, B a quitosana, C tween 20, D geraniol, E óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo geraniol, F as partículas PGE, G as partículas ALGE e I referente as partículas ALGE Q.



## 4 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho, pode-se concluir que a morfologia das partículas de zeína e zeína revestidas com quitosana carregadas com óleo essencial da alfavaca africana (*Ocimum gratissimum* L.) quimiotipo geraniol e geraniol na sua forma pura, obtidas pelo método de nanoprecipitação apresentaram formato esférico e regular, apresentando distribuição unimodal, o que evidencia uma distribuição homogênea.

As partículas mantiveram a maioria de suas propriedades físico-químicas ao longo do tempo de armazenamento. A eficiência de encapsulação demonstrou forte interação entre o material de parede e os compostos ativos. As análises de TGA e espectroscopia no infravermelho indicaram a encapsulação dos compostos ativos, pelo fato de as partículas apresentarem comportamento distinto ao óleo essencial e compostos puros.

Pode-se concluir, também, que as partículas contendo OE *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo geraniol e as partículas contendo revestimento de quitosana não diferiram ( $p < 0,05$ ) das partículas controle, demonstrando que o revestimento com quitosana quanto a substituição do geraniol pelo OE, são medidas viáveis.

O presente estudo confirmou através dos resultados obtidos que as partículas de zeína e zeína revestidas com quitosana carregadas com óleos essenciais são estáveis físico-quimicamente. Sendo possível com otimizações do seu desenvolvimento e avaliação na liberação desses compostos da matriz polimérica, prever possíveis aplicações em matrizes alimentícias, assim como verificar sua capacidade antimicrobiana frente nestas matrizes.



## 5 REFERÊNCIAS

AMELLER, T. et al. Polyester-poly (ethylene glycol) nanoparticles loaded with the pure antiestrogen RU 58668: physicochemical and opsonization properties. **Pharmaceutical Research**, v.20, p. 1063–1070, 2003.

BOOTZ, A. et al. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.57, p.369-375, 2003.

BRAND-WILLIAMS, M.E.; CUVÉLIER, C.; BERSER, Use of a free radical method to evaluate antioxidant, **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. **International Journal Food Microbiology**. V 94, nº3, p.223-253, 2004.

CALVO P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. **Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 1431-1436, 1997.

CHEN, W., VILJOEN, A. Geraniol—A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, p.643–651, 2010.

DA ROSA, C. G. et al. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v 481, p.337–344, 2015.

DAVIDSON, P.M., CRITZER, F.J., TAYLOR, T.M. Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods. **Food Science and Technology**, V. 4, p.163 -190, 2013.

GUINEBRETIERE, S. et al. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. **Materials Science and Engineering C**, v. 21, p. 137-142, 2002.

HILL, L.E., GOMES, C., TAYLOR, T.M., Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils, trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark extract, and clove bud extracts for antimicrobial delivery applications **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, p.86-93, 2013.

LAPCZYNSKI, A. et al. Fragrance material review on geraniol. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.160–170, 2008.

LUO, Y.; WANG, Q. Zein-Based Micro- and Nano-Particles for Drug and Nutrient Delivery: A Review. **Journal of Applied Polymer Science**, v, 131, 2014.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.

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

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIV, V. et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806 – 1815, 2011.

REIS, C.P. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, Vol. 26, No. 5, p.726-737, 2003.

SANGUANSRI, P., AUGUSTIN, M.A., Nanoscale materials development e a food industry perspective. **Trends Food Scienc. Technology**, v.7, p.547-556, 2006.

SHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, p.136–141.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009.

STELLA, B.; ARPICCO, S.; ROCCO, F. et al. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 71-77, 2007.

WEISS, J. et al. Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials **Food Science and Technology. Academic Press**, San Diego, p. 425-479, 2009.

YEGIN, Y. et al. Development and characterization of geraniol-loaded polymeric nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne bacterial pathogens. **Journal of Food Engineering**. V. 170 . p. 64-71, 2016.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly-  $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 261-267, 2005.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as nanopartículas poliméricas de zeína com e sem revestimento de quitosana, contendo óleos essenciais e seus principais constituintes foram preparadas com êxito pela técnica de nanoprecipitação.

O diâmetro médios das partículas desenvolvidas ficou em uma faixa de 145 à 245 nm, com índices de polidispersão inferiores a 0,226. Os valores para potencial zeta entre as diferentes formulações variaram entre + 21 e + 43mV, apresentando sempre carga positiva. As partículas contendo revestimento de quitosana, apresentaram maior potencial zeta, o que confirma o revestimento de quitosana nas partículas. Valores mais elevados deste potencial indicam também, maior estabilidade nas suspensões. O revestimento, não influenciou de forma significativa ( $p$  menores que 0,05) o diâmetro médio das partículas.

A eficiência de encapsulação das partículas demonstrou boa afinidade com material de parede, obtendo-se EE entre 89 e 99%.

Quando comparadas as partículas contendo OE com as partículas de seus respectivos compostos puros, não foram observadas diferenças nos parâmetros de estabilidade avaliados.

Com este estudo foi possível avaliar a estabilidade das partículas, onde nas diferentes formulações verificou-se que estas mantiveram-se estáveis, quanto aos parâmetros de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação.

As partículas contendo óleo essencial quimiotipo eugenol, assim como as partículas contendo apenas este composto, apresentaram maior atividade antioxidante por DPPH quando comparadas as partículas contendo o óleo essencial quimiotipo geraniol e seu composto na forma isolada.

A análise térmica de calorimetria exploratória diferencial não apresentou resultados satisfatórios para as amostras. As análises térmogravimétricas assim como a espectroscopia no infravermelho demonstraram a interação entre os compostos, indicando a encapsulação.

A técnica empregada conduziu a obtenção de nanopartículas esféricas, regulares, com evidências de estrutura capsular envolvendo o núcleo, observadas pelo microscópio eletrônico de transmissão.

Em suma o estudo contribuiu para que novas tecnologias sejam desenvolvidas no setor da nanotecnologia. Sendo necessários estudos com relação à capacidade antimicrobiana e antifúngica das nanopartículas, assim como, o perfil de liberação destas partículas, para futuras aplicações.

## **ANEXOS**



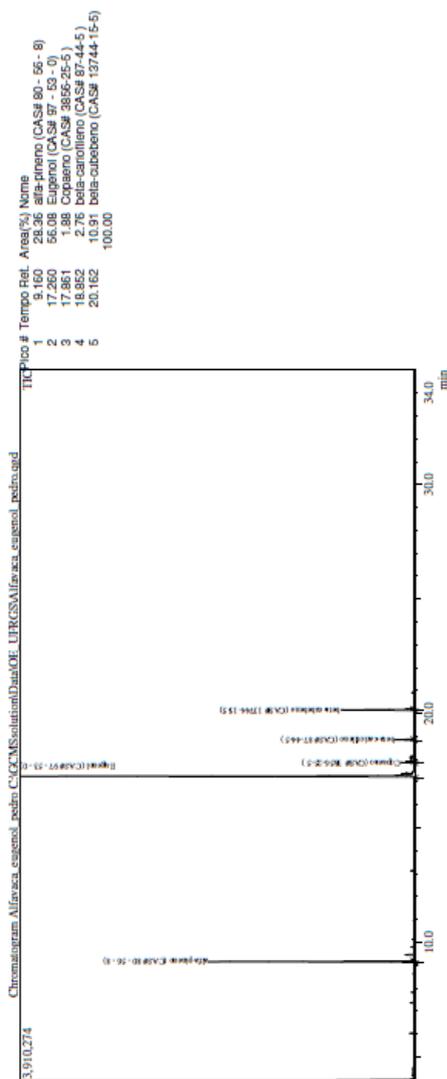
# ANEXO A: Cromatograma do óleo essencial da *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo eugenol



EPAGRI - EMPRESA DE PESQUISA AGROP. E EXT. RURAL DE SANTA CATARINA  
 Estação Experimental de Itajaí (EEI)  
 Unidade de Ensaios Químicos (UENQ)



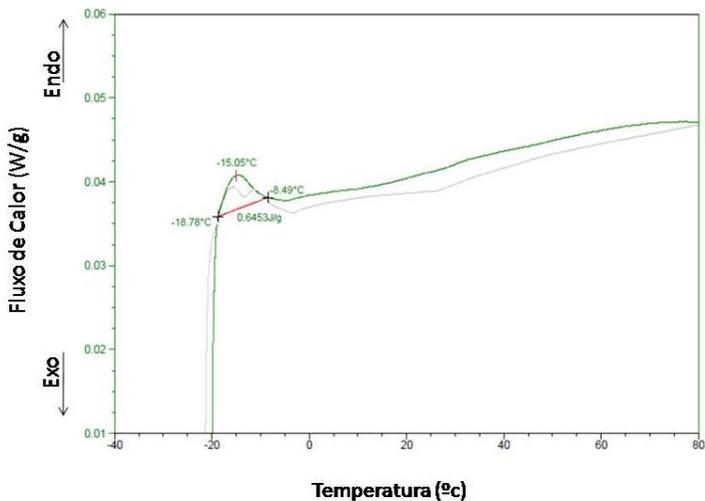
Amostra: Alfavaca Africana QT Eugenol (*Ocimum gratissimum*)



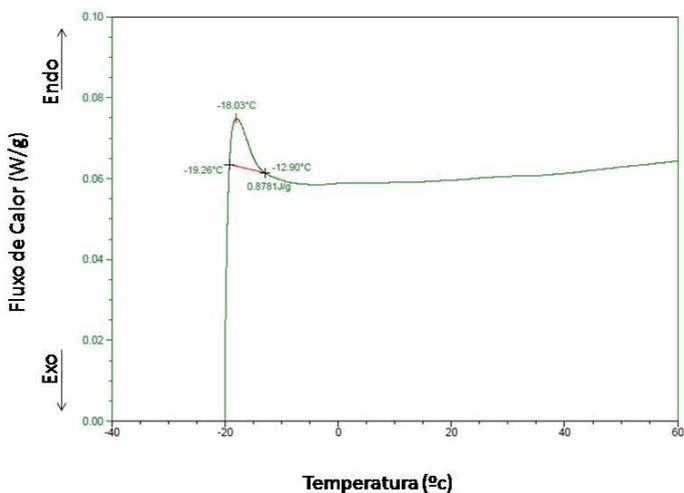


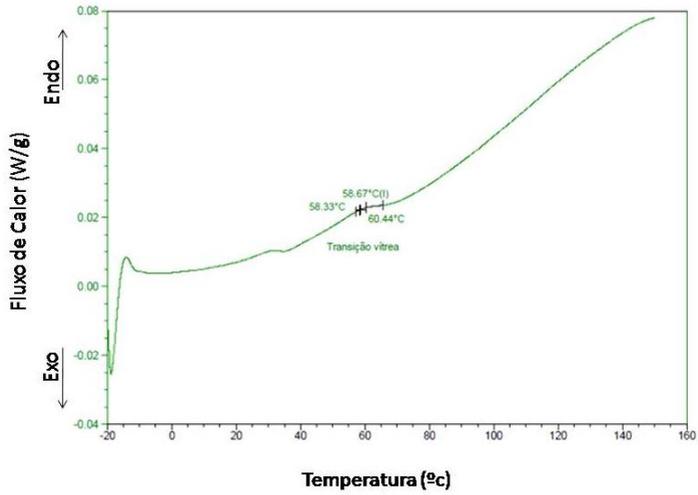
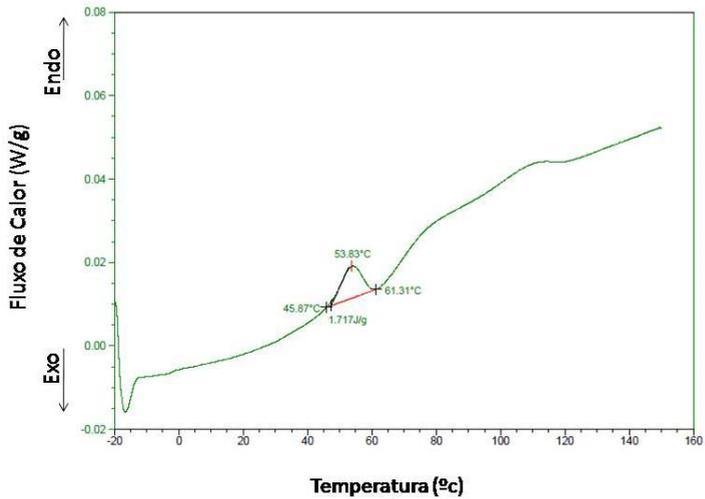
**ANEXO B:** Transições térmicas referentes ao óleo essencial *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo eugenol, eugenol, quitosana e zeína

**DSC – Óleo essencial alfavaca africana quimiotipo eugenol**

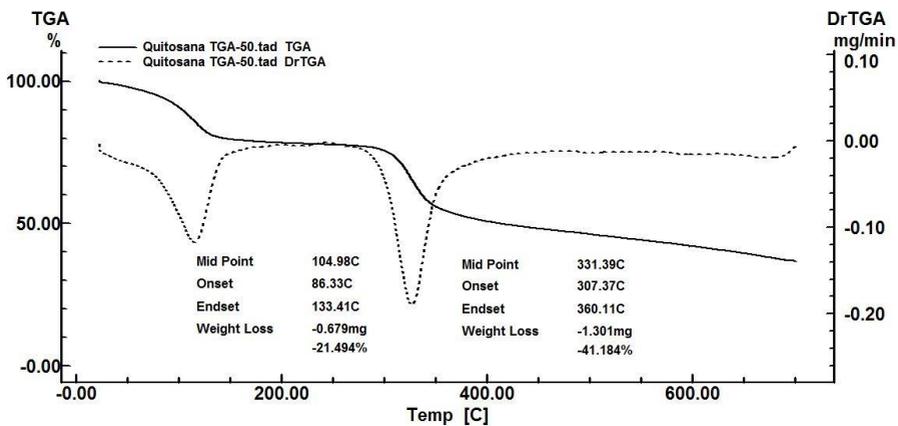
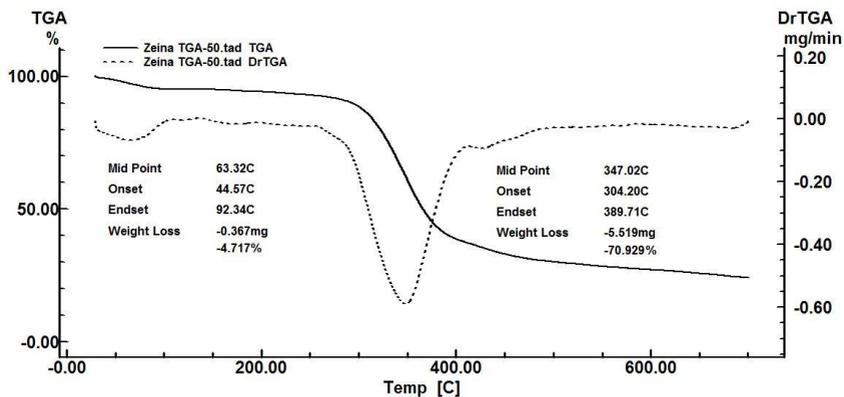


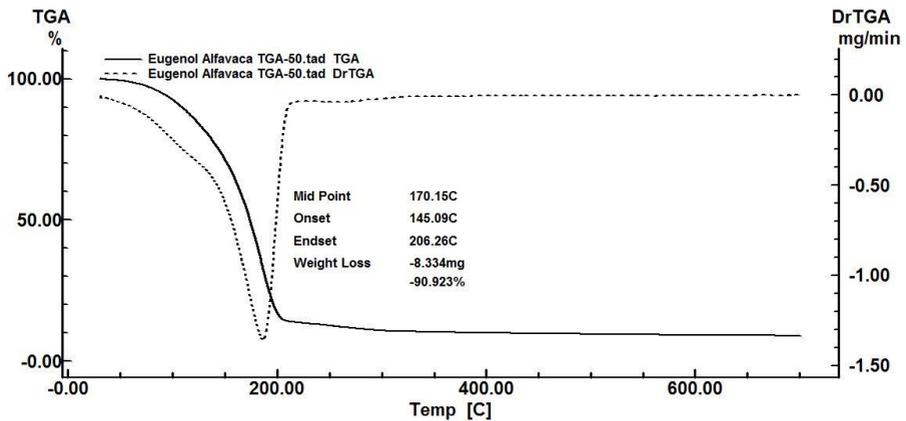
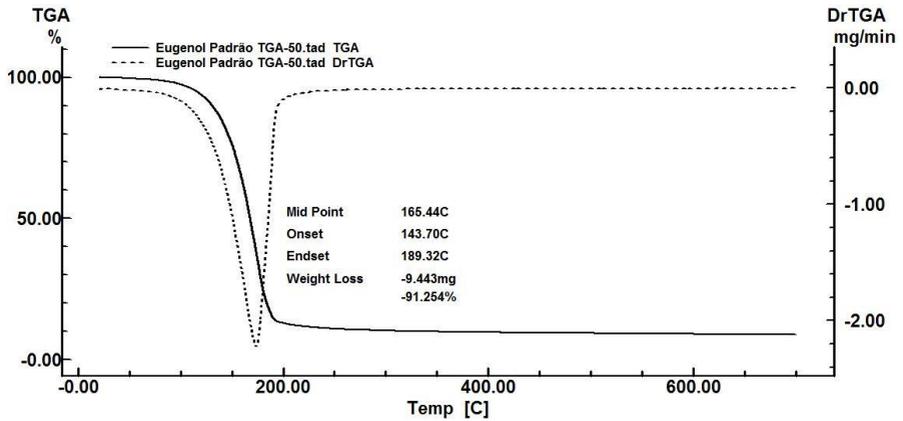
**DSC – Eugenol**

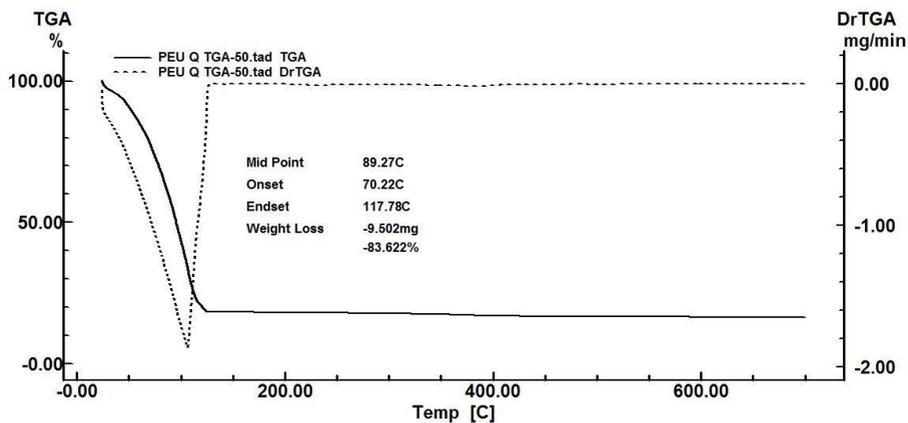
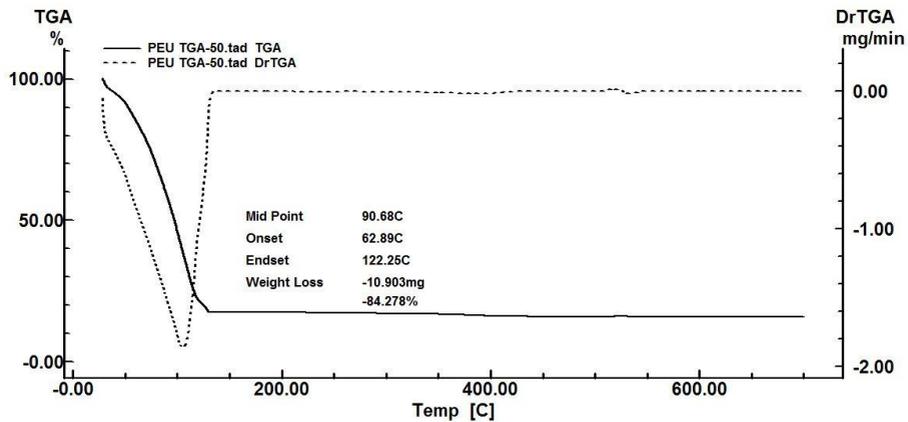


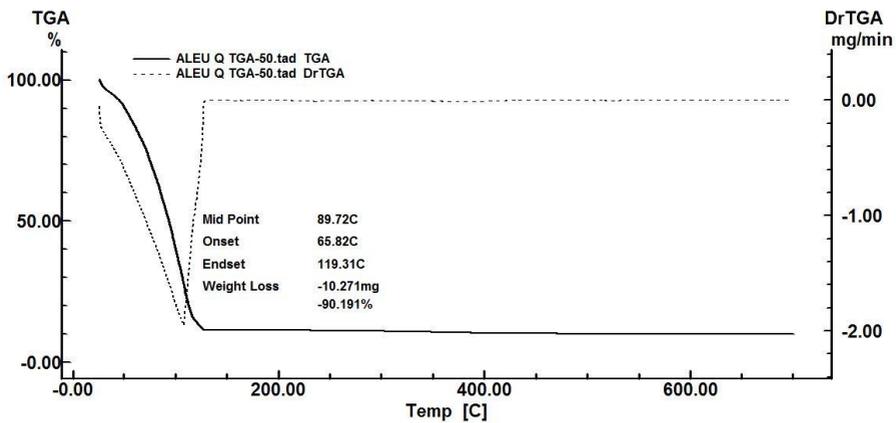
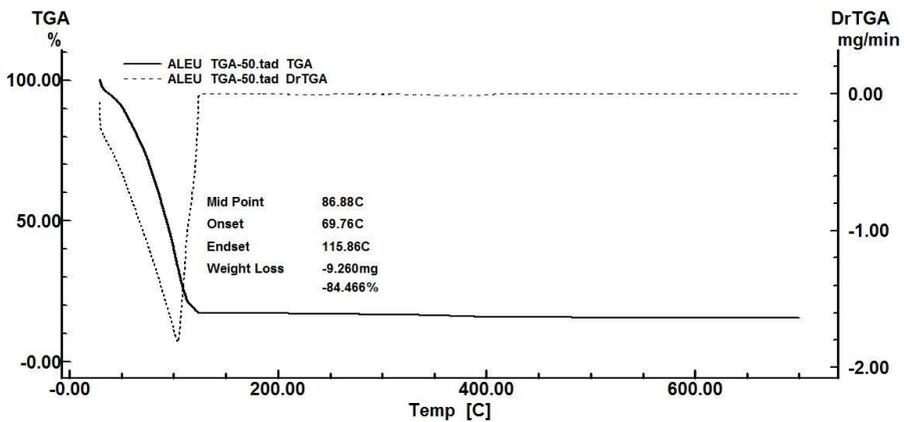
**DSC – Quitosana****DSC – Zeína**

**Anexo c:** termogramas de análise termogravimétrica (tga) referentes a zeína, quitosana, eugenol, óleo essencial alfavaca africana quimiotipo eugenol, partículas de eugenol e óleo essencial alfavaca quimiotipo eugenol.









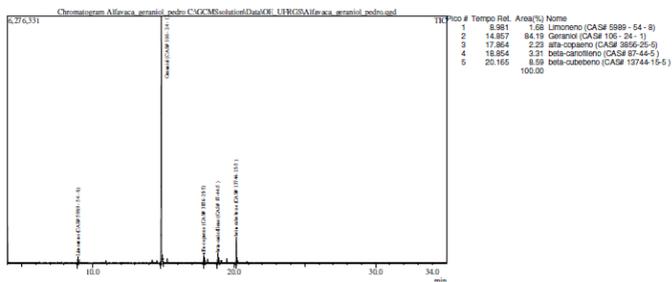
## ANEXO D: Cromatograma óleo essencial *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo geraniol



EPAGRI - EMPRESA DE PESQUISA AGROP. E EXT. RURAL DE SANTA CATARINA  
Estação Experimental de Itajaí (EEI)  
Unidade de Ensaios Químicos (UENQ)

**UENQ**

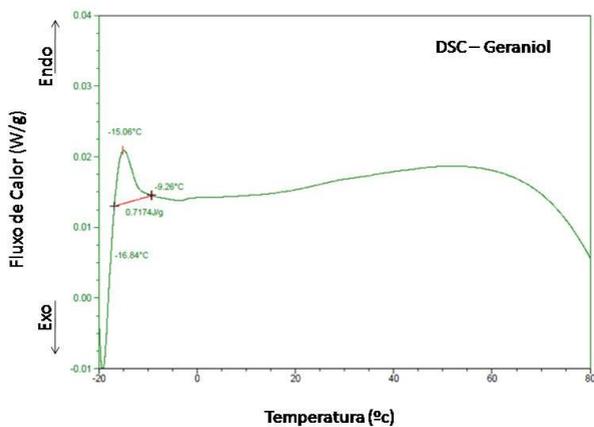
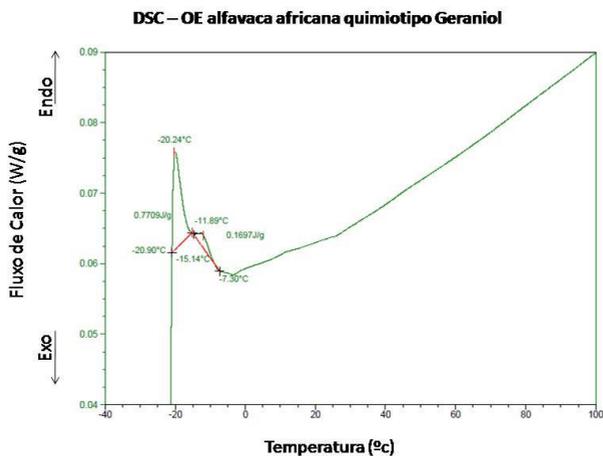
Amostra: Alfavaca Africana QT Geraniol (*Ocimum gratissimum*)

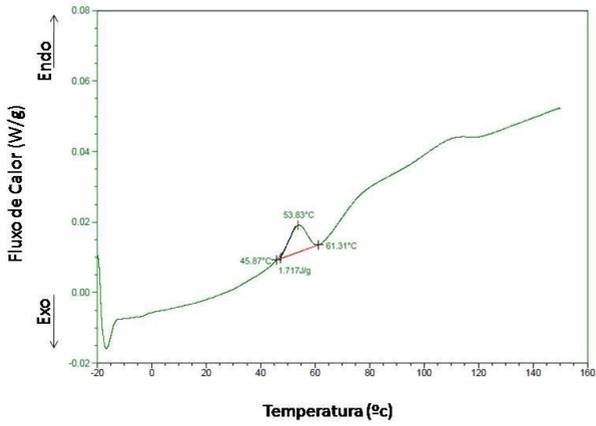
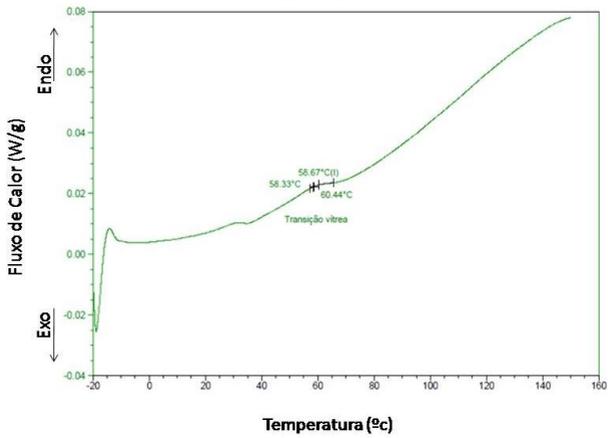


Método:  
Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS)  
Coluna ZIN-5MS, 30m x 0,25mm x filme 0,25µm - Temp. Inicial: 40°C (4min), 6°C/min, até 210°C, permanecer 6min, (Total=15min)  
Temp. Injeção = 250°C, Fluxo na coluna = 1 mL/min  
Amostra de óleo diluída 40% em hexano inj. inj. com split de ...



**ANEXO E:** Transições térmicas referentes ao óleo essencial *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo geraniol, geraniol, quitosana e zeína.



**DSC – Zeína****DSC – Quitosana**

**ANEXO F:** Termogramas de análise termogravimétrica (TGA) referentes a zeína, quitosana, geraniol, óleo essencial *Ocimum gratissimum* L. quimiotipo geraniol, partículas de geraniol e óleo essencial *gratissimum* L. quimiotipo geraniol.

