



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA –
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)

NAIANNY L. O. NASCIMENTO MERGULHÃO

Desenvolvimento de encapsulados de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) por gelificação iônica e avaliação da atividade antioxidante

Maceió
2024

NAIANNY L. O. NASCIMENTO MERGULHÃO

Desenvolvimento de encapsulados de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) por gelificação iônica e avaliação da atividade antioxidante

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Dr. João Xavier de Araújo Júnior

Co-orientador: Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior

Maceió

2024

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

M559d Mergulhão, Naianny L. O. Nascimento.
Desenvolvimento de encapsulados de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) por gelificação iônica e avaliação da atividade antioxidante / Naianny L.O. Nascimento Mergulhão. – 2024.
94 f. : il. color.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.
Coorientador: Irinaldo Diniz Basílio Júnior.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 78-94.

1. Encapsulação. 2. Gelificação iônica. 3. Liofilização. 4. Óleo essencial. I. Título.

CDU: 615.453.4 : 665.5

NAIANNY L. O. NASCIMENTO MERGULHÃO

**DESENVOLVIMENTO DE ENCAPSULADOS DE ÓLEO ESSENCIAL DE
SYZYGIVM AROMATICUM (L.) POR GELIFICAÇÃO IÔNICA E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Aprovada em: 17/05/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 JOAO XAVIER DE ARAUJO JUNIOR
Data: 31/05/2024 08:50:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOÃO XAVIER DE ARAÚJO JÚNIOR
Orientador - Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Documento assinado digitalmente
 IRINALDO DINIZ BASILIO JUNIOR
Data: 26/05/2024 09:38:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. IRINALDO DINIZ BASILIO JUNIOR
Coorientador – Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Documento assinado digitalmente
 FABIANE CAXICO DE ABREU GALDINO
Data: 18/05/2024 09:20:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. FABIANE CAXICO DE ABREU GALDINO
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Documento assinado digitalmente
 TICIANO GOMES DO NASCIMENTO
Data: 17/05/2024 17:23:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. TICIANO GOMES DO NASCIMENTO
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Documento assinado digitalmente
 JOHNNATAN DUARTE DE FREITAS
Data: 24/05/2024 22:01:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOHNNATAN DUARTE FREITAS
Instituto Federal de Alagoas - IFAL

Documento assinado digitalmente
 JOSEAN FECHINE TAVARES
Data: 24/05/2024 21:49:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOSEAN FECHINE TAVARES
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.

Josué 1:9

RESUMO

Considerando a necessidade de aperfeiçoamento de produtos, o melhoramento da estabilidade térmica de compostos voláteis e o desenvolvimento de terapias farmacológicas complementares, este trabalho objetivou desenvolver encapsulados de alginato de sódio carregados com óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) através das técnicas de gelificação iônica e liofilização. Foram preparados encapsulados em diferentes concentrações de óleo essencial: F1 (1,0%, v/v); F2 (0,5%, v/v); e F3 (0,1%, v/v). A solução de CaCl₂ à 3,0% (p/v) foi utilizada para a reticulação química com o alginato (1,0% p/v). Os encapsulados F1, F2 e F3 foram submetidos a secagem por liofilização para a obtenção dos encapsulados LF1, LF2 e LF3, respectivamente. As seguintes técnicas foram utilizadas para caracterizar as formulações: liberação de eugenol, grau de intumescimento, GC/MS, MEV, FTIR, TGA/DSC, além de análise do poder antioxidante (DPPH e FRAP). Os encapsulados F1, F2 e F3 apresentaram-se arredondados, rígidos ao toque, com coloração variando de translúcido (menor concentração de OEC) à esbranquiçado (maior concentração de OEC). A liofilização foi empregada com a finalidade de remover o conteúdo aquoso presente nos encapsulados e proporcionar maior estabilidade térmica ao produto final. Os liofilizados encapsulados apresentaram-se rígidos, com aspecto ressecado, rugoso e murcho. A Eficiência de Encapsulação (EE%) mostrou-se alta (LF1: 39,3% ± 0,79; LF2: 50,4% ± 0,63; LF3: 76,9% ± 0,51). O eugenol foi o componente majoritário identificado por GC/MS. O alto conteúdo fenólico presente no óleo essencial (449,9 mg E.AG g⁻¹) foi preservado nos encapsulados liofilizados, resultando em importante atividade antioxidante. O encapsulado LF1 apresentou o menor IC₅₀ 18,1 µg/mL, chegando a 80,3% de inibição do radical DPPH. No teste de FRAP, apresentou poder de redução de 1,824.6 ± 3.5 µmol Fe²⁺/g, valor próximo ao do óleo essencial puro. Os três encapsulados liofilizados apresentaram diferenças estatísticas em todas as concentrações analisadas por ANOVA e teste de Tukey (p<0,05). As bandas de FTIR correspondentes ao OEC presente nos encapsulados foram identificados sem alterações moleculares. As microscopias por MEV apresentaram baixa tendência para formação de aglomerados e partículas rígidas, com aspecto enrugado, poroso e com formas irregulares. Na análise térmica, o encapsulado LF3 foi, aparentemente, mais estável seguido pelo encapsulado LF2 e LF1. O grau de intumescimento foi de 19,2% (solução PBS). A liberação de eugenol (92,5%) em solução de PBS foi mais rápida que em meio ácido. De forma geral, conclui-se que os resultados são promissores e oferecem uma base para ampliar o escopo da pesquisa de encapsulados liofilizados com óleos essenciais. A tecnologia de baixo custo utilizada permite a manutenção do conteúdo e das características do CEO nas três concentrações testadas, oferecendo base para futuras pesquisas com encapsulados de óleos essenciais.

Palavras-chave: encapsulação; gelificação iônica; liofilização; óleo essencial; *Syzygium*.

ABSTRACT

Considering the need to improve products, improve the thermal stability of volatile compounds and develop complementary pharmacological therapies, this work aimed to develop sodium alginate encapsulates loaded with clove essential oil (*Syzygium aromaticum*) using techniques ionic gelation and freeze drying. They were prepared encapsulated in different concentrations of essential oil: F1 (1.0%, v/v); F2 (0.5%, v/v); and F3 (0.1%, v/v). A 3.0% (w/v) CaCl₂ solution was used for chemical crosslinking with the alginate (1.0% w/v). Encapsulated F1, F2 and F3 were subjected to freeze-drying to obtain encapsulated LF1, LF2 and LF3, respectively. The following techniques were used to characterize the formulations: eugenol release, degree of swelling, GC/MS, SEM, FTIR, TGA/DSC, in addition to analysis of antioxidant power (DPPH and FRAP). Encapsulated F1, F2 and F3 were rounded, rigid to the touch, with color varying from translucent (lower concentration of CEO) to whitish (higher concentration of CEO). Freeze-drying was used in order to remove the aqueous content present in the encapsulates and provide greater thermal stability to the final product. The encapsulated lyophilized products appeared rigid, with a dry, rough and shriveled appearance. The Encapsulation Efficiency (EE%) was high (LF1: 39.3% ± 0.79; LF2: 50.4% ± 0.63; LF3: 76.9% ± 0.51). Eugenol was the majority component identified by GC/MS. The high phenolic content present in the essential oil (449.9 mg E.AG g⁻¹) was preserved in the freeze-dried encapsulates, resulting in important antioxidant activity. The encapsulated LF1 showed the lowest IC₅₀ of 18.1 µg/mL, reaching 80.3% inhibition of the DPPH radical. In the FRAP test, it presented a reducing power of 1,824.6 ± 3.5 µmol Fe²⁺/g, a value close to that of pure essential oil. The three lyophilized encapsulates showed statistical differences in all concentrations analyzed by ANOVA and Tukey's test (p<0.05). The FTIR peaks corresponding to the CEO present in the encapsulates were identified without molecular changes. SEM microscopies showed a low tendency for the formation of agglomerates and rigid particles, with a wrinkled, porous appearance and irregular shapes. In thermal analysis, the LF3 encapsulated was apparently more stable followed by the LF2 and LF1 encapsulated. The degree of swelling was 19.2% (PBS solution). The release of eugenol (92.5%) in PBS solution was faster than in acidic medium. In general, it is concluded that the results are promising and offer a basis for expanding the scope of research into freeze-dried encapsulated essential oils. The low-cost technology used allows the content and characteristics of CEO to be maintained in the three concentrations tested, offering a basis for future research with essential oil encapsulates.

Keywords: encapsulation; ionic gelation; freeze drying; essential oil; *Syzygium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia da microcápsula e microesfera.....	22
Figura 2 - Mecanismo de gelificação iônica externa: (a) gotícula de alginato em contato com a solução de cálcio; (b) difusão interna de íons de cálcio; (c) gelificação para dentro da gotícula; e (d) gelificação completa	24
Figura 3 - Mecanismo de gelificação iônica interna: (a) dispersão de gotícula de alginato em contato com a solução de cálcio; (b) difusão interna de íons de cálcio; (c) gelificação para dentro da gotícula; e (d) gelificação completa.....	25
Figura 4 - Características estruturais dos alginatos. A. Unidades monoméricas, manuronato (M) e guluronato (G). B. Conformação da cadeia. C. Distribuição em bloco. (Bloco G: ácido gulurônico; Bloco M: ácido manurônico; Bloco MG: alternância de ácido gulurônico e ácido manurônico).....	29
Figura 5 - A. Modelo “caixa de ovo” para a estrutura do gel de alginato de cálcio. B. Formação de junções intercadeias	31
Figura 6 - Espécie <i>Syzygium aromaticum</i> . A - Botões florais do craveiro-da-índia prontos para serem coletados. B - Botões florais secos (cravo-da-índia).....	32
Figura 7 – Fluxograma do planejamento experimental	39
Figura 8 - Processo de obtenção dos glóbulos de óleo essencial OEC	42
Figura 9 - Perfil cromatográfico do óleo essencial de cravo-da-Índia obtido por GC/MS.....	50
Figura 10 - Fotografia dos encapsulados produzidos por gelificação iônica. F1 – Alginato 1,0% + CaCl ₂ a 3,0% + OE a 1,0%; F2 – Alginato 1,0% + CaCl ₂ a 3,0% + OE a 0,5%; F3 – Alginato a 1,0% + CaCl ₂ a 3,0% + OE a 0,1%. Tamanho de partícula: 4,36 ± 0,30 mm (LF1), 4,30 ± 0,29 mm (LF2), 4,27 ± 0,30 mm (LF3)....	51
Figura 11 - Fotografia dos encapsulados liofilizados. LF1 – Alginato de sódio a 1,0% + CaCl ₂ a 3% + OE a 1,0%; LF2 – Alginato de sódio a 1,0% + CaCl ₂ a 3% + OE a 0,5%; LF3 – Alginato de sódio a 1,0% + CaCl ₂ a 3% + OE a 0,1%	52
Figura 12 – Perfis cromatográficos dos encapsulados LF1, LF2 e LF3 obtidos por GC/MS	54

Figura 13 - Curva padrão para fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu (ácido gálico).....	55
Figura 14 - Variações nas colorações formadas pela reação de Folin-Ciocalteu nos encapsulados liofilizados.....	56
Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura das amostras liofilizadas em diferentes pontos com ampliação de foco variável. A-C: encapsulado liofilizado placebo; D-F: encapsulado LF1 (1,0%); G-H: encapsulado LF2 (0,5%); e I: encapsulado LF3 (0,1%)	58
Figura 16 - Espectros de infravermelho do óleo essencial de cravo-da-índia (OEC) e dos encapsulados liofilizados LF1, LF2 e LF3.....	62
Figura 17 - As curvas termogravimétricas (A) e calorimétricas (B) mostram, respectivamente, a perda de massa (%) ou a variação de energia de cada amostra em função da temperatura (°C).	67
Figura 18 - Grau de intumescimento dos encapsulados liofilizados LF1 em diferentes tempos de imersão em solução ácida e em tampão fosfato (PBS) ..	68
Figura 19 - Esquema proposto de intumescimento das partículas de alginato obtidas por gelificação iônica.....	69
Figura 20 - Imagem dos encapsulados LF1 em solução ácida (A) e em solução tampão (B) em diferentes tempos de imersão	69
Figura 21 - Liberação do eugenol em solução ácida e de tampão fosfato em diferentes tempos	70
Figura 22 - Mudança de coloração de violeta escuro para amarelo pálido, resultante da estabilização do radical livre DPPH originando sua forma reduzida	72
Figura 23 - Mudança de coloração proveniente da reação de redução do ferro férrico (Fe³⁺) pelo método de FRAP	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações do OEC obtido comercialmente	38
Tabela 2 - Formulações desenvolvidas inicialmente.....	39
Tabela 3 - Formulações desenvolvidas com alginato 1,0% (p/v).....	39
Tabela 4 – Componentes químicos dos encapsulados LF1, LF2 e LF3.....	41
Tabela 5 - Identificação dos principais componentes químicos do óleo essencial de cravo-da-índia (OEC)	49
Tabela 6 - Eficiência de encapsulação do OE de cravo-da-índia.....	53
Tabela 7 - Conteúdo de fenóis totais em amostras de óleo essencial de cravo-da-índia e encapsulados LF1, LF2 e LF3.....	55
Tabela 8 - Peso médio dos encapsulados úmidos e liofilizados	57
Tabela 9 - Principais dados termogravimétricos e calorimétricos das amostras.....	62
Tabela 10 - Atividade antioxidante do óleo essencial e dos encapsulados de cravo-da-índia (% Inibição do radical DPPH)	73
Tabela 11 - Atividade antioxidante FRAP do óleo essencial e dos encapsulados de cravo-da-índia ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$).....	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Depósito de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial.....	15
Quadro 2 – Artigos publicados na plataforma PUBMED relacionados a encapsulação de óleos por gelificação iônica.....	17
Quadro 3 – Artigos publicados na plataforma SCIELO relacionados a encapsulação de óleos.....	17
Quadro 4 – Artigos publicados na plataforma SCIENCE DIRECT relacionados a encapsulação de óleo essencial de cravo-da-índia.....	18
Quadro 5 – Dissertação publicada no BDTD sobre a encapsulação de eugenol.....	20
Quadro 6 – Pesquisas de acesso livre no Google	20
Quadro 7 – Técnicas de encapsulação e seus processos envolvidos.....	23
Quadro 8 – Características dos principais métodos de secagem de materiais vegetais	26
Quadro 9 – Principais materiais de parede usados na encapsulação	27
Quadro 10 – Atividades biológicas do óleo essencial de cravo-da-índia	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Encapsulação: aspectos gerais.....	21
3.2 Técnicas de encapsulação	22
3.2.1 Gelificação iônica	24
3.2.2 Liofilização	26
3.3 Materiais encapsulantes.....	27
3.3.1 Alginato de sódio	28
3.4 Óleo essencial de cravo-da-índia	32
4. OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo geral.....	37
4.2 Objetivos específicos	37
5. MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1 Materiais	38
5.2 Métodos	38
5.2.1 Densidade e pH do óleo essencial (OE)	40
5.2.2 Identificação química (CG/EM)	40
5.2.3 Determinação do teor de fenóis totais	40
5.2.4 Desenvolvimento dos encapsulados	41
5.2.5 Processo de secagem	42
5.2.6 Eficiência de encapsulação	43
5.2.7 Caracterização dos encapsulados liofilizados	43
5.2.7.1 Avaliação do peso médio	43
5.2.7.2 Teor de umidade	44
5.2.7.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	44
5.2.7.4 Espectroscopia FTIR/ATR	44
5.2.7.5 Análises térmicas (TGA/DSC)	44
5.2.8 Atividade antioxidante	45
5.2.8.1 DPPH	45
5.2.8.2 FRAP	45

5.2.9 Grau de intumescimento e liberação de ativos	46
5.2.10 Análises estatísticas	47
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.1 Características, densidade e pH do óleo	48
6.2 Identificação dos principais constituinte do óleo	48
6.3 Desenvolvimento dos encapsulados	50
6.4 Eficiência de encapsulação	52
6.5 Determinação do teor de fenóis totais	54
6.6 Características dos encapsulados liofilizados	56
6.6.1 Avaliação do peso médio	56
6.6.2 Teor de umidade	57
6.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	58
6.6.4 Espectroscopia FTIR/ATR	60
6.6.5 Análises térmicas (TGA/DSC)	62
6.7 Grau de intumescimento e liberação de ativos	67
6.8 Atividade antioxidante	72
6.8.1 DPPH	72
6.8.2 FRAP	75
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1. INTRODUÇÃO

Sistemas de encapsulação surgem como alternativas tecnológicas de preservação das características do produto aprisionado na matriz. Por definição, são técnicas de revestimento polimérico uniforme ou a incorporação do material ativo, proporcionando aumento da estabilidade físico-química, facilidade de padronização de dosagem, transporte e concentração de compostos ativos (Gharsallaoui et al., 2007; Xu et al., 2022). A partir da encapsulação de um produto, há a possibilidade de elaboração de diferentes formas farmacêuticas que facilitam a administração, com precisão de dosagem e boa aceitação pelo paciente (Zhang et al., 2019).

As interferências ambientais na estabilidade físico-química dos compostos voláteis são fator limitante de sua conservação. Um exemplo de baixa estabilidade química é o eugenol, componente majoritário do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), que é suscetível à oxidação e a muitas interações bioquímicas (Zari; Zari; Hakeem, 2021). As publicações científicas relatando as atividades biológicas dos óleos essenciais, em especial o óleo essencial de cravo-da-índia, são extensas e relevantes para o setor farmacêutico: atividade antibacteriana (Kacaniová et al., 2021), atividade antifúngica (Biernasiuk; Baj; Malm, 2023), atividade antiparasitária (Moemenbellah-Fard et al., 2020), atividade antioxidante (Johari; Khan, 2022), atividade anti-inflamatória (Nikoui et al., 2017) e atividade anestésica (Kheawfu et al., 2017). Portanto, é pertinente a intensificação de pesquisas que envolvam a encapsulação de óleos essenciais, mantendo suas características naturais e o teor de seus constituintes (Vahedikia et al., 2019).

A adição de óleos essenciais em formulações alimentares tem sido estudada para diversos fins, a maioria delas relacionadas com o seu efeito antimicrobiano e antioxidante. Sabe-se que a incorporação desses óleos de forma pura gera altas perdas de seus constituintes químicos por volatilização, com consequente diminuição da sua atividade biológica, além das interferências ambientais, a falta de controle na taxa de liberação do óleo essencial, proporcionando efeito instantâneo e de curta duração (Benavides et al., 2016). Portanto, em outras palavras, a encapsulação de óleos essenciais é útil para prevenir a oxidação, a perda de substâncias voláteis e para controlar a liberação dos ativos. A encapsulação pode ajudar a melhorar a qualidade nutricional, aumentar a vida de prateleira ou controlar propriedades dos

alimentos processados, além de mascarar sabores (Maes; Bouquillon; Fauconnier, 2019; Pina-Barrera et al., 2019).

Na agropecuária, pode ser empregada na produção de pesticidas, reduzindo a toxicidade ao homem durante o manuseio bem como ao ambiente, pois controla a liberação do ativo, reduzindo concentrações elevadas na lavoura e a contaminação ambiental (Maes; Bouquillon; Fauconnier, 2019; Pina-Barrera et al., 2019). Na indústria farmacêutica, a encapsulação de ativos ajuda na proteção contra a degradação dos componentes encapsulados por fatores ambientais, garantindo eficácia e segurança aos pacientes (Zari; Zari; Hakeem, 2021). A encapsulação é útil, inclusive, em aumentar a biodisponibilidade dos ativos (Marchese et al., 2017).

A gelificação iônica ou ionotrópica é um dos métodos de encapsulação mais mais utilizados para o encapsulamento de substâncias sensíveis. Trata-se de um método de baixo custo e de fácil reprodução. Não requer a utilização de solventes orgânicos e altas temperaturas, tornando seu uso crescente e promissor (Moura et al., 2019; Naranjo-Durán et al., 2021).

Estudos têm mostrado os efeitos protetores da encapsulação por gelificação iônica sobre a estabilidade de compostos sensíveis a degradação química, como antioxidantes naturais (Deladino et al., 2008; Córdoba; Deladino; Martino, 2013), antimicrobianos (Martín-Villena et al., 2013; Radünz et al., 2018), probióticos (Etchepare et al., 2015; Menezes et al., 2015; Poletto et al., 2019), óleo essencial de tolmiho (Benavides et al., 2016), óleo de linhaça (Wissam; Samer, 2019), células, enzimas e lipídios (Dias et al., 2017), microalgas como a espirulina (Rajmohan; Bellmer, 2019), dentre outros.

A encapsulação de óleos essenciais com a finalidade de aperfeiçoamento de produtos, proteção e manutenção do teor dos ativos é sempre de grande interesse para as indústrias alimentícia e farmacêutica. A gelificação iônica pode proporcionar uma forma estável de encapsular e entregar óleos essenciais, mas a estabilidade a longo prazo pode variar com base nas condições de armazenamento e na formulação específica utilizada. Esse fato pode estar relacionado ao conteúdo aquoso resultante desse tipo de encapsulação. Mais estudos nesta área tem alta relevância científica.

Diante da limitação na técnica de encapsulação de óleos essenciais, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de encapsulados com baixa concentração de alginato de sódio carregados com diferentes concentrações de óleo essencial de cravo-da-índia através da técnica de gelificação iônica com posterior

secagem por liofilização. A finalidade do estudo foi identificar a concentração ideal de óleo essencial a ser empregada na formulação, garantindo alta eficiência de encapsulação, além de proporcionar maior estabilidade térmica ao encapsulado, podendo empregá-lo como agente antioxidante.

2. JUSTIFICATIVA

Durante a elaboração do projeto de pesquisa, o quadro de patentes depositadas no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) foi consultado. Foram utilizados os descritores “gelificação iônica”, “encapsulação gelatinosa”, “encapsulação iônica”, “encapsulação eletrostática”, “encapsulação *and* alginato”, “esferas de alginato”, “esferas de quitosana”, “alginato *and* extrusão”, “encapsulação *and* óleo essencial”, “gelificação *and* cravo”, “encapsulação *and* cravo”, “encapsulação *and* *Syzygium*”, “alginato *and* *Syzygium*”, “liofilização *and* cravo”, “liofilização *and* *Syzygium*”, e “liofilização *and* gelificação”. A busca foi realizada individualmente com cada descritor, estando este presente pelo menos no resumo. As patentes que não se relacionam com a metodologia de gelificação iônica foram excluídas. Um total de 13 patentes foram identificadas entre os anos de 2011 e 2021 (Quadro 1).

Quadro 1: Depósito de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

PATENTES DEPOSITADAS NO INPI		
Nº	Título	Data de depósito
1	FORMULAÇÃO DE COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE LIOFILIZADO DE EXTRATO E/OU FRAÇÕES ATIVAS DE PARTES AÉREAS DE <i>Syzygium cumini</i> , E SEU USO NA REDUÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL	12/04/2011
2	NANO-ESFERAS POLIMÉRICAS RECOBERTAS COM FOLATO DE QUITOSANA E USO DAS MESMAS	25/11/2011
3	FORMULAÇÃO DA MISTURA DOS EXTRATOS HIDROALCÓOLICOS LIOFILIZADOS DAS FOLHAS DE AVERRHOA CARAMBOLA E DE <i>SYZYGIUM CUMINI</i> , SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E SEU USO NA PREVENÇÃO E NO TRATAMENTO DO DIABETES TIPO ii E SUAS COMPLICAÇÕES	01/03/2012
4	FORMULAÇÕES DE COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE LIOFILIZADO DE EXTRATO DE PARTES AÉREAS DE <i>SYZYGIUM CUMINI</i> , E SEU USO NA PREVENÇÃO DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO	12/03/2014
5	FILMES ANTIMICROBIANOS A BASE DE ALGINATO DE SÓDIO UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL BIOATIVO DE <i>SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS</i> E <i>MELALEUCA ALTERNIFÓLIA</i>	09/12/2016
6	FLUIDO COLOIDAL AGNPS-S.AROMATICUM ALGINATO POSSUINDO ATIVIDADE FRENTE A <i>CANDIDA ALBICANS</i>	21/09/2018

7	PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE UMA PEROXIDASE OBTIDA DAS RAÍZES DE MORINGA OLEIFERA EM ESFERAS DE QUITOSANA MODIFICADAS COM GLUTARALDEÍDO	26/06/2019
8	NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS À BASE DE FE/NI SUPORTADAS EM ESFERAS DE QUITOSANA, PROCESSOS DE SÍNTESE E USO	30/01/2019
9	PROCESSO PARA REMOÇÃO DE CORANTES DE EFLUENTES INDUSTRIAIS UTILIZANDO REATOR DE LEITO FLUIDIZADO COMPOSTO POR NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS DE FE/NI SUPORTADAS EM ESFERAS DE QUITOSANA E USO	30/01/2019
10	ESFERAS DE ALGINATO E MÉTODOS DE FABRICAÇÃO E USO DAS MESMAS	16/04/2019
11	PROCESSO DE ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEOS E PRODUTOS COSMÉTICOS EM ESFERAS DE ALGINATO SUSPENSAS EM SOLUÇÃO DE POLISSACARÍDEO	06/05/2010
12	MILICAPSULAS DE HIDROGEL COM EXTRATO DA FLOR CLITÓRIA TERNÁTEA L. AZUL PELO PROCESSO DE GELIFICAÇÃO IÔNICA	16/12/2021
13	MILICAPSULAS DE HIDROGEL DE COLÁGENO EXTRAÍDO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO DE AVES, PRODUZIDAS PELO PROCESSO DE GELIFICAÇÃO IÔNICA	27/12/2021

Fonte: Autora, 2023.

Após a leitura dos resumos, observa-se que as patentes não coincidem com o objeto de estudo no presente trabalho, sendo os títulos 10 e 11 os que mais assemelham. A patente 10 descreve “esferas de alginato e métodos de produção das ditas esferas, as esferas sendo capazes de conter hidratação, aditivos nutricionais, medicamentos, corantes, adoçantes e/ou aromatizantes, e que são particularmente vantajosos para uso como cobertura para ração de aves domésticas”. A patente 11 refere-se ao “desenvolvimento de um processo de encapsulação de óleos e produtos cosméticos em esferas de alginato suspensas em solução de polissacarídeo”.

Em seguida, a busca na literatura seguiu em plataformas científicas importantes como o PUBMED, onde após a pesquisa por descritores como “*alginate and oil and encapsulation and ionic gelation*”, foi possível rastrear 22 artigos publicados entre os anos de 2004 a 2023, apenas um deles (nº13) relacionado ao cravo-da-índia (Quadro 2). Nenhum dos artigos utiliza a liofilização como etapa subsequente a gelificação iônica. Essa revisão da literatura serviu de base para a discussão e estruturação da referida tese.

Quadro 2: Artigos publicados na plataforma PUBMED relacionados a encapsulação de óleos por gelificação iônica.

ARTIGOS PUBLICADOS NO PUBMED			
Nº	Título	Autor(es)	Ano
1	Controlled release of protein from hydrocolloid gel microbeads before and after drying.	Mukai-Correa et al.	2004
2	Alginate microparticles as novel carrier for oral insulin delivery.	Reis et al.	2007
3	Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process.	Hosseini et al.	2013
4	Alginate-based emulsion template containing high oil loading stabilized by nonionic surfactants.	Ong et al.	2015
5	Prosopis alba exudate gum as excipient for improving fish oil stability in alginate-chitosan beads.	Vasile et al.	2016
6	Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation.	Benavides et al.	2016
7	Calcium-alginate microparticles for sustained release of catechin prepared via an emulsion gelation technique.	Kim; Lee; Lee	2016
8	Improving oxidative stability of echium oil emulsions fabricated by Microfluidics: Effect of ionic gelation and phenolic compounds.	Comunian et al.	2017
9	Microcapsules biologically prepared using Perilla frutescens (L.) Britt. essential oil and their use for extension of fruit shelf life.	Li et al.	2018
10	Impact of Prosopis alba exudate gum on sorption properties and physical stability of fish oil alginate beads prepared by ionic gelation.	Vasile; Judis; Mazzobre	2018
11	Lipid Oxidation in Emulsions Fortified with Iron-Loaded Alginate Beads.	Cengiz et al.	2019
12	Effect of Process Parameters on the Initial Burst Release of Protein-Loaded Alginate Nanospheres.	Yasmin; Chen; Eames	2019
13	Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (<i>Syzygium aromaticum</i> , L.) essential oil	Radunz et al.	2019
14	Microencapsulated Bio-Based Rejuvenators for the Self-Healing of Bituminous Materials.	Norambuena-Contreras et al.	2020
15	Encapsulation of wheat germ oil in alginate-gelatinized corn starch beads:	Feltre et al.	2020

	Physicochemical properties and tocopherols' stability.		
16	A novel capsule-based smell test fabricated via coaxial dripping.	Ismail et al.	2021
17	Sodium alginate microencapsulation improves the short-term oral bioavailability of cannabidiol when administered with deoxycholic acid.	Majimbi et al.	2021
18	Effects of UV-C and Edible Nano-Coating as a Combined Strategy to Preserve Fresh-Cut Cucumber.	Zambrano-Zaragoza et al.	2021
19	Influence of the particle size of encapsulated chia oil on the oil release and bioaccessibility during <i>in vitro</i> gastrointestinal digestion.	Álvarez et al.	2022
20	Microencapsulation of marjoram essential oil as a food additive using sodium alginate and whey protein isolate.	Mazza et al.	2023
21	Encapsulation of Ruta essential oil in chitosan and alginate matrices as an ecological alternative for the control of nematodes.	Castillo et al.	2023
22	Vitexin-loaded poly(ethylene glycol) methyl ether-grafted chitosan/alginate nanoparticles: preparation, physicochemical properties and <i>in vitro</i> release behaviors.	Yoksan; Towong-Phaichayonte	2023

Fonte: Autora, 2023.

Na plataforma SCIELO foram identificados 5 artigos utilizando os descritores “*alginate and oil and encapsulation*” entre os anos de 2007 e 2020 (Quadro 3). Nenhum dos artigos citados relaciona-se ao cravo-da-índia.

Quadro 3 - Artigos publicados na plataforma SCIELO relacionados a encapsulação de óleos.

ARTIGOS PUBLICADOS NO SCIELO			
Nº	Título	Autor(es)	Ano
1	Características físicas e nutricionais da matriz de encapsulamento na produção de sementes sintéticas de pimenta-longa (<i>Piper hispidinervum</i> C. DC.)	Guedes et al.	2007
2	Esferas (beads) de alginato como agente encapsulante de óleo de croton zehntneri Pax et Hoffm	Paula et al.	2010
3	Production and characterization of alginate-starch-chitosan microparticles containing stigmasterol through the external ionic gelation technique	Fujiwara et al.	2013

4	Encapsulation of flaxseed oil extract in alginate-salep system by ionic gelation	Wissam; Samer	2019
5	Chitosan-Sodium Alginate Polyelectrolyte Complex Coating Pluronic® F127 Nanoparticles Loaded with Citronella Essential Oil	Sanches et al.	2020

Fonte: Autora, 2023.

Na plataforma SCIENCE DIRECT foram identificados 196 artigos originais utilizando os descritores “*ionic gelation*” and “*essential oil clove*” entre os anos de 2002 e 2023. Um total de 63 artigos originais foram publicados nos últimos 10 anos. Destes, apenas 4 artigos falam sobre a encapsulação do óleo essencial de cravo-da-índia de forma específica (Quadro 4).

Quadro 4 - Artigos publicados na plataforma SCIENCE DIRECT relacionados a encapsulação de óleo essencial de cravo-da-índia.

ARTIGOS PUBLICADOS NO SCIENCE DIRECT				
Nº	Título	Observação	Autor(es)	Ano
1	Clove essential oil encapsulated on nanocarrier based on polysaccharide: A strategy for the treatment of vaginal candidiasis	Não utiliza gelificação iônica. Apenas a emulsão para tratamento da candidíase.	Campelo et al.	2020
2	Wound-aided semi-solid poly(vinyl alcohol) hydrogels incorporating essential oil-loaded chitosan nanoparticles	Material de parede: quitosa; Utilização como tratamento de feridas	Buntum et al.	2021
3	Nano-encapsulation of a combination of clove oil and thymol and their application in fresh-cut apples and raw minced beef	Associação de óleo de cravo e timol para a utilização como conservante de alimentos	Lim; Lee; Gyu Lee	2023
4	Clove essential oil loaded chitosan nanocapsules on quality and shelf-life of blueberries	Material de parede: quitosa; Utilização como conservante natural	Xu et al.	2023

Fonte: Autora, 2023.

Trabalhos acadêmicos publicados na Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações (BDTD) também foram investigados através do descritor “gelificação iônica” and “óleo essencial”. Um total de 9 trabalhos foram identificados entre os anos de 2017 e 2022. Destes, apenas 1 trabalho relacionado ao cravo-da-índia (Quadro 5).

Quadro 5: Dissertação publicada no BDTD sobre a encapsulação de eugenol.

DISSERTAÇÃO				
Nº	Título	Observação	Autor(es)	Ano
1	Micropartículas de eugenol por gelificação iônica: ação antimicrobiana	Dissertação de mestrado. Material de parede: alginato e proteína do soro do leite.	Santana, Merielly Saeli de	2020

Fonte: Autora, 2023.

Outros trabalhos de pesquisas laboratoriais puderam ser encontrados acessando a página do Google (Quadro 6).

Quadro 6: Pesquisas de acesso livre no Google.

PESQUISAS				
Nº	Título	Observação	Autor(es)	Ano
1	Encapsulação de ativos naturais com atividade antimicrobiana em materiais de parede protéicos e lipídicos	Dissertação de mestrado. Encapsulação de vários óleos essenciais juntos para utilização como antimicrobiano	Silva, Laiane Souza da	2019
2	Microencapsulation of clove essential oil with gelatin and alginate	Trabalho apresentado no XXXV IULTCS Congress. Não foi feito DPPH, FRAP, Fenois, liofilização. Trabalho comparativo com gelatina	Kopp et al.	2019

Fonte: Autora, 2023.

Diante do exposto, a encapsulação do óleo essencial de cravo-da-índia representa uma abordagem inovadora na preservação e utilização desse valioso extrato botânico. Ao encapsular esse óleo essencial, não apenas se amplia sua estabilidade (devido a proteção contra possíveis degradações pela luz, oxigênio e outros fatores ambientais), mas também se abre caminho para aplicações mais eficazes em setores como a medicina, cosmética e aromaterapia. A encapsulação do óleo de cravo-da-índia oferece uma perspectiva promissora para explorar suas propriedades terapêuticas de maneira mais controlada e duradoura, sendo possível, inclusive, a incorporação desse óleo essencial em outros produtos como cosméticos, produtos de cuidados pessoais, suplementos alimentares, medicamentos e alimentos.

Esses benefícios podem tornar a encapsulação por gelificação iônica uma escolha valiosa para a comercialização do óleo essencial de cravo-da-índia.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Encapsulação: aspectos gerais

A encapsulação pode ser definida como uma técnica que consiste no revestimento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos por uma camada polimérica semipermeável, originando uma partícula (Shahidi; Han, 1993).

A indústria farmacêutica utiliza essa tecnologia visando à proteção do material encapsulado das condições adversas do meio externo, estabilizando e aumentando sua vida útil, e permitindo sua liberação de forma controlada, a partir de determinado estímulo, em local e quantidade adequada para atender as necessidades farmacoterapêuticas. Além disso, muitos compostos bioativos têm várias limitações e podem sofrer inativação no ambiente ácido do estômago (Budinčić et al., 2021; Sousa et al., 2022).

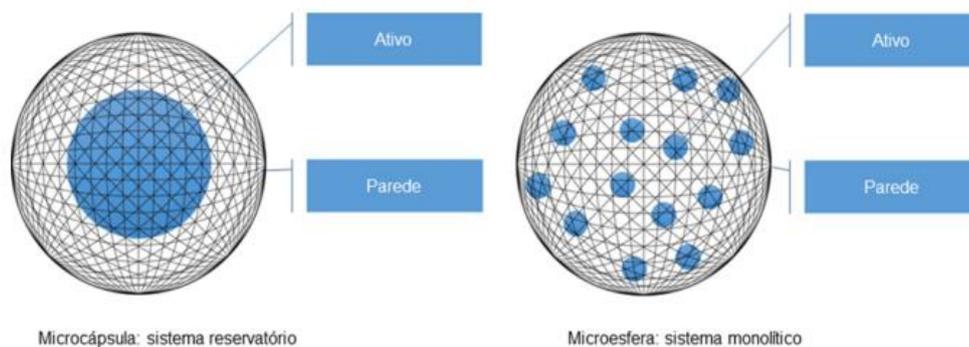
O composto encapsulado é referido como núcleo, fase interna ou preenchimento e pode conter um ou vários compostos, enquanto a parede é, às vezes, chamada de casca, revestimento ou membrana e pode ser classificada como simples ou dupla (Arshady, 1993; Gharsallaoui et al., 2007; Xu et al., 2022). O núcleo pode ser um material cristalino, uma partícula adsorvente irregular, uma emulsão, uma suspensão de sólidos, uma suspensão de partículas menores ou até mesmo dendrímeros, ou seja, macromoléculas com estruturas altamente ramificadas (Gharsallaoui et al., 2007). Portanto, o encapsulamento é um processo que pode envolver várias formas de estruturas encapsuladas com o intuito de melhorar as propriedades de diferentes substâncias.

As partículas formadas no processo de encapsulação podem ser classificadas em diferentes escalas de tamanho: nanopartículas, micropartículas e macropartículas. As nanopartículas são estruturas diminutas, com dimensões na faixa de nanômetros, variando de 1 a 100 nm. As micropartículas que podem apresentar diâmetros de 1 a 1.000 μm e formas variáveis a depender dos materiais e dos métodos usados para prepará-las (Silva et al., 2003).

Na Figura 1 é demonstrado os dois subgrupos que as micropartículas podem ser divididas: microcápsula, que compreende um sistema do tipo reservatório onde o material ativo é envolto pelo encapsulante; e microesfera, que é um sistema monolítico onde o material ativo se encontra disperso em uma matriz contínua, podendo ser encontrado também por toda a superfície (Nazzaro et al., 2012; Silva et al., 2014).

Esse revestimento que envolve o ativo se dissolve por meio de um estímulo específico, podendo liberar o núcleo no lugar e momento ideais (Suave et al., 2006). As técnicas de encapsulação oferecem várias vantagens, como maior estabilidade, controle das reações de oxidação e da forma de liberação, mascaramento do sabor, odor ou cor indesejável e prolongamento da vida útil do material encapsulado (Favaro-Trindade; Pinho; Rocha, 2008). Para desenvolver um sistema de encapsulação para um determinado produto, é importante compreender as propriedades físico-químicas deste (estabilidade, viscosidade e tamanho das gotículas), além de analisar quais os melhores agentes encapsulantes e a melhor metodologia de encapsulamento a serem utilizadas para esta formulação específica, pois não há um método ideal que possa ser aplicado universalmente a uma variedade de produtos distintos (Gupta; Dey, 2012).

Figura 1 - Morfologia da microcápsula e microesfera.



Fonte: adaptado de Pereira et al. (2019).

3.2 Técnicas de encapsulação

A escolha do método para a encapsulação depende de fatores econômicos, das condições de processamento às quais o material encapsulado deve resistir sem liberar seu conteúdo, da funcionalidade que o material ativo deve fornecer ao produto final, do mecanismo de liberação, do tamanho de partícula desejado, das

propriedades do agente encapsulado e do material de parede, e da aplicabilidade como ingrediente em alimentos e mecanismos de liberação. As principais técnicas utilizadas para encapsulação são: gelificação iônica, coacervação simples e complexa, *spray drying*, *spray cooling*, liofilização, leite fluidizado, co-cristalização e a produção de lipossomas (Jones; McClements, 2010). Observe o Quadro 7.

Quadro 7: Técnicas de encapsulação e seus processos envolvidos.

TÉCNICA DE ENCAPSULAÇÃO	PRINCIPAIS ETAPAS
Spray-drying	a. Preparação da dispersão b. Homogeneização da dispersão c. Atomização da dispersão d. Desidratação das partículas atomizadas
Spray-cooling	a. Preparação da dispersão b. Homogeneização da dispersão c. Atomização da dispersão de alimentação
Leite fluidizado	a. Preparação da solução de revestimento b. Fluidização de partículas centrais c. Revestimento de partículas centrais
Liofilização	a. Mistura do núcleo em uma solução de revestimento b. Liofilização da mistura
Coacervação	a. Formação de três fases imiscíveis b. Deposição do revestimento c. Solidificação do revestimento
Co-cristalização	a. Preparação solução supersaturada de sacarose b. Adição de núcleo à solução c. Emissão de calor substancial após a solução atingir a temperatura de cristalização da sacarose
Lipossomas	a. Microfluidização b. Ultrassonicação c. Evaporação de fase reversa
Gelificação iônica	a. Preparação da solução de revestimento b. Homogeneização do material a ser revestido c. Gotejamento em cloreto de cálcio

Fonte: adaptado de Desai e Park (2005), com alterações.

A técnica de encapsulação por gelificação iônica destaca-se pela sua simplicidade, baixo custo, fácil execução, além de não necessitar de altas temperaturas e solventes orgânicos. Além disso, é capaz de formar, com eficiência, uma matriz impermeável ao oxigênio, mas permeável ao princípio ativo encapsulado, possibilitando sua liberação gradual (Naranjo-Durán et al., 2021).

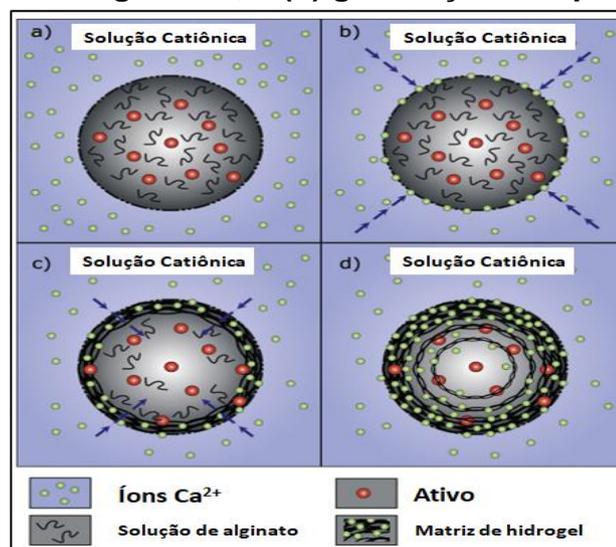
O processo de liofilização também é de grande importância por promover maior estabilidade microbiológica evitando degradações químicas ou biológicas e diminuição de custos de armazenamento e transporte (Gharsallaoui et al., 2007). Portanto, essas técnicas foram descritas mais detalhadamente nos tópicos abaixo.

3.2.1 Gelificação iônica

A técnica de gelificação iônica baseia-se na capacidade de polissacarídeos aniônicos, como o alginato, a pectina, a goma carragena e a goma gelana em complexar-se, formando géis insolúveis na presença de íons divalentes como o cálcio (Burey et al., 2008).

Esse método de encapsulação pode ser classificado em dois tipos, externo e interno. A gelificação iônica externa (Figura 2) é a mais conhecida; a solução biopolimérica é gotejada com uma pipeta de calibre reduzido (3 a 5 mm), processo de extrusão, ou atomizada sobre uma solução de íons divalentes (geralmente, solução de CaCl_2). O endurecimento das partículas ocorre instantaneamente, começando na superfície na qual os íons divalentes reagem com as cadeias biopoliméricas carregadas negativamente, formando uma estrutura tridimensional rígida, com alto teor de água, através da qual os íons difundem para o interior da partícula, favorecendo a reticulação do exterior para o interior (Schoubben et al., 2010).

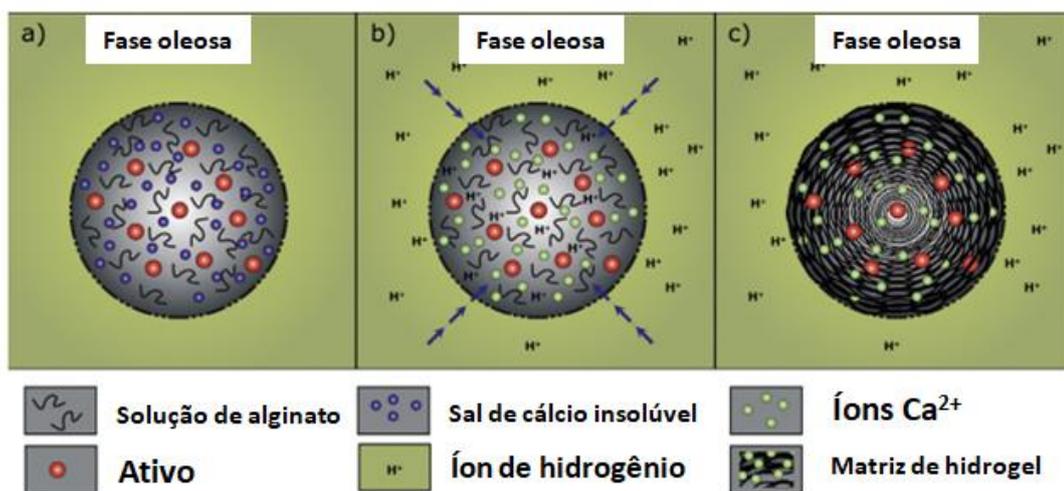
Figura 2 - Mecanismo de gelificação iônica externa: (a) gotícula de alginato em contato com a solução de cálcio; (b) difusão interna de íons de cálcio; (c) gelificação para dentro da gotícula; e (d) gelificação completa.



Fonte: Adaptado de Leong et al. (2016).

Na gelificação iônica interna (Figura 3), a solução polimérica contendo o material a ser encapsulado e sais insolúveis de cálcio sofrem emulsificação em fase oleosa contendo agente surfactante. Após isso, o meio ácido é adicionado a fim de reduzir o pH para que haja a liberação dos íons cálcio e possibilitando a complexação dos grupos carboxílicos com o cálcio.

Figura 3 - Mecanismo de gelificação iônica interna: (a) dispersão de gotícula de alginato em contato com a solução de cálcio; (b) difusão interna de íons de cálcio; (c) gelificação para dentro da gotícula; e (d) gelificação completa.



Fonte: Adaptado de Leong et al. (2016).

As vantagens da gelificação iônica estão relacionadas com sua simplicidade, baixo custo e com a não necessidade de utilização de solventes orgânicos e/ou pH extremos. É possível encapsular substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, tornando-a uma técnica cada vez mais estudada pelas indústrias farmacêutica e alimentícia (McClements, 2017). Segundo Arriola et al. 2019, os óleos são eficientemente encapsulados pois forma-se uma camada de gel insolúvel em água.

A concentração dos agentes encapsulantes deve ser cuidadosamente analisada e determinada para evitar perdas expressivas do ativo, que pode atravessar a porosa barreira protetora e se perder ao longo do processo ou do armazenamento (Frascareli et al., 2012).

3.2.2 Liofilização

A liofilização, também chamada criodesidratação, criossecagem e *freeze-drying*, é uma técnica simples, usada para desidratar materiais sensíveis ao calor e aromas como óleos através do vácuo. Esse processo de secagem utiliza a sublimação, onde a água passa diretamente do estado sólido para o estado de vapor sem passar pelo estado líquido (Sousa et al., 2022). A baixa temperatura e pressão requerida, a torna adequada para a secagem de produtos termolábeis ou instáveis em solução aquosa durante o período de armazenamento prolongado, mas que possui estabilidade na sua forma seca (Hazarika; Gosztola, 2020).

Após sublimação, a água que ainda permanece ligada fortemente aos solutos, denominada água adsorvida, é convertida em vapor e removida do produto por dessorção (Jales, 1999).

Quadro 8 - Características dos principais métodos de secagem de materiais vegetais.

MÉTODO	CARACTERÍSTICAS	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Ambiente	Conduzido na sombra e em local ventilado	Baixo custo	Processo lento; variável com o clima; baixa eficácia
Liofilização	Congelamento e sublimação da água	Conservação das propriedades bioquímicas	Processo lento e dispendioso
Estufa	Transferência de calor por condução/convecção; As condições de temperatura, umidade e corrente de ar são variáveis	Simplicidade	Alteração da composição química; possíveis perdas de voláteis
Micro-ondas	Geração de calor no interior do material vegetal	Rapidez Eliminação de microorganismos Preservação da cor	Distribuição desigual do calor; a secagem pode não ser uniforme

Fonte: Adaptado de Pastorini, Bacarin e Abreu (2002).

Substâncias como peptídeos, proteínas e moléculas orgânicas sintéticas complexas, estão sujeitas a uma variedade de reações químicas (como hidrólise, reticulação, oxidação, agregação e rearranjos dissulfureto) em soluções aquosas,

muitas das quais são bastante inaceitáveis em termos de desempenho ou segurança do produto. A secagem retarda esses processos de degradação (Franks, 1998).

3.3 Materiais encapsulantes

A escolha dos agentes encapsulantes é a etapa crucial para a obtenção do produto final desejado. Dessa forma, fatores como não reatividade com o agente ativo, baixa viscosidade em concentrações elevadas, fácil manipulação, baixa higroscopicidade, baixo custo, sabor agradável, capacidade de revestimento, mecanismo de liberação ideal e facilidade de solubilização são alguns exemplos das condições que devem ser levados em consideração (Favaro-Trindade; Pinho; Rocha, 2008; Reis et al., 2021). Com relação à gelificação iônica propriamente dita, os agentes encapsulantes devem apresentar propriedades emulsificantes, com facilidade para a formação de película.

Há uma extensa variedade de materiais de revestimento que podem ser utilizados sozinhos ou combinados (Quadro 3), porém a combinação ideal irá depender da técnica aplicada. Com a finalidade de se obter melhores resultados de eficiência de encapsulação, podem ser empregadas diferentes combinações desses materiais (Pereira et al., 2019). De todo modo, o sistema de encapsulamento é selecionado de acordo com a finalidade pretendida para a formulação final.

Quadro 9 - Principais materiais de parede usados na encapsulação.

CATEGORIA	PRINCIPAIS MATERIAIS
Carboidratos	Amido, maltodextrina, quitosana, dextrina, ciclodextrina, amido modificado
Celulose	Carboximetilcelulose, metilcelulose
Gomas	Goma arábica, ágar, carragena, alginato de sódio
Lipídios	Cera, parafina, cera de abelha, diacilglicerol, óleos
Proteínas	Glúten, gelatina, albumina, caseína, peptídeos

Fonte: Adaptado de Pereira et al. (2019).

Dentre os biopolímeros, os polissacarídeos certamente se revelaram os mais versáteis para dar origem a géis químicos e físicos. No primeiro caso, a riqueza de grupos funcionais (principalmente o grupo hidroxila, mas também o grupo amino) se

presta a uma série de reações químicas de reticulação, criando ligações covalentes (Paoletti; Donati, 2022). Segundo Shahidi e Han (1993), a capacidade dos carboidratos de proteger os componentes do núcleo durante o processo de encapsulação é evidente, tornando-os materiais de revestimento muito utilizados.

3.3.1 Alginato de sódio

Em 1883, o químico inglês E. C. C. Stanford, ao fazer uma maceração em algas marrons, descobriu uma nova substância que ele então nomeou de *algin* (Stanford, 1883). O alginato é um polissacarídeo aniônico natural, solúvel em água, originário de algas da família *Phaeophyceae*, onde está presente como os sais de cálcio, magnésio e sódio do ácido algínico formando parte da parede celular com funções estruturais semelhantes à carragenina e ágar. Estas algas são encontradas em ambientes marinhos e costeiros ao redor do mundo e são uma fonte valiosa de alginato (Yang; Xie; He, 2011; Senturk Parreidt; Müller; Schmid, 2018). Os alginatos são preferencialmente extraídos na forma de sódio devido a sua maior solubilidade em água fria (Fertah et al., 2017).

Além das algas, o alginato pode ser obtido também a partir de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Azotobacter* presentes no solo. A sua produção por microorganismos permite uma exploração controlada de suas fontes naturais, além de ser possível obter materiais específicos com características uniformes (Garcia-Cruz; Foggetti; Silva, 2008; Food Ingredients Brasil, 2013; Gao; Pollet; Avérous, 2017). A extração do alginato é realizada através de uma série de etapas envolvendo a dissolução do ácido algínico na biomassa de algas marinhas com uma solução alcalina, precipitação de alginato de sódio com cloreto de cálcio, filtração e subsequentes operações de purificação e secagem (Qin et al., 2018).

A estrutura do alginato é formada por ácido α -L-gulurônico (G) e o ácido β -D-manurônico (M), unidos por ligações glicosídicas 1-4 (Figura 4) que se agrupam em blocos sequenciais MM, MG e GG. Estas ligações variam com a proporção, distribuição e número de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas destes blocos, que irão definir as configurações espaciais dos blocos M e G, determinando as propriedades químicas e físicas da molécula de alginato. As unidades M e G nos alginatos podem ser aleatoriamente ou não aleatoriamente organizadas como sequências heterogênea ou homogênea (Fu et al., 2011).

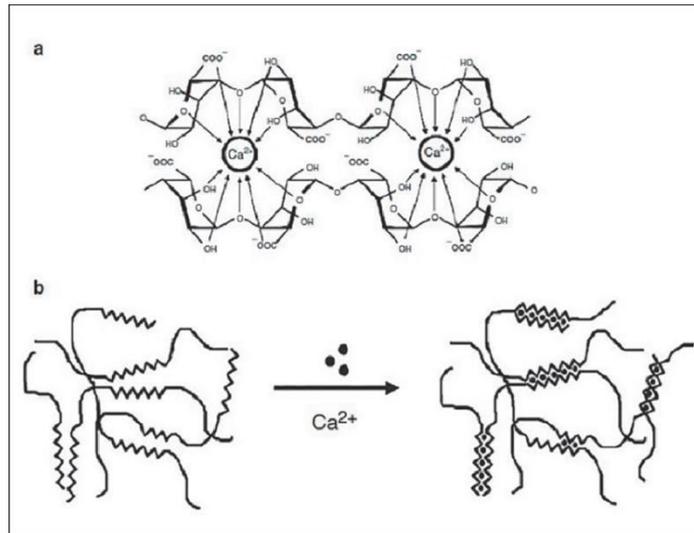
multivalentes, como íons de cálcio, ou ainda quando o pH do meio é inferior a 3,5, há a formação de gel. O seu volume pode aumentar em 10 vezes após absorção de água do meio (Guo et al., 2020).

A afinidade por cátions e as propriedades de formação de gel do alginato estão principalmente relacionadas ao conteúdo de resíduos gulurônicos (G), pois quando dois resíduos gulurônicos são adjacentes no polímero eles formam um sítio de ligação para cátions polivalentes (Smidsrod; Draget, 1996). Em outras palavras, esses resíduos (G) são responsáveis pela força do gel, além da sua maior solubilidade. Por outro lado, os resíduos manurônicos (M) são responsáveis por sua flexibilidade, maciez e elasticidade, além de conferir menor solubilidade à formulação. O teor de G e M do alginato pode afetar significativamente suas propriedades gelificantes e, portanto, é importante para fins industriais e acadêmicos. É importante salientar que o alginato é incapaz de formar géis se a fração molar dos blocos G for menor que 20-25% (Petrova et al. 2019).

Para explicar as propriedades gelificantes do alginato, um modelo foi proposto por Grant et al. (1973), conhecido como o modelo “caixa de ovo” (Figura 5). Esse modelo exemplifica como os cátions (como o cálcio) interagem com os monômeros de ácidos gulurônicos gerando um emparelhamento de blocos G, sendo que o alginato modifica a sua forma linear gerando uma rede tridimensional, ampliando a possibilidade de mais íons cálcio reagirem com o alginato, formando então estruturas cada vez mais complexas (Fu et al., 2011).

Nas indústrias alimentícias e têxteis os alginatos são amplamente utilizados como espessantes, estabilizadores e formadores de filme. Por ser um polissacarídeo não digerível, também pode ser classificado como fibra alimentar, sendo inclusive utilizado para reduzir a absorção intestinal de nutrientes, promover saciedade e interferir no índice glicêmico. Sua ampla gama de usos corresponde à natureza heterogênea desse polímero de ocorrência natural. Por ser biocompatível, biodegradável, atóxico e não imunogênico, o alginato é usado na indústria farmacêutica, odontológica e biomédica para controlar/sustentar a liberação de fármacos a partir de formas farmacêuticas diversas (Onsoyen, 1996; Brownlee et al., 2005). Normalmente, utiliza-se uma concentração dentro da faixa de 1 a 10% (p/p) de alginato em determinado produto.

Figura 5 – A. Modelo “caixa de ovo” para a estrutura do gel de alginato de cálcio. B. Formação de junções intercadeias.



Fonte: Rehm (2009).

O peso molecular do alginato (32-400 kDa) pode influenciar significativamente suas propriedades de gelificação, incluindo intumescimento, encolhimento, rigidez mecânica e capacidade de resistir à interferência de cátions monovalentes. Com a redução do seu peso molecular, a atividade biológica do alginato pode ser perdida, afetando o desempenho de suas características funcionais. Por outro lado, com o aumento do peso molecular, sua taxa de gelificação torna-se mais rápida e o gel formado é mais resistente à ruptura (Farrés; Norton, 2014; Cao et al., 2020). Esse aumento de resistência acontece até o limite de 240 kDa (viscosidade intrínseca < 4,8 dL/g); se o peso molecular for superior a 240 kDa, o efeito de força do gel é insignificante (Martinsen; Skjåk-Bræk; Smidsrød, 1989; Hu et al., 2021).

O alginato tem sido utilizado para encapsular vários materiais, tais como óleo essencial de tomilho (Benavides et al., 2016), células, enzimas e lípidios (Dias et al., 2017), microalgas como a espirulina (Rajmohan; Bellmer, 2019). São inúmeros os artigos publicados associando o alginato com a gelificação iônica, desde o ano de 1989. A matriz de alginato sofre hidratação quando entra em contato com o fluido gástrico. A superfície polimérica torna-se tumefeita, de maneira previsível, formando uma camada gelatinosa que atua como um limitador da velocidade de liberação dos ativos encapsulados (Barrocas et al., 2007).

3.4 Óleo essencial de cravo-da-índia

A espécie *Syzygium aromaticum* (L.) também conhecida como *Eugenia caryophyllata* L. pertence à família *Myrtaceae*, cresce em climas tropicais e tem sido amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa há mais de 2000 anos (Bhowmik et al., 2012). É espécie nativa da Indonésia, mas hoje em dia é cultivada em várias partes do mundo, inclusive no Brasil devido ao clima favorável, quente e úmido. Esta planta é uma das mais ricas fontes de compostos fenólicos, hidrocarbonetos, monoterpenos e sesquiterpenos, fato que explica seu grande potencial para produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentícios e aplicações agrícolas (Cortés-Rojas; Souza; Oliveira, 2014). Segundo Batiha et al. (2020), é a especiaria mais importante e a segunda mais valiosa no comércio mundial.

O craveiro-da-índia é uma árvore de ciclo perene (Figura 6), que cresce a uma altura que varia de 10 a 20 metros, possui folhas ovais grandes e flores de cor vermelha brilhante em formato de sino que se apresentam em numerosos grupos de cachos terminais. Os botões florais aparecem quatro anos após o plantio e são colhidos quando chegam a 1,5-2 cm de comprimento (Alma et al., 2007).

Figura 6 – Espécie *Syzygium aromaticum*. A - Botões florais do craveiro-da-índia prontos para serem coletados. B - Botões florais secos (cravo-da-índia).



Fonte: Google imagens.

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (2019), o botão floral seco desta planta possui odor forte, aromático e característico. Ao ser pressionado exsuda óleo e é indicado pelo nome inglês “cravo”, derivado da palavra latina “clavus” (prego), pois a forma se assemelha à de um prego de tamanho pequeno. Atualmente, o cravo-da-índia é usado em três formas diferentes, como botões secos inteiros (comumente chamados de “cravinho”), tempero moído e óleo essencial. Embora todas as formas

compartilhem propriedades biomédicas relevantes, elas diferem no grau de potência, sendo o óleo essencial o mais potente e sua forma moída a menos potente já que parte dos seus voláteis é perdida durante o processo de moagem.

Apesar de o cravo-da-índia ser utilizado, desde a antiguidade, como tempero para diversos alimentos e conservante natural, suas atividades farmacológicas são evidentes e são relatadas amplamente na literatura: anestésica, estimulante, antioxidante (Gülçin, 2012; Bakour et al., 2018; Hassine et al., 2021), antibacteriana (Abdullah et al., 2015), antifúngica (Rana; Rana; Rajak, 2011; Ascensão; Mouchrek Filho, 2013; Puškárová et al., 2017), anti-tripanosoma (Zanusso Junior et al., 2018), anti-inflamatória (Han; Parker, 2017; Marmouzi et al., 2019), inseticida (Hassine et al., 2021), larvicida (Gohary et al., 2021) e anti-sépticas. O óleo essencial encontra aplicações, ainda, na assistência odontológica, incluindo tratamento de infecções gengivais, queimaduras e distúrbios respiratórios e digestivos (Kim et al., 1998; Chaieb et al., 2007). Segundo Córtes-Rojas et al. (2014), devido ao poder antioxidante e antimicrobiano do cravo-da-índia, este pode ser considerado um importante conservante em inúmeros alimentos principalmente no processamento de carnes, em substituição aos conservantes químicos.

Segundo Vicidomini, Roviello e N. Roviello (2021), o cravo-da-índia é dotado de propriedades medicinais consideradas relevantes na prevenção de infecções bacterianas secundárias durante a terapia da COVID-19. Seu óleo essencial já havia mostrado efeitos antibacterianos notáveis contra as infecções de pacientes hospitalizados imunossuprimidos (Chaieb et al., 2007). As composições químicas dos extratos aquosos e etanólicos de cravo-da-índia foram investigadas sobre seus potenciais na supressão da ligação da proteína SARS-CoV-2 spike-ACE2, reduzindo a disponibilidade de ACE2 e eliminando os radicais livres (Yanfang et al. 2022).

A *Food and Drug Administration* (FDA) confirmou a segurança de botões de cravo, óleo de cravo, eugenol e oleorresinas como suplemento alimentar (Vijayasteltar et al., 2016) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstrou que a quantidade diária aceitável de cravo em humanos é de 2,5 mg/kg de peso corporal (Ogunwande et al., 2005). Embora toda substância pode ser considerada tóxica a depender da dose administrada ou absorvida, do tempo e frequência de exposição e da via de administração, em um estudo toxicológico pré-clínico do extrato do cravo-da-índia em roedores foi observado boa tolerabilidade em contato com a pele, bem como baixo índice de alergia quando adicionado a produtos de higiene pessoal, a

produtos odontológicos e a perfumes, desde que as quantidades ministradas sejam feitas de maneira correta e em concentrações seguras (Valente et al., 2009; Affonso et al., 2012).

Cerca de 30 compostos já foram identificados no óleo essencial de cravo (OEC), sendo os principais os fenilpropanóides, como eugenol (70-85%) e seus derivados. Além destes, níveis menores de compostos orgânicos β -cariofileno (5-12%) e α -humuleno (El Asbahani et al., 2015; Haro-González et al., 2021). A concentração de cada componente no óleo pode variar de acordo com a parte da planta utilizada para a extração (Oliveira et al., 2009). Seus compostos instáveis e voláteis são capazes de se decompor ou evaporar facilmente sob condições de processamento, durante a utilização e armazenamento, ou quando incorporados em alimentos ou embalagens como resultado de altas temperaturas, baixas pressões, presença de ar e luz.

O eugenol, composto majoritário, foi isolado pela primeira vez em 1929 e, em seguida, começou a ser produzido em larga escala por um processo que envolve a destilação fracionada. Esse composto bioativo é amplamente disponível em várias outras ervas, como canela e pimenta (Taleuzzaman et al., 2021). O uso do eugenol na odontologia é bastante conhecido em alguns tipos de restaurações dentárias, pois apresenta eficácia contra dores de dente, já que consegue atravessar o tecido da polpa dentária e chegar à corrente sanguínea. Além disso, detém capacidade de formar uma espécie de cimento provisório ou intermediário quando misturado ao óxido de zinco. A produção desse produto libera um odor característico do eugenol, fazendo com que esse cheiro seja comumente associado aos consultórios odontológicos (Martínez-Herrera et al., 2016; Batiha et al., 2020).

O efeito sinérgico do eugenol com vários antibióticos, por exemplo, vancomicina, penicilina e eritromicina, tem sido relatado na literatura. Ao potencializar ação do fármaco, reduz sua concentração inibitória mínima (CIM), o que tem o efeito de reduzir a resistência aos antibióticos entre os patógenos (Ulanowska; Olan, 2021).

Quadro 10: Atividades biológicas do óleo essencial de cravo-da-índia.

Atividades biológicas	Autor(es), ano
Antibacteriana <ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Salmonella</i> sp. • <i>Serratia</i> sp. • <i>Klebsiella</i> sp. • <i>Kluyvera</i> sp. • <i>Enterobacteriaceae</i> sp. 	<p>Mytle et al., 2006 Beraldo et al., 2013 Gupta et al., 2013 Mishra; Sharma, 2014 Radünz et al., 2018 Thielmann; Muranyi; Kazman, 2019 Selles et al., 2020 Kacaniová et al., 2021 Ginting; Retnaningrum; Widiasih, 2021</p>
Antifúngica <ul style="list-style-type: none"> • <i>Fusarium moniliforme</i> • <i>Fusarium oxysporum</i> • <i>Fusarium chlamydosporum</i> • <i>Aspergillus</i> sp. • <i>Mucor</i> sp. • <i>Trichophyton rubrum</i> • <i>Microsporum gypseum</i> • <i>Alternaria alternata</i> • <i>Helminthosporium oryzae</i> • <i>Rhizoctonia bataticola</i> • <i>Candida albicans</i> • <i>Candida krusei</i> • <i>Candida parapsilosis</i> • <i>Candida glabrata</i> 	<p>Beg; Ahmad, 2002 Pina-Váz et al., 2004 Rana; Rana; Rajak, 2011 Ascenção; Mouchrek Filho, 2013 Puškárová et al., 2017 Kaur; Kaushal; Rani, 2019 Shahbazi, 2019 Santos Júnior et al., 2021 Hekmatpanah et al., 2022 Biernasiuk; Baj; Malm, 2023</p>
Antiparasitária <ul style="list-style-type: none"> • <i>Leishmania tropica</i> • <i>Leishmania major</i> • <i>Trichinella spiralis</i> • <i>Dermatophagoides farinae</i> • <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> • <i>Rhipicephalus microplus</i> • <i>Dermatophagoides farina</i> 	<p>Kim; Kim; Ahn, 2003 Kim; Sharma, 2011 Ferreira et al., 2018 Fahmy; Zalat; Rabei, 2020 Moemenbellah-Fard et al., 2020</p>
Larvicida <ul style="list-style-type: none"> • <i>Aedes aegypti</i> • <i>Aedes albopictus</i> 	<p>Rodrigues et al., 2019 Santos et al., 2020 Budiman et al., 2021 Budiman et al., 2022 Mohd-Nawi et al., 2022 Santos et al., 2022</p>
Anti-inflamatória	<p>Öztürk; Özbek, 2005 Bachiega et al., 2012 Han; Parker, 2017 Nikoui et al., 2017</p>

Antioxidante	Viuda-Martos et al., 2010 Silvestri et al., 2010 Gülçin, 2012 Pérez-Rosés et al., 2016 Bakour et al., 2018 Radünz et al., 2018 Farias et al., 2019 Kaur; Kaushal; Rani, 2019 Selles et al., 2020 Hassine et al., 2021 Al-Zereini et al., 2022 Johari; Khan, 2022
Anestésico	Fujimoto et al., 2017 Kheawfu et al., 2017

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver encapsulados estáveis termicamente, formados por alginato de sódio e óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) através da técnica de gelificação iônica externa com posterior liofilização, para empregabilidade como agente antioxidante.

4.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o óleo essencial de cravo-da-índia quanto sua densidade, pH e composição química (GC/MS);
2. Desenvolver formulações poliméricas de alginato de sódio para a incorporação de diferentes concentrações (0,1%, 0,5% e 1,0%) de óleo essencial de cravo-da-índia pela técnica de gelificação iônica externa;
3. Realizar desidratação dos encapsulados por liofilização;
4. Quantificar o teor de ativos retidos pela parede polimérica de alginato e identificar o percentual de óleo essencial perdido no processo;
5. Identificar a concentração de óleo essencial que proporciona maior eficiência de encapsulação;
6. Realizar caracterização dos encapsulados liofilizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Análise térmica por TGA e DSC;
7. Determinar o grau de intumescimento dos encapsulados liofilizados em meios ácido e tampão PBS;
8. Determinar a liberação do eugenol aprisionado nos encapsulados liofilizados em diferentes tempos;
9. Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial e dos encapsulados liofilizados pelas técnicas de DPPH e FRAP.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

O alginato de sódio e o cloreto de cálcio grau farmacêutico para uso alimentício e farmacêutico foram obtidos da farmácia de manipulação Alquimia (Indaiatuba/SP – Centro). Reagente Folin-Ciocalteau (Lote: 126613 – Cód. P.01.0132.000.00.78). O óleo essencial de cravo-da-índia foi obtido a partir da empresa Quinarí (responsável técnico José Reinaldo de Souza – Jandira/SP) e é proveniente da Indonésia (Registro na ANVISA: 25351.183090/2017-50; número CAS: 8000-34-8; 84961-50-2 / *Chemical Abstracts Service*). Mais detalhes estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Especificações do OEC obtido comercialmente.

Análises	Especificações	Resultados
Aparência	Líquido amarelo claro à amarelo dourado	De acordo
Aroma	Quente, doce e picante	De acordo
Nota do perfume	Média	De acordo
Índice de refração (20 °C)	1,520 – 1,540	1,535
Rotação óptica (20 °C)	[-2°; 0°]	-0,7°
Solubilidade	Solúvel em álcoois e óleos vegetais (fixo); insolúvel em água.	De acordo

Dados disponibilizados pelo fornecedor.

5.2 Métodos

Para a realização dos experimentos e produção dos encapsulados, foi traçado um planejamento de desenvolvimento de duas formulações contendo diferentes concentrações de alginato de sódio (1,0% e 2,0%) e óleo essencial (1,0% e 2,0%). A escolha da concentração de 1,0% (p/v) de alginato de sódio e 1,0% (v/v) de óleo essencial foi baseada na eficiência de encapsulação obtida por GC/MS. Houve baixa encapsulação quando utilizadas as concentrações de alginato de sódio e de óleo essencial mais altas, de acordo com a Tabela 2 a seguir.

Tabela 2. Formulações desenvolvidas inicialmente.

	Alg1% + OEC1%	Alg1% + OEC2%	Alg2% + OEC1%	Alg2% + OEC2%
EE%	39,3	23,0	21,0	16,0

EE%: eficiência de encapsulação (%) baseada no eugenol.

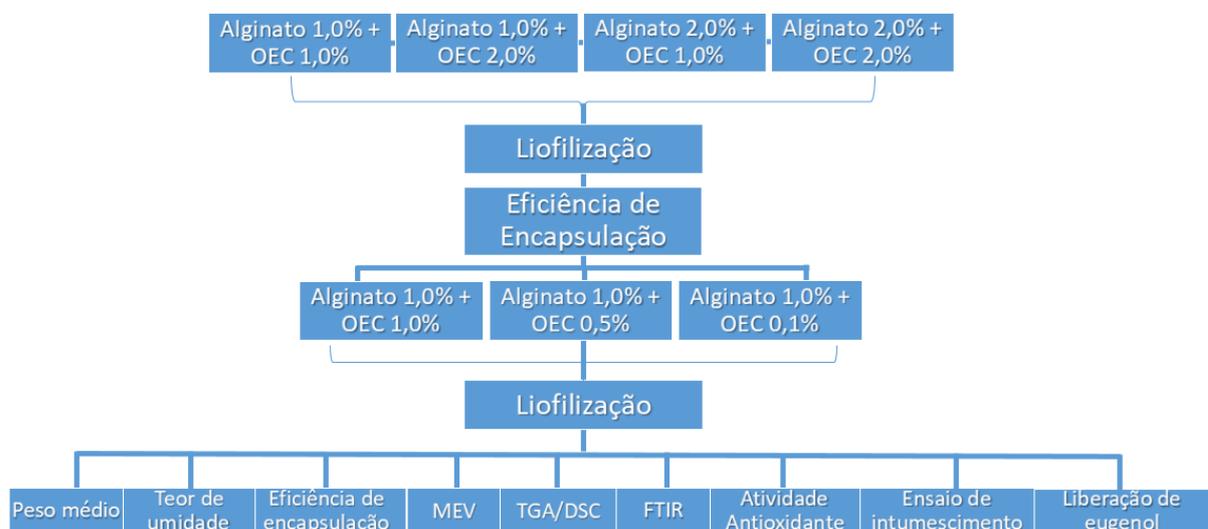
Em seguida, optou-se por observar a variação de eficiência de encapsulação a partir de três concentrações de óleo essencial, tomando como base os estudos anteriores. Portanto, as concentrações de 1,0% (v/v), 0,5%(v/v) e 0,1%(v/v) de óleo essencial foram utilizadas para a produção de novos encapsulados com alginato de sódio a 1,0% (p/v). Observe a tabela a seguir.

Tabela 3. Formulações desenvolvidas com alginato 1,0% (p/v).

	OEC 1,0%, v/v	OEC 0,5%, v/v	OEC 0,1%, v/v
EE%	39,3	50,4	76,9

EE%: eficiência de encapsulação (%) baseada no eugenol.

A partir desses dados, foi dada continuidade aos experimentos com os encapsulados de alginato de sódio 1,0% com variações de óleo essencial de 1,0%, 0,5% e 0,1%. Mais adiante, está disposto o fluxograma do planejamento experimental (Figura 7).

Figura 7 - Fluxograma do planejamento experimental.

Fonte: Autora (2024).

5.2.1 Densidade e pH do óleo essencial (OE)

A densidade do óleo essencial de cravo-da-índia (OEC) foi determinada através de um picnômetro de volume nominal de 10 mL (20° C), previamente calibrado com água destilada. A análise do pH foi realizada em pHmetro digital (Quimis® Q400MT), utilizando-se um eletrodo de vidro previamente calibrado em soluções tampão de pH 7,0 e 4,0, tomando cuidado para que a ponte salina estivesse mergulhada no líquido.

5.2.2 Identificação química (GC/MS)

A separação e identificação dos componentes presentes no OEC foram realizadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS) modelo *Shimadzu* GCMS-QP 2010 Plus. A solução estoque foi preparada dissolvendo o OEC em hexano para a obtenção das concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 µg/mL, a fim de se obter a curva de calibração. A coluna capilar cromatográfica de sílica apolar teve como gás de arraste o hélio (1,0 mL/min.). A corrida cromatográfica iniciou em 60 °C com aumento de 3 °C/min. até 90 °C; a temperatura se elevou 30 °C/min. até 210 °C. O modo de injeção foi sem divisão de fluxo (Splitless) no volume de 1 µL. A curva de linearidade foi obtida por regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela equação $y = ax + b$. A faixa linear foi calculada usando o coeficiente de determinação (R^2), com o critério mínimo aceitável de 0,99.

5.2.3 Determinação do teor de fenóis totais

A determinação do conteúdo total de fenóis foi realizada em triplicata, de acordo com o método de Folin-Ciocalteu descrito por Woisky (1998). A curva padrão de calibração foi construída utilizando o ácido gálico (*Sigma Aldrich*) em diferentes concentrações (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 µg/mL). Em cada balão volumétrico de 5 mL, adicionou-se 3,5 mL de água destilada, 400 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e uma alíquota da solução estoque de ácido gálico correspondente a concentração desejada, agitando-se levemente por alguns segundos. Em seguida, foram adicionados 600 µL da solução saturada de carbonato de sódio a 20% em intervalos de um minuto para cada balão e o volume foi completado com água destilada. A reação ocorreu com o auxílio de banho-maria a 50 °C por 20 minutos, em seguida, foi realizada a leitura em

espectrofotômetro UV-Vis, modelo 1240 Shimadzu, no comprimento de onda de 760 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados. Para a determinação do teor de fenóis totais do óleo essencial e dos encapsulados liofilizados foi utilizada a concentração de 25 µg/mL. O resultado foi expresso em Equivalentes de Ácido Gálico (EAG).

5.2.4 Desenvolvimento dos encapsulados

O óleo essencial de cravo-da-índia foi encapsulado pela técnica de gelificação iônica utilizando o método *dripping*, que se trata do gotejamento de uma solução em uma outra, gerando assim grânulos esféricos por meio de gelificação química. O agente encapsulante utilizado foi o alginato de sódio a 1,0% (p/v), solução em água destilada a 35 °C. Outros autores utilizaram o biopolímero na concentração de 1,0%, p/v (Benavides et al., 2016). Concentrações elevadas de alginato de sódio têm sido relatadas (Zam et al., 2014; Medeiros et al., 2022). A escolha da concentração de 1,0% (p/v) de alginato se deu através de estudos prévios, onde a eficiência de encapsulação foi mais baixa em concentrações de alginato superiores, conforme relatado anteriormente. A Tabela 4 apresenta os componentes da formulação e suas respectivas concentrações.

Table 4: Componentes químicos dos encapsulados LF1, LF2 e LF3.

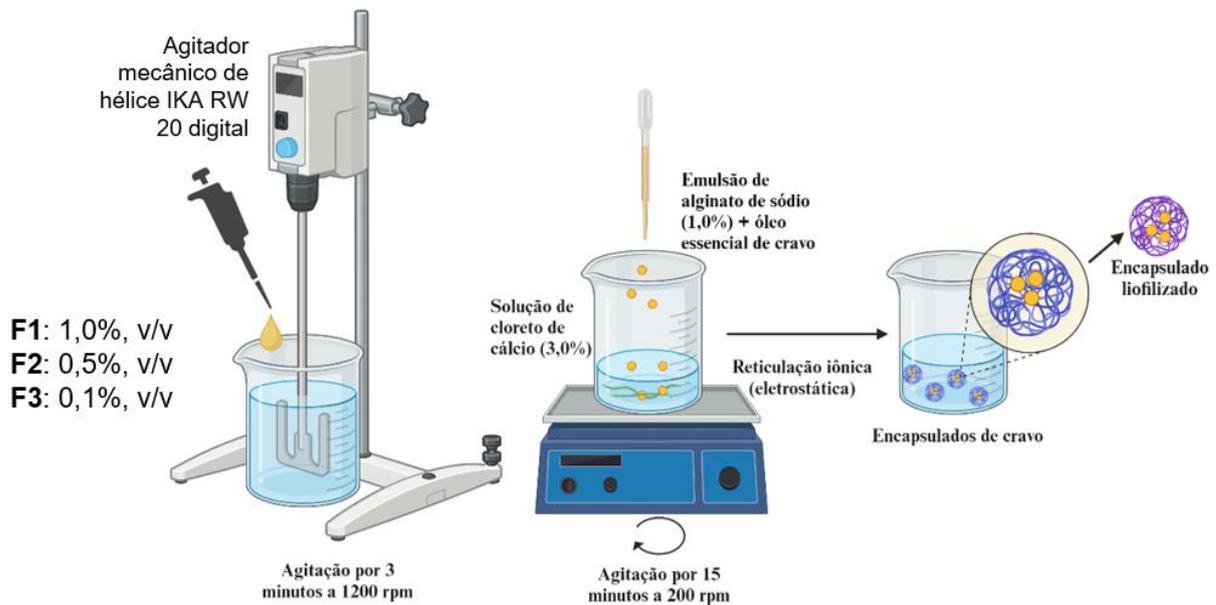
	F1	F2	F3
OEC	1,0%, v/v	0,5%, v/v	0,1%, v/v
Alginato de sódio	1,0%, p/v	1,0%, p/v	1,0%, p/v
Cloreto de cálcio	3,0%, p/v	3,0%, p/v	3,0%, p/v

OEC: óleo essencial de cravo.

As soluções de alginato de sódio foram deixadas sob agitação constante em agitador mecânico de hélice IKA RW 20 digital, durante 30 minutos a 1200 rpm. O óleo essencial de cravo (0,1%, 0,5% e 1,0%, v/v em relação a solução de alginato) foi adicionado às soluções de alginato e emulsionados por 3 minutos. A emulsão foi gotejada com pipeta de *Pasteur* sobre a solução de cloreto de cálcio (3,0%, p/v), sob

agitação constante em agitador magnético (200 rpm) por mais 15 minutos. Os encapsulados formados foram lavados em água destilada com o auxílio de um tamis redondo de aço inoxidável (1 mesh, 25,4 mm) para a remoção do cloreto de cálcio remanescente e denominados F1 (1,0% de óleo essencial), F2 (0,5% de óleo essencial) e F3 (0,1% de óleo essencial). A Figura 8 demonstra o passo a passo do desenvolvimento dos encapsulados.

Figura 8 - Processo de obtenção dos encapsulados de óleo essencial OEC.



Fonte: Autora (2024).

5.2.5 Processo de secagem

Os encapsulados foram congelados em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, e levados a liofilizador Terroni LS 3000, nas condições de pressão 5 mmHg e uma temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por mais 24 horas. Os encapsulados desidratados foram armazenados em dessecador e denominados encapsulados LF1 (1,0% de óleo essencial), LF2 (0,5% de óleo essencial) e LF3 (0,1% de óleo essencial).

5.2.6 Eficiência de encapsulação

Para determinar a quantidade de OEC aprisionado na matriz polimérica, $\pm 0,1$ g dos encapsulados foram submetidos a ultrassom (15 min.) com 2,0 mL de água

destilada. Em seguida, aproximadamente 8,0 mL de hexano foram adicionados. A porção apolar (1 µL) foi filtrada e injetada em GC/MS para análise nas condições descritas anteriormente (tópico 4.2.2). Para determinação da quantidade de OEC não encapsulado, o cloreto de cálcio também foi injetado para análise, após extração com hexano. A eficiência de encapsulação foi calculada a partir da diferença do OEC total detectado no encapsulado e a sua concentração teórica.

$$EE\% = \frac{EE}{EO} \times 100 \quad (1)$$

Onde, EE = Eficiência de Encapsulação; EM = teor de eugenol no encapsulado; EO = teor de eugenol no óleo essencial.

$$OS\% = \frac{ES}{EO} \times 100 \quad (2)$$

Onde, OS = Óleo essencial no sobrenadante; ES = teor de eugenol no sobrenadante; EO = teor de eugenol no óleo essencial.

5.2.7 Caracterização dos encapsulados liofilizados

5.2.7.1 Avaliação do peso médio

Para a determinação do peso médio, foi utilizada balança digital analítica da marca Shimadzu AUY220, de capacidade 0,001g-200g, onde foram pesadas 20 unidades de cada amostra e o peso médio foi definido pela média dos pesos obtidos. Esse ensaio seguiu as normas da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019). O teste possibilita verificar se as unidades de um mesmo lote apresentam uniformidade de peso.

5.2.7.2 Teor de umidade

Para esta análise, 1,0 g dos encapsulados foram submetidos ao infravermelho em analisador de umidade modelo MOC63u da Shimadzu, com ajuste da intensidade da radiação emitida até 105 °C. O teste foi realizado em triplicata.

5.2.7.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O estudo da morfologia das amostras foi realizado em microscópio TESCAN VEGA3 com aceleração de voltagem de até 15 kV. Os encapsulados foram fixados com fita metálica adesiva de carbono de dupla face em um *stub* circular de aço, e, em seguida, metalizados em alvo de ouro por 200 segundos (corrente de 45 mA) para a obtenção das imagens. A varredura foi realizada em diferentes pontos com ampliação de foco variável, com o objetivo de observar a forma, a porosidade e a presença de fissuras e de deformações. O tamanho das partículas foram analisadas pelos softwares VEGATC® e ImageJ®.

5.2.7.4 Espectroscopia FTIR/ATR

Os espectros de infravermelho foram obtidos em Espectrômetro Thermo Scientific (Nicolet™ iS™ 10 FT-IR Spectrometer), na faixa de 4000-650 cm^{-1} , com 64 varreduras, utilizando pastilhas de brometo de potássio. Os materiais puros (alginato e OEC), os encapsulados LF1, LF2 e LF3 e os encapsulados sem OEC (placebo) foram analisados. Foi aplicada pressão de 100 psi. Os dados obtidos foram compilados através do software Origin® versão 8.0.

5.2.7.5 Análise térmica (TGA/DSC)

As análises termogravimétricas e calorimétricas foram obtidas em aparelho *Shimadzu* modelo TGA-50H e DSC-60, respectivamente. A temperatura foi de 25 a 800 °C (10 °C/minuto), sob atmosfera de nitrogênio e fluxo de 20 mL/min. ou 50 mL/min, respectivamente. Os dados termogravimétricos, inclusive a termogravimetria derivada, foram analisados utilizando o software TasyS da *Shimadzu*.

5.2.8 Atividade antioxidante

5.2.8.1 DPPH

O ensaio foi realizado de acordo com Gulcin e Alwasel (2023). Foi preparada uma solução de 0,1 mM do radical DPPH em etanol absoluto e armazenada em vidro âmbar. Em balões de 5,0 mL adicionou-se 2,0 mL da solução de DPPH e, em

intervalos de 1 minuto para cada balão, uma alíquota das amostras, contendo 5, 10, 25, 30 e 40 µg/mL e completou-se o volume com etanol absoluto. Aguardaram-se 30 minutos para ocorrência da reação em ambiente escuro. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis modelo Shimadzu 1240, com comprimento de onda de 517 nm. O percentual de atividade antioxidante foi calculado baseando-se na seguinte equação:

$$\%DPPH \bullet \text{ remanescente} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{(\text{Abs controle} - \text{Abs branco})} \times 100 \quad (1)$$

Onde: **Abs amostra** = absorbância da reação entre a solução do radical DPPH e a amostra antioxidante; **Abs branco** = absorbância da solução do solvente utilizado para preparar a amostra antioxidante; **Abs controle** = absorbância do radical DPPH com uma alíquota do solvente correspondente ao volume da maior concentração da amostra.

Após a determinação do radical DPPH remanescente, determinou-se a porcentagem de inibição do radical DPPH através da seguinte fórmula:

$$\%Inibição \text{ do radical DPPH} = 100 - \%DPPH \bullet \text{ remanescente} \quad (2)$$

5.2.8.2 FRAP

O ensaio de FRAP foi realizado conforme descrito por Benzie e Strain (1996). Em balões de 5,0 mL, adicionaram-se alíquotas de 90 µL contendo 25 µg/mL da amostra (OEC ou encapsulados), 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP (preparado a partir de 25 mL da solução tampão acetato a 0,3 M, 2,5 mL da solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) a 10mM, e 2,5 mL da solução aquosa de cloreto férrico a 20 mM). As soluções foram homogeneizadas em agitador de tubos e mantidas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Após o tempo de reação, a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis modelo Shimadzu 1240, comprimento de onda de 595 nm.

- **Solução de ácido clorídrico** 40 mM (MM = 36,46 g.mL⁻¹): em balão volumétrico, adicionar 50 mL de água ultrapura e 122 µL de HCl concentrado.

Completar o volume para 100 mL com água ultrapura. A validade da solução é indefinida. Armazenar em temperatura ambiente.

- **Solução de TPTZ** 10 mM (2,4,6-tri(2- piridil)-s-triazina; MM = 312,33 g/mol): dissolver 15,61 mg de TPTZ em 1 mL de HCl 40 mM e completar o volume para 5 mL com HCl 40 mM. Preparar e usar no dia da análise.
- **Solução de cloreto férrico** 20 mM (MM = 270,30 g/mol): dissolver 27,03 mg de cloreto férrico hexahidratado em 5 mL de água ultrapura. Preparar e usar no dia da análise.
- **Tampão acetato de sódio** 0,3 M com pH 3,6 (MM = 82,03 g/mol): dissolver 0,775 g de acetato de sódio em 230 mL de água ultrapura em balão volumétrico. Ajustar o pH para 3,6 com ácido acético glacial, adicionando aos poucos, aproximadamente 3 mL do ácido. Ajustar o volume para 250 mL com água ultrapura e verificar o pH da solução. A validade da solução é indefinida. Armazenar em temperatura ambiente.

5.2.9 Grau de intumescimento e liberação de eugenol

A capacidade de intumescimento e erosão dos encapsulados foi avaliada pelo percentual de variação do peso quando estes foram incubados em meio ácido (0,01 mol/L de ácido clorídrico com 2mg/mL de NaCl, pH 1,2) e em solução tampão fosfato salina (10 mM, pH 7,4) para investigar o comportamento dos encapsulados. O método baseou-se nos experimentos de Zheng et al. (2022). Cerca de 0,1g dos encapsulados liofilizados (LF1) foi submetido, separadamente, aos meios (10 mL) e mantidos sob temperatura ambiente (25 °C) sob baixa agitação de 1.200 rpm. Em intervalos de tempo de 10, 25, 30 e 60 minutos, os encapsulados foram retirados, secos e pesados. Para calcular o grau de intumescimento, foi considerado a variação de peso das amostras antes e após a imersão nos meios. Observe a equação 3.

$$\text{Grau de intumescimento} = \frac{(P_f - P_i)}{(P_i)} \times 100 \quad (3)$$

Onde, Pf = peso final dos encapsulados; Pi = peso inicial dos encapsulados.

Para a análise do percentual de liberação do óleo essencial aprisionado nos encapsulados LF1, o meio ácido nos diferentes tempos (10, 25, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos) foi recolhido, submetido a extração em hexano (proporção 1:1) e analisado em GC/MS nas mesmas condições descritas no item 5.3.2.

5.2.10 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram expressos no programa Microsoft Excel 2010 na forma de média \pm coeficiente de variação ($n = 3$). Os dados de fenóis e atividade antioxidante por DPPH e FRAP foram analisados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey. O valor de corte para rejeitar a hipótese nula foi de $p < 0,05$. As curvas de linearidade foram obtidas pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$. A faixa linear foi calculada usando o coeficiente de determinação (R^2), com o critério mínimo aceitável de 0,99. Para a elaboração dos elementos gráficos, foi utilizado o Programa Excel (Pacote Office 2010).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Características, densidade e pH do OEC

O OEC se apresenta como um líquido transparente, homogêneo, amarelo pálido, com odor característico de eugenol, e pH 5,2 ($n=3$; $\pm 0,34$). O valor de densidade encontrado no presente estudo, $d = 1,11 \text{ g/mL}$, foi superior ao relatado por outros autores, $0,973 \text{ g mL}^{-1}$ (Gomes et al., 2018) e $0,989 \text{ g/mL}$ (Teles et al., 2021). As condições de origem e crescimento da planta, o processamento pós-colheita e o método de extração do óleo essencial podem contribuir com diferenças sutis de densidade. Portanto, é comum observar variações na densidade de um mesmo óleo essencial, principalmente se eles forem obtidos de fontes diferentes ou em momentos distintos. É importante destacar também que a fração rica em eugenol possui maior densidade. O eugenol isolado tem densidade em torno de $1,06 \text{ g/mL}$, de acordo com o Programa Nacional de Toxicologia, Instituto de Ciências da Saúde Ambiental, Institutos Nacionais de Saúde (NTP). Pequenas variações de densidade não são significativas a ponto de afetar o uso dos óleos essenciais.

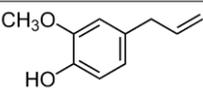
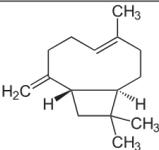
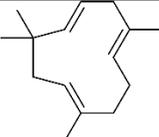
6.2 Identificação dos principais constituintes

Os principais componentes químicos presentes no OEC foram identificados através de GC/MS. A Tabela 5 demonstra o tempo de retenção de cada componente, bem como a estrutura química e a composição percentual relativa.

O eugenol foi o componente majoritário, mas outras substâncias como o β -cariofileno e o humuleno apresentaram-se relevantes na composição do óleo essencial. Esses dados são importantes, pois o eugenol demonstra importantes atividades farmacológicas, como as citadas pela revisão de literatura de Ulanowska e Olas (2021): antibacteriana, antiviral, antifúngica, anticancerígena, anti-inflamatória e antioxidante. Esses dados torna o eugenol um potencial componente de produtos com importância terapêutica. Em estudos recentes, o eugenol demonstrou ser uma alternativa no manejo clínico de várias apresentações de candidíase, especialmente apresentações mucocutâneas, como infecções orais e vulvovaginais (Didehdar; Chegini; Shariati, 2022).

O β -cariofileno, por sua vez, pode reduzir a concentração de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NF- κ B, e auxiliar no tratamento de patologias crônicas caracterizadas por inflamação e estresse oxidativo (Scandiffio et al., 2020). Em um estudo *in vitro*, demonstrou efeitos antibacterianos e antifúngicos importantes (Dahham et al., 2015).

Tabela 5 - Identificação dos principais componentes químicos do óleo essencial de cravo-da-índia (OEC).

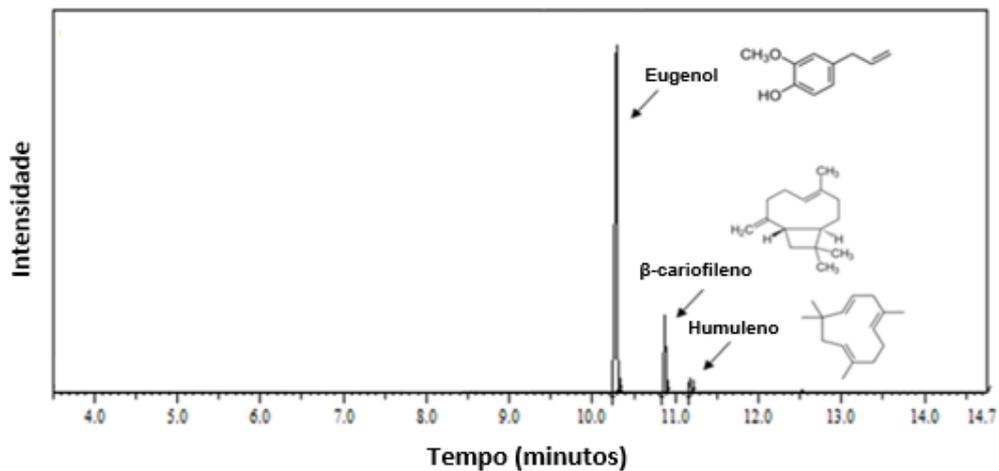
Pico	Tempo de retenção (min.)	Componente	Estrutura química	Teor (%)*
1	10.28	Eugenol		81,5
2	10.87	β -cariofileno		13,9
3	11.17	Humuleno		3,3

*Correspondente a 1 μ L (100 μ g/mL) do óleo essencial de cravo-da-índia injetado.

Em um estudo realizado por Kacániová et al. (2021), os constituintes majoritários no OEC também foram o eugenol (variando de 82,4% a 88,8%) e o β -cariofileno (variando de 0,91% a 14,0%). Outros constituintes foram identificados em quantidades inferiores a 0,1%. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (Cortés-Rojas; Souza; Oliveira, 2014; Baker; Grant, 2017; Gomes et. al., 2018; Zanusso Junior et al., 2018; Kunicka-Styczyńska et al., 2020; Hadidi et al., 2020; Teles et al., 2021; Hekmatpanah et al., 2022). De modo geral, pelo menos 50% da concentração total do óleo essencial de cravo deve ser composta por eugenol (Haro-González et al., 2021).

Sabe-se que a concentração dos componentes dos óleos essenciais de plantas de uma mesma espécie pode variar devido a fatores ecológicos e as condições do meio ambiente, interferindo inclusive nas propriedades farmacológicas do produto (Djouahri et al., 2015). Aqui está a importância da análise cromatográfica como controle de qualidade no desenvolvimento de novas formulações.

Figura 9 - Perfil cromatográfico do óleo essencial de cravo-da-índia obtido por GC/MS.



Fonte: Autora (2023).

6.3 Desenvolvimento dos encapsulados

Os encapsulados de alginato carregadas com óleo essencial de cravo-da-índia (F1, F2 e F3) foram obtidos um a um pela técnica de gotejamento em cloreto de cálcio. De uma forma geral, os encapsulados produzidos apresentaram-se macroscopicamente arredondados, rígidos ao toque, porém facilmente perfuráveis. Isso indica que as condições adotadas no processo de desenvolvimento foram adequadas para obtenção da morfologia desejada. A rigidez instantânea dos encapsulados é explicada por Reis et al. (2006), onde descreve que as interações iônicas entre os blocos G (ácido α -L-gulurônico) e os íons cálcio causam a formação de um gel resistente e termoestável. A estrutura tridimensional formada tem alto teor de água. Segundo Tonnesen e Karlsen (2002), durante a gelificação com alginato, os cátions divalentes se ligam preferencialmente aos blocos G de uma maneira altamente cooperativa, pois os resíduos G exibem uma afinidade mais forte por íons divalentes do que os resíduos M. Através desse processo, os íons difundem-se na partícula, favorecendo a reticulação de fora para dentro.

Devido ao processo de emulsificação O/A, os materiais encapsulados produzidos com menor percentual do OEC ficaram com aparência translúcida, enquanto aqueles mais concentrados apresentaram-se com coloração mais opaca

(Figura 10). O tamanho da partícula foi de, aproximadamente, $4,36 \pm 0,30$ mm (F1), $4,30 \pm 0,29$ mm (F2), $4,27 \pm 0,30$ mm (F3).

A morfologia dos encapsulados formados pode variar de acordo com as condições externas como o ângulo de gotejamento, diâmetro do orifício gotejador, viscosidade dos polímeros utilizados e a força da gravidade. Estudos realizados por Rajmohan e Bellmer (2019) mostram encapsulados de espirulina-alginato em forma de lágrima. Os formatos de gota, ou arredondado com bordas irregulares são comuns. No presente estudo, utilizou-se gotejamento por pipeta de *Pasteur*, mas é possível realizar a técnica utilizando outros aparatos como bicos atomizadores, que proporcionam maior precisão de dispersão e padronização da formulação.

A espessura e diâmetro dos encapsulados estão relacionados com a concentração de alginato na formulação, e não com a concentração de cloreto de cálcio (Rajmohan; Bellmer, 2019). Mas o tempo de permanência dos encapsulados na solução de cloreto de cálcio também é capaz de interferir nas características do produto final, tornando-o mais rígido e resistente. Segundo Racovita et al. (2009), a resistência dos encapsulados permanece constante após aproximadamente 20 minutos de reticulação. No entanto, após estudos prévios, sugere-se que os encapsulados devem ser mantidos em solução de cloreto de cálcio por 24 horas antes da lavagem para início dos ensaios, esse tempo garante a reticulação química de forma eficiente.

Figura 10 – Fotografia dos encapsulados produzidos por gelificação iônica. F1 – Alginato 1,0% + CaCl₂ a 3,0% + OE a 1,0%; F2 – Alginato 1,0% + CaCl₂ a 3,0% + OE a 0,5%; F3 – Alginato a 1,0% + CaCl₂ a 3,0% + OE a 0,1%. Tamanho de partícula: $4,36 \pm 0,30$ mm (LF1), $4,30 \pm 0,29$ mm (LF2), $4,27 \pm 0,30$ mm (LF3).



Fonte: Autora (2023).

A liofilização foi empregada com a finalidade de remover o conteúdo aquoso presente nos encapsulados e proporcionar maior estabilidade térmica ao produto final.

Os liofilizados encapsulados apresentaram-se rígidos, com aspecto ressecado, rugoso e murcho (Figura 11). Os encapsulados não se aglomeraram. Segundo Chan, Lee e Heng (2002), a deformação pode ser atribuída a formação de cristais de gelo durante o congelamento e a sublimação desses cristais sob a pressão proporcionada pelo vácuo no liofilizador, o que provoca um estresse mecânico na partícula. Os liofilizados apresentaram-se com tamanho de, aproximadamente 2,7 mm \pm 0,25 mm (LF1); 2,5 mm \pm 0,21 mm (LF2); 2,5 mm \pm 0,20 mm (LF3).

Essa técnica de encapsulação costuma formar partículas que variam o tamanho entre 0,5 e 3,0 mm (Reis et al., 2021). O tamanho dos encapsulados formados é dependente do diâmetro do aparato utilizado, da viscosidade e da concentração da solução biopolimérica, e da distância entre o gotejamento e a solução iônica (Burey et al., 2008). Os encapsulados são classificados na escala de macropartículas. Segundo Silva et al. (2003), as micropartículas apresentam diâmetros na faixa de 1 a 1.000 μ m.

Figura 11 – Fotografia dos encapsulados liofilizados. LF1 – Alginato de sódio a 1,0% + CaCl₂ a 3,0% + OE a 1,0%; LF2 – Alginato de sódio a 1,0% + CaCl₂ a 3,0% + OE a 0,5%; LF3 – Alginato de sódio a 1,0% + CaCl₂ a 3,0% + OE a 0,1%.



Fonte: Autora (2023).

6.4 Eficiência de encapsulação

A capacidade de encapsulação de um ativo é dependente da concentração da parede protetora formada pelo alginato (Łętocha; Miastkowska; Sikora, 2022). As três formulações apresentaram boa capacidade de encapsulação do OEC, sendo a formulação LF1 (1,0%, v/v) a que menos gerou perdas de óleo essencial na solução de cloreto de cálcio (Tabela 6).

De forma semelhante, em um estudo realizado por Hosseini e colaboradores (2013) com óleo essencial de *Satureja hortensis*, a eficiência de encapsulação variou de $52,4\% \pm 0,65$ a $66,4\% \pm 1,00$, diminuindo com o aumento do teor de óleo essencial. Altas concentrações de óleo essencial têm se mostrado mal mantidas no encapsulado de alginato. Esse achado pode implicar que o polímero alginato atinge seu ponto de saturação em baixas concentrações de óleo essencial. Em estudos prévios ao presente estudo, observou-se que teores altos de óleo essencial são pouco retidos no encapsulamento por alginato ($\pm 23\%$). Ao aumentar a concentração de alginato para 2%, a eficiência de encapsulação pode ser ainda menor ($\pm 16\%$).

Recentemente foi publicado um artigo por Xu et al. (2023) onde a eficiência de encapsulação do óleo essencial de cravo-da-índia encapsulado por quitosana foi de 39%. As nanocápsulas formadas foram utilizadas como conservantes e apresentaram alta eficiência. Como observado, os valores apresentados aqui para encapsulados liofilizados se assemelha ao estudo citado, apresentando ainda melhor encapsulação a depender da variação da concentração do óleo essencial, sendo assim, mostram-se promissores nessa área.

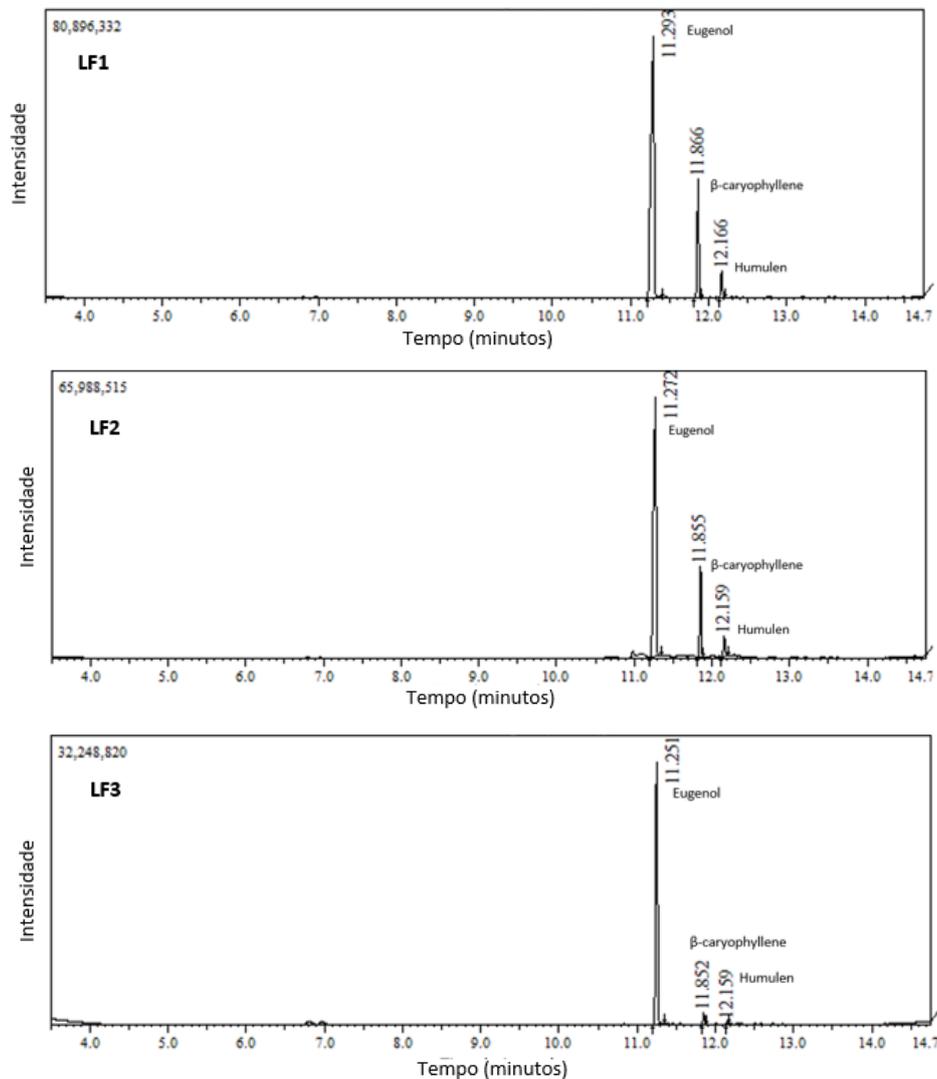
Tabela 6 – Eficiência de encapsulação do OE de cravo-da-índia.

	LF1	LF2	LF3
% incorporada (\pmd.p.)	39,3 ($\pm 0,79$)	50,4 ($\pm 0,63$)	76,9 ($\pm 0,51$)
% não incorporada (\pmd.p.)	2,4 ($\pm 0,23$)	4,0 ($\pm 0,42$)	9,3 ($\pm 0,36$)

* LF1: 1,0% (v/v) de óleo essencial; LF2: 0,5% (v/v) de óleo essencial; LF3: 0,1% (v/v) de óleo essencial. \pm d.p: desvio padrão.

Os perfis cromatográficos das formulações LF1 (1,0%), LF2 (0,5%) e LF3 (0,1%) estão dispostos na Figura 12. Como é esperado, os picos de eugenol, cariofileno e humuleno apresentaram-se com variações de intensidade e tempos de corrida semelhantes.

Figura 12 – Perfis cromatográficos dos encapsulados LF1, LF2 e LF3 obtidos por GC/MS.



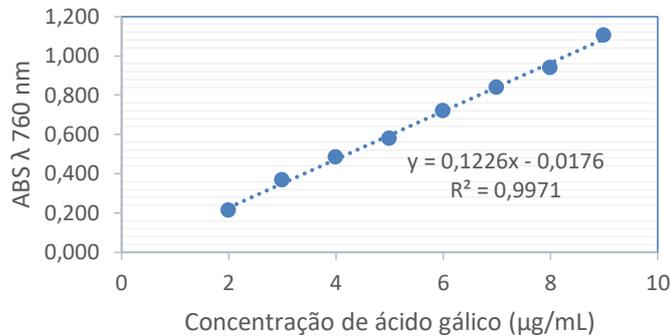
6.5 Determinação do teor de fenóis totais

Os fenóis são uma classe de compostos químicos que têm pelo menos um grupo hidroxila (-OH) ligado a um anel aromático. São conhecidos por suas propriedades antioxidantes, portanto, a determinação da quantidade de fenóis totais em produtos naturais pode indicar o potencial antioxidante do produto.

Uma das metodologias mais comuns para realizar o teste de fenóis totais é o método de Folin-Ciocalteu, onde a solução colorida formada pela reação desse reagente é composta por solutos que se comportam como cromóforos. Quando a luz monocromática é incidida sobre essa solução que contém o cromóforo, parte da

reação luminosa será absorvida; sendo assim, quanto maior a concentração de soluto na solução, maior será a absorção. O espectrofotômetro mede a intensidade dessa absorção e revela um valor denominado absorvância. A solução padrão de ácido gálico foi utilizada (Singleton; Rossi, 1965; Prior et al., 2005).

Figura 13 - Curva padrão de ácido gálico para fenóis totais.



Fonte: Autora (2023).

Segundo o banco de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, o cravo é a especiaria que apresenta o maior teor de polifenóis e compostos antioxidantes (Cortés-Rojas; Souza; Oliveira, 2014). A Tabela 7 a seguir demonstra o teor de fenóis identificado nas amostras.

Tabela 7 - Conteúdo de fenóis totais em amostras de óleo essencial de cravo-da-índia e encapsulados LF1, LF2 e LF3.

	FENÓIS TOTAIS (mg E.AG g ⁻¹)
Óleo essencial	449,9 ± 0,08 ^a
Encapsulado LF1	172,2 ± 3,85 ^b
Encapsulado LF2	147,6 ± 2,86 ^c
Encapsulado LF3	146,5 ± 5,54 ^c

*média dos valores obtidos ± coeficiente de variação. E.AG = equivalente de ácido gálico (m/m). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (p<0,05)

Foi possível determinar a concentração de compostos fenólicos em todas as formulações. Como é possível observar na Figura 14, a variação de coloração foi discreta, indicando a baixa concentração dos fenóis nas soluções testadas. Esse fato pode ser justificado pela dificuldade de dissolução dos encapsulados liofilizados para

a realização do teste. As amostras não se dissolvem com facilidade em água ou álcool etílico, as partículas permanecem rígidas e com limitada liberação na solução do óleo essencial encapsulado no alginato. De todo modo, a formulação LF1 apresentou 172,2 mg E.AG g⁻¹, concentração considerada suficiente para obtenção de atividades farmacológicas importantes. É importante ressaltar, ainda, que o teste foi realizado em concentrações baixas, e a concentração de ativos da formulação pode ser ajustada conforme a necessidade. Os encapsulados LF2 e LF3 não apresentaram diferenças entre si, mas foram estatisticamente diferentes do encapsulado LF1 ($p < 0,05$).

Figura 14 – Variações nas colorações formadas pela reação de Folin-Ciocalteu nos encapsulados liofilizados.



Fonte: Autora (2023).

6.6 Caracterização dos encapsulados liofilizados

6.6.1 Avaliação do peso médio

Os pesos médios dos encapsulados úmidos e liofilizados estão expressos na Tabela 8. O peso médio dos encapsulados foram aproximados, variando de 0,012 a 0,014 g para os encapsulados F1, F2 e F3, e de 0,0015 a 0,0016 após a liofilização. A remoção do teor aquoso reduziu significativamente o peso dos encapsulados, tornando-os leves e fáceis de manusear. Devido à sua menor necessidade de refrigeração, os encapsulados liofilizados são considerados mais convenientes para transporte e armazenamento em comparação aos produtos não liofilizados.

A variação discreta de peso médio entre os encapsulados do grupo úmido e os encapsulados do grupo seco pode estar relacionada a quantidade de óleo essencial em cada encapsulado. O peso médio pode ajudar a garantir a consistência do produto final, trazendo aparência e desempenho uniformes. Além disso, do ponto de vista farmacêutico a dose correta é fundamental para a eficácia e segurança do produto.

Um peso médio consistente garante que cada dose contenha a quantidade correta de ativos.

Tabela 8: Peso médio dos encapsulados úmidos e liofilizados.

	F1	F2	F3	LF1	LF2	LF3
Média (g)	0,014	0,012	0,012	0,0016	0,0015	0,0015
DP (%)	2,6	1,9	2,1	1,9	1,8	2,6
CV (%)	6,5	6,1	6,9	6,0	7,1	7,2

F1, F2 e F3 = encapsulados com 1,0%, 0,5% e 0,1% de óleo essencial, respectivamente. LF1, LF2 e LF3 = encapsulados liofilizados com 1,0%, 0,5% e 0,1% de óleo essencial, respectivamente. DP: desvio padrão. CV: coeficiente de variação.

6.6.2 Teor de umidade

O teor de umidade dos encapsulados obtidos por gelificação iônica foi de 89% \pm 0,02%. Outros autores obtiveram resultados inferiores: 79,37 \pm 0,06% (Cutrim; Alvim; Cortez, 2019); 77,03 \pm 0,01% (Moura et al., 2018). Esses valores são esperados, visto o alto teor de água retido na matriz. A umidade elevada pode afetar a estabilidade do encapsulado ao longo do tempo, potencialmente levando à degradação ou instabilidade da substância encapsulada, além de requerer condições específicas de armazenamento para preservar a qualidade e a vida útil.

Após a liofilização, o teor de umidade reduziu chegando a 4,7 \pm 0,05% nos encapsulados LF1, 4,1 \pm 0,09% nos encapsulados LF2 e 3,9 \pm 0,05% nos encapsulados LF3. Essa baixa umidade ajuda a prevenir o crescimento de microorganismos contaminantes no produto, reduzindo sua deterioração. Para a legislação brasileira de alimentos liofilizados, o máximo de umidade permitida é de 5% (Brasil, 2023).

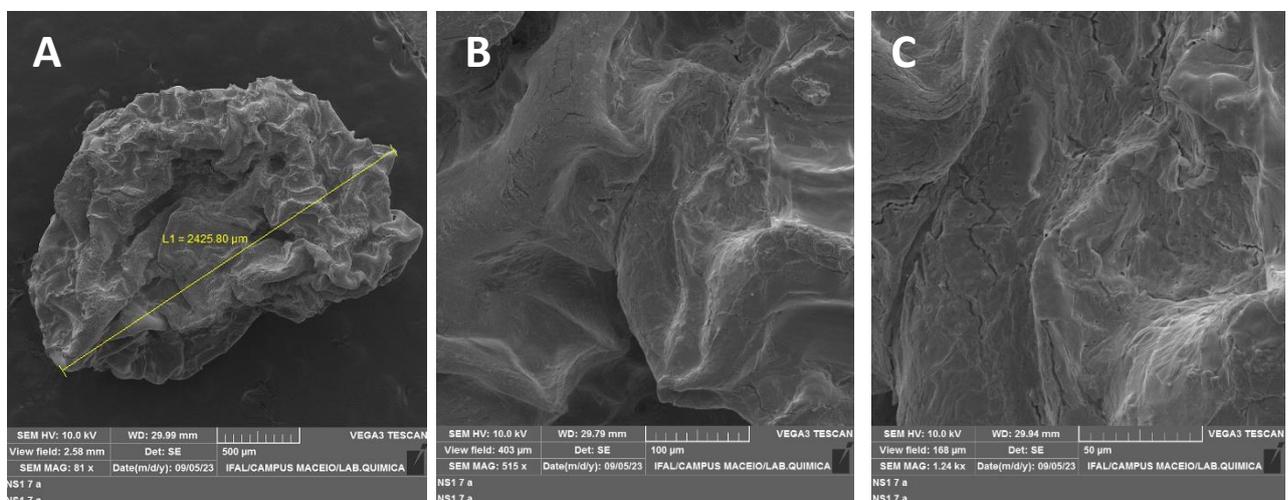
6.6.3 MEV

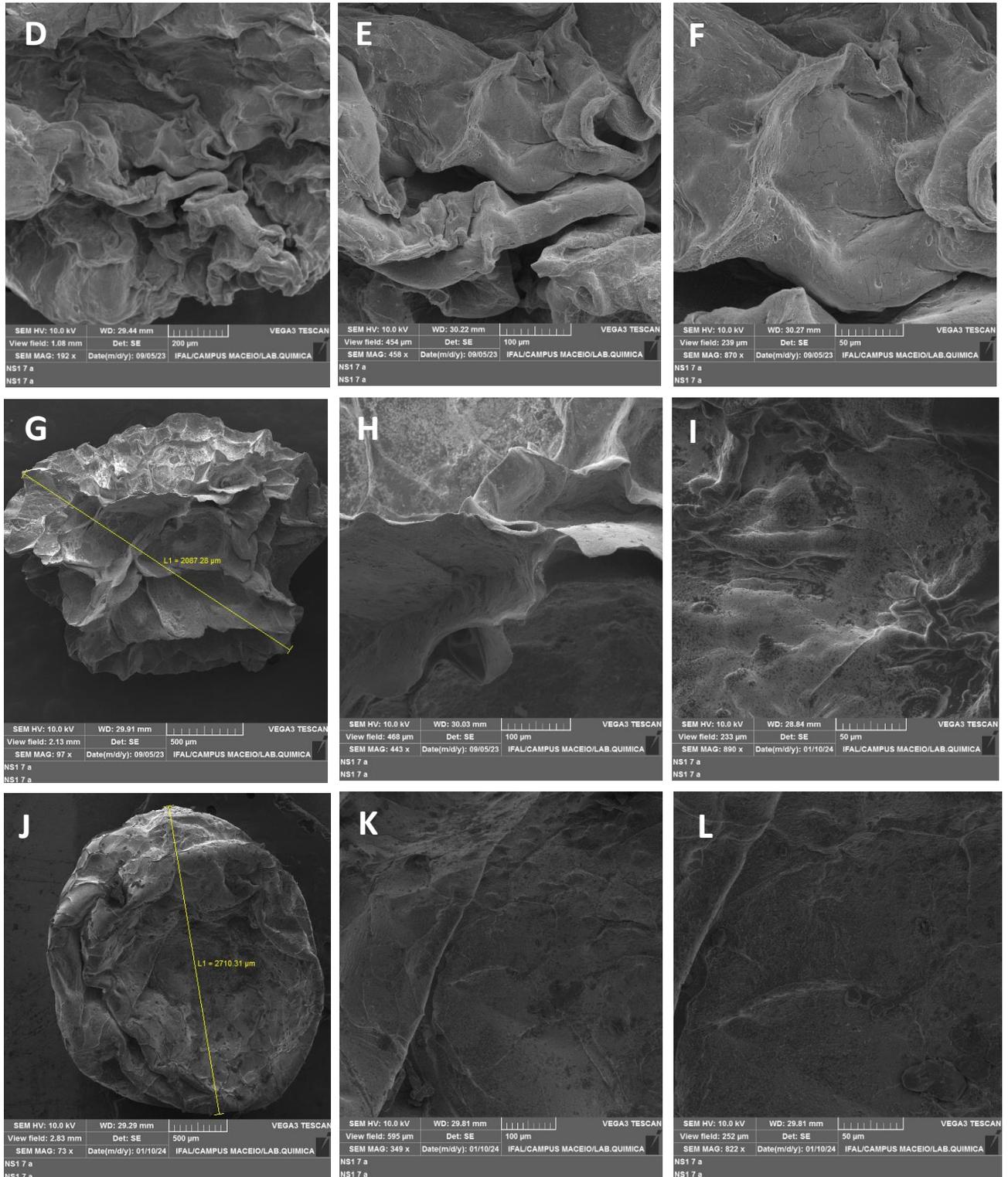
O congelamento em que os encapsulados foram submetidos para o processo de liofilização provocou rigidez à estrutura, tornando-a porosa e com formas irregulares (Kuck; Noreña, 2016; Ballesteros et al., 2017; Poletto et al., 2019), no

entanto, os ativos permaneceram protegidos pelo alginato (conforme descrito no item 5.4). Provavelmente, a rede de gel tridimensional formada pelas interações da carga aniônica do polissacarídeo (COO-) com os íons catiônicos é responsável pela porosidade das estruturas observadas. Os cristais de gelo formados podem ter ajudado no estresse mecânico da partícula.

De forma geral, as partículas não aglomeraram. Os encapsulados liofilizados com óleo essencial a 1,0 e 0,5% (Figura 15D-I) tornaram-se mais pregueados e com rachaduras mais discretas em comparação ao liofilizado sem óleo essencial (Fig. 15A-C), o que pode sugerir que o óleo essencial interferiu no grau de homogeneidade dos componentes da formulação. O liofilizado com 0,1% de óleo essencial se apresentou mais arredondado e com a superfície mais lisa em comparação aos liofilizados mais concentrados em óleo essencial. Nas microscopias do liofilizado sem o óleo observam-se aberturas importantes na parede, características do processo de secagem. A adição de um agente tensoativo à formulação, como o Tween 80, talvez proporcione maior uniformidade à partícula, diminuindo as aberturas na parede e, conseqüentemente, a perda dos ativos durante o armazenamento.

Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura das amostras liofilizadas em diferentes pontos com ampliação de foco variável. A-C: encapsulado liofilizado placebo; D-F: encapsulado LF1 (1,0%); G-I: encapsulado LF2 (0,5%); e J-L: encapsulado LF3 (0,1%).





6.6.4 FTIR

A Figura 16 apresenta o espectro de FTIR do alginato de sódio, a fim de identificar as vibrações moleculares presentes no material. As regiões mais importantes para análises estão compreendidas na faixa entre 4000 e 700 cm^{-1} , onde

ocorrem as absorções dos grupos O-H, C=O, C=C e C-O. A região entre 1300 e 900 cm^{-1} , conhecida como região de “impressão digital”, é mais complexa onde, geralmente, os modos vibracionais são acoplados, porém pode ser muito importante para determinação estrutural.

A confirmação da presença do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) nos encapsulados também foi confirmada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A caracterização por esta técnica se baseou na análise das ligações químicas e grupos funcionais presentes nos componentes constituintes dos encapsulados, incluindo o óleo e o alginato. Através dos sinais espectroscópicos provenientes das vibrações dessas ligações foi possível determinar propriedades estruturais importantes de tais componentes.

De acordo com seu espectro de infravermelho médio (Figura 16), o alginato apresentou uma banda larga com absorção em torno de 3300 cm^{-1} , proveniente de vibrações de estiramentos do grupo -OH (Capar, 2023). As absorções em 1596 e 1410 cm^{-1} são geradas de vibrações da carbonila do grupo carboxilato do alginato, correspondendo, respectivamente, aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação C=O carbonílica (Voo et al., 2015). Sinais espectrais característicos do alginato também ficaram evidentes em todos os espectros dos encapsulados contendo as correspondentes formulações LF1, LF2 e LF3, conforme mostra a Figura 16. Segundo Xiao; Gu e Tan (2014), a presença de água na estrutura do alginato resulta na saturação do sinal com maior alargamento da banda de O-H (Figuras 16). Outros sinais provenientes do alginato também se destacaram em seus espectros, como os sinais que aparecem em 1125, 1085 e 1025 cm^{-1} , os quais foram gerados das absorções das ligações C-O presentes em sua cadeia polimérica. Bandas fracas provenientes do alginato que correspondem aos blocos dos ácidos manurônico e gulurônico aparecem no intervalo entre 780 e 1100 cm^{-1} (Pereira et al., 2003; Leal et al., 2008; Kondaveeti et al., 2018).

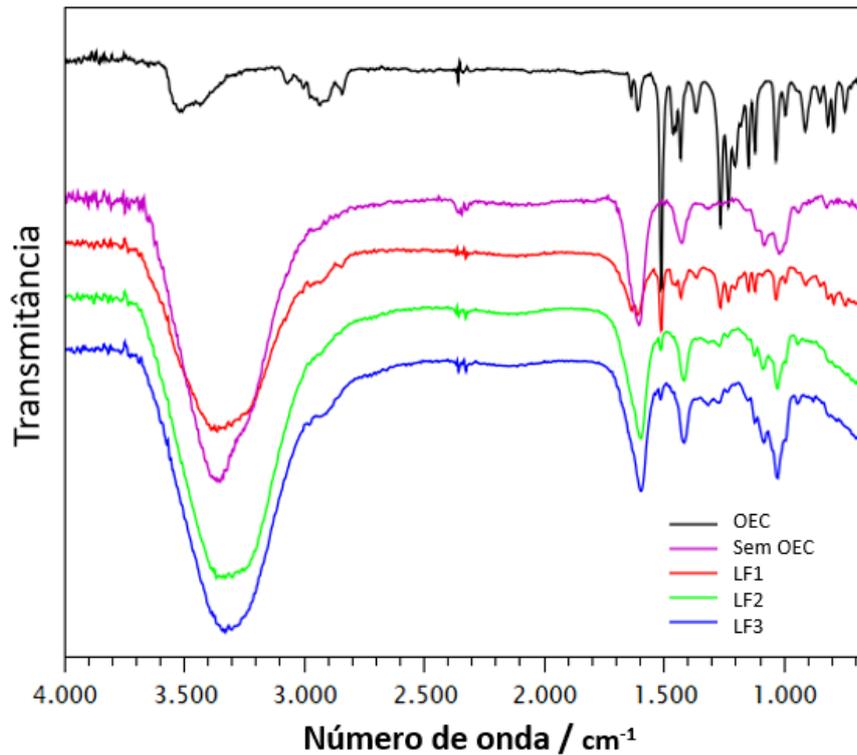
Considerando que o óleo de cravo utilizado nas formulações para os encapsulados tinha aproximadamente 95% de sua composição determinada por dois compostos, o eugenol e o β -cariofileno, de acordo com a análise cromatográfica, era esperado que seu espectro de infravermelho fosse resultante desses compostos, majoritariamente, com seus sinais vibracionais determinando o perfil espectral. O óleo de cravo produziu sinais de baixa intensidade gerados das vibrações de estiramentos da ligação O-H de grupos hidroxilas (3520-3433 cm^{-1}) (Figura 16). Picos gerados das

absorções de CH₃ e CH₂ apareceram com baixa intensidade (2975-2844 cm⁻¹). Estiramentos da ligação C-H também são identificados pelas absorções em 3071 e 3004 cm⁻¹, as quais sugerem a presença de alceno terminal (H-C=) e anel aromático em sua composição, características de alcenos como o eugenol e outros terpenos, como o β-cariofileno (Tarhan, 2021). A baixa intensidade destes sinais não condicionou visualização nos espectros obtidos com as formulações LF1, LF2 e LF3, devido às sobreposições com a banda de estiramentos de OH do alginato, com exceção do pico em 2844 cm⁻¹ que aparece fraco em LF1. No entanto, outros sinais provenientes do óleo foram observados em seus espectros, conforme mostrado na Figura 16.

Sinal de estiramento de duplas ligações (C=C) em 1639 cm⁻¹, seguido da absorção em 1512 cm⁻¹, característica de anel aromático, estão presentes nos espectros de LF1, LF2 e LF3. Estes grupos também são confirmados pelas vibrações que aparecem em 1462, 1452 e 1432 cm⁻¹ e pelos picos compreendidos na faixa entre 995 e 818 cm⁻¹, gerados de dobramentos envolvendo ligações C-H de duplas ligações, incluindo as adjacentes a grupos metínicos e metilênicos. Os sinais em 1266 e 1034 cm⁻¹, absorções de estiramento de C-O de grupos hidroxilas e éteres e outras absorções de dobramentos de ligações C-H, também estão presentes em todos encapsulados (Tarhan, 2021).

Algumas variações relativamente pequenas nos espectros dos encapsulados podem ser devido a sobreposições, como diferenças de intensidades e visualização de bandas. De um modo geral, os picos característicos do OEC se repetiram nos encapsulados sem grandes alterações aparentes, comprovando a incorporação do óleo nas esferas e confirmando propriedades estruturais de seus dois principais componentes (eugenol e β-cariofileno), indicando excelente dispersão destes na matriz polimérica.

Figura 16 – Espectros de infravermelho do óleo essencial de cravo, do alginato e dos encapsulados liofilizados LF1, LF2 e LF3.



6.6.5 Análise Térmica (TGA/DSC)

Os principais eventos termogravimétricos e calorimétricos das amostras estão representados na tabela a seguir, onde foi correlacionada a perda de massa ou o fluxo de calor com a temperatura. Para estas análises, as curvas DTG foram utilizadas a fim de visualizar com mais clareza as temperaturas correspondentes ao início e final do evento térmico.

Tabela 9 – Principais dados termogravimétricos e calorimétricos das amostras.

Amostras	ET	Termogravimetria			ET	Calorimetria de Varredura		
		Intervalo de temperatura (°C)	PM (°C) ¹	Perda massa (%)		Intervalo de temperatura (°C)	PM (°C) ¹	ΔH (J/g)
OEC	I	161,3 – 201,1	179,2	99,0	I	25,0 – 44,9	26,9	-38,3
					II	164,1 – 180,0	176,9	-85,2
					III	261,3 – 281,1	272,9	-54,5
					IV	397,8 – 427,6	365,9	+188,3

LF1	I	63,0 – 120,9	86,8	68,4	I	71,7 – 95,2	71,6	+2,8
	II	207,0 – 240,9	218,8	12,1	II	98,4 – 115,9	103,8	-9,9
	III	299,7 – 336,5	314,4	9,2	III	193,3 – 215,9	258,2	-1,7
					IV	386,6 – 420,2	319,5	-35,6
LF2	I	63,2 – 106,4	83,1	45,1	I	122,6 – 134,3	123,2	-224,4
	II	211,4 – 239,7	224,0	6,6	II	297,7 – 315,2	305,5	+1,24
	III	316,1 – 346,1	327,4	6,6	II	400,6 – 413,8	429,0	+1,75
LF3	I	82,4 – 106,3	82,4	34,5	I	28,0 – 50,4	51,6	+1,43
	II	309,9 – 348,9	327,7	6,3	II	97,1 – 114,2	104,2	-27,7
P	I	94,8 – 143,8	110,4	32,6	I	82,7 – 101,4	99,9	+24,6
	II	221,2 – 282,6	231,2	14,7	II	291,3 – 315,5	334,1	+15,2
	III	426,6 – 436,1	412,3	9,6	III	401,5 – 455,4	453,5	+11,2

ET: evento térmico; OEC: óleo essencial de cravo; A: alginato em pó; LF1: formulação 1,0%; LF2: formulação 0,5%; LF3: formulação 0,1%; P: placebo ¹ponto médio de temperatura; ²variação de entalpia.

• TGA/dTG

Na curva termogravimétrica do placebo (Figura 18) é observado três eventos térmicos associados ao alginato de sódio gelificado/liofilizado. O primeiro evento térmico pode estar relacionado com o início das movimentações moleculares coordenadas da cadeia polimérica e a perda de umidade residual ligada ao polissacarídeo. Nessa fase, o ponto médio de temperatura foi identificado 110,4 °C, com perda de massa de 32,6%. A estrutura do alginato de sódio é formada por muitos grupos –OH, o que favorece a ligação com a água. Portanto, embora trate-se de um material liofilizado, a depender da forma de acondicionamento, pode haver adsorção de água do ambiente.

A medida que a temperatura aumenta, a matriz do alginato de sódio começa a se decompor. As ligações entre as unidades de açúcar do polímero começam a se desfazer, levando a fragmentação da estrutura. A perda de massa na fase II pode estar associada ao início dessa degradação do polímero liofilizado. Provavelmente, há abertura do anel glicosídico do polissacarídeo e a liberação de gases. Estudos mostram o início da decomposição em temperaturas acima de 200 °C (Ghadiri et al., 2013; Castellano et al., 2019; Doderó et al., 2019).

Em temperaturas ainda mais elevadas, pode haver a formação de resíduos carbonizados como o carbonato de sódio (Na₂CO₃), que se degrada mais vagorosamente. Após a completa degradação do alginato de sódio, podem

permanecer cinzas residuais compostas pelos sais inorgânicos presentes no alginato resultantes da decomposição térmica dos componentes orgânicos.

É importante salientar que após os três eventos térmicos observados, a perda de massa foi menor que 57% da amostra, o que pode indicar que o processo de liofilização empregado minimizou perdas, podendo levar a manutenção da integridade do produto por mais tempo. Em estudos com alginato liofilizado, a primeira perda de massa foi identificada a partir dos 50 °C (Balanč et al., 2015). Enquanto que no presente estudo, essa primeira perda se iniciou em 94,8 °C.

Os encapsulados liofilizados LF1 e LF2 apresentaram três eventos térmicos, de forma semelhante ao placebo liofilizado. A temperatura *onset*, ou seja, o ponto de partida da perda de massa do material, foi semelhante em ambas as amostras. O encapsulado liofilizado LF3, por sua vez, sofreu dois eventos térmicos. A perda de massa inicial (evento I) é mais acentuada no encapsulado liofilizado F1 (68,4%) em comparação aos liofilizados LF2 (45,1%) e LF3 (34,5%). As perdas mais discretas podem sugerir maior estabilidade térmica. Essa diferença de perda de massa inicial é associada ao maior teor de umidade identificado (relatado no item 5.6.2) no liofilizado LF1 ($4,7 \pm 0,05\%$), em comparação ao liofilizado LF2 ($4,1 \pm 0,09\%$) e LF3 ($3,9 \pm 0,05\%$). Além disso, a concentração de óleo essencial presente no produto pode ter influenciado na formação da emulsão que deu origem ao encapsulado, afetando a estabilidade de sua estrutura.

Acredita-se que o segundo evento térmico dos liofilizados estejam relacionados com o início de decomposição da estrutura polissacarídica, com consequente liberação do óleo essencial aprisionado. Essa liberação acontece de forma gradativa, diferentemente do óleo essencial puro onde a perda é imediata. O liofilizado LF1 é mais concentrado em óleo essencial, podendo também justificar a maior perda de massa. Observe no gráfico (Figura 17) que os eventos térmicos não aparecem de forma evidente, sendo necessário uma análise mais cuidadosa. É possível que os eventos térmicos aconteçam de forma concomitante, ou seja, antes de um evento finalizar o outro já se inicia. Nota-se também que o liofilizado LF3 tem início de degradação mais tardio (82,4 °C).

O óleo essencial de cravo-da-índia foi submetido a análise TGA/dTG a fim de obter parâmetros de comparação com os encapsulados. A estabilidade térmica foi identificada a uma temperatura de até 47,8 °C, com posterior perda de seus componentes. À temperatura de 201 °C houve a perda do óleo essencial foi total, de

forma abrupta, após um único evento térmico. Esse evento térmico está relacionado a volatilização e/ou decomposição dos constituintes químicos do óleo essencial. Em um estudo realizado por Santos et al. (2009), a degradação total do eugenol ocorreu a uma temperatura de, aproximadamente, 274,5 °C. Essa informação é importante, pois o eugenol é o componente majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia. Em análises realizadas por outros autores o eugenol foi totalmente degradado a temperaturas mais baixa, aproximadamente, 195 °C (Shao et al., 2018) e 190 °C (Silva; Kano; Rosa et al. 2019).

A temperatura média de degradação que pode estar associada à perda de óleo essencial foi de 218,8 °C para o encapsulado LF1, 224,0 °C para LF2 e 327,7 °C para LF3. No óleo essencial sozinho o pico médio de volatilização e/ou decomposição acontece a uma temperatura mais baixa, 179,2 °C. Sugere-se, portanto, que os encapsulados liofilizados foram úteis na proteção, de forma eficiente, do óleo essencial de cravo-da-índia, levando a perda do óleo de forma mais tardia em comparação ao óleo essencial sem a proteção polimérica. Embora o liofilizado F3 tenha apresentado temperatura de degradação superior, o liofilizado LF1 pode ser mais conveniente, já que contém maior conteúdo de óleo essencial, o que seria uma vantagem comercial.

- **DSC**

A caracterização térmica foi completada por experimentos de DSC, cujos os resultados estão expressos na Tabela 7. Os resultados obtidos foram discutidos associando-se com os achados de TGA.

No liofilizado placebo (Figura 17 B), há transições de segunda ordem devido a variação de capacidade calorífica do material, porém sem variações de entalpia. Estas transições não geram picos nas curvas de DSC, apresentando-se como um deslocamento da linha base em forma de S, como apresentado no gráfico. Esse deslocamento pode estar associado com relaxações de tensões térmicas da cadeia polimérica. Foram identificados três importantes eventos endotérmicos de absorção de calor. O primeiro evento ($\Delta H = +24,6$ J/g) pode estar associado à perda de água pelo alginato de sódio, conforme descrito anteriormente. Durante a vaporização, as moléculas de água ganham energia cinética para superar as forças intermoleculares e se transformar em vapor. Esse ganho de energia é resultado da absorção de calor.

Os demais picos endotérmicos do liofilizado placebo podem estar envolvidos com as etapas de degradação polimérica. No evento térmico II dois picos sobrepostos foram identificados. A curva derivada dTG facilitou a visualização dessa sobreposição. Aparentemente, múltiplas transições térmicas estão acontecendo em estreita sucessão. O material liofilizado está, possivelmente, recebendo calor enquanto se decompõe. As temperaturas coincidem com os eventos termogravimétricos.

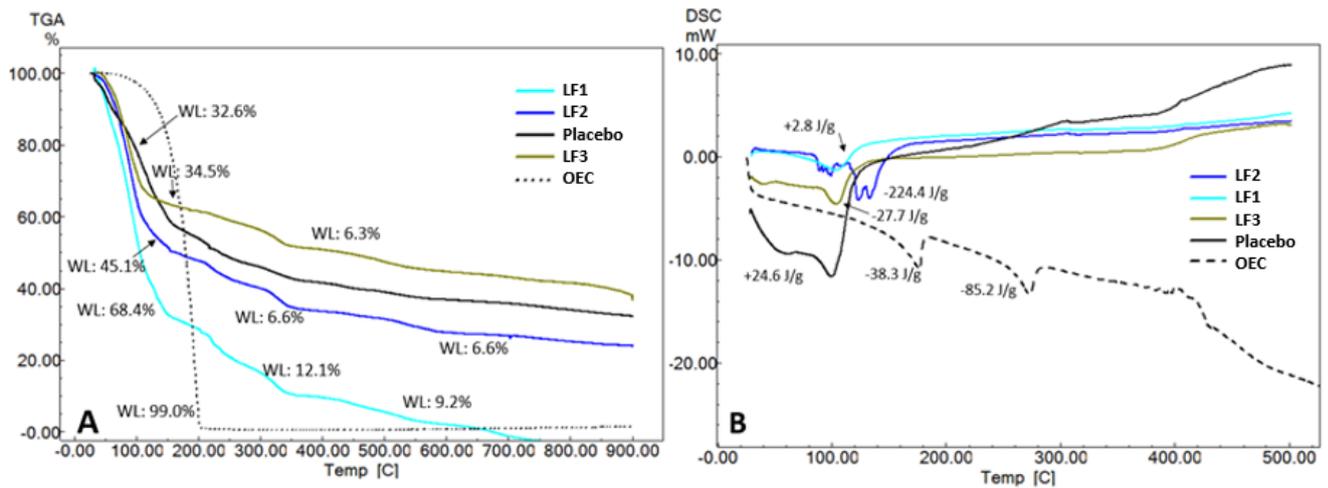
O liofilizado F3 (Figura 17 B) demonstrou um discreto evento endotérmico inicial, à aproximadamente 51,6 °C ($\Delta H = +1,43$ J/g). Em seguida, o evento exotérmico de liberação de calor pode está relacionado com a decomposição do polímero e, conseqüentemente, liberação do óleo essencial aprisionado. Esse evento acontece em temperatura superior no TGA.

O liofilizado F1 (Figura 17 B) também apresentou evento endotérmico inicial, no entanto, três eventos exotérmicos se sucederam, sendo o último deles o mais intenso em energia de entalpia (319,5 °C / $\Delta H = -35,6$ J/g). O pico formado é assimétrico devido, provavelmente, a variação da capacidade calorífica da amostra. No liofilizado F2 (Figura 17 B) os vários eventos térmicos iniciais de decomposição resultaram em intensa energia de entalpia exotérmica. Os vários picos podem sugerir decomposição polimérica de forma gradativa.

De forma geral, os liofilizados LF1, LF2 e LF3 apresentaram alta estabilidade térmica, com início de evento calorimétrico acontecendo em 71,6 °C ($\Delta H = +2,8$ J/g), 123,2 °C ($\Delta H = -224,4$ J/g) e 51,6 °C ($\Delta H = +1,43$ J/g), respectivamente. Perceba que no caso dos liofilizados LF1 e LF3 esse primeiro evento é endotérmico e pode estar associado a perda de água. O início da degradação polimérica propriamente dita acontece, provavelmente, em temperatura semelhante à do liofilizado LF2, mas de forma menos intensa (LF1: 103,8 °C / $\Delta H = -9,9$ J/g e LF3: 104,2 °C / $\Delta H = -27,7$ J/g).

O óleo essencial puro sofre o primeiro processo exotérmico à 26,9 °C ($\Delta H = -38,3$ J/g), indicando o início da volatilização e/ou degradação de seus constituintes químicos. Esses dados reforçam os achados do TGA/dTGA. Sendo assim, a encapsulação por gelificação iônica com posterior liofilização mostrou ser uma técnica importante para proteção de produtos sensíveis a degradação térmica. Ou seja, após a encapsulação o óleo essencial é perdido de forma mais tardia.

Figura 17 - As curvas termogravimétrica (A) e calorimétrica (B) mostram, respectivamente, a perda de massa (%) ou a variação de energia de cada amostra em função da temperatura (°C).



6.7 Grau de intumescimento e liberação de eugenol

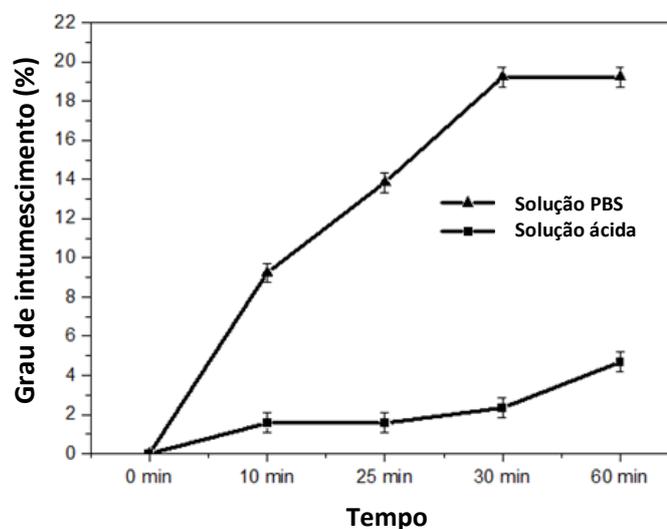
O teste do grau de inchamento foi realizado para obter uma compreensão mais profunda do comportamento dos encapsulados em meios ácidos e PBS. Esses dados são cruciais para otimizar a permeabilidade e a estabilidade do encapsulamento.

O maior grau de intumescimento do encapsulado liofilizado foi de 19,2% e ocorreu em solução PBS (10 mM, pH 7,4) após 30 minutos de imersão. Após 60 minutos, esse valor foi mantido e, em seguida, a rede polimérica começou a se desfazer, reduzindo a massa do encapsulado. Em solução ácida (HCl 0,01 mol/L com 2 mg/mL de NaCl, pH 1,2), o grau de intumescimento foi de apenas 2,3% após 30 minutos e 4,7% após 60 minutos de imersão. Compreender o inchaço em diferentes meios é crucial para otimizar propriedades como permeabilidade e estabilidade do encapsulado (Figura 18).

É evidente que em uma solução ácida o processo de inchamento ocorre, porém, em um ritmo mais lento em relação à solução PBS, onde os grupos carboxílicos tendem a permanecer na forma dissociada, favorecendo a troca iônica com os íons Ca^{2+} presentes nos encapsulados. Assim, há uma perda de integridade das ligações cruzadas, aumentando o inchaço. A presença do íon fosfato e a alta concentração de eletrólitos na solução de PBS favorecem o processo de troca iônica e, conseqüentemente, o inchamento das substâncias encapsuladas (Berardi et al., 2021).

Em outras palavras, quando as substâncias encapsuladas são colocadas em contato com a solução tampão PBS, os íons sódio presentes na solução iniciam um processo de troca iônica com os íons cálcio ligados aos grupos -COO- das unidades MM (resíduos de ácido β -D-mannurônico) do alginato. Assim, a fase inicial é o inchamento dos encapsulados e a difusão do cálcio para o meio. À medida que o tempo de imersão aumenta, os encapsulados incham ainda mais e a cadeia polimérica fica mais relaxada, proporcionando a troca iônica com os íons cálcio mais estáveis, que estão ligados mais fortemente com os grupos -COO- das unidades GG (resíduos de ácido α -L-gulurônico). Quando o processo de inchamento atinge seu máximo, a fase final é atingida e a matriz colapsa devido à perda da estrutura "egg-box" causada pela ruptura das ligações cruzadas do polímero e pela liberação de íons cálcio (Berardi et al., 2021; Makarova et al., 2023; Condé et al., 2023). No ambiente ácido, os grupos -COO- convertem-se em -COOH devido ao baixo pKa de alginato de sódio, cerca de 3,2. Portanto, ligações de hidrogênio são facilmente formadas entre os grupos -COOH, o que dificulta a penetração de moléculas de água na matriz alginato-cálcio. Isso explica o baixo inchaço dos encapsulados em um ambiente ácido (Song et al., 2018).

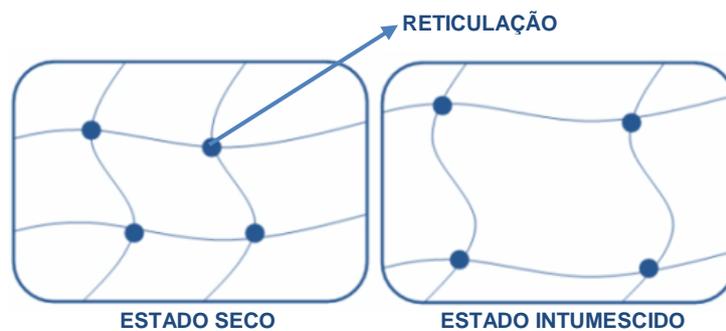
Figura 18: Grau de intumescimento dos encapsulados liofilizados LF1 em diferentes tempos de imersão em solução ácida e em tampão fosfato (PBS).



A capacidade de intumescimento pode ser atribuída a natureza hidrofílica dos polímeros (Gupta; Agarwal; Alam, 2014). O processo de intumescimento ocorre quando a solução entra na matriz polimérica e provoca relaxamento das cadeias,

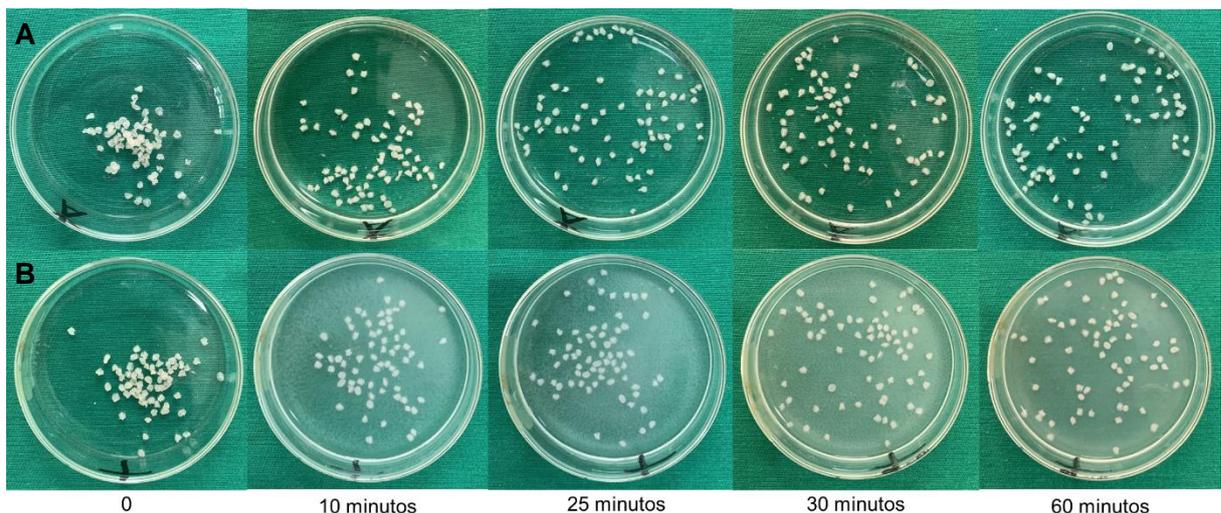
seguido de abertura das redes poliméricas (Figura 19). Isso promove a penetração de mais solução aquosa. Nos últimos estágios de inchamento, o coeficiente de difusão é diminuído porque as cadeias estão completamente relaxadas e próximas do equilíbrio (Gijpferich, 1996).

Figura 19: Esquema proposto de intumescimento das partículas de alginato obtidas por gelificação iônica.



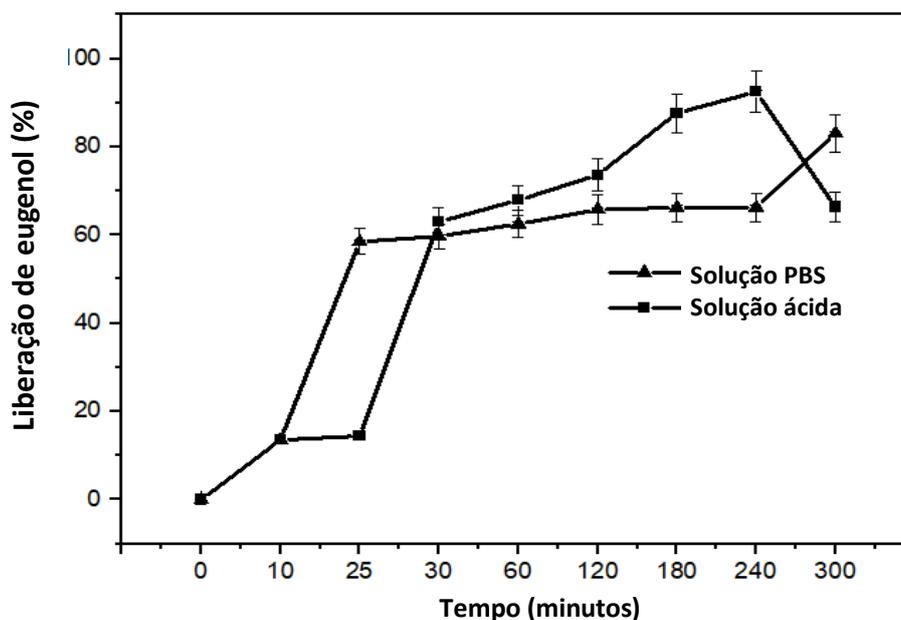
Não foram observadas alterações macroscópicas quando os encapsulados foram embebidos em solução ácida (Figura 20 A), por outro lado, em solução tampão PBS os encapsulados pareceram sofrer discreta dissolução quase imediata (10 minutos), tornando a solução opaca (Figura 20 B). O encapsulado sem o processo de liofilização se dissolve totalmente após 1 horas de imersão, mas após a liofilização, a estrutura torna-se enrijecida e difícil de solubilizar. Apenas parte da estrutura se desfaz.

Figura 20: Imagem dos encapsulados LF1 em solução ácida (A) e em solução tampão (B) em diferentes tempos de imersão.



Para a análise de liberação de ativos, a solução ácida e tampão fosfato foram injetadas em GC/MS em diferentes tempos de análise. Embora os encapsulados não tenham intumescido em meio ácido tanto quanto em meio tampão fosfato, a liberação do eugenol em ambos os meios foi semelhante. Perceba que até 25 minutos a solução tampão (10 mM, pH 7,4) foi capaz de liberar maior percentual de eugenol em relação a solução ácida (HCl 0,01 mol L⁻¹ com 2 mg mL⁻¹ de NaCl, pH 1,2); no entanto, esse percentual se mantém semelhante nos próximos tempos analisados, aumentando apenas após 240 minutos de análise, com 83,1% de liberação aos 300 minutos. Por outro lado, em meio ácido o maior percentual de liberação acontece após 25 minutos. No tempo de 30 minutos, cerca de 63,0% do eugenol foi liberado. A análise finaliza no tempo 240 minutos, liberando um total de 92,5% de eugenol. Após esse tempo, os valores de eugenol identificados são decrescentes devido, provavelmente a volatilização do óleo essencial da formulação em solução. Os encapsulados parecem ser mais estáveis em baixos valores de pH, o que pode fornecer uma característica promissora de liberação responsiva ao pH (Figura 21).

Figura 21: Liberação do eugenol em solução ácida e de tampão fosfato em diferentes tempos.



A liberação do eugenol dos encapsulados de alginato depende da penetração do meio de dissolução nas esferas, da expansão e dissolução da matriz de alginato e

da dissolução dos componentes ativos através da matriz ampliada. A hidratação e o inchaço que ocorrem ao entrar em contato com o meio de dissolução aquoso levam à formação de uma camada superficial de hidrogel que controla o influxo do meio aquoso e a dissolução dos componentes ativos (Aldawsari et al., 2021). Pressões osmóticas ou mecânicas, enzimas e/ou variações de pH são alguns dos estímulos que provocam alterações na fase gel, responsáveis pela liberação dos componentes ativos contidos na matriz alginato (Kurozawa et al., 2017). As características de dissolução *in vitro* de esferas contendo apigenina à base de alginato de cálcio foram examinadas em trabalho recente (Aldawsari et al., 2021). A liberação da droga foi retardada com o aumento no conteúdo de alginato de sódio. Os pontos aparentes de reticulação no interior dos grânulos aumentaram quando o conteúdo de alginato foi elevado, resultando em uma matriz rígida e adiando a liberação dos componentes ativos. A liberação acontece em 24 horas.

De fato, a carga das partículas que envolvem os óleos essenciais varia com os níveis de pH (Esmaeli et al., 2015). O grau de ionização dos vários grupos funcionais dos portadores (Yamine et al., 2024) muda como resultado. Por exemplo, a liberação de produtos químicos bioativos a partir de nanocápsulas de quitosana carregadas com hortelã-pimenta, chá verde (Shetta; Kegere, Mamdouh, 2019), *Carum copticum* (Esmaeli et al., 2015) e carvacrol (Keawchaoon, Yoksan, 2011) foi substancialmente maior em pH 3,0 do que em valores de pH mais elevados (pH entre 7 e 11) (Yamine et al., 2024).

Microcápsulas submersas em meio pH 4,8 apresentaram as maiores taxas de liberação de óleo essencial de orégano. Nessas circunstâncias, observaram-se altos níveis de liberação em horários pré-definidos (78% em 7 horas). Menores taxas de liberação foram observadas em meios com pH 4,2 (59% em 7 horas). Taxas intermediárias foram observadas em meios com pH 3,8 (Muneratto, Gallo, Nicoletti, 2021). De acordo com Muneratto, Gallo e Nicoletti, os valores de enfraquecimento e liberação do complexo aumentaram em pH 4,8, onde o potencial zeta apresentou a menor diferença de carga. No entanto, as microcápsulas não foram destruídas, podendo-se sugerir que a baixa liberação inicial de eugenol em um ambiente ácido está relacionada à menor diferença de carga formada, tornando-o mais estável.

6.8 Atividade Antioxidante

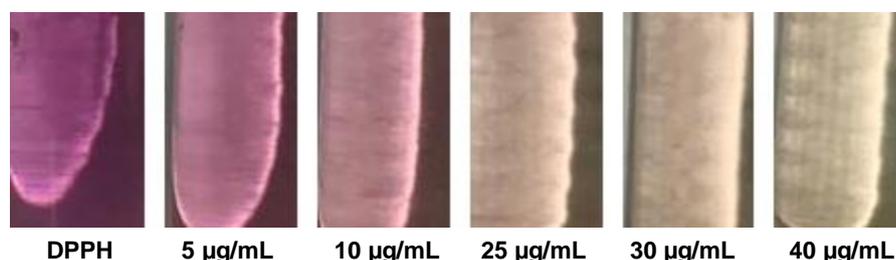
A capacidade antioxidante de extratos de plantas é geralmente analisada por pelo menos dois métodos diferentes devido à composição complexa, sendo assim, optou-se neste estudo por realizar os métodos DPPH (baseado na capacidade de sequestro de radicais livres) e FRAP (baseado na capacidade de redução) para determinação das propriedades antioxidantes do óleo essencial de cravo-do-índia.

6.8.1 DPPH

O óleo essencial de cravo-da-índia demonstrou forte capacidade de eliminação do radical DPPH, com valor de inibição chegando a 87,4%, variando conforme a concentração do óleo utilizada. Essa atividade pode ser atribuída à capacidade de doação de hidrogênio exibida por uma ampla gama de constituintes presentes no óleo essencial, sobretudo pelos compostos fenólicos e terpênicos, como eugenol e β -cariofileno. De forma geral, a ação antioxidante dos compostos fenólicos aumenta com o grau de hidroxilação, ou seja, com a quantidade de grupos hidroxila presentes na estrutura química. A substituição do grupo hidroxila no anel aromático por um grupo metoxil, por exemplo, reduz a atividade antioxidante do composto.

O grupo hidroxila disponível no anel aromático do eugenol é responsável pela atividade antioxidante. Os compostos fenólicos transferem elétrons ou átomos de hidrogênio e neutralizam os radicais livres, resultando em um processo oxidativo bloqueado (Shahbazi, 2019). A atividade antioxidante do óleo essencial pode ser preservada caso o processo de encapsulação seja realizado de forma adequada, evitando a degradação pelo oxigênio e temperatura (Hadidi et al., 2020).

Figura 22 – Mudança de coloração de violeta escuro para amarelo pálido, resultante da estabilização do radical livre DPPH originando sua forma reduzida.



Fonte: Autora (2023).

Tabela 10 - Atividade antioxidante do óleo essencial e dos encapsulados de cravo-da-índia (% Inibição do radical DPPH).

Concentração (µg/mL)	(% inibição DPPH)			
	Óleo essencial ^a	F1 ^b	F2 ^c	F3 ^d
5	31,9 ± 1,01	28,2 ± 0,21	11,2 ± 1,85	5,8 ± 0,58
10	50,8 ± 0,30	45,4 ± 1,30	24,8 ± 1,36	14,1 ± 1,59
25	78,5 ± 1,01	69,2 ± 0,83	48,8 ± 0,58	20,2 ± 1,58
30	82,9 ± 0,78	75,9 ± 0,49	54,2 ± 0,21	22,3 ± 0,35
40	87,4 ± 0,29	80,3 ± 0,57	65,1 ± 0,70	30,8 ± 0,25
IC₅₀ (µg/mL)	11,4	18,1	25,2	86,4

*Média ± Coeficiente de variação. IC₅₀= capacidade de inibir o radical DPPH em 50%.

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas em todas as concentrações (p<0,05)

A concentração do óleo essencial capaz de inibir o radical DPPH em 50% (IC₅₀ 11,4 µg/mL) foi maior que à relatada por outros autores: 1,1 µg/mL (Silvestri et al., 2010), 1,6 µg/mL (Al-Zereini et al., 2022), 4,82 µg/mL (Selles et al., 2020) e 5,76 µg/mL (Farias et al., 2019). Kaur, Kaushal e Rani (2019) relataram IC₅₀ para a atividade antioxidante de óleos essenciais de cravo-da-índia variando de 10,9 a 31,6 µg/mL. Em estudos de Baghshahi et al. (2023), a atividade antioxidante do extrato de cravo foi mais de 10 vezes maior do que a da vitamina E no teste de capacidade de sequestro de radicais livres DPPH. A forte capacidade antioxidante do CEO pode ser atribuída à capacidade doadora de hidrogênio apresentada por uma ampla gama de constituintes químicos presentes no óleo essencial, especialmente fenóis e terpenóides, como eugenol e β-cariofileno.

O β-cariofileno demonstra forte atividade antioxidante, quebrando cadeias e eliminando radicais livres, como ânions hidroxila e superóxido, que são altamente reativos (Vinholes et al., 2014; Alvarez-González, Madrigal-Bujaidar, Castro-García, 2014; Sharma et al., 2016). A literatura descreve a capacidade do eugenol de inibir a produção de ânion superóxido em neutrófilos, induzida por fMLF (fator N-formil-metionil-leucil-fenilalanina) ou PMA (forbol miristato acetato), bloqueando a fosforilação da via de sinalização celular envolvida na produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), Raf/MEK/ERK1/2/p47phox. Quando ativada por estímulos como o fMLF, essa via de sinalização leva à fosforilação de proteínas-chave como Raf, MEK, ERK1/2 e p47phox, o que resulta na ativação do complexo NADPH oxidase e consequente produção de superóxido (Chniguir et al., 2019; Xue et al., 2022). Além disso, o eugenol pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, como SOD-3 ou GST-4, reduzindo o acúmulo de ERO in vivo e exercendo efeitos antioxidantes

(Zhang, Gu, Wang, 2021; Johari, Khan, 2022). Além disso, suas propriedades redutoras de Fe^{3+} e sua capacidade de doação de elétrons podem neutralizar radicais livres, formando produtos estáveis para reforçar seus efeitos antioxidantes (Xue et al., 2022; Johari, Khan, 2022).

O eugenol exibe um efeito inibitório maior sobre o peróxido de hidrogênio do que outras ROS e também pode bloquear a oxidação do DNA e a peroxidação lipídica induzida por radicais hidroxila (Nam, Kim, 2013). Essas propriedades destacam o eugenol como um agente potencialmente valioso na proteção contra danos oxidativos celulares. O eugenol aumenta a atividade transcricional e o nível de expressão do fator nuclear eritróide 2-related factor 2 (Nrf2), um regulador central das respostas celulares ao estresse oxidativo, de forma dose-dependente. Estudos adicionais revelaram que o eugenol melhorou a estabilização do Nrf2 e a translocação nuclear. O tratamento com eugenol reduz os níveis intracelulares de ERO enquanto aumenta a resistência celular ao H_2O_2 de forma dependente de Nrf2 (Ma et al., 2021).

Estudos realizados por Radünz et al. (2018), mostram que para o óleo essencial de cravo-da-índia conseguir inibir 94,9% dos radicais DPPH, precisou utilizar uma concentração de 484,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de óleo. Valores elevados de IC_{50} foram relatados: 100,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Johari; Khan, 2022), 380 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Viuda-Martos et al., 2010). Pérez-Rosés et al. (2016) relatou $\text{IC}_{50} = 13,2 \mu\text{g}/\text{mL}$ para o óleo essencial de cravo e 11,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o eugenol isoladamente.

A maioria dos antioxidantes sintéticos são perigosos e cancerígenos em pequenas quantidades, eles são problemáticos para serem utilizados como protetores do corpo contra ataques de radicais livres (Rahaman et al., 2023). O uso de produtos químicos antioxidantes naturais pode ajudar na remoção de radicais livres.

Estudos realizados por Alfikri et al. (2020), indicam que o cravo na fase de floração produziu o melhor óleo essencial, bem como a fonte mais eficiente de antioxidantes naturais, com IC_{50} de 15,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, resultado este que se assemelha ao encontrado no presente estudo. Esses achados implicam que pode haver grandes variações na atividade farmacológica de produtos contendo óleos essenciais.

A encapsulação do óleo essencial em um sistema polimérico inerte contendo alginato de sódio proporciona maior proteção aos componentes fenólicos das possíveis reações de degradação favorecidas pelo contato com o meio externo (ar, luz e calor). O poder antioxidante do óleo essencial de cravo-da-índia foi conservado nas três formulações, no entanto, o encapsulado LF1 apresentou, de forma esperada,

resultados aproximados ao do óleo essencial, com valor de IC_{50} 18,1 $\mu\text{g/mL}$, chegando a 80,3% de inibição (Tabela 8). Perceba que os dados dos liofilizados chegaram, inclusive, a maior eficácia antioxidante em comparação com óleos de cravo descritos na literatura. As três formulações apresentaram diferenças estatísticas em todas as concentrações analisadas por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). As descobertas do estudo indicam que os encapsulados liofilizados exibem um poder redutor notável, sugerindo uma capacidade antioxidante promissora com potencial para produzir benefícios moderados a altos usados como antioxidante natural.

6.8.2 FRAP

Esse método é baseado na transferência de elétrons, assim como o método de DPPH, no entanto, o método de FRAP é mais específico para compostos fenólicos. O óleo essencial de cravo-da-índia e seus microencapsulados apresentaram capacidade redutora do ferro férrico (Fe^{3+}) proveniente do complexo férrico tripiridiltriazina ($[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$). Em baixo pH, o excesso de Fe^{3+} na mistura da reação foi reduzido à forma ferrosa (Fe^{2+}), ao qual gerou a formação de cor azul intensa, diretamente proporcional a capacidade de redução da amostra (Figura 23).

Figura 23 – Mudança de coloração proveniente da reação de redução do ferro férrico (Fe^{3+}) pelo método de FRAP.



Fonte: Autora (2023).

Os valores de FRAP encontrados no óleo essencial chegaram a 2.021 μmol de sulfato ferroso/g, este valor elevado é proporcional ao alto poder antioxidante da amostra.

Tabela 11 - Atividade antioxidante FRAP do óleo essencial e dos microencapsulados de cravo-da-índia ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$).

Amostras	OEC ^a	F1 ^b	F2 ^c	F3 ^d
Atividade antioxidante* ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$)	2.021 \pm 1,7	1.984 \pm 1,3	1.292 \pm 1,6	441,1 \pm 1,9

*Média (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm coeficiente de variação. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas em todas as concentrações ($p < 0,05$).

A atividade antioxidante óleo essencial de cravo-da-índia é afetada pela técnica de extração utilizada, o que explica as variações encontradas na literatura. Em estudos realizados por Olszowy e Dawidowicz (2016), o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou valor inferior, 622,7 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ (0,5 mg/mL), ao encontrado no presente estudo. Em estudos mais recentes, a concentração de sulfato ferroso variou entre 3.290 a 4.000 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$ do óleo essencial (Tunç; Koca, 2019). Altos valores de FRAP são observados para extratos de folhas de *Syzygium cumini*, variando de 2.320 \pm 0,02 a 3.120 \pm 0,07 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ da amostra (Ruan, Zhang e Lin, 2008). Análises realizadas com extratos foliares de outras espécies de *Syzygium* demonstraram potencial redutor de íons férricos variando de 1.030 \pm 0,03 a 7.520 \pm 0,49 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ para *S. griffithii*; 1.170 \pm 0,07 a 7.310 \pm 1,48 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ para *S. pseudoformosum*; e 1.090 \pm 0,18 a 6.540 \pm 0,24 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ para *S. glaucum* (Abdullah, Jamil, 2020). Emulsões contendo uma mistura de óleos essenciais de cravo, orégano e canela, obtiveram um FRAP de 1.802,0 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ (Hu et al., 2023)

Nos encapsulados, o poder redutor do Fe^{3+} presente no óleo essencial apresenta-se em intensidade proporcional a suas concentrações. Esses resultados, assim como os observados em DPPH, podem ser atribuídos ao teor de compostos fenólicos presentes no produto. A formulação F1 se assemelha ao óleo essencial, apresentando alta potência antioxidante. Esses dados são inéditos e auxiliam na validação da utilização dos encapsulados como ferramenta de proteção de óleos essenciais, contribuindo com a manutenção da qualidade e das atividades farmacológicas. As três formulações apresentaram diferenças estatísticas em todas as concentrações analisadas por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entendendo as dificuldades de conservação e armazenamento de óleos essenciais, este trabalho propõe a técnica de gelificação iônica com posterior liofilização como um método eficiente para o encapsulamento de substâncias voláteis, como aqueles presentes nos óleos essenciais. O baixo custo requerido, a simplicidade e a rapidez de produção são fatores impactantes na escolha desse método de encapsulação de ativos.

Observou-se que proporções baixas de alginato de sódio (1,0%) reticulam-se à estrutura de cloreto de cálcio formando imediatamente uma rede tridimensional capaz de aprisionar o óleo essencial com eficiência. A técnica de liofilização foi útil para remover o alto teor aquoso, proporcionando estabilidade térmica aos encapsulados e alta concentração percentual de princípios ativos.

A menor concentração de óleo essencial utilizada, 0,1% (LF3), mostrou maior poder de retenção sugerindo que o polímero se torna saturado ao aumentar a concentração do óleo essencial. Esse dado é importante para a redução de custos nas produções em larga escala. O eugenol apresentou-se altamente concentrado em todos os encapsulados (LF1, LF2 e LF3), proporcionando possibilidade de utilização desse produto na indústria alimentícia como conservante natural, na agropecuária como inseticida ou larvicida, e nas áreas médicas devido suas atividades farmacológicas extensamente evidenciadas na literatura. É importante salientar que os encapsulados podem ser empregados para a produção de diversas formas farmacêuticas como cápsulas gastrorresistentes e cremes.

Com relação a morfologia microscópica, as formulações com ou sem óleo essencial apresentaram-se com superfície de aspecto rugoso e com pequenas rachaduras, morfologia típica do processo de liofilização, mas sem interferência na capacidade de proteção dos ativos.

Os resultados das análises de FTIR mostram a presença de óleo essencial de cravo-da-índia nos encapsulados. Algumas variações relativamente pequenas nos espectros como diferenças nas formas de bandas ou intencionalidades, podem ser devido às sobreposições e comprovam o encapsulamento. De um modo geral, os picos característicos do óleo essencial e do placebo se repetiram em LF1, LF2 e LF3 sem grandes alterações aparentes. Sugere-se, portanto, que não houve mudanças

nas estruturas moleculares, nem tampouco interação química entre os componentes e os materiais de revestimento, o que indica ótima dispersão na matriz polimérica.

Os dados de análise térmica revelaram que a encapsulação pode ser útil no aumento da estabilidade dos componentes ativos, e que a perda de massa em função da elevação da temperatura pode ser ajustada conforme a mudança da formulação, visto que os materiais de revestimento são primeiramente degradados e, de forma sistemática, liberam os ativos. A formulação LF3, aparentemente, é mais estável as variações de temperatura, provavelmente devido a menor concentração de água intrínseca e maior conteúdo oleoso. Mas levando-se em consideração que os três encapsulados apresentaram estabilidade térmica importante, a escolha de LF1 tem como vantagem a maior concentração de ativos e a potente atividade antioxidante. O encapsulado LF3, o menos concentrado, apresentou também menor capacidade antioxidante. Esses dados são inéditos e podem ser levados em consideração para um início de estudos *in vivo*.

O óleo encapsulado exibiu a capacidade de liberar o eugenol em uma solução tampão fosfato, bem como em meio ácido. Ao iniciar a pesquisa *in vivo*, esses fatos podem ser considerados. Por fim, conclui-se que encapsulados liofilizados de alginato carregados com OEC podem ser promissores contra o estresse oxidativo. O alginato funciona como um eficiente sistema de proteção de ativos e pode ser útil no controle da liberação de conteúdo encapsulado. A literatura (Spadari et al., 2019; Reig-Vano et al., 2021) nos mostra que o alginato é um polímero natural atóxico, biocompatível e biodegradável, sendo considerado um potencial veículo para encapsular compostos. Este trabalho apresenta um produto inovador, rico em eugenol, de fácil reprodução, seguro para consumo oral em concentrações pré-estabelecidas (Ulanowska, Olas, 2021), termicamente estável, que pode aumentar a vida útil dos compostos aprisionados (Sarma et al., 2023), e com características favoráveis ao seu uso.

Levando em consideração que o Brasil é um dos principais atores no mercado global de óleos essenciais, e entendendo as dificuldades de conservação e armazenamento desses produtos voláteis, este trabalho nos mostra a técnica de encapsulamento por gelificação iônica como um método viável. Os ensaios realizados foram favoráveis e abrem espaço para novas pesquisas com esse produto, analisando-se outras atividades farmacológicas.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, B.H. et al. A comparative study of the antibacterial activity of clove and rosemary essential oils on multidrug resistant bacteria. **UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences**, v.3, n.1, p.18-22, 2015.
- ABDULLAH, S. A.; JAMIL, S. Phytochemical screening and antioxidant activities of Methanol extracts from eight *Syzygium* species. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 16, n.1, p.13-17, 2020.
- AFFONSO, R. S. et al. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v.4, n.2, p.146–161, 2012.
- ALDAWSARI, M.F. et al. Development and Characterization of Calcium-Alginate Beads of Apigenin: In Vitro Antitumor, Antibacterial, and Antioxidant Activities. **Marine Drugs**, v.19, n.1, p.467, 2021.
- ALFIKRI, F.N. et al. Quality, and Antioxidant Activity of Clove (*Syzygium aromaticum* L.) Bud Oil at the Different Phenological Stages in Young and Mature Trees. **Scientifica**. v.2020, n.1, p.1-6, 2020.
- ALMA, M. H. et al. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). **BioResources**, v.2, n.2, p.265-269, 2007.
- ALVAREZ-GONZÁLEZ, I.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; CASTRO-GARCÍA, S. Antigenotoxic capacity of beta-caryophyllene in mouse, and evaluation of its antioxidant and GST induction activities. **Journal of Toxicological Sciences**, v.39, n.1, p.849-59, 2014.
- AL-ZEREINI et al. Antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry essential oil with identification of its chemical constituents. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.78, n.3-4, p.105-112, 2022.
- ARRIOLA, N. D. A. et al. Encapsulation of stevia rebaudiana Bertoni aqueous crude extracts by ionic gelation—Effects of alginate blends and gelling solutions on the polyphenolic profile. **Food Chemistry**, v.275, n.1, p.123-134, 2019.
- ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**, v.10, n.1, p.413-435, 1993.
- ASCENÇÃO, V. L.; MOUCHREK FILHO, V. E. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Cadernos de Pesquisa**, v. 20, n.1, 2013.
- BACHIEGA, T. F. et al. Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.64, n.1, p.610-616, 2012.

BAGHSHAHI, H. et al. Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with diferente extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. **Cryobiology**, v.69, n.1, p.482-7, 2014.

BAKER, B. P.; GRANT, J. A. "Eugenol Profile" Active Ingredient Eligible for Minimum Risk Pesticide Use. **Integrated Pest Management**, v.1, n.1, p.1-15, 2017.

BAKOUR, M. et al. The antioxidant content and protective effect of argan oil and *Syzygium aromaticum* essential oil in hydrogen peroxide-induced biochemical and histological changes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.2, p.1-14, 2018.

BALANČ, B. et al. Calcium-Alginate-Inulin Microbeads as Carriers for Aqueous Carqueja Extract. **Journal of Food Science**, v.81, n.1, p.E65–E75, 2015.

BALLESTEROS, L. F. et al. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. **Food Chemistry**, v.237, n.1, p.623-631, 2017.

BARROCAS, P. M. C. et al. Sistemas farmacêuticos gastrorretentivos flutuantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.3, 2007.

BATIHA, G. E. S. et al. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. **Biomolecules**, v.10, n.1, p.1-16, 2020.

BEG, A. Z.; AHMAD, I. *In vitro* fungitoxicity of the essential oil of *Syzygium aromaticum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.1, p. 317-319, 2002.

BENAVIDES, S. et al. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, v.204, n.1, p.77-83, 2016.

BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v.239, n.1, p.70-76, 1996.

BERALDO, C. et al. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, n.4, p.436-440, 2013.

BERARDI, A. et al. Alginates as tablet disintegrants: Understanding disintegration mechanisms and defining ranges of applications. **International Journal of Pharmaceutics**, 601, 120512, 2021.

BHOWMIK, D. et al. Recent trends in Indian traditional herbs *Syzygium aromaticum* and its health benefits. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.1, n.1, p.13-22, 2012.

BIERNASIUK, A.; BAJ, T.; MALM, A. Clove Essential Oil and Its Main Constituent, Eugenol, as Potential Natural Antifungals against *Candida* spp. Alone or in

Combination with Other Antimycotics Due to Synergistic Interactions, **Molecules**, v.28, n.1, p.215, 2023.

BRASIL, Ministério da Saúde. Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. Brasília: ANVISA, 2019, p.60. Disponível em: <https://www2.fcfar.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/principiosativosnaturais/etoxicologianovo/farmacognosia/farmacopeia-6-edicao.pdf>

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – CNNPA n.12, de 24/07/1978 – Dispõe sobre normas técnicas especiais. Disponível em: www.anvisa.gov.br Acesso em 18 de março 2023.

BROWNLEE, I. A. et al. Alginate as a source of dietary fiber. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, n.6, p.497-510, 2005.

BUDIMAN et al. Effectiveness of Clove Oil (*Syzygium aromaticum*) as Biolarvacide of *Aedes aegypti*. **Biomedical & Pharmacology Journal**, v.15, n.4, p.2287-2292, 2022.

BUDIMAN et al. Essential oil as a new tool for larvicidal *Aedes aegypti*: A systematic review. **Gaceta Sanitaria**, v. 35, n. 2, p.S459-S462, 2021.

BUDINČIĆ et al. Study of vitamin E microencapsulation and controlled release from chitosan/sodium lauryl ether sulfate microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v.251, n.1, 2021.

BUREY, P. et al. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.48, n.5, p.361-377, 2008.

CAPAR, T.D. Characterization of sodium alginate-based biodegradable edible film incorporated with *Vitis vinifera* leaf extract: Nano-scaled by ultrasound-assisted technology. **Food Packag. Shelf Life**, v.37, n.1, p.101068, 2023.

CAO, L. et al. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. **Carbohydrate Polymers**, v.242, n.1, 2020.

CASTELLANO, M. et al. Electrospun composite mats of alginate with embedded silver nanoparticles: synthesis and characterization, **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.137, n.1,p.767-778, 2019.

CHAIEB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. **Phytotherapy Research**, v.21, n.1, p.501-506, 2007.

CHAN, L.W.; LEE, H.Y.; HENG, P.W.S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, v.242, n.1, p.259-262, 2002.

CHNIGUIR, A. et al. Eugenol prevents fMLF-induced superoxide anion production in human neutrophils by inhibiting ERK1/2 signaling pathway and p47phox phosphorylation. **Scientific Reports**, v.9, n.1, p.18540, 2019.

CONDÉ, D. T. et al. Larvicidal Activity of Calcium Alginate Microcapsules Containing Clove Essential Oil Obtained by Microfluidics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.34, n.1, p.1166-1174, 2023.

CÓRDOBA, A.L.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. **Carbohydrate Polymers**, v.95, n.1, p.315-23, 2013.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.4, n.2, p.90-96, 2014.

CUTRIM, C. S.; ALVIM, I. D.; CORTEZ, M. A. S. Microencapsulation of green tea polyphenols by ionic gelation and spray chilling methods. **Journal of food science and technology**, v. 56, n. 8, p. 3561–3570, 2019.

DAHAM, S. et al. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v.20, n.1, p.11808-11829, 2015.

DE CELIS ALONSO, B. et al. NMR relaxometry and rheology of ionic and acid alginate gels. **Carbohydrate Polymers**, v.82, n.3, p.663–669, 2010.

DELADINO, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v.71, n.1, p.126-134, 2008.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, v.23, n.1, p.1361-1394, 2005.

DIAS, D. R. et al. Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. **Current Opinion in Food Science**, v.13, p.31-37, 2017.

DIDEHDAR, M.; CHEGINI, Z.; SHARIATI, A. Eugenol: A novel therapeutic agent for the inhibition of *Candida* species infection, **Frontiers in Pharmacology**, v.13, n.1, p.872127, 2022.

DJOUAHRI, A. et al. Geographic's variation impact on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils from wood and leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. **Industrial Crops and Products**, v.63, n.1, p.138-146, 2015.

DODERO, Andrea et al. Alginate-based hydrogels prepared via ionic gelation: An experimental design approach to predict the crosslinking degree. **European Polymer Journal**, v.118, n.1, p.586-594, 2019.

EL ASBAHANI, A. et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.483, n.1, p.220-43, 2015.

ESMAEILI, A.; ASGARI, A. In vitro release and biological activities of Carum copticum essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.81, n.1, p.283-290, 2015.

ETCHEPARE, M. A. et al. Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. **Ciência Rural**, v.45, n.7, 2015.

FAHMY, A.; ZALAT, R.; RABEI, A. In vitro evaluation of the antiparasitic activity of *Syzygium aromaticum* against adult and larval stages of *Trichinella spiralis*. **Sci Parasitol**, v.21, n.3, p.94-101, 2020.

FARIAS, P.K.S. et al. Antioxidant activity of essential oils from condiment plants and their effect on lactic cultures and pathogenic bacteria. **Ciência Rural**, v.49, n.1, p.2-17, 2019.

FARRÉS, I. F.; NORTO, I. T. Formation kinetics and rheology of alginate fluid gels produced by in-situ calcium release. **Food Hydrocolloids**, v. 40, n.1, p. 76-84, 2014.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.2, p.103-112, 2008.

FERREIRA, F. M. et al. Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolated and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.32, n.1, p.41-47, 2018.

FERTAH, M. et al. Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan Laminaria digitata brown seaweed. **Arabian Journal of Chemistry**, v.10, n.1, p.S3707–S3714, 2017.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Os Alginatos e Suas Múltiplas Aplicações**. Revista-fi. n.26, v.1, 2013. Disponível em: https://revista-fi.com/upload_arquivos/201606/2016060847415001464961683.pdf

FRANKS, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.45, n.1, p. 221–229, 1998.

FRASCARELI, E. et al. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v.90, n.1, p.413-424, 2012.

FU, S. et al. Relevance of rheological properties of sodium alginate in solution to calcium alginate gel properties. **AAPS PharmSciTech**, v.12, n. 2, p. 453-460, 2011.

FUJIMOTO, R.Y. et al. Clove oil induces anaesthesia and blunts muscle contraction power in three Amazon fish species. **Fish Physiology and Biochemistry.**, v.44, n.1, p.245-256, 2017.

GAO, C.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Innovative Plasticized Alginate Obtained by Thermo-mechanical Mixing: Effect of Different Biobased Polyols Systems. **Carbohydrate Polymers**, v.157, n.1, p.669-676, 2017.

GARCIA-CRUZ, C.H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A.N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v.31, n.7, 2008.

GHADIRI, M. et al. Physico-chemical, mechanical and cytotoxicity characterizations of Laponite®/alginate nanocomposite. **Applied Clay Science**, v.85, n.1, p.64–73, 2013.

GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of *spray-drying* in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v.40, n.9, p.1107-1121, 2007.

GINTING, E. V.; RETNANINGRUM, E.; WIDIASIH, D. A. Antibacterial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) and cinnamon (*Cinnamomum burmannii*) essential oil against extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria. **Veterinary world**, v.14, n.8, p. 2206–2211, 2021.

GOHARY et al., E. Insecticidal, Repellency, and Histopathological Effects of Four Extracts of Clove Oil (*Syzygium aromaticum*) Against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries**, v.25, n.6, p.79-96, 2021.

GOMES, P. R. B. et al. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas**, v.47, n.1, 2018.

GÖPFERICH, Achim. Mechanisms of polymer degradation and erosion. **The biomaterials: silver jubilee compendium**, p.117-128, 1996.

GRANT, G. T. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **FEBS Letters**, v.32, n.1, p.195–198, 1973.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v.86, n.3, p.345-391, 2012.

GULCIN, I.; ALWASEL, S.H. DPPH Radical Scavenging Assay. **Processes**, v.11, n.8, p.2248, 2023.

GUO, X. Structures, properties and application of alginic acid: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.162, n.1, p.618-628, 2020.

GUPTA, B.; AGARWAL, R.; SARWAR ALAM M. Antimicrobial and release study of drug loaded PVA/PEO/CMC wound dressings. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.25, n.6, p.1613-22, 2014.

GUPTA, A. et al. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *Syzygium aromaticum*, *Ocimum sanctum* and *Cinnamomum zeylanicum* plant extracts against *Enterococcus faecalis*: A preliminary study. **International Endodontic Journal**, v.46, n.1, p.775-783, 2013.

GUPTA, A.; DEY, B. Microencapsulation for controlled drug delivery: a comprehensive review. **Sunsari Technical College Journal**, v.1, n.1, p.48-54, 2012.

HADIDI, M. et al. Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. **Carbohydrate Polymers**, v.142, n.1, p.172-180, 2020.

HAN, X.; PARKER, T.L. Anti-inflammatory activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil in human dermal fibroblasts. **Pharmaceutical Biology**, v.55, n.1, p.1619-1622, 2017.

HARO-GONZÁLEZ, J. N. et al. Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. **Molecules**, v.26, n.21, p.6387, 2021.

HASSINE, D. B. et al. Clove Buds Essential Oil: The Impact of Grinding on the Chemical Composition and Its Biological Activities Involved in Consumer's Health Security. **Biomed Research International**, v.2021, n.1, 2021.

HAZARIKA, U.; GOSZTOLA, B. Lyophilization and its effects on the essential oil content and composition of herbs and spices – a review. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v.19, n.4, p.467-473, 2020.

HEKMATPANA, A. et al. Efficacy of *Syzygium aromaticum* essential oil on the growth and enzymatic activity of pathogenic *Candida albicans* strains. **Current Medical Mycology**, v.8, n.1, p.12-19, 2022.

HOSSEINI, S. M. et al. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.62, n.1, p.582-588, 2013.

HU, C. et al. Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, n.1, p.578–588, 2021.

HU, J. et al. Emulsions containing composite (clove, oregano, and cinnamon) essential oils: Phase inversion preparation, physicochemical properties and antibacterial mechanism. **Food chemistry**, v.421, n.136201, p.136201, 2023.

JALES, S. T. L. **Avaliação da atividade microbiológica e tecnologia de obtenção das formas farmacêuticas cápsulas e flaconetes à base de *Zymomonas mobilis*.**

Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Produção e Controle de Medicamentos), 1999.

JOHARI, A.; KHAN, M. H. Ava Evaluation of the Antioxidant Activity of Essential Oils of Some Indian Medicinal Plants by DPPH, FRAP and ABTS assay. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v.13, n.6, p.1-6, 2022.

JOHARI, A.; KHAN, M. H. Evaluation of the Antioxidant Activity of Essential Oils of Some Indian Medicinal Plants by DPPH, FRAP and ABTS assay. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v.13, n.1, p.1-6, 2022.

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Biopolymer Nanoparticles from HeatTreated Electrostatic Protein–Polysaccharide Complexes: Factors Affecting Particle Characteristics. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 2, p. 36-43, 2010.

KACÁNIOVÁ et al. Chemical Composition, *In Vitro* and *In Situ* Antimicrobial and Antibiofilm Activities of *Syzygium aromaticum* (Clove) Essential Oil. **Plants**, v.10, n.10, p.2185, 2021.

KAUR, K; KAUSHAL, S.; RANI, R. Chemical composition, antioxidant and antifungal potential of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil, its major compound and its derivatives. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.22, n.5, p.1195-1217, 2019.

KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids Surf**, v.84, n.1, p.163-171, 2011.

KHEAWFU, K. et al. Nanoemulsion: A suitable nondelivery system of clove oil for anesthetizing Nile tilapia. **Drug Discovery Therapeutics**, v.11, n.1, p.181-185, 2017.

KIM, E. H.; KIM, H. K.; AHN, J. J. Acaricidal Activity of Clove Bud Oil Compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.4, p.885-889, 2003.

KIM, H. M. et al. Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, n.2, p.125-131, 1988.

KIM, J.R.; SHARMA, S. Acaricidal activities of clove bud oil and red thyme oil using microencapsulated against HDMs. **Journal of Microencapsulation**. v.28, n.1, p.82-91, 2011.

KONDAVEETI, S. et al. Microbicidal gentamicin-alginate hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v.186, n.1, p.159-167, 2018.

KUCK L. S., NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. **Food Chemistry**, v.194, n.1, p.569-576, 2016.

KUNICKA-STYCZYNSKA, A. et al. Clove Oil (*Syzygium aromaticum* L.) Activity against *Alicyclobacillus acidoterrestris* Biofilm on Technical Surfaces. **Molecules**, v.25, n.15, p.3334, 2020.

KUROZAWA, L.; HUBINGER, M. Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. **Current Opinion in Food Science**, v.15, n.1, p.50-55, 2017.

LEAL, D. et al. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. **Carbohydrate Research**, v.343, n.2, p.308-316, 2008.

LEONG, J. Y. et al. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. **Particuology**, v. 24, p. 44– 60, 2016.

ŁĘTOCHA, A.; MIASTKOWSKA, M.; SIKORA, E. Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. **Polymers**, v.14, n.1, 2022.

MA, L. et al. Eugenol protects cells against oxidative stress via Nrf2. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.21, n.1, p.107, 2021.

MAES, C.; BOUQUILLON, S.; FAUCONNIER, M.L. Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. **Molecules**, v.24, n.14, p.2539, 2019.

MAKAROVA, A. O et al. Ion-Induced Polysaccharide Gelation: Peculiarities of Alginate Egg-Box Association with Different Divalent Cations. **Polymers (Basel)**, v.15, n.5, p.1243, 2023.

MARCHESE, A. et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, v.43, n.1, p.668-689, 2017.

MARMOUZI, I. et al. Modulatory effect of *Syzygium aromaticum* and *Pelargonium graveolens* on oxidative and sodium nitroprusside stress and inflammation. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v.19, n.1, p.201-210, 2019.

MARTÍNEZ-HERRERA, A. et al. Effect of 4-Allyl-1-hydroxy-2-methoxybenzene (Eugenol) on Inflammatory and Apoptosis Processes in Dental Pulp Fibroblasts. **Mediators of inflammation**, v. 2016, p. 1–7, 2016.

MARTINSEN, A.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. **Biotechnology and bioengineering**, v.33, n.1, p.79-89, 1989.

MARTÍN-VILLENA, M. J. et al. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: Development and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v.94, n.1, p. 1-11, 2013.

MCCLEMENTS, D. J. Recent progress in hydrogel delivery systems for improving nutraceutical bioavailability. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 238-245, 2017.

MEDEIROS, Kaline de Araújo et al. Desenvolvimento de grânulos de alginato para veiculação de derivado tiofênico 5CN06 por gelificação ionotrópica. **Research, Society and Development**, v.11, n.14, p.e26111435898, 2022.

MENEZES, M. F. S. C. et al. Microencapsulação de probióticos por gelificação iônica externa utilizando pectina. **Ciência e Natura**, v.37, n.1, 30-37, 2015.

MISHRA, R.P.; SHARMA, K. Antimicrobial activity of *Syzygium aromaticum* L. (Clove). **International Research Journal of Biological Science.**, v.3, n.1, p.22-25, 2014.

MOEMENBELLAH-FARD, M. D. et al. Antibacterial and leishmanicidal activities of *Syzygium aromaticum* essential oil versus its major ingredient, eugenol. **Flavour and Fragrance Journal**, v.00, p.1-7, 2020.

MOHD-NAWI, F. et al. Larvicidal Potential of Essential Oils Extracted from *Syzygium aromaticum* Against *Aedes albopictus* In Malaysia: A Preliminary Study. **Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences**, v.18, n.1, p.9-13, 2022.

MOURA, S. C. S. R. et al. Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. **Food Chemistry**, v.241, n.1, p.317-327, 2018.

MOURA, S. C. S. R. et al. Stability of Hibiscus Extract Encapsulated by Ionic Gelation Incorporated in Yogurt. **Food and Bioprocess Technology**, v.12, n.9, p.1500-1515, 2019.

MUNERATTO, V. M.; GALLO, T. C. B.; NICOLETTI, V. R. Oregano essential oil encapsulation following the complex coacervation method: Influence of temperature, ionic strength, and pH on the release kinetics in aqueous medium. **Food Science and Technology**, v.45, n.1, p.e003221, 2021.

MYTLE, N. et al. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**, v.17, n.2, p.102-107, 2006.

NAM, H.; KIM, M. M. Eugenol with antioxidante activity inhibits MMP-9 related to metastasis in human fibrosarcoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.55, n.1, p.106–112, 2013.

NARANJO-DURÁN, A.M. et al. Modified-release of encapsulated bioactive compounds from annatto seeds produced by optimized ionic gelation techniques. **Scientific Reports**, v.11, n.1, p.1317, 2021.

NAZZARO, F. et al. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, n.1, p.182-186, 2012.

NIKOU, V. et al. The anti-inflammatory and antipyretic effects of clove oil in healthy dogs after surgery. **Pharma Nutrition.**, v.5, n.1, p.52- 57, 2017.

OGUNWANDE, I.A. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **International Journal Aromatherapy**, v.15, n.3, p.147-152, 2005.

OLIVEIRA, R.A. et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira da Farmacognosia**, v.19, n.3, p.771-775, 2009.

OLSZOWY, M; DAWIDOWICZ, A. Essential oils as antioxidants: their evaluation by DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, and β -carotene bleaching methods. **Monatshefte Für Chemie**, v.147, n.12, p.2083-2091, 2016.

ONSOYEN, E. Commercial applications of alginates. **Carbohydrate Chemistry Eur.** v.14, n.1, p.26-31, 1996.

ÖZTÜRK, A.; ÖZBEK, H. The anti-inflammatory activity of *Eugenia caryophyllata* essential oil: an animal model of antiinflammatory activity. **EUR. J. Gen Med.**, v.2, n.1, p.159-163, 2005.

PAOLETTI, S.; DONATI, I. Comparative Insights into the Fundamental Steps Underlying Gelation of Plant and Algal Ionic Polysaccharides: Pectate and Alginate. **Gels**, v.8, n.12, p.784, 2022.

PAQUES, J. P. et al. Preparation methods of alginate nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.209, n.1, p.163–171, 2014.

PASTORINI, L. H.; BACARIN, M. A.; ABREU, C. M. Secagem de material vegetal em forno de microondas para determinação de matéria seca e análises químicas. **Ciência Agrotecnologia**, v.26, n.6, p.1252-1258, 2002.

PEREIRA, K.L. et al. A new aerosol flow reactor to study secondary organic aerosol. **Atmospheric Measurement Techniques**, v.12, n.1, p.4519-4541, 2019.

PEREIRA, L. et al. Use of FTIR, FT-Raman and ^{13}C -NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular Engineering**, v.20, n.1, p.223-228, 2003.

PÉREZ-ROSÉS, R. et al. Biological and Nonbiological Antioxidant Activity of Some Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.64, n.23, p.4716-4724, 2016.

PETROVA, V.Y. et al. Alginate gel reinforcement with chitin nanowhiskers modulates rheological properties and drug release profile, **Biomolecules**, v.9, n.1, p. 291, 2019.

PINA-BARRERA, A.M. et al. Application of a Multisystem Coating Based on Polymeric Nanocapsules Containing Essential Oil of *Thymus Vulgaris* L. to Increase the Shelf Life of Table Grapes (*Vitis Vinifera* L.). **IEEE Transactions Nanobioscience**, v.18, n.4, p.549-557, 2019.

PINA-VAZ, C. et al. Antifungal activity of thymus oils and their major compounds. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v.18, n.1, p.73-78, 2004.

POLETTO, G. et al. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and different prebiotic agents by external ionic gelation followed by freeze-drying. **Ciência Rural**, v.49, n.2, 2019.

PRIOR, R. L. et al. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.10, p.4290-4302, 2005.

PUŠKÁROVÁ, A. et al. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p.1-11, 2017.

QIN, Y. et al. Applications of Alginate as a Functional Food Ingredient. In: GRUMEZESCU, Alexandru Mihai; HOLBAN, Alina Maria (org.). **Biopolymers for Food Design**. Firsted. London: Academic Press, p. 536, 2018.

RACOVITȚĂ, S. et al. Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 54, p.709–718, 2009.

RADÜNZ, M. et al. Antimicrobial and Antioxidant Activity of Unencapsulated and Encapsulated Clove (*Syzygium aromaticum*, L.) Essential Oil. **Food Chemistry**, v.276, n.1, p.180-186, 2018.

RAHAMAN, M.M. et al. Natural antioxidants from some fruits, seeds, foods, natural products, and associated health benefits: An update. **Food Science & Nutrition**, v.11, n.1, p.1657-1670, 2023.

RAJMOHAN, D.; BELLMER, D. Characterization of Spirulina-Alginate Beads Formed Using Ionic Gelation. **International Journal of Food Science**, p.1-7, 2019.

RANA, I. S.; RANA, A. S.; RAJAK, R. C. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (l.) By extraction, purification and analysis of its main component eugenol. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, n.1, p.1269-1277, 2011.

REHM, Bernd H. A. (ed.). **Alginates: Biology and Applications**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. E-book. ISBN 9783540926788.

REIG-VANO, B. et al. Alginate-based hydrogels for cancer therapy and research. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.170, n.1, p.424-436, 2021.

REIS, A. A. et al. Encapsulação Por Gelificação Iônica: Uma Revisão Narrativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: pesquisa e práticas contemporâneas** - Volume 2 , por Carlos Alberto Martins Cordeiro et al., 1a ed., Editora Científica Digital, 2021, pp.

- REIS, C. P. et al. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the desing of alginate particles. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 3, n. 245-357, 2006.
- RODRIGUES, A. M. et al. Different susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae to plant-derived products. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 52, n.1, 2019.
- RUAN, Z. P.; ZHANG, L. L.; LIN, Y. M. Evaluation of the Antioxidant Activity of *Syzygium cumini* Leaves. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v.13, n.10, p.2545–2556, 2008.
- SANTOS et al. Characterization of the raw essential oil eugenol extracted from *Syzygium aromaticum* L. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.96, n.3, p.821-825, 2009.
- SANTOS JÚNIOR, C. J. et al. Atividade antifúngica de isolados clínicos de *Candida não-albicans* aos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto-comum). **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.54, n.1, 2021.
- SANTOS, A. J. et al. Clay/PVP nanocomposites enriched with *Syzygium aromaticum* essential oil as a safe formulation against *Aedes aegypti* larvae. **Applied Clay Science**, v.185, n.1, p.1-7, 2020.
- SANTOS, A. L. S. et al. Chemical characterization and larvicidal properties of the essential oils of against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.24, n.1, p. 22-28, 2022.
- SARMA, B.D. et al. An alginate-based encapsulation enhances shelf life and bioactivity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.33, n.1, p.69, 2023.
- SCANDIFFIO, R. et al. Protective Effects of (*E*)- β -Caryophyllene (BCP) in Chronic Inflammation. **Nutrients**, v.12, n.11, p.3273, 2020.
- SCHOUBBEN, A. et al. Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. **Chemical engineering journal**, v.160, n.1, p. 363- 369, 2010.
- SELLES et al. Chemical composition, in-vitro antibacterial and antioxidant activities of *Syzygium aromaticum* essential oil. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v.14, n.1, p.2352-2358, 2020.
- SENTURK PARREIDT, T.; MÜLLER, K.; SCHMID, M. AlginateBased Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications. **Foods**, v.7, n.10, p.170, 2018.
- SHAHBAZI, Y. Antioxidant, antibacterial, and antifungal properties of nanoemulsion of clove essential oil. **Nanomedicine Research Jornal**, v.4, n.1, p.204-208, 2019.
- SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, p.501-547, 1993.

SHAO, Y. et al. Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v.193, n.1, p.144-152, 2018.

SHARMAA, C. et al. Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of - Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise. **Current Pharmaceutical Design**, v.22, n.1, p.1-28, 2016.

SHETTA, A.; KEGERE, J.; MAMDOUH, W. Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: encapsulation, thermal stability, in-vitro release, antioxidant and antibacterial activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.126, n.1, p.731-742, 2019.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.1, p. 1-19, 2003.

SILVA, C. G.; KANO, F. S.; ROSA, D. Thermal stability of the PBAT biofilms with cellulose nanostructures/essential oils for active packaging. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.**, v.1, p 22-37,2019.

SILVA, P. T. S. et al. Microencapsulation: Concepts, Mechanisms, Methods and Some Applications in Food Technology. **Ciência rural**, v. 44, n. 7, p. 1304-11, 2014.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v.57, n.1, p.589-594, 2010.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.1, p.144-158, 1965.

SMIDSRD, O.; DRAGET, K. I. Chemistry and physical properties of alginates. **Carbohydrates in Europe**, v.14, n.1, p.6-13, 1996.

SONG B. Lotus leaf-inspired design of calcium alginate particles with superhigh drug encapsulation efficiency and pH responsive release. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.172, n.1, p.464-470, 2018.

SOUSA, V. I. et al. Microencapsulation of Essential Oils: A Review. **Polymers**, v.14, n.9, p.1730, 2022.

SPADARI, C. C. et al. Alginate nanoparticles as non-toxic delivery system for miltefosine in the treatment of candidiasis and cryptococcosis. **International Journal of Nanomedicine**, v.14, n.1, p.5187–5199, 2019.

STANFORD, E. C. On algin: a new substance obtained from some of the commoner species of marine algae. **Chemistry News**, v.47, n.254, 1883.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.

TALEUZZAMAN, M. et al. Eugenol as a Potential Drug Candidate: A Review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 20, p. 1804-1815, 2021.

TARHAN, I. A robust method for simultaneous quantification of eugenol, eugenyl acetate, and β -caryophyllene in clove essential oil by vibrational spectroscopy. **Phytochemistry**, v.191, n.1, p.112928, 2021.

TELES, A. M. et al. GC-MS Characterization of Antibacterial, Antioxidant, and Antitrypanosomal Activity of *Syzygium aromaticum* Essential Oil and *Eugenol*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2021, n.1, p.12, 2021.

THIELMANN, J.; MURANYI, P.; KAZMAN, P. Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Heliyon.**, v.5, n.6, 2019.

TONNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Alginate in Drug Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, n. 28, v. 6, p. 621–630, 2002.

TUNÇ, M. T.; KOCA, I. Ohmic heating assisted hydrodistillation of clove essential oil. **Industrial Crops. & Products**, v.141, n.1, 2019.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3671, 2021.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol-A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.1, p.3671, 2021.

VAHEDIKIA et al. Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, n.1, p.25-32, 2019.

VALENTE, R. O. H. et al. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo) do extrato do *Syzygium aromaticum* (L) em roedores. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 557-560, 2009.

VICIDOMINI, C; ROVIELLO, V.; N. ROVIELLO, G. Molecular Basis of the Therapeutical Potential of Clove (*Syzygium aromaticum* L.) and Clues to Its Anti-COVID-19 Utility. **Molecules**, v.26, n.7, p.1880, 2021.

VIJAYASTELTAR, L. et al. Safety assessment of a standardized polyphenolic extract of clove buds: subchronic toxicity and mutagenicity studies. **Toxicology Reports**, v.3, n.1, p.439-449, 2016.

VINHOLE, J. et al. Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. **Food Chemistry**, v.1, n.1, p.204-11, 2014.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, n.1, p.13-19, 2010.

WISSAM, Z.; SAMER, H. Encapsulation of flaxseed oil extract in alginate–salep system by ionic gelation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.55, n.1, p.1-9, 2019.

WOISKY R.G.; SALATINO A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecore for chemical fuality control. **Journal of Apicultural Research**,. v.37, n.2, p.99-105, 1998.

XIAO, Q.; GU, X.; TAN, S. Drying process of sodium alginate films studied by two-dimensional correlation ATR-FTIR spectroscopy. **Food Chemistry**, v.164, n.1, p.179-184, 2014.

XU, C. et al. Novel nano-encapsulated probiotic agents: Encapsulate materials, delivery, and encapsulation systems. **Journal of Controlled Release**, v.349, n.1, p.184-205, 2022.

XU, Y. et al. Clove essential oil loaded chitosan nanocapsules on quality and shelf-life of blueberries. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 30, n.1, 2023.

XUE, Q. et al. Recent advances in nutritional composition, phytochemistry, bioactive, and potential applications of *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae). **Frontiers in Nutrition**, v.14, n.1, p.1002147, 2022.

YAMMINE, J. et al. Advances in essential oils encapsulation: development, characterization and release mechanisms. **Polymer Bulletin**, v.81, n.1, p.3837-3882, 2024.

YANFANG, L. et al. Chemical Compositions of Clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.) Extracts and Their Potentials in Suppressing SARS-CoV-2 Spike Protein-

ACE2 Binding, Inhibiting ACE2, and Scavenging Free Radicals. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**, v.70, n.45, p.14403-14413, 2022.

YANG, J.; XIE, Y.; HE, W. Research Progress on Chemical Modification of Alginate: A Review. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 33–39, 2011.

ZAM, W. et al. Alginate-pomegranate peels' polyphenols beads: effects of formulation parameters on loading efficiency. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.50, n.4, p.1-8, 2014.

- ZANUSSO JUNIOR, G. et al. Efficacy of essential oil of *Syzygium aromaticum* alone and in combination with benznidazole on murine oral infection with *Trypanosoma cruzi* IV. **Experimental Parasitology**, v.185, n.1, p92-97, 2018.
- ZARI, T.A.; HAKEEM, K.R. Anticancer Properties of Eugenol: A Review. **Molecules**, v.26, n.23, p.7407, 2021.
- ZHANG, H. et al. One-step assembly of zein/caseinate/alginate nanoparticles for encapsulation and improved bioaccessibility of própolis. **Food & Function**, v.10, n.2, p.635-645, 2019.
- ZHANG, L.; GU, B.; WANG, Y. Clove essential oil confers antioxidant activity and lifespan extension in *C. elegans* via the DAF-16/FOXO transcription factor. **Comparative Biochemistry & Physiology**, v.242, n.1, p.108938, 2021.
- ZHENG, W. et al. Pickering emulsion hydrogel based on alginate-gellan gum with carboxymethyl chitosan as a pH-responsive controlled release delivery system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.216, n.1, p.850–859, 2022.