

DÉBORA TEODORO CONDÉ

**OBTENÇÃO PELA TÉCNICA DE MICROFLUÍDICA DE MICROCÁPSULAS DE
ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO O ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-
ÍNDIA E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LARVICIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Renata Pereira Lopes

Coorientadores: Róbson Ricardo Teixeira
Álvaro Vianna Novaes C. Teixeira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C745o
2021 Condé, Débora Teodoro, 1994-
Obtenção pela técnica de microfluídica de microcápsulas de
alginato de cálcio contendo o óleo essencial do cravo-da-índia e
avaliação de atividade larvicida / Débora Teodoro Condé. - Viçosa,
MG, 2021.
77 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Renata Pereira Lopes Moreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 69-77.

1. Microencapsulação. 2. *Aedes aegypti*. 3. Preparações de
liberação controlada. 4. Compostos orgânicos voláteis. 5. *Eugenia
caryophyllata*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
II. Título.

CDD 22. ed. 615.19

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB6 2525

DÉBORA TEODORO CONDÉ

OBTENÇÃO PELA TÉCNICA DE MICROFLUÍDICA DE MICROCÁPSULAS DE
ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO O ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-
ÍNDIA E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LARVICIDA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do Programa de
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química, para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 01 de junho de 2021.

Assentimento:



Débora Teodoro Condé
Autora



Renata Pereira Lopes Moreira
Orientadora

Deus, aos meus pais Carlos e Graça que sempre estão ao meu lado, ao meu irmão Felipe por me ajudar em todos os momentos, e ao meu marido Wesley pelo apoio incondicional e por todo carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me sustentado, por me amar incondicionalmente e por sempre cuidar de mim.

Agradeço e dedico esse trabalho aos meus pais, Maria das Graças Teodoro Condé (minha guerreira) e Carlos Roberto Condé (meu herói), por serem minha base e me apoiar mesmo passando por momentos difíceis, sem vocês eu jamais teria motivação para finalizar esse trabalho. Ao meu irmão Felipe Teodoro Condé por estar sempre presente me ajudando e incentivando.

Ao meu amor, meu marido e amigo, Wesley Antônio Araújo, por não ter deixado eu desistir, por me apoiar, me escutar e me motivar quando eu dizia que não aguentava mais, por me colocar de pé todas as vezes que eu caía em prantos. Obrigada por fazer tanto por mim e por nossa família.

Às minhas primas, Marcia e Jeovania que sempre estão ao meu lado. Ao meu querido afilhado Heitor, por ser a alegria da casa.

A todos os meus amigos pelo companheirismo e pelos momentos de descontração. Em especial o meu amigo, meu irmão, Ivan Pedro, por se fazer presente, mesmo com a distância. Às minhas amigas, Larissa, Carol e Taíssa, pelos conselhos e motivação do dia a dia.

Agradeço carinhosamente a minha amiga Bárbara, por me acolher e me incentivar tanto, por toda cumplicidade e carinho. Às minhas amigas, Hídila, Nina e Ana Maria por me acolherem durante esses dois anos. À Rita Freire e sua família pela amizade e acolhimento. Cada um de vocês tem um espaço reservado no meu coração.

Agradeço imensamente minha Orientadora Renata, por acreditar em mim e me ensinar com tanta paciência, por ser um exemplo de pessoa e profissional. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim durante esses dois anos, principalmente pelos “puxões de orelha” que me fizeram crescer profissionalmente. Sou eternamente grata a você.

Ao meu coorientador Álvaro Viana, por ser essa pessoa e profissional “show de bola”. Por ter ficado ao meu lado, por ter me ensinado e me apoiado durante esses dois anos, foi muito especial poder trabalhar ao seu lado.

Ao meu coorientador Robson Teixeira por toda a preocupação e por ser essa pessoa incrível, que sempre estava disponível para me ajudar.

À Luiza, por toda sua competência, dedicação e auxílio nesses dois anos. Lu, você foi fundamental para a realização desse trabalho, eu sou muito grata por tudo que fez por mim. Ao Rafael por sempre estar disposto a ajudar, o meu muito obrigada.

Ao incrível grupo de pesquisa LANAQUA, por terem me acolhido e contribuído para o meu trabalho, em especial o Guilherme, Lucas, Arthur e Mayra. À Luana e a Camila que entraram no grupo a pouco tempo, que se tornaram muito especiais.

E Por fim, À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

CONDÉ, Débora Teodoro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2021. **Obtenção pela técnica de microfluídica de microcápsulas de alginato de cálcio contendo o óleo essencial do cravo-da-índia e avaliação de atividade larvicida.** Orientadora: Renata Pereira Lopes Moreira. Coorientadores: Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira e Róbson Ricardo Teixeira.

Os óleos essenciais (OEs) possuem aplicações diversas como, por exemplo, atividade antibacteriana, antifúngica, entre outras. Porém, são suscetíveis à oxidação na presença de ar, luz e umidade e são sensíveis ao calor. Neste sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas de microencapsulamento para aumentar o tempo de vida útil dos OEs. Neste trabalho, o OE foi obtido a partir do cravo-da-índia (OEC) por hidrodestilação e caracterizado por cromatografia gasosa (CG), RMN, Raman, FTIR. Os compostos majoritários encontrados na análise feita pela técnica CG, foram o eugenol (83%), acetato de eugenol (9%) e β -cariofileno (8%), respectivamente. O OEC foi encapsulado por extrusão utilizando um dispositivo microfluídico. Para fazer as microcápsulas, foram utilizadas solução de alginato de sódio ($0,0150 \text{ g mL}^{-1}$) como material de parede, a solução surfactante dodecil sulfato de sódio - SDS ($0,0288 \text{ g mL}^{-1}$) para formação de emulsões contendo o óleo, e solução de CaCl_2 ($0,0147 \text{ g mL}^{-1}$) como agente reticulante. Foram avaliados diferentes parâmetros na formação das cápsulas, como massa de OEC, volume de solução de alginato, volume de solução de SDS e volume de solução de CaCl_2 , que foram, respectivamente, iguais a $0,0751 \text{ g}$, $20,00 \text{ mL}$; $4,00 \text{ mL}$ e $20,00 \text{ mL}$ para **OEC-CapA**, $0,0751 \text{ g}$, $20,00 \text{ mL}$; $4,00 \text{ mL}$ e $40,00 \text{ mL}$ para **OEC-CapB**, $0,0375 \text{ g}$, $10,00 \text{ mL}$; $1,00 \text{ mL}$ e $40,00 \text{ mL}$ para **OEC-CapC** e $0,1500 \text{ g}$, $10,00 \text{ mL}$; $1,00 \text{ mL}$ e $40,00 \text{ mL}$ **OEC-CapD**. Os tamanhos das cápsulas foram de $197,2 \pm 0,04 \mu\text{m}$, $222,4 \pm 0,05 \mu\text{m}$, $227,6 \pm 0,08 \mu\text{m}$ e $164,7 \pm 0,03 \mu\text{m}$ para OEC-CapA, OEC-CapB, OEC-CapC, OEC-CapD respectivamente, com rendimento de encapsulação de $(55,0 \pm 6,3) \%$, $(29,0 \pm 7,2) \%$, $(59,9 \pm 11,2) \%$ e $(63,7 \pm 14) \%$, respectivamente. A cápsula de maior rendimento e menor tamanho (OEC-CapD) foi selecionada para os demais ensaios. Grupos funcionais característicos do OEC presentes na cápsula foram identificados por Espectroscopia na região do Infravermelho e Raman. Por análise termogravimétrica, observou-se que a cápsula aumentou a estabilidade térmica do óleo essencial de 162 para $230 \text{ }^\circ\text{C}$. Foi realizado a liberação controlada da cápsula (OEC-CapD), sendo possível observar um perfil de liberação com comportamento exponencial ($R^2=0,997$), com tempo de equilíbrio de 72 h e liberação de 54% de OEC. Por fim, foi feita uma aplicação do OEC puro em larvas de *Aedes aegypti* nos quais, o CL_{50} foi de $74,4 \text{ ppm}$ e

CL₉₀ de 106,2 ppm. As cápsulas também foram avaliadas, podendo-se observar seu efeito tóxico contra *Aedes aegypti*. Pode-se concluir, portanto, que as cápsulas apresentam potencial de aplicação no controle de das larvas de *Aedes aegypti*, porém melhorias devem ser efetuadas para aplicação.

Palavra-chave: Microencapsulação. *Aedes aegypti*. Liberação controlada. Constituintes voláteis. *Eugenia caryophyllata*.

ABSTRACT

CONDÉ, Débora Teodoro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2021. **Obtainment by microfluidics technique of calcium alginate microcapsules containing the essential oil of clove and evaluation of larvicidal activity.** Adviser: Renata Pereira Lopes Moreira. Co-advisers: Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira and Róbson Ricardo Teixeira.

Essential oils (EOs) have different applications, such as antibacterial and antifungal activities, among others. However, they are susceptible to oxidation in the presence of air, light and moisture and are sensitive to heat. In this sense, it is necessary to develop microencapsulation techniques to increase the useful life of EOs. In this work, EO was obtained from cloves (OEC) by hydrodistillation and characterized by gas chromatography (GC), NMR, Raman, FTIR. The major compounds found in the analysis performed by the GC technique were eugenol (83%), eugenol acetate (9%) and β -caryophyllene (8%), respectively. The OEC was encapsulated by extrusion using a microfluidic device. To make the microcapsules, sodium alginate solution (0.0150 g mL^{-1}) was used as a wall material, the surfactant solution sodium dodecyl sulfate - SDS (0.0288 g mL^{-1}) to form emulsions containing the oil, and CaCl_2 solution (0.0147 g mL^{-1}) as crosslinking agent. Different parameters were evaluated in the formation of the capsules, such as OEC mass, alginate solution volume, SDS solution volume and CaCl_2 solution volume, which were, respectively, equal to 0.0751 g, 20.00 mL; 4.00 mL and 20.00 mL for OEC-CapA, 0.0751 g, 20.00 mL; 4.00 ml and 40.00 ml for OEC-CapB, 0.0375 g, 10.00 ml; 1.00 ml and 40.00 ml for OEC-CapC and 0.1500 g, 10.00 ml; 1.00 mL and 40.00 mL OEC-CapD. The capsule sizes were $197.2 \pm 0.04 \text{ }\mu\text{m}$, $222.4 \pm 0.05 \text{ }\mu\text{m}$, $227.6 \pm 0.08 \text{ }\mu\text{m}$ and $164.7 \pm 0.03 \text{ }\mu\text{m}$ for OEC-CapA, OEC-CapB, OEC-CapC, OEC-CapD respectively, with encapsulation efficiency of $(55.0 \pm 6.3) \%$, $(29.0 \pm 7.2) \%$, $(59.9 \pm 11.2) \%$ and $(63.7 \pm 14) \%$, respectively. Therefore, the capsule with the highest yield and the smallest size (OEC-CapD) was selected in the other trials. Functional groups characteristic of the OEC were observed in the capsule by spectroscopy in the infrared and Raman region. By thermogravimetric analysis, it was found that the capsule made it possible to increase the thermal stability of the essential oil from 162 to 230 °C. The controlled release of the capsule (OEC-CapD) was performed, and it is possible to observe a release profile with exponential behavior ($R^2=0.997$), with an equilibrium time of 72 h and a release of 54% of OEC. Finally, an application of pure OEC was made in *Aedes aegypti* larvae in which the LC50 was 74.4 ppm and LC90 of 106.2 ppm. The capsules were also evaluated, and their toxic effect against *Aedes aegypti* could be observed. It can be

concluded, therefore, that the capsules have application potential in the control of *Aedes aegypti* larvae, but improvements must be made for application.

Keywords: Microencapsulation. *Aedes aegypti*. Controlled release. Volatile constituents. *Eugenia caryophyllata*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fórmula estrutural do isopreno	19
Figura 2 - Fórmulas estruturais de alguns monoterpenos encontrados em óleos essenciais	20
Figura 3 - Fórmulas estruturais de compostos aromáticos encontrados em óleos essenciais...	21
Figura 4 - Esquema de uma cápsula obtida pela técnica de microencapsulação.....	28
Figura 5 - Campos de aplicação da técnica de microencapsulação em diferentes setores	28
Figura 6 - Estrutura de subunidades do ácido algínico.....	32
Figura 7 - Representação esquemática da estrutura da “caixa de ovo”	33
Figura 8 - Esquema de sistema de encapsulamento.	40
Figura 9 - Cromatografia correspondente à análise do óleo essencial do cravo-da-índia.	47
Figura 10 - Espectro ¹ H- RMN do óleo essencial do cravo-da-índia	48
Figura 11 - Termograma do óleo essencial do cravo-da-índia	49
Figura 12 - Espectroscopia UV- vis do óleo essencial do cravo-da-índia.....	50
Figura 13 - Espectro no IV(ATR) do óleo essencial do cravo-da-índia.....	51
Figura 14 - RAMAN do óleo essencial do cravo-da-índia.....	52
Figura 15 - Imagens dos materiais obtidos (emulsão e cápsulas).....	55
Figura 16 - Raman do óleo essencial do cravo da índia e das cápsulas obtidas.....	56
Figura 17 - Emulsão do óleo essencial, SDS e solução de alginato	57
Figura 18 - Emulsão do óleo essencial, SDS e solução de alginato após agitação.....	57
Figura 19 - Imagem de microscopia óptica dos materiais obtidos por microfluídica	58
Figura 20 - FTIR (a) do óleo essencial do cravo-da-índia e das cápsulas	59
Figura 21 - Espectros do óleo essencial do cravo-da-índia e curva analítica.....	60
Figura 22 - TGA do alginato (vermelho), cápsula liofilizada.	61
Figura 23 - Raman do óleo essencial do cravo da índia e das cápsula.....	63
Figura 24 - Liberação controlada das cápsulas.....	64
Figura 25 - Curva de mortalidade da larva do <i>Aedes aegypti</i>	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principal composição dos óleos essenciais obtidos.....	22
Tabela 2 - Propriedades biológicas de óleos essenciais e aplicações	23
Tabela 3 - Composição do óleo essencial do cravo-da-índia (OEC).....	25
Tabela 4 - Os principais processos utilizados para obtenção de microencapsulação	29
Tabela 5 - Principais materiais utilizados em encapsulamento de óleos essenciais.....	31
Tabela 6 - Reagentes utilizados no trabalho	35
Tabela 7 - Quantidades utilizadas na obtenção de microcápsulas de OEC por microfluídica	40
Tabela 8 - Características físico-químicos do óleo essencial do cravo-da-índia.....	46
Tabela 9 - Composição química do OEC determinada por CG/MS.....	47
Tabela 10 - Dados obtidos da análise RMN	49
Tabela 11 - Equação de regressão ajustada para a liberação das cápsulas	65
Tabela 12 - Concentração letal OEC nas larvas do <i>Aedes aegypti</i>	66
Tabela 13 - Letalidade das larvas do <i>Aedes aegypti</i>	67

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA E OBJETIVOS	15
1.1 INTRODUÇÃO	16
1.2 OBJETIVO GERAL	18
1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
1.3 REVISÃO DA LITERATURA	19
1.3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	19
1.3.2 APLICAÇÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	22
1.3.3 ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA	24
1.3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	25
1.3.4.1 Extração por arraste vapor.....	25
1.3.4.2 Extração por hidrodestilação	26
1.3.4.3 Extração por solvente	26
1.3.4.4 Extração por micro-ondas.....	26
1.3.4.5 Extração Supercrítica.....	27
1.3.5 MICROENCAPSULAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	27
1.3.5.1 Técnicas de microencapsulação utilizadas em óleos essenciais.....	29
1.3.5.2 Materiais utilizados em encapsulamento de óleos essenciais	30
1.3.5.3 Alginato.....	31
CAPÍTULO 2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
2. METODOLOGIA	35
2.1 PADRÕES E REAGENTES.....	35
2.2 PREPARO DE SOLUÇÕES DE ALGINATO DE SÓDIO E CLORETO DE CÁLCIO E SDS.....	35
2.3 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	35
2.4 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA	36
2.4.1 Caracterização do óleo essencial do cravo da índia	36
2.4 ENSAIOS PRELIMINARES DE OBTENÇÃO DE CÁPSULAS.....	39
2.5 OBTENÇÃO DE CÁPSULAS CONTENDO OEC POR MICROFLUÍDICA.....	39
2.5.1. Montagem do dispositivo microfluídico para o encapsulamento do óleo essencial	39
2.5.2. Preparo de soluções para obtenção das cápsulas por microfluídica.....	39
2.5.3. Obtenção das cápsulas por microfluídica.....	40
2.5.4. Eficiência do encapsulamento	41
2.5.5. Microscopia óptica das cápsulas	41

2.5.6. Espectroscopia Raman	42
2.5.7. Espectroscopia no Infravermelho.....	42
2.6 LIBERAÇÃO CONTROLADA DAS CÁPSULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO OEC.	42
2.7 APLICAÇÃO DO OEC E DAS CÁPSULAS OBTIDAS POR MICROFLUÍDICA EM LARVAS <i>Aedes Aegypti</i>	43
CAPÍTULO 3 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDA POR EXTRAÇÃO DO CRAVO DA ÍNDIA	45
3 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	46
3.1. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL	46
3.2. IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS PRESENTE NO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO A PARTIR DOS BOTÕES FLORAIS DO CRAVO DA ÍNDIA.....	46
3.3 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA ÍNDIA POR RMN	48
3.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA ÍNDIA.....	49
3.5. ANÁLISE DE ABSORÇÃO NO UV/VIS DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA ÍNDIA	50
3.6. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR) DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA ÍNDIA.....	51
3.7. RAMAN DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA ÍNDIA	52
3.8. CONCLUSÃO PARCIAL	52
CAPÍTULO 4 OBTENÇÃO DE CÁPSULAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA ÍNDIA POR MICROFLUÍDICA	54
4.1 ENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA.....	55
4.1.1 ENSAIOS PRELIMINARES.....	55
4.1.1.1 Caracterização por Espectroscopia Raman das cápsulas dos ensaios preliminares	55
4.1.2 CÁPSULAS OBTIDAS POR MICROFLUÍDICA.....	56
4.1.4 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	58
4.1.5 Obtenção do rendimento de encapsulação por Espectroscopia UV-Vis.....	60
4.1.6. Análise Termogravimétrica das cápsulas liofilizadas	61
4.1.7 Espectroscopia Raman das cápsulas liofilizadas.....	62
4.1.8 LIBERAÇÃO CONTROLADA	63
4.1.9 APLICAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA	65
5 CONCLUSÃO PARCIAL	67
6 CONCLUSÃO GERAL	67

7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
8 REFERÊNCIAS	69

CAPÍTULO 1

**INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA E
OBJETIVOS**

1.1 Introdução

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis lipofílicos com características odoríferas e consistência oleosa obtidos a partir da extração de sementes, folhas, flores e cascas de plantas. A comercialização desses óleos vem sendo importante para a economia de vários países, uma vez que podem ser aplicados para diversas finalidades como, por exemplo, nas indústrias de cosméticos (SARKIC; STAPPEN, 2018), alimentícia (RIBEIRO-SANTOS *et al.*, 2017) e farmacêutica (KHALIL *et al.*, 2017).

Matérias-primas como manjerona (*Origanum majorana L.*), manjericão (*Ocimum basilicum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum Blume*), coentro (*Coriandrum sativum L.*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*), louro (*Laurus nobilis L.*), entre outros, são algumas das fontes de OEs que são constituídos por compostos constituídos por diferentes classes de compostos orgânicos, tais como: terpenos, fenilpropanoides, compostos oxigenados, aldeídos, cetonas, ésteres e outros. Diferentes propriedades têm sido descritas para os OES, dentre elas, antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, ovicidas, adulticidas, fungicidas, podendo ainda, ser utilizados na proteção de alimentos armazenados (PAVELA *et al.*, 2019; VEIGA *et al.*, 2019; KHORSHIDIAN *et al.*, 2018)

Alguns óleos essenciais também têm mostrado elevado potencial inseticida como, por exemplo, o óleo essencial do cravo da índia. Para que uma substância seja utilizada como inseticida, ela precisa ter algumas características como: biodegradabilidade, eficácia em pequenas concentrações, ausência de fitotoxicidade e não ser tóxico para outros animais. (SANTOS *et al.*, 2020).

Dentre os óleos essenciais que contêm atividades larvicida, antioxidante, antimicrobiana comprovadas, destaca-se o óleo proveniente do cravo-da-índia. O óleo essencial do cravo da índia (OEC) vem sendo estudado por conter alta toxicidade aos vetores das larvas do *Aedes aegypti* (SOONWERA; PHASOMKUSOLSIL, 2016). Os principais componentes químicos desse óleo essencial são o eugenol e o β -cariofileno, sendo que o eugenol representa aproximadamente 80% da composição do óleo (SINGH; CHANDEL; MANOHAR, 2018).

OEs são suscetíveis à oxidação na presença de ar, luz e umidade e são sensíveis ao calor (VEIGA *et al.*, 2019). Geralmente, os constituintes dos óleos essenciais apresentam baixa massa molar e grande volatilidade. Tais características dificultam as aplicações dos OEs, comprometendo as suas propriedades e a sua composição (HOYOS-LEYVA *et al.*, 2018).

Diante disso, uma das soluções desenvolvidas para preservar ou reter compostos voláteis é a microencapsulação. Por meio dessa técnica, a liberação do OEs pode ser controlada, protegendo os compostos das condições adversas do meio ambiente (MANAF *et al.*, 2015). A microencapsulação é uma técnica nas quais gotículas, ou partículas muito pequenas, de material líquido ou sólido são envolvidas, ou revestidas, com uma película contínua de material polimérico, cerâmico, entre outros, obtendo-se pequenas cápsulas. Essa técnica permite alterar propriedades coloidais e de superfície dos OEs, fornecendo proteção ambiental, controlando as características de liberação ou a disponibilidade de materiais revestidos (VEIGA *et al.*, 2019).

Neste contexto, buscou-se neste trabalho realizar a microencapsulação do óleo essencial do cravo-da-índia pela técnica de microfluídica. Primeiramente, o OE foi extraído da matéria-prima, que foi caracterizado por diferentes técnicas analíticas, descrevendo as principais características do material obtido. Na sequência, o OE foi encapsulado pelo material de parede, o alginato. Parâmetros de microencapsulação do OE foram avaliados. As microcápsulas obtidas também foram caracterizadas por diferentes técnicas e a liberação do óleo também foram avaliadas. Por fim, as microcápsulas foram avaliadas quanto a uma possível aplicação no controle de *Aedes aegypti*. Finalmente, foi realizada uma avaliação das vantagens e desvantagens da técnica empregada.

1.2 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho consistiu em obter e caracterizar microcápsulas de alginato de cálcio contendo o óleo essencial do cravo-da-índia pela técnica microfluídica.

1.2.1 Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial do cravo-da-índia e caracterizá-lo pelas técnicas: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM), ressonância magnética nuclear (RMN), análise termogravimétrica (TGA), ultravioleta visível (UV-Vis), Infravermelho (FTIR), Raman.
- Obter as microcápsulas de alginato de cálcio contendo o óleo essencial de cravo-da-índia pela técnica microfluídica;
- Caracterizar as microcápsulas por diferentes técnicas analíticas: Ressonância magnética nuclear (RMN), termogravimétrica (TGA), ultravioleta visível (UV-Vis), infravermelho (FTIR), Raman e microscopia óptica;
- Avaliar a eficiência de encapsulamento do óleo essencial;
- Avaliar o controle de liberação do óleo essencial das microcápsulas;
- Avaliar a aplicação das microcápsulas contendo óleo essencial do cravo-da-índia no controle do *Aedes aegypti*.

1.3 Revisão da literatura

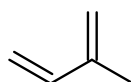
1.3.1 Composição química dos óleos essenciais

Os OEs são misturas complexas constituídas principalmente de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanoides (PANDEY; SINGH, 2017; VEL; SAMPERS; RAES, 2019). Os terpenos são compostos orgânicos de cheiro forte, com odores característicos, comumente agradáveis e corresponde à maioria das moléculas que constituem os óleos essenciais (MATOS *et al.*, 2019; SALHA; ABDERRABBA; LABIDI, 2019).

Os terpenos são hidrocarbonetos simples, enquanto os terpenóides são terpenos que contem oxigênio (HANUŠ; HOD, 2020). Destaca-se um número variado de atividades biológica dos terpenóides, como a prevenção ao câncer (TETALI, 2019), atividades antifúngica (SCHRODER *et al.*, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2018), antimicrobiana (REYES-JURADO *et al.*, 2019), antiviral, antiparasitária (BROCHOT *et al.*, 2017) e anti-inflamatória (NASCIMENTO *et al.*, 2018). Além disso, podem apresentar melhorias na penetração de algumas formulações médicas na pele de humanos, além de ajudar na prevenção de doenças inflamatórias (JIANG *et al.*, 2017).

Os terpenos podem ser sintetizados por meio de metabólicos primários. São formados por rotas da síntese do metileritritol fosfato e do ácido mevalônico (BORGES, AMORIM, 2020). As estruturas isoprenicas (C₅), se unem por meio das ligações cabeça-cauda, formando diversos grupos de terpenos. Desse grupo, os mais importantes são os tetraterpenos (C₄₀), triterpenos (C₃₀), diterpenos (C₂₀) sesquiterpenos (C₁₅), monoterpenos (C₁₀) e hemiterpenos (C₅), que representam cerca de 90% dos OEs (CHÁVEZ-GONZÁLEZ; RODRÍGUEZ-HERRERA, 2016; BROCHOT, 2016).

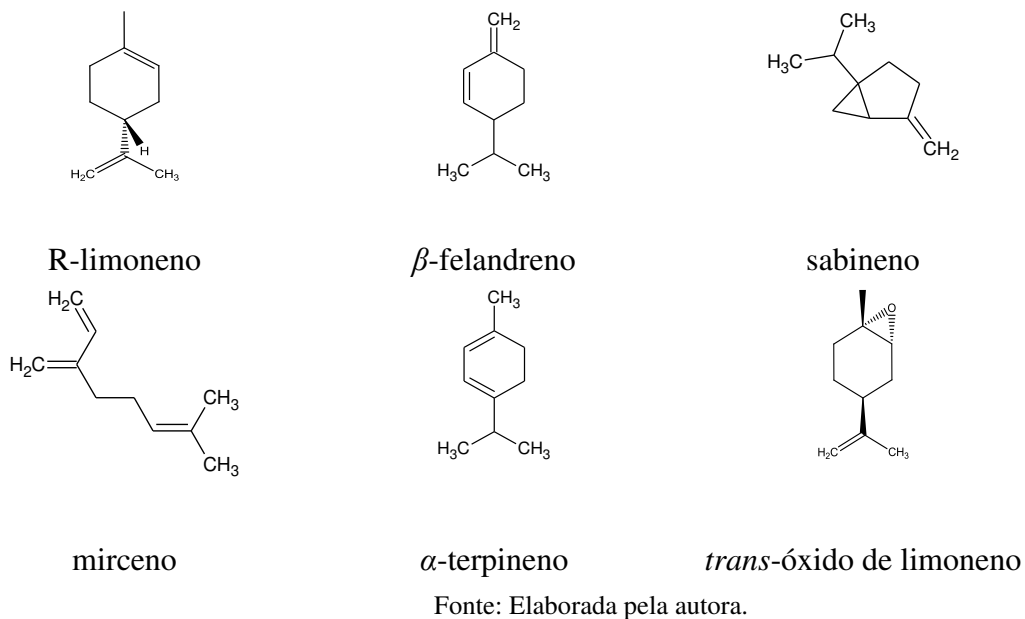
Figura 1- Fórmula estrutural do isopreno



Fonte: Elaborada pela autora.

A biossíntese de monoterpenos ocorre devido a combinação de dimetil alil difosfato e isopentenil difosfato. Essa interação possibilita a formação de pirofosfato de linalila e pirofosfato de nerila, o que possibilita a formação de outros monoterpenos (BORGES, AMORIM, 2020). Os principais componentes dos óleos essenciais aromáticos são encontrados em folhas, flores, cascas e frutas (LONE; YUN, 2016). O limoneno, encontrado em mais de 300 vegetais (JÚNIOR; PASTORE, 2007), por exemplo, é um monotepeno derivado do isopreno. Existem dois enantiômeros do limoneno. O mais utilizado industrialmente é o *d*-limoneno (Figura 2), que tem o cheiro forte de laranja como sua principal característica e, normalmente, usados como ingrediente na produção de produtos de limpeza (HAUENSTEIN *et al.*, 2016; SOULIMANI; BOUAYED; JOSHI, 2019).

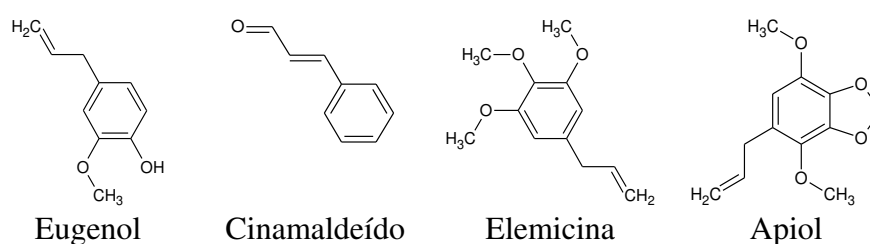
Figura 2 - Fórmulas estruturais de alguns monoterpenos encontrados em óleos essenciais



O β -felandreno (Figura 2) é um composto encontrado em diferentes espécies vegetais, sendo utilizado como barreira física e química contra ataques de patógenos e insetos em árvores coníferas (FORMIGHIERI; MELIS, 2018). O sabineno (Figura 2) é um produto químico fino bicíclico, muito utilizado como aromatizante, como aditivo em biocombustíveis avançados e aditivo de perfumes (CAO *et al.*, 2018). O mircene e o α -terpineno (Figura 2) possuem odor agradável e características antioxidantes (ORLANDO *et al.*, 2019; QUIROGA; NEPOTE; BAUMGARTNER, 2019).

Compostos aromáticos também estão presentes nos OEs e são denominados de fenil propanóides (Figura 3). Este termo é usado para se referir a composição contendo uma cadeia de três carbonos ligado a um anel aromático de seis carbonos, como o fenil propano. Os fenil propanóides, porém, estão em menor concentração em relação aos terpenos. Esses compostos aromáticos apresentam diferentes funções orgânicas como álcoois, aldeídos, fenóis e éteres. Na Figura 3 são mostrados alguns exemplos destes compostos aromáticos (MESQUITA *et al.*, 2019; VEL; SAMPERS; RAES, 2019).

Figura 3 - Fórmulas estruturais de compostos aromáticos encontrados em óleos essenciais.



Fonte: Elaborada pela autora.

O eugenol e o cinamaldeído são reconhecidos por suas atividades antimicrobiana e antifúngica. São os principais compostos dos óleos essenciais do cravo-da-índia e da canela, bastante utilizados em indústrias alimentícias (EDRIS, 2020; HERRERA *et al.*, 2019). A elemicina é encontrada em plantas como citronela, sendo muito utilizada na composição de medicamentos, devido às suas propriedades antioxidante, antimicrobiana e antiviral (WANG *et al.*, 2019). Assim como a elemicina, o composto apiol apresenta atividade antioxidante e está presente na composição do óleo extraído da planta endro, que é muito utilizado como planta medicinal (WANG *et al.*, 2019). Além do óleo essencial do cravo-da-Índia, outros óleos são destaques, devido a suas propriedades. Na Tabela 1 são mostradas as principais composições de óleos essenciais obtidas a partir de diferentes espécies de plantas.

Tabela 1 - Principal composição dos óleos essenciais obtidos por diferentes espécies de plantas (matéria-prima)

Matéria prima	Composição	Referência
Cravo-da-índia	Eugenol; β -cariofileno; α -copaeno; α -humuleno; 2-metoxi-4-(2-propenil) acetato; δ -cadineno; óxido de cariofileno; aromadendrene.	(CANBAY-GOKCE <i>et al.</i> , 2019)
Citronela	Citronelal; geraniol; citronelol; acetato de geranila; citral.	(WANG <i>et al.</i> , 2019)
Manjeriço	linalol; eugenol; 1,8 cineol; epi- α -cadinol; α -trans-bergamoteno.	(MILENKOVIĆ <i>et al.</i> , 2019)
Tomilho	Carvacrol; γ -terpineno; p -cimeno; β -cariofileno; timol.	(GEDIKOĞLU; SÖKMEN; ÇIVIT, 2019)
Hortelã	Carvona; limoneno; 8-cineol; germacreno D; β -carilofileno; β -pineno; α -pineno.	(CHRYSARGYRIS <i>et al.</i> , 2019)
Alecrim	α -pineno; 1,8-cineol; cânfora; canfeno; limoneno; borneol; verbenona; acetato de bornila; α -terpineol.	(VERMA <i>et al.</i> , 2019)
Canela	Cinamaldeído; α -pineno; canfeno; p -cimeno; limonene; 1,8-cineol; linalol; α -copaeno	(MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2019)
Coentro	Hidroxilamina; 1,2,4-trimetoxi-5-1-propenil; ácido dodecanóico; éster 1,2,3-propanetriílico.	(ARASU <i>et al.</i> , 2019)

Fonte: Elaborada pela autora

1.3.2 Aplicações dos óleos essenciais

A produção mundial no mercado de óleo essencial foi de 226.800 toneladas em 2018 (IRSHAD *et al.*, 2019, sendo que a demanda desses óleos nas indústrias cresce a cada ano. Estima-se que a Taxa Anual de Crescimento Composta (*Compound Annual Growth Rate - CAGR*) seja de 8,6% entre 2019 e 2025 (IRSHAD *et al.*, 2019). A comercialização de OEs é muito importante para economia de vários países como, Brasil e Índia, uma vez que podem ser aplicados para diversas finalidades como em indústrias de cosméticos (SARKIC; STAPPEN, 2018), alimentícia (CHRYSARGYRIS *et al.*, 2019) e farmacêutica (TARIQ *et al.*, 2019).

Na indústria de cosméticos, os OEs oferecem uma variedade de benefícios devido às suas atividades biológicas tais como analgésica, antimicrobiana, antisséptica, dentre outras. Porém, a principal razão para a utilização dos EOs em cosméticos é o aroma agradável. Os cosméticos são constituídos por surfactantes, ácidos graxos, entre outros compostos, que

contém um perfume desagradável. Assim, os óleos essenciais também são adicionados para mascarar o cheiro desses constituintes (SARKIC; STAPPEN, 2018). Os terpenos e fenil propanóides presentes nos OEs tem uma grande aplicação na área biomédica, sendo amplamente utilizados na indústria farmacêutica por conterem ação contra patógenos de origem viral e bacteriana (TARIQ *et al.*, 2019).

Os OEs também são aplicados como agentes aromatizantes em alimentos como iogurte, temperos, entre outros. Também são incorporados aos materiais de embalagem para controlar o crescimento de patógenos de origem alimentar (FALCÓ *et al.*, 2019). Na Tabela 2 são mostradas diferentes aplicações dos EOs.

Tabela 2 - Propriedades biológicas de óleos essenciais e aplicações

Matéria-prima	Espécie Vegetal	Aplicações do óleo essencial	Referência
Laranja	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Agente Antimicrobiano contra a bactéria <i>Salmonella</i> .	(TOSUN <i>et al.</i> , 2018)
Menta japonesa	<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes	O óleo tem um efeito inibidor contra o ácido isovalérico, que é um dos principais compostos responsáveis pelo mau odor humano.	(MYODA <i>et al.</i> , 2018)
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt e <i>C. nardus</i> (L.) Rendle	Propriedade antimicrobiana, é utilizado para limpeza de dentaduras.	(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2016)
Limão	<i>Citrus limon</i> (L.) N.L. Burn	Efeitos antioxidantes e redutores do colesterol.	(LEE <i>et al.</i> , 2018)
Eucalipto (tipo cineol)	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill., <i>E. polybractea</i> R.T. Baker e <i>Eucalyptus spp.</i>	Impede o desenvolvimento de biofilme formado pelas cepas resistentes à metilicina.	(MERGHNI <i>et al.</i> , 2018)
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. e L. M. Perry	Utilizado como agente quimiopreventivo na medicina, tem propriedades antivirais, antibacterianas e anticâncer e atividade larvicida contra <i>Aedes aegypti</i>	(NIRMALA <i>et al.</i> , 2019)(SOONWERA ; PHASOMKUSOLSI L, 2016)

Tabela 2 (continuação)

Matéria-prima	Espécie Vegetal	Aplicações do óleo essencial	Referência
Lavanda	<i>Lavandula intermedia</i> Emeric <i>ex Loise</i>	Reduz a ansiedade perioperatória e pode ser considerada prospectivamente em estudos futuros por suas características sedativas em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos sob anestesia local.	(KARAN, 2019)
Cânfora	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl.	Induzem alterações bioquímicas por causar uma redução drástica no total de proteínas e carboidratos nas larvas tratadas nas larvas de <i>Spodoptera littoralis</i> (Boisduval)	(ALI; IBRAHIM, 2018)
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> L	Potente anticonvulsivante ativador de canal de potássio	(MANVILLE; ABBOTT, 2019)

Fonte: Elaborada pela autora

1.3.3 Óleo essencial do cravo-da-índia

O óleo essencial do cravo-da-índia (OEC) (*Syzygium aromaticum* L.) é extraído dos brotos da planta e tornou-se um produto muito procurado devido às suas atividades biológicas, muito utilizada na aromaterapia e na medicina (JENTZSCH; GUALPA; RAMOS, 2018). Além de sua atividade antioxidante e antimicrobiana, como comentado anteriormente, apresenta propriedades ovicida e larvicida. Sua instabilidade diante das condições ambientais (luz, oxigênio e temperatura) e volatilidade, limita o seu uso industrial (PANDIYAN; MATHEW; MUNUSAMY, 2019; RADÜNZ *et al.*, 2019).

Segundo Canbay-gokce *et al.*, (2019), o principal OEC é majoritariamente constituído pelo eugenol ($\approx 80-60\%$), seguido do β -cariofileno ($\approx 7-4\%$). Na Tabela 3 são mostrados outros componentes do OEC, que foram detectados por meio da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) por dois diferentes autores.

Tabela 3 - Composição do óleo essencial do cravo-da-índia (OEC)

Composto	%*	%**
Eugenol	81,84	62,88
α-Copaeno	0,14	0,17
β-Cariofileno	6,94	15,60
α-Humuleno	0,74	1,86
Acetato de 2- metox-4-alil fenila aceteuogenol	9,88	18,69
δ-Cadineno	0,17	0,10
Oxido de cariofileno	0,20	0,34
Aromadendrene	0,09	-

Fonte: Adaptado de *CANBAY-GOKCE *et al.*, 2019, ** OLIVEIRA *et al.*, 2016

As diferentes porcentagens, encontradas na literatura dos compostos majoritários e minoritários, podem estar relacionadas ao método de extração, ou outros fatores como a variedade de planta, variação genética, oferta de fertilizantes, localização geográfica e a forma de armazenamento. Tais condições podem provocar alterações relevantes na composição química dos OEs (RADÜNZ *et al.*, 2019).

1.3.4 Métodos de extração dos óleos essenciais

Diferentes métodos são utilizados para extração de óleos essenciais de plantas e discutidos nos próximos itens.

1.3.4.1 Extração por arraste vapor

A extração por arraste a vapor é um processo de obtenção de OEs que proporciona as vantagens de altos rendimento e qualidade. A extração pode ser realizada por vapor seco ou vapor úmido, isto é, o material pode ficar imerso ou não na água. Na destilação por arraste a vapor é utilizado um prato perfurado, no qual é colocado o material que será destilado. A caldeira é preenchida com água pela parte superior e colocada em ebulição, o vapor gerado arrasta os compostos voláteis por meio de um condutor, que passa por um condensador. Então, a mistura de óleo-água é condensada, necessitando fazer posteriormente uma separação. Porém, a desvantagem ao utilizar esse sistema para obtenção de óleos essenciais consiste na possível decomposição de componentes do óleo (JÚNIOR *et al.*, 2006).

1.3.4.2 Extração por hidrodestilação

A hidrodestilação é um processo bastante simples, além de ser economicamente viável e possibilitar o isolamento de compostos a partir de vegetais utilizando temperaturas inferiores a 100 °C. Também é muito usado no isolamento de produtos naturais, que não são solúveis em meio aquoso e com elevada temperatura de ebulição. O processo consiste em embeber o material vegetal em água, mantendo a temperatura de ebulição da água, evitando o superaquecimento do óleo. O vapor arrasta os compostos voláteis, que são condensados formando o hidrolato (mistura de uma fase orgânica e uma fase aquosa). Utilizando um solvente orgânico extrator, como por exemplo o diclorometano, é possível extrair o óleo essencial. Na sequência, o solvente orgânico é eliminado resultando na obtenção do óleo essencial extraído. A principal desvantagem da hidrodestilação, comparado com outros métodos, é o tempo de extração (AZIZ *et al.*, 2018).

1.3.4.3 Extração por solvente

O processo de extração por solvente é utilizado em materiais florais, considerados materiais frágeis ou delicados que não podem ser extraídos usando calor ou vapor fornecido. Esse processo tem como objetivo extrair materiais lipofílicos da planta por meio de solventes como etanol, metanol dentre outros. Primeiramente, ocorre a mistura do material vegetal com o solvente. Após a obtenção do óleo, aquece-se a mistura para eliminação do solvente. O sistema é então filtrado, obtendo-se a resina, o óleo essencial e sua fragrância. Esse filtrado é colocado em mistura com o álcool (etanol, metanol) e, logo em seguida, é destilado em temperatura branda para a obtenção do óleo essencial. Comparando os métodos de extração, esse é o mais complexo e tem o custo mais elevado e é mais demorado (AZIZ *et al.*, 2018).

1.3.4.4 Extração por micro-ondas

O processo de extração por micro-ondas é um método de extração sem solvente orgânico à pressão atmosférica. É baseado no efeito da irradiação por micro-ondas da água e moléculas *in situ*, aquecendo o material da planta imediatamente. O aumento da temperatura e pressão dentro das células da planta causa ruptura física e hidrodifusão de água e metabólitos de dentro para fora da célula. Suas principais vantagens são: alta qualidade dos compostos

obtidos e a rapidez da extração. Comparado à extração por hidrodestilação, mantem o ambiente seguro e limpo (BENMOUSSA *et al.*, 2019).

1.3.4.5 Extração Supercrítica

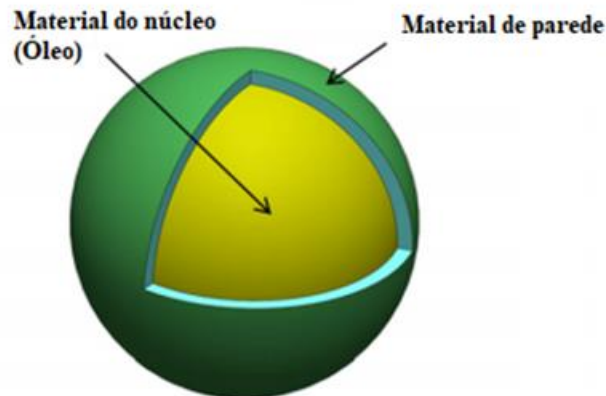
A extração supercrítica (ESC) é um processo muito utilizado para obtenção de compostos voláteis de matéria prima vegetal. O processo é caracterizado por utilizar solvente como CO₂ em estado supercrítico, ou seja, temperaturas e pressões acima do seu do seu ponto crítico, para solubilizar produtos desejados. Quando comparado com os demais processos de extração, a ESC proporciona vantagens, como facilidade de separar o soluto do solvente, além de ser possível realizar o controle da temperatura e pressão do sistema, permitindo assim, um produto completamente isento de solvente (MEIRELES, 2006). Como desvantagem, apresenta baixa eficiência de extração de óleos essenciais comparado com a hidrodestilação, além de ter um alto custo (AZIZ *et al.*, 2018).

1.3.5 Microencapsulação dos óleos essenciais

A redução das atividades apresentadas pelos OEs pode estar associada à sua volatilização e decomposição quando exposto ao ar, calor ou irradiação. Dessa forma, técnicas de proteção do óleo são essenciais para manter as suas características químicas, sendo a microencapsulação uma alternativa atraente (RADÜNZ *et al.*, 2019). A microencapsulação pode ser pensada como uma técnica em que partículas, ou gotículas, de um determinado composto de interesse são envolvidas em uma matriz encapsulante, que é usada para proteger o material encapsulado, permitindo a sua liberação em diferentes momentos, regiões e condições (MÁRQUEZ-GÓMEZ *et al.*, 2018).

O encapsulamento físico de óleos sensíveis em pequenas cápsulas pode impedir a oxidação provocada pela umidade, íons metálicos, oxigênio e calor. Resumidamente, a microencapsulação pode ser definida como um processo de construção de uma barreira funcional entre o núcleo e o material de parede para evitar reações químicas e físicas e manter as propriedades biológicas, funcionais e físico-químicas dos materiais do núcleo (BAKRY *et al.*, 2016). Na Figura 4 é mostrado um desenho esquemático de um material de parede encapsulando um óleo essencial.

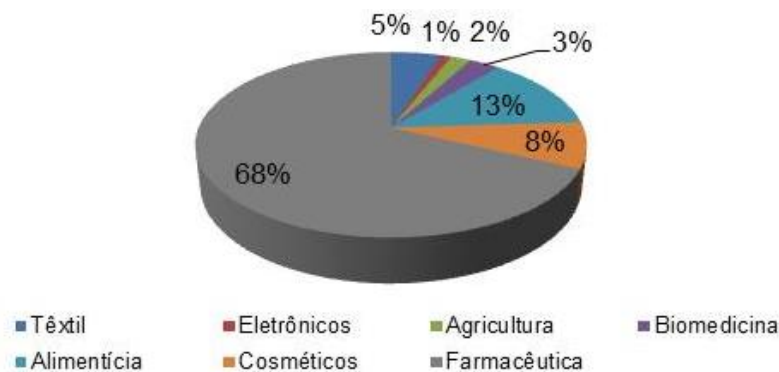
Figura 4 - Esquema de uma cápsula obtida pela técnica de microencapsulação



Fonte: Adaptado (BAKRY *et al.*, 2016)

Há várias aplicações no meio industrial da técnica de microencapsulação, a qual é utilizada para proteger fragrâncias (BAKRY *et al.*, 2016; CARVALHO; ESTEVINHO; SANTOS, 2016), ou outros agentes ativos (BEZERRA *et al.*, 2016), da oxidação que podem ser causadas pela luz, calor, umidade e contato com as demais substâncias. Pode ser utilizada também para evitar a evaporação do composto de interesse, controlando a sua taxa de liberação. Segundo Martins *et al.*, (2014) existem algumas possibilidades de usar a microencapsulação como técnica para obter produtos com alto valor agregado. Pode-se observar na Figura 5 o campo de aplicação da técnica de encapsulação, sendo os setores da indústria farmacêutica (68%) e alimentícia (13%), as áreas que mais possuem trabalhos publicados com o tema de microencapsulação e aplicação referente a abril de 2014 (MARTINS *et al.*, 2014).

Figura 5 - Campos de aplicação da técnica de microencapsulação em diferentes setores



Fonte: Adaptado (MARTINS *et al.*, 2014)

1.3.5.1 Técnicas de microencapsulação utilizadas em óleos essenciais

Escolher o método mais adequado para o encapsulamento depende do material a ser encapsulado, do tipo de núcleo, para qual finalidade será aplicada a microcápsula, o tamanho, as propriedades físicas e químicas do óleo e da cápsula. Além disso, depende também do mecanismo de liberação que será necessário e principalmente do custo.

Os principais processos de encapsulamento são: Secagem por aspersão (*Spray Drying*), Revestimento de suspensão a ar (*Air Suspension Coating*), Extrusão centrífuga (*Centrifugal Extrusion*), *Pan Coating*, Evaporação de solvente/extração de solvente (*Solvent Evaporation/Solvent Extraction*), Expansão de fluido supercrítico (*Supercritical Fluid Expansion*), Coacervação (*Coacervation*) e microfluídica (*microfluidic*). Na Tabela 4 estão apresentados os principais métodos utilizados e suas características (LUCY *et al.*, 2014).

Tabela 4 - Os principais processos utilizados para obtenção de microencapsulação e as suas principais características

Técnica de microencapsulação	Princípios da técnica	Referência
“ Spray drying ”	Tem como princípio a maximização da área de troca de calor e massa durante a secagem. Esse método permite a remoção de umidade.	(VEIGA <i>et al.</i> , 2019)
“ Air Suspension Coating ”	Tem como princípio a cobertura com suspensão a ar de partículas por arranjos ou por fusão; oferece melhor controle e adaptabilidade.	(AYOUB <i>et al.</i> , 2019)
“ Centrifugal extrusion ”	Os líquidos são encapsulados usando uma cabeça de extrusão rotativa contendo bocais concêntricos. Um jato de líquido central é envolvido por uma bainha de solução de parede ou fundido. À medida que o jato se move pelo ar, ele se quebra, em gotículas de núcleo, cada uma revestida com a solução de parede.	(VASHIST; CHANDEL, 2018)
“ Pan coating ”	O processo de revestimento de <i>pan</i> , as partículas do agente a encapsular sofrem rotação e, sobre elas, o material de revestimento é aplicado lentamente. À medida que o agente encapsulante é lançado, uma corrente de ar quente passa, por meio do material encapsulado a fim de remover o solvente da solução e do agente encapsulante.	(VASHIST; CHANDEL, 2018)

Tabela 4- (Continuação)

Técnica de microencapsulação	Princípios da técnica	Referência
“Solvent Evaporation/Solvent Extraction”	Nesse método, o revestimento da microcápsula é primeiro disperso em um solvente volátil e é imiscível com a líquida fase volátil de fabricação. O material do núcleo a ser microencapsulado é dissolvido na solução do polímero de revestimento.	(NAG; AND BIPUL NATH, 2018)
“Supercritical Fluid Expansion”	Os processos supercríticos de CO ₂ permitem o projeto e o controle do tamanho das partículas. Essa técnica consiste basicamente num processo de extração supercrítica de um substrato de interesse, seguido de uma rápida despressurização através de um bocal.	(VASHIST; CHANDEL, 2018)
“Coacervation”	Coacervação complexa é um processo de separação de fases causado pela interação de dois colóides com carga oposta, geralmente proteínas e polissacarídeos.	(ALI; IBRAHIM, 2018)
“Mirofluidic”	O dispositivo produz emulsões com baixa dispersão de tamanhos.	(BOGGIONE <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Elaborada pela autora

1.3.5.2 Materiais utilizados em encapsulamento de óleos essenciais

Há muitas variedades de materiais que foram estudados para a sua adequação como material encapsulante. A escolha desse material é importante para a característica das microcápsulas obtidas, sendo necessário seguir alguns critérios como, por exemplo, o material tem que ser quimicamente compatível e não reativo aos materiais do núcleo. Além disso, deve proteger o núcleo contra condições adversas do ambiente. Na Tabela 5 são apresentados alguns materiais utilizados para encapsular óleos essenciais.

Tabela 5 - Principais materiais utilizados em encapsulamento de óleos essenciais

Material da carcaça	Material do núcleo: óleo essencial	Referências
Goma Arábica Maltodextrina	Sucupira (<i>Pterodon emarginatus</i>), Lima (<i>Citrus aurantiifolia</i>)	(ALVES <i>et al.</i> , 2014) ; (BRINGAS-LANTIGUA; VALDÉS; PINO, 2012)
Alginato	Cravo-da-índia (<i>Eugenia caryophyllata</i>); Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>); Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	(EMAD <i>et al.</i> , 1992)
Quitosana	Citronela (<i>Cymbopogon winterianus</i>)	(EMAD <i>et al.</i> , 1992)
Gelatina	Manjerição sagrado (Manjerição sagrado)	(SUTAPHANIT; CHITPRASERT, 2014)
Etilcelulose	Alecrim (<i>Salvia rosmarinus</i>), Lavanda (<i>Lavandula</i>)	(VONCINA <i>et al.</i> , 2009); (WANG, 2008)
Formaldeído de melamina	Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>); Lavanda (<i>Lavandula hybrida</i>); Salva (<i>Salvia officinalis</i>)	BOH; KNEZ, 2006)
PMMA (polimetacrilato de metila)	Jasmim (<i>Jasminum</i>)	(BOH; KNEZ, 2006)

Fonte: Adaptado (CARVALHO; ESTEVINHO; SANTOS, 2016)

1.3.5.3 Alginato

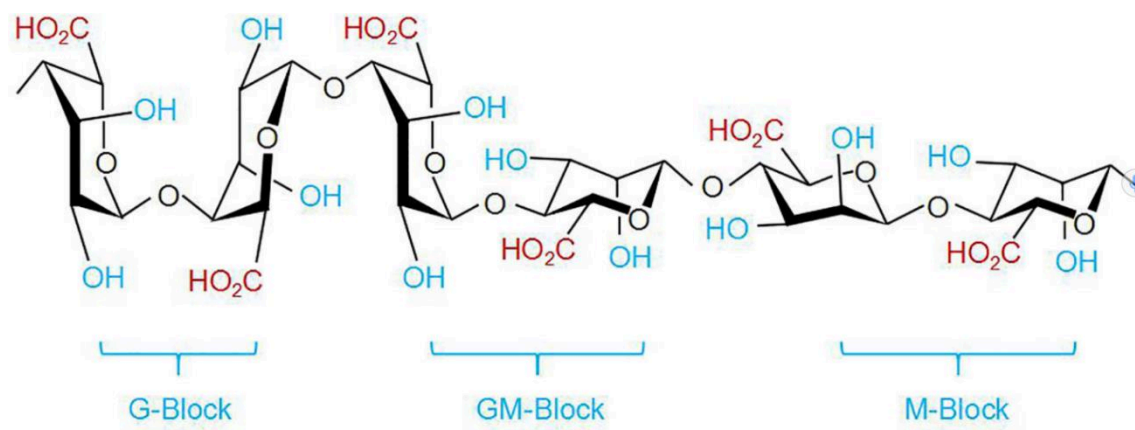
O alginato é um polissacarídeo aniônico natural derivado de algas marinhas marrons, como *Macrocystis pyrifera*, *Sargassum* spp e *Ascophyllum nodosum* (QUESADA *et al.*, 2020). Esse polissacarídeo também pode ser produzido por fermentação microbiana utilizando bactérias especializadas. O alginato pode ser encontrado na forma de alginato de magnésio, potássio e sódio, desempenhando o papel de fortalecimento da parede celular das algas. Porém, o composto obtido pela extração a partir das algas marinhas é o alginato de sódio (GUO *et al.*, 2020).

O alginato de sódio foi descoberto em 1883 e, desde então, foram realizadas várias pesquisas sobre o seu valor prático. A produção em grande escala começou nos Estados Unidos em 1929. Em 1983, o alginato de sódio foi aprovado para ser adicionado aos alimentos, usado para revestir vegetais e frutas, como produto de proteção viral e microbiana (PUSCASELU *et al.*, 2020). Em indústrias farmacêuticas o alginato é usado em produtos que precisarão ser

solubilizados em água quente antes do consumo, como misturas de ingredientes para tratar resfriados, coquetéis de vitaminas, dores de cabeça, tonturas ou como sistemas de liberação de medicamentos antirrefluxo (GUO *et al.*, 2020; UYEN *et al.*, 2020).

Quimicamente, o alginato de sódio é classificado como um sal de sódio do ácido algínico, que é solúvel em água. Esse ácido é formado por ácido α -gulurônico (G) e β -D-manurônico (M), como mostrado na Figura 6 (AGÜERO *et al.*, 2017). Esses ácidos G e M se agrupam em blocos sequenciais do tipo GG-block, GM-block e MM-block, devido às ligações entre os carbonos C-1 e C-4 (GUO *et al.*, 2020). O estágio de crescimento da alga, a partir da qual foi extraído o alginato, interfere nas proporções e distribuições dos dois ácidos da cadeia polimérica, podendo acontecer variações nas porcentagens desses ácidos (OZEL *et al.*, 2020).

Figura 6 - Estrutura de subunidades do ácido algínico.

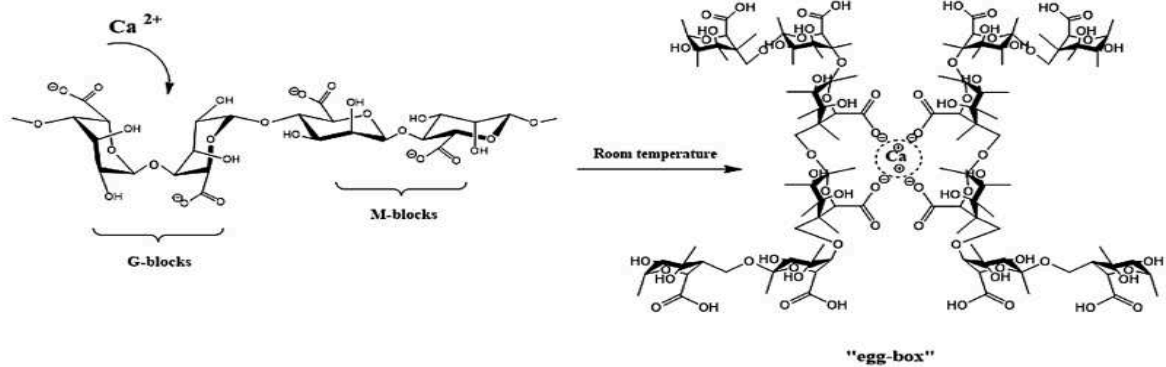


Fonte: (GUO *et al.*, 2020)

O alginato pode formar um gel ao interagir com cátions divalentes como, por exemplo, o Ca^{+2} . As cadeias G alinham-se lado a lado, tomando a forma similar de um diamante, que tem o tamanho ideal para acomodar um íon divalente, como mostrado na Figura (7).

A explicação da gelificação do alginato, proposta por Grant e colaboradores (1973), ocorre devido à modificação do alginato ao entrar em contato com íons divalentes. Ocorre, portanto, a formação de uma rede tridimensional, possibilitando que outros íons divalentes sejam complexados, tornando a estrutura cada vez mais complexa. Esse modelo foi denominado por Grant como modelo “casca de ovo” (GRANT *et al.*, 1973).

Figura 7- Representação esquemática da estrutura da “caixa de ovo” pela complexação de íons Ca^{2+} com íons carboxilato de unidades G de alginato



. Fonte : (AGÜERO *et al.*, 2017)

Para a obtenção do gel, primeiramente deve-se hidratar o alginato em pó formando uma solução de concentração desejada. Quando essa solução entra em contato com a solução catiônica, os blocos MG, MM e GG formarão a rede tridimensional, mencionada anteriormente. Pode-se perceber na Figura 7 a importância das subunidades G na formação do gel do alginato. Uma maior fração dos blocos GG possibilita a formação de um gel mais resistente, enquanto maiores frações dos blocos MM possibilita a formação de géis mais frágeis (ROMERO *et al.*, 2000).

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2. Metodologia

2.1 Padrões e reagentes

Os reagentes utilizados na realização deste trabalho são listados na Tabela 6.

Tabela 6 - Reagentes utilizados no trabalho

Reagente	Marca	Pureza / %
Diclorometano	Química Moderna	99,5 %
Alginato de Sódio PA	Dinâmica	-
Cloreto de Cálcio	Isofar	-
Dodecil Sulfato de sódio (SDS)	Merck	-
Acetonitrila	Merck	99,5%
Hidróxido de Sódio	Proquimios	-

Fonte: Elaborada pela autora

2.2 Preparo de soluções de alginato de sódio e cloreto de cálcio e SDS

Na realização desse trabalho, foram preparadas três soluções, a solução de alginato de sódio, dodecil sulfato de sódio (SDS) e cloreto de cálcio. Para a solução de alginato $0,0694 \text{ mol L}^{-1}$, pesou-se 7,500 g de alginato em um béquer, sendo acrescentado 500 mL de água destilada. O sistema foi submetido à agitação a 580 rpm e aquecimento na temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h até a dissolução completa do alginato. Para a solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) $0,100 \text{ mol L}^{-1}$, pesou-se 1,400 g em um béquer, que foi dissolvido em água destilada e transferido para um balão volumétrico de 50,00 mL, e que teve o volume completado com água destilada até a marca de aferição. Para solução de cloreto de cálcio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pesou-se 7,350 g de cloreto de cálcio, dissolvido em água e transferido para um balão volumétrico de 500,00 mL, sendo o volume completado com água destilada até a marca de aferição.

2.3 Obtenção do material vegetal

O material vegetal utilizado para obtenção do óleo essencial foi o cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), obtido em mercado local na cidade de Viçosa, Minas Gerais. O material foi utilizado sem pré-tratamento prévio.

2.4 Obtenção do óleo essencial do cravo-da-índia

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação. Foram pesados 30,000 g do cravo-da-índia em um balão de fundo redondo e adicionados 400 mL de água tipo 1, purificada por sistema Milli-Q (Millipore Corporation). O sistema foi aquecido à temperatura de 100 °C, sem agitação, durante 3 horas. O vapor gerado foi condensado e recolhido, obtendo-se um hidrolato. O hidrolato (250 mL) foi submetido à três sequências de extração líquido-líquido, utilizando o diclorometano (100 mL). Finalmente, o solvente foi removido sob pressão reduzida em rota evaporador por 40 min à temperatura de 22 °C, sendo esta temperatura selecionada para que não ocorresse a degradação do óleo essencial. O óleo essencial foi recolhido e armazenado em frasco de vidro, envolvido por papel alumínio e armazenado sob refrigeração a 4 °C.

2.4.1 Caracterização do óleo essencial do cravo da índia

2.4.1.1 Rendimento da extração do óleo essencial

O rendimento do óleo foi calculado pela razão da quantidade de óleo que se obteve em relação a massa de botões florais usada, conforme mostrado na Equação 1 (KAPADIYA; DESAI, 2017).

$$\text{Rendimento} = \frac{M_o}{M_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde, M_o é a massa de óleo essencial obtida e M_i é a massa de botões florais utilizada.

2.4.1.2 Densidade do óleo essencial do cravo da índia

A densidade do óleo foi calculada de acordo com a Equação 2. Foi utilizado uma pipeta volumétrica calibrada, ajustada em um volume de 10 µL. Na sequência, o óleo pipetado foi pesado. O procedimento foi realizado em quadruplicata.

$$\varphi = \frac{m}{v} \quad (\text{Eq.2})$$

Em que, φ é a densidade, m é a massa e v é o volume.

2.4.1.3 Caracterização do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

O óleo essencial foi caracterizado por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MSQP2010 Ultra espectrômetro, Shimadzu, Kyoto, Japão). As condições empregadas foram: He como gás de arraste, com fluxo de 1,80 mL min⁻¹; temperatura do injetor foi de 220 °C na razão split de 1:10; coluna capilar de sílica fundida Ultra Alloy® (30 m x 0,25 mm) contendo fase estacionária Rtx®-5MS (0,25 µm de espessura do filme). A temperatura do forno teve a seguinte programação: temperatura inicial de 40 °C, permanecendo por 2 minutos, em seguida a temperatura foi aumentada com uma taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹ até atingir 240 °C, em que permaneceu por 5 minutos. O tempo total de análise foi de 73,67 min. A temperatura utilizada no detector MS foi de 240 °C. O preparo da amostra consistiu na mistura de 10 mg de óleo em 1 mL de hexano 95%.

A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com os disponíveis no banco de dados da espectroteca (Wiley 7, NIST 05 e NIST 05s). O percentual relativo de cada composto, identificado no óleo essencial, foi calculado por meio da razão entre a área integralizada de cada pico e a área total de todos os constituintes da amostra como mostra na Equação 3. Os compostos com área relativa acima de 1% foram identificados. As análises foram feitas no departamento de Química da UFV, Viçosa, MG.

$$Pr = A_i/A_t \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que, *Pr* é o percentual relativo, *A_i* é área integrada de cada pico e *A_t* é a área total de todos os constituintes.

2.4.1.4 Caracterização do óleo essencial por análise termogravimétrica

A estabilidade térmica do óleo essencial do cravo da Índia foi avaliada pelo método termogravimétrico usando um TGA, modelo DTG- 60H (Shimadzu, Japão). Para isso, 3,1904 g do óleo foi aquecido em cadinho de alumina a 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio com um fluxo de 50 mL min⁻¹. As análises foram feitas no Departamento de Engenharia de Alimentos no laboratório LABEM da UFV, Viçosa, MG.

2.4.1.5 Caracterização do óleo essencial por Espectroscopia de Absorção Molecular UV/Vis

Para as análises realizadas empregado espectroscopia UV/Vis foi utilizado um espectrofotômetro modelo UV 1800 (Shimadzu, Japão) no modo de varredura na faixa de 190 a 800 nm. Utilizou-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Para o preparo das amostras, 0,198g do óleo essencial foram diluídos em 10,00 mL de acetonitrila. A análise foi realizada no Departamento de Engenharia de Alimentos no laboratório LABEM da UFV, Viçosa, MG.

2.4.1.6 Caracterização do óleo essencial por ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H foram obtidos em espectrômetro Varian Mercury 300 MHz, sendo utilizado CDCl_3 deuterado como solvente e acetonitrila como padrão interno. O pulso de 45° (pw45) foi determinado para todas as amostras usando a sequência de calibração implementada pelo programa VnmrJ4.2 da Agilent Technologies. O tempo de relaxação longitudinal (T1) foi determinado experimentalmente pela sequência de inversão recuperação para todos os hidrogênios da amostra. O mais longo T1 obtido para validação e para quantificação das amostras de óleos essenciais foi de 4 s. O número de transientes (nt) de 16, tempo de aquisição (aq) de 4,55 s, tempo de atraso (d1) foi de 20 s. A análise foi realizada no Departamento de Química da UFV, Viçosa, MG. As análises foram realizadas em triplicata (CERCEAU *et al.*, 2020).

Foi utilizada a Eq. 4 para calcular o teor de eugenol no óleo essencial do cravo da Índia.

$$m_{eug} = \frac{I_{eug}}{I_{acet}} \times \frac{N_{acet}}{N_{eug}} \times \frac{M_{eug}}{M_{acet}} \times m_{acet} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que:

m_{eug} = quantidade de eugenol encontrada (g); I_{eug} = integral do sinal do eugenol no espectro de RMN de ^1H ; I_{acet} = integral do sinal do padrão interno acetonitrila (1000); N_{acet} = número de hidrogênios da acetonitrila (3); N_{eug} = número de hidrogênios do sinal do eugenol escolhido (3); M_{eug} = massa molar do eugenol (164,204 g/mol); M_{acet} = massa molar da acetonitrila (41,053 g/mol); m_{acet} = massa de acetonitrila (0,04293 g).

2.4 Ensaios preliminares de obtenção de cápsulas

Foram obtidas cápsulas em que se misturaram 10,00 mL da solução de alginato $0,0694 \text{ mol L}^{-1}$ sob o qual foram adicionados adicionado 3,300 g de óleo essencial e 1,00 mL da solução de SDS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O sistema foi submetido à agitação por 10 minutos a 580 rpm. Posteriormente, a mistura foi gotejada manualmente sob uma solução de cloreto de cálcio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com auxílio de uma pipeta Pasteur. Todo o procedimento foi realizado à temperatura ambiente ($\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

2.5 Obtenção de cápsulas contendo óleo essencial do cravo-da-índia por microfluídica

2.5.1. Montagem do dispositivo microfluídico para o encapsulamento do óleo essencial

O dispositivo foi montado com um compressor de ar (Olidef cz, Brasil), uma bomba de seringa (PHD2000, Harvard Apparatus, EUA), uma agulha (0,80 mm x 25 mm - 21 G, Becton Dickinson, Brasil) e um capilar de 1 mm (1B100-6). O fluxo de ar e a vazão do líquido foram regulados pelo compressor de ar e pela bomba de seringa, respectivamente, de acordo com a metodologia adaptada de Batalha, (2017).

2.5.2. Preparo de soluções para obtenção das cápsulas por microfluídica

Para obtenção das cápsulas por microfluídica, a solução de alginato $0,0694 \text{ mol L}^{-1}$ foi transferida para um béquer contendo o óleo essencial do cravo da índia, cujas massas são descritas na Tabela 7, seguida da adição de um determinado volume de solução do surfactante SDS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, também descrita na Tabela 7. O sistema foi mantido sob a agitação por mais 10 min a 580 rpm. A solução de cloreto de cálcio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi reservada para coleta das cápsulas no processo de encapsulação por microfluídica, cujos volumes utilizados são descritos na Tabela 7. Foram preparadas quatro amostras distintas, que foram intituladas OEC-CapA, OEC-CapB, OEC-CapC e OEC-CapD. As quantidades utilizadas em cada amostra são descritas na Tabela 7. Posteriormente essas amostras foram congeladas a $-27,1 \text{ }^\circ\text{C}$ e liofilizadas.

Tabela 7 - Quantidades utilizadas na obtenção de microcápsulas de óleo essencial de cravo-da-índia por microfluídica

Amostra	OEC* (g)	Alginato (mL)^a	SDS** (mL)^b	CaCl₂ (mL)^c
OEC-CapA	0,0751	20,00	4,00	20,00
OEC-CapB	0,0751	20,00	4,00	40,00
OEC-CapC	0,0375	10,00	1,00	40,00
OEC-CapD	0,1500	10,00	1,00	40,00

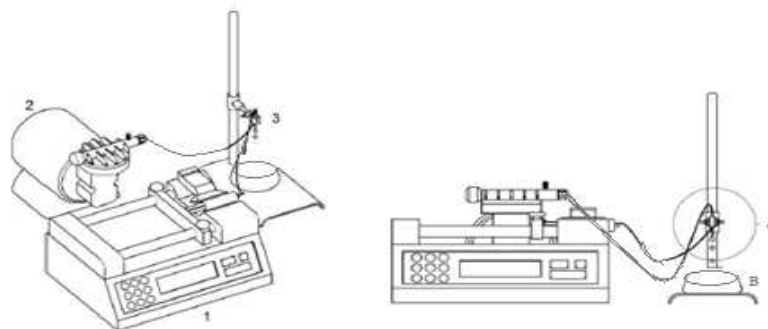
OEC*= óleo essencial do cravo da índia; SDS**= dodecil sulfato de sódio; solução de alginato (0,0150 g/mL); solução de SDS (0,0288 g/mL); solução CaCl₂ (0,0147 g/mL).

Fonte: Elaborada pela autora.

2.5.3. Obtenção das cápsulas por microfluídica

Para obtenção das cápsulas foi necessário a montagem do sistema como esquematizado na Figura 8. Em uma seringa de 10 mL foi adicionada a mistura contendo a solução de alginato, óleo essencial e SDS 0,1 mol L⁻¹ (as quantidades utilizadas de cada componente estão descritas na Tabela 7). Essa seringa foi acoplada à bomba de seringa (1), que foi configurada para ser operada na vazão de 1000 µL/min. A bomba de seringa e a bomba de ar (2) foram ligadas simultaneamente. A solução passou pela agulha e pelo micro capilar de 1 mm (A), formando as pequenas gotas que foram recolhidas no recipiente contendo a solução de cloreto de cálcio (0,1 mol L⁻¹) descrita também Tabela 7, formando as cápsulas.

Figura 8 - Esquema do sistema de encapsulamento montado com bomba de seringa (1), compressor de ar (2) e agulha (3). Detalhe do bocal de saída da solução pela agulha e capilar (A). Recipiente com cloreto de cálcio (B).



Fonte: (BATALHA,2017)

2.5.4. Eficiência do encapsulamento

Para avaliar a eficiência do processo de encapsulamento, preparou-se uma curva analítica. Preparou-se uma solução estoque de OEC, em que se pesou a massa de óleo 3,3 mg, que foi dissolvida em 25,00 mL de acetonitrila. A partir dessa solução, foram preparadas as soluções de trabalho em diferentes concentrações, variando de 6,60 a 46,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções foram realizadas em triplicata. Para cada concentração foi realizada uma análise utilizando a Espectroscopia no UV-Vis, monitorando-se o comprimento de onda de 280 nm. Todas as leituras foram preparadas em triplicata. A partir dos dados de absorvância para cada concentração, fez-se a regressão linear dos pontos obtidos pelo método dos Mínimos Quadrados. A qualidade do ajuste foi avaliada pelo coeficiente de determinação (*MENDES et al.*, 2017).

As cápsulas obtidas OEC-CapA, OEC-CapB, OEC-CapC, OEC-CapD foram armazenadas em freezer $-27,1^{\circ}\text{C}$ por 72 h. Na sequência elas foram liofilizadas em um equipamento Liofilizador L101 por 48 h a temperatura de -51°C e pressão 80 de μHg . Para o cálculo da eficiência, todo o material liofilizado foi pesado. A partir dessa massa, pesou-se 0,0400 g da cápsula em um béquer, sob a qual, foram adicionados 2,00 mL de uma solução de NaOH ($0,0400\text{ g mL}^{-1}$) e 18,00 mL de acetonitrila. O sistema foi submetido a agitação por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, uma alíquota dessa solução foi analisada por meio da Espectroscopia UV-Vis, monitorando-se o comprimento de onda de 280 nm. A absorvância dessa análise foi utilizada para o cálculo de concentração final do óleo essencial encapsulado, utilizando a curva analítica, possibilitando determinar a quantidade de óleo essencial encapsulada. A eficiência de encapsulação foi calculada por meio da Equação Eq.5.

$$E\% = \frac{\text{massa de óleo encapsulado}}{\text{massa de óleo inicial}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

2.5.5. Microscopia óptica das cápsulas

A morfologia e o tamanho das cápsulas foram determinados utilizando microscópio óptico (Carl Zeiss, Alemanha). Foram analisadas 30 esferas de cada lote. A análise foi realizada no Departamento de Física da UFV, Viçosa, MG.

2.5.6. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos usando um sistema MicroRaman – InVia Renishaw e o laser utilizado possuía comprimento de onda de 785 nm. Em uma resolução espectral de 4 cm^{-1} , foram obtidas relações sinal-ruído com 730 e 3000 cm^{-1} varreduras de interferograma acumuladas, utilizando potências a laser de 3 mW para o óleo de cravo e seus formulados. Cada amostra foi adicionada em uma cubeta de quartzo de 10 mm de comprimento de caminho. Os espectros coletados foram tratados por meio do programa Origin® versão 8.0.

A mistura contendo o óleo essencial 0,1500g e 10 mL da solução de alginato 0,0694 foram analisados sem preparo da amostra. As cápsulas obtidas nos ensaios preliminares (item 2.4), no entanto, tiveram a sua superfície lavada com água tipo 1 e analisada. Posteriormente, a cápsula foi cortada com um bisturi para que fosse analisado o material contido em seu interior. As cápsulas obtidas por microfluídica, foram pressionadas utilizando duas lamínulas para serem pressionadas e posteriormente analisadas. As análises foram realizadas no Departamento de Física da UFV, Viçosa, MG.

2.5.7. Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram adquiridos empregando-se a técnica reflectância total atenuada (ATR), em equipamento Varian 660-IR com acessório GladiATR com cristal de diamante, no modo transmitância com varredura de 400 a 4000 cm^{-1} . As análises foram realizadas no Departamento de Química da UFV, Viçosa, MG.

2.6 Liberação controlada das cápsulas de alginato de cálcio contendo óleo essencial do cravo da índia.

A liberação do óleo essencial do cravo da índia foi realizada seguindo a metodologia adaptada de Babaoglu *et al.* (2016). Foram dispersos 100 mg de cápsulas liofilizadas contendo o óleo essencial do cravo da índia em 1,00 mL de solução de NaOH (0,04 g mL^{-1}) em um Erlenmeyer, e adicionados 200,00 mL de acetonitrila. A solução permaneceu sob constante agitação 580 rpm, sendo retiradas alíquotas em diferentes intervalos de tempo para realização da leitura no Espectrofotômetro UV-vis. Os tempos selecionados foram 0,25; 0,5; 1,1; 5,2; 2,5;

3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 8,5; 10; 13; 16; 24; 32; 40; 48; 56; 72 e 88 horas de experimento.

Todas as alíquotas retiradas para análise foram devolvidas ao Erlenmeyer para dar sequência ao experimento. Os dados foram coletados e as concentrações de OEC nas alíquotas foram calculadas por meio da Equação 6. Em que 0,013 e 17,61 representam, respectivamente, os coeficientes linear e angular da curva de analítica obtida conforme descrito no item 2.3.4, e Abs a absorbância da alíquota. A partir desse resultado, a massa expressa em porcentagem de óleo essencial removida acumulada foi calculada de acordo com a Equação 7.

$$C = \frac{Abs - 0,013}{17,061} \quad \text{Eq. 6}$$

$$\% = \left(\frac{C * Ve}{MOC} \right) * 100 \quad \text{Eq. 7}$$

Em que:

%= massa de óleo essencial removida acumulada (%); C= concentração de OEC nas alíquotas, resultado da Equação 6; Ve= volume total de (acetonitrila e NaOH) colocado no Erlenmeyer; MOC= massa de óleo essencial do cravo da índia em 100 mg de cápsulas liofilizadas.

A partir dos dados obtidos, construiu-se um gráfico de porcentagem de óleo essencial liberado em função do tempo utilizando o software Origin.Pro 8.5.

2.7 Aplicação do óleo essencial do cravo da índia e das cápsulas obtidas por microfluídica em larvas *Aedes aegypti*

Os ensaios larvicidas foram realizados de acordo com a metodologia descritas por Souza *et al.*, 2017. Para os ensaios realizados com o óleo essencial do cravo da índia, foi utilizado o solvente dimetilsulfóxido DMSO 1% (v/v). Foram preparadas soluções de óleo essencial em DMSO nas concentrações de 10 a 130 $\mu\text{g/mL}$, com intervalo de 10 em 10 $\mu\text{g/mL}$. As larvas foram cedidas pelo laboratório de biologia da UFV. Utilizaram-se 25 larvas em cada solução, as quais foram separadas com auxílio de uma pipeta Pasteur. Em seguida, as larvas foram distribuídas em frascos de vidro contendo 50,00 mL das diluições. Após 24 horas foi realizada a contagem das larvas mortas de cada pote. Os dados foram anotados e posteriormente tratados com auxílio do software Minitab®, versão 17.

Para os ensaios feitos com a cápsula obtidas por microfluídica, as cápsulas liofilizadas foram pesadas nos frascos de vidro em que o experimento foi realizado. Levando em consideração a eficiência das cápsulas, calculou-se as concentrações do OEC em $\mu\text{g/mL}$. As concentrações foram de 80 a 180 $\mu\text{g/mL}$, com intervalo de 10 em 10 $\mu\text{g/mL}$. Para cada concentração foram realizadas quatro repetições. Em seguida, foram adicionadas 50,00 mL de água Milli-Q em cada frasco. Utilizaram-se 25 larvas em cada solução, as quais foram separadas com auxílio de uma pipeta Pasteur. Em seguida, as larvas foram distribuídas nos frascos de vidro. Após 24 horas foi realizada a contagem das larvas mortas de cada frasco.

CAPÍTULO 3

**CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDA
POR EXTRAÇÃO DO CRAVO DA ÍNDIA**

3 Caracterização do óleo essencial

3.1. Avaliação das características físico-químicas do óleo essencial

O óleo essencial investigado neste trabalho foi obtido a partir de extração de botões florais do cravo-da-índia por processo de hidrodestilação. Inicialmente, o rendimento da extração foi calculado de acordo com a Eq. 1, obtendo-se um rendimento de 10,6 % m/m. Esse resultado foi semelhante ao obtido por outros autores como Khalil *et al.*(2017) e Kapadiya e Desai (2017), que obtiveram 11,35 e 11,5 % m/m, respectivamente.

De modo geral, a qualidade dos óleos essenciais depende de parâmetros como, densidade, pureza, entre outros. Dessa forma, foram determinados alguns parâmetros físico-químicos do óleo de cravo da índia, que são mostrados na Tabela 8. O óleo obtido apresentou-se transparente, com odor característico e densidade de $1,150 \text{ g mL}^{-1} \pm 0,001$. Resultados semelhantes foram obtidos por Gomes *et al.* (2018).

Tabela 8 - Características físico-químicos do óleo essencial do cravo-da-índia

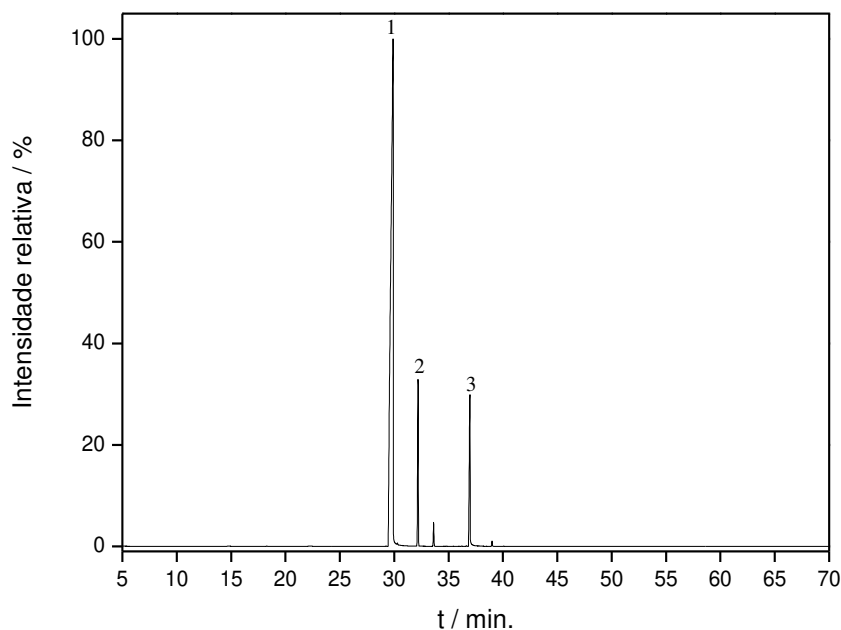
Parâmetros Físico-químicos	Cravo da índia
Densidade (g mL^{-1})	1,15 \pm 0,001
Coloração	Transparente
Aparência	Límpido
Odor	Característico

Fonte: Elaborada pela autora

3.2. Identificação dos constituintes químicos presente no óleo essencial obtido a partir dos botões florais do cravo da índia.

O óleo essencial também foi caracterizado por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas, sendo o cromatograma mostrado na Figura 9. Pode-se observar a presença de três picos, com tempos de retenção de 29,9; 32,2 e 37,0 minutos, que foram atribuídos aos compostos (1) eugenol, (2) β -cariofileno e (3) acetato de eugenol, com base na comparação da biblioteca de espectros de massa disponível no equipamento utilizado para a análise de CG/MS. Foram observadas mais de 95 % de similaridade.

Figura 9 - Cromatograma obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) correspondente à análise do óleo essencial do cravo-da-índia. Legenda: (1) eugenol, (2) β -cariofileno e (3) acetato de eugenol.



Fonte: Elaborada pela autora.

O teor relativo de cada componente, calculado de acordo com a Eq.3, é mostrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Composição química do óleo essencial do cravo-da-índia determinada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas

n*	Composto	Tempo de retenção (min)	A_{rel} (%)
1	eugenol	29,9	83
2	β -cariofileno	32,2	8
3	acetato de eugenol	37,0	9
Total identificado			100

*n= número do composto no cromatograma da Figura 8.

Fonte: Elaborada pela autora.

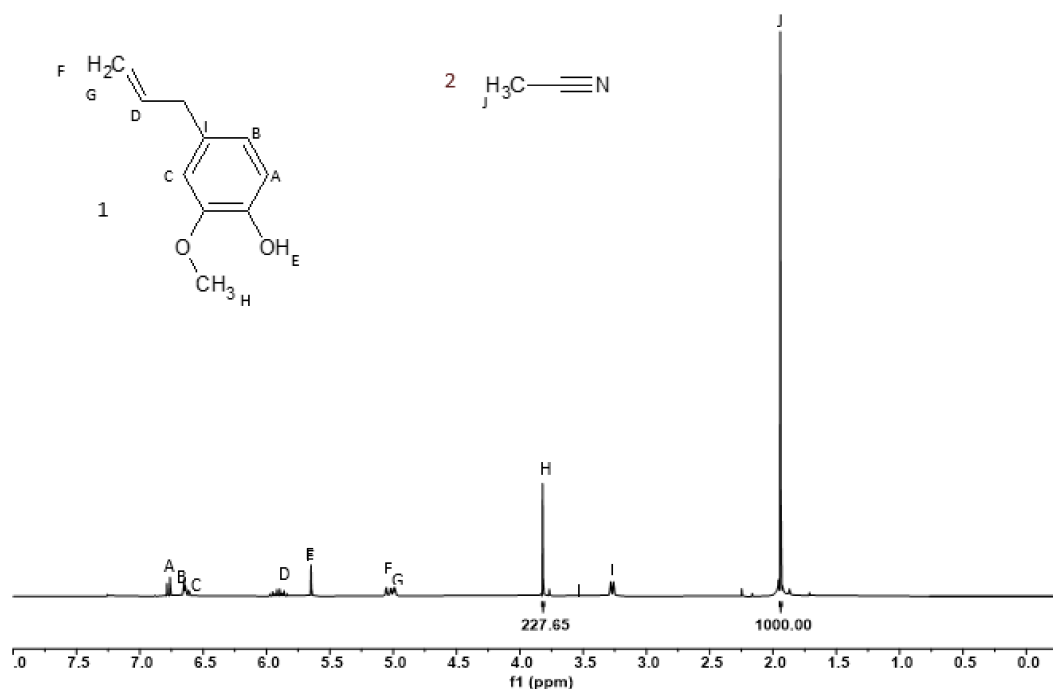
O teor para cada componente foi de 83% para eugenol, 8% para β -cariofileno e 9% para acetato de eugenol. Os componentes com a área relativa inferior a 1% foram desconsiderados.

Resultados similares também foram descritos por Tunç e Koca (2019) e Hadidi *et al.*(2020), que obtiveram 82,69 e 11,11% para o eugenol e o acetato de eugenol, respectivamente.

3.3 Análise do Óleo essencial do cravo da índia por RMN

O óleo essencial obtido também foi caracterizado por Ressonância Magnética nuclear de hidrogênio (^1H - RMN) e o espectro é mostrado na Figura 10. São apresentados 9 sinais referentes aos hidrogênios quimicamente diferentes (A-K), cujos sinais são coerentes com os hidrogênios destacados no inserto da Figura 10.

Figura 10 - Espectro ^1H - RMN do óleo essencial do cravo da índia. Inseto: (1): fórmula estrutural do eugenol (2): fórmula estrutural da acetonitrila



Fonte: Elaborada pela autora.

A quantificação do eugenol foi feita por padronização interna, adicionando-se acetonitrila à amostra. Pode-se observar a presença de um sinal em δ 3,806 ppm com integração de 227,65. Esse sinal é atribuído aos hidrogênios da metila do grupo éter da molécula do eugenol, como mostrado no inserto da Figura 10, representado pela letra H. O sinal próximo a δ 2 ppm, com integração de 1000 é atribuído ao hidrogênio da acetonitrila, representado pela

letra J (Insero da Figura 10). O teor de eugenol foi calculado de acordo com a Eq. 4, e os resultados são mostrados na Tabela 9. Pode-se observar que o óleo essencial obtido apresentou um teor de eugenol de $88,4 \pm 0,1 \%$. Este teor está de acordo com o que foi quantificado por cromatografia a gás, cujo teor obtido foi de 83%. Kempri *et al.*(2020) e Fajrin, Mariliana e Handayani. (2018) encontraram, respectivamente, picos em 3,8 e 3,90 ppm nos espectros RMN, o que corrobora as atribuições realizadas para os hidrogênios do eugenol.

Tabela 10 - Dados obtidos da análise RMN

Ieug*	Massa da amostra (g)	Massa de eugenol da amostra (g)	Teor de eugenol na	Teor médio de eugenol (%)	DP** (%)
227,86	0,04421	0,0391	88,5		
227,14	0,04421	0,0390	88,3		
227,65	0,04421	0,0391	88,5	88,4	0,1

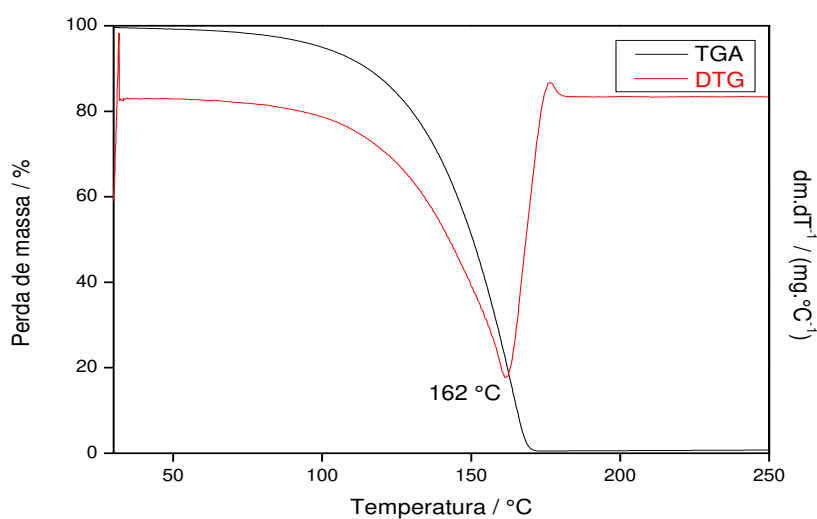
*Ieug = integral do sinal do eugenol no espectro de H1-RMN ** DP: Desvio padrão

Fonte: Elaborada pela autora

3.4 Análise termogravimétrica do óleo essencial do cravo da Índia

A estabilidade térmica do óleo essencial foi determinada por análise termogravimétrica (TGA), cujo resultado é mostrado na Figura 11.

Figura 11 - Termograma do óleo essencial do cravo da Índia



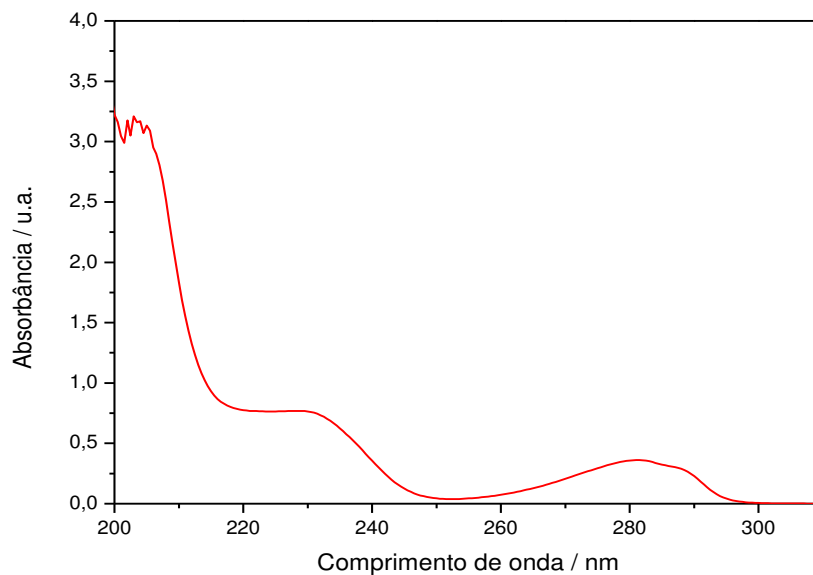
Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se ver que o óleo essencial do cravo da Índia tem uma perda de massa que se inicia em temperaturas abaixo de 100 °C. Porém, observa-se um evento térmico em 162 °C na curva DTGA, que resulta em perda de massa de 99,5%. Resultados semelhantes foram obtidos por Fang *et al.* (2020), que observaram uma decomposição do óleo em 160 °C.

3.5. Análise de absorção no UV/Vis do óleo essencial do cravo da Índia

Outra caracterização consistiu na análise do óleo essencial por espectroscopia no UV-Vis, e o espectro é mostrado na Figura 12. Pode-se observar três bandas características na região do ultravioleta, uma próxima a 210 nm, outra em 230 nm e uma terceira em 280 nm, que podem ser atribuídas a C=C do eugenol, grupo éster do acetato de eugenol e à função fenol do eugenol, respectivamente (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2020). Como observado anteriormente, o óleo essencial do cravo da Índia tem como seus compostos majoritários o eugenol seguido do acetato de eugenol. Antunes *et al.* (2021) e Jacumazo *et al.* (2020) obtiveram espectros semelhantes para óleo essencial do cravo da Índia, com um pico em 280 nm.

Figura 12 - Espectroscopia UV- vis do óleo essencial do cravo da Índia. Solução preparada pela mistura do óleo em acetonitrila (0,0198 mg mL⁻¹).

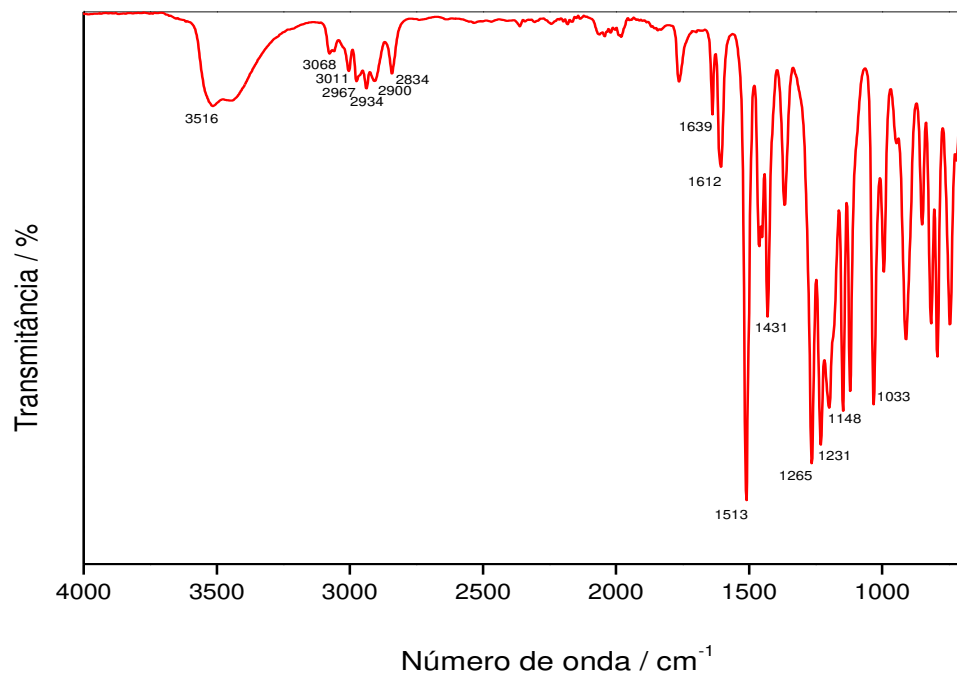


Fonte: Elaborada pela autora.

3.6. Caracterização por Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) do óleo essencial do cravo da índia

O espectro no infravermelho do óleo essencial do cravo-da-índia (Figura 13) apresentou os bandas característicos do eugenol, seu composto majoritário como foi mostrado nos itens 3.2 e 3.3. A banda em 3516 cm^{-1} corresponde ao estiramento do grupo hidroxila (O-H) ligado ao benzeno (GONZALEZ-RIVERA *et al.*, 2021). O estiramento da ligação C-H do anel benzenico aparece em 3068 cm^{-1} . As bandas em 2900 e 2834 cm^{-1} podem ser atribuídas aos estiramentos -CH, relacionada ao alongamento -CH alifático nos grupos -CH₂ e -CH₃ (BOYÁS *et al.*, 2017). A banda em 1612 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento C=C de compostos aromáticos (MAHAPATRA; ROY, 2014). As bandas em 1513 e 1431 cm^{-1} indicam o anel fenil (KIM *et al.*, 2016). A banda de 1639 cm^{-1} é atribuída à ligação C=C; 1265 cm^{-1} à C-O do grupo fenólico; 1231 cm^{-1} à deformação do éter C-O-C; e em 1148 e 1033 cm^{-1} à ligação C-O éter aromático (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2020).

Figura 13 - Espectro de infravermelho (FTIR) do óleo essencial do cravo-da-índia

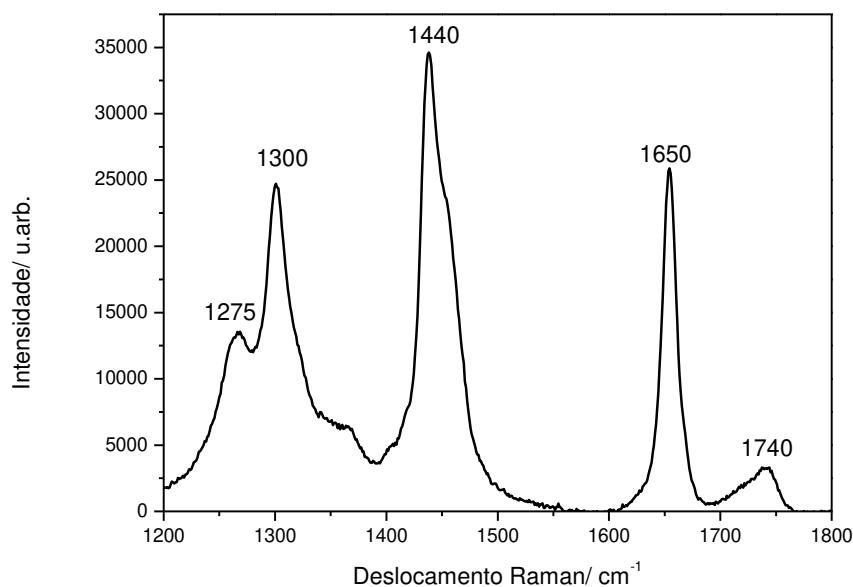


Fonte: Elaborada pela autora.

3.7. Raman do óleo essencial do cravo da índia

O óleo essencial foi caracterizado por Espectroscopia Raman e o resultado é mostrado na Figura 14. A banda em 1275 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento do grupo éter (Ar-O) (JENTZSCH *et al.*, 2018). A banda em 1300 cm^{-1} pode ser atribuída ao anel benzênico do eugenol (CHOWDHRY *et al.*, 2015). A banda em 1440 cm^{-1} pode ser atribuída aos modos de flexão dos grupos CH_3 e CH_2 (JENTZSCH *et al.*, 2018). O sinal intenso em 1650 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração de alongamento da ligação $\text{C}=\text{C}$ (CHOWDHRY *et al.*, 2015). No entanto, a banda mais fraca em 1740 cm^{-1} pode ser atribuída ao acetato de eugenol (Modo de alongamento $\text{C}=\text{O}$ de um éster) (JENTZSCH *et al.*, 2018).

Figura 14 – Espectro Raman do óleo essencial do cravo-da-índia



Fonte: Elaborada pela autora.

3.8. Conclusão parcial

Por meio dos resultados obtidos neste capítulo, pode-se concluir que o óleo essencial do cravo da índia foi extraído com sucesso a partir dos botões florais de cravo-da-índia. Os componentes principais presentes no óleo foram identificados como eugenol, acetato de eugenol e β -cariofileno, os quais foram identificados por diferentes técnicas analíticas. O teor

de eugenol foi confirmado por meio das análises de CG/MS e H^1 RMN. Por meio da análise termogravimétrica, foi observado uma estabilidade do OEC até $100^{\circ}C$. As técnicas Raman e FTIR possibilitaram identificar os grupos funcionais presentes nos compostos do OEC. A técnica UV-vis permitiu a observação de três bandas, sendo a mais sensível em 280 nm. Por análise físico-química foram observadas características como, odor e aparência que evidenciam a obtenção do OEC.

CAPÍTULO 4

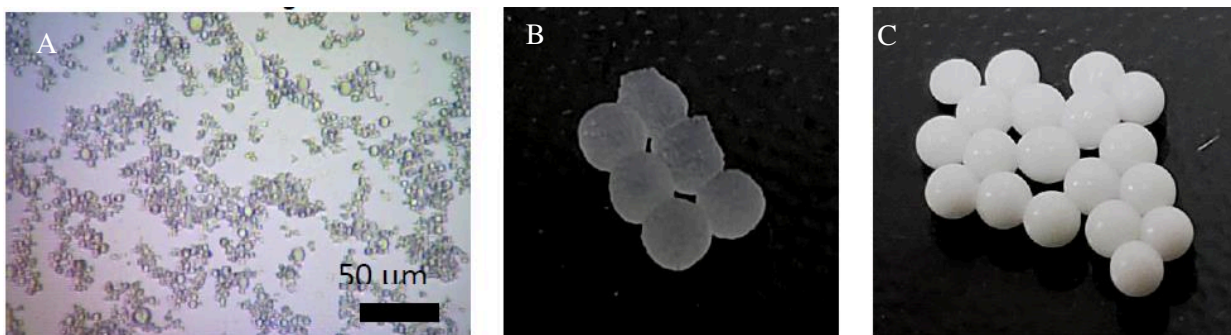
OBTENÇÃO DE CÁPSULAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA ÍNDIA POR MICROFLUÍDICA

4.1 Encapsulação do óleo essencial do cravo-da-índia

4.1.1 Ensaios preliminares

Ensaios prévios foram conduzidos para avaliar a possibilidade de encapsulação do óleo essencial de cravo da índia por microfluídica. Os resultados de microscopia óptica são mostrados na Figura 15. Pode-se ver na Figura 15(A) a imagem da emulsão constituída de alginato, óleo essencial e dodecil sulfato de sódio (SDS). A presença do surfactante permite que a emulsão fique dispersa de forma mais homogênea. Na Figura 15(B) são mostradas as cápsulas de alginato formadas por gelificação rápida na presença de íons cálcio, que são transparentes. O óleo encapsulado, obtida por gotejamento, é mostrado na Figura 15(C), em que se observa cápsulas brancas. É importante mencionar que a coloração da cápsula obtida, esbranquiçada, é decorrente do encapsulamento do óleo.

Figura 15 - Imagens dos materiais obtidos (A) Emulsão constituída de alginato, óleo essencial e dodecil sulfato de sódio (B) Cápsula de alginato, gelificada em solução de CaCl_2 , sem óleo essencial (C) óleo essencial encapsulado com alginato, gelificado em solução de CaCl_2



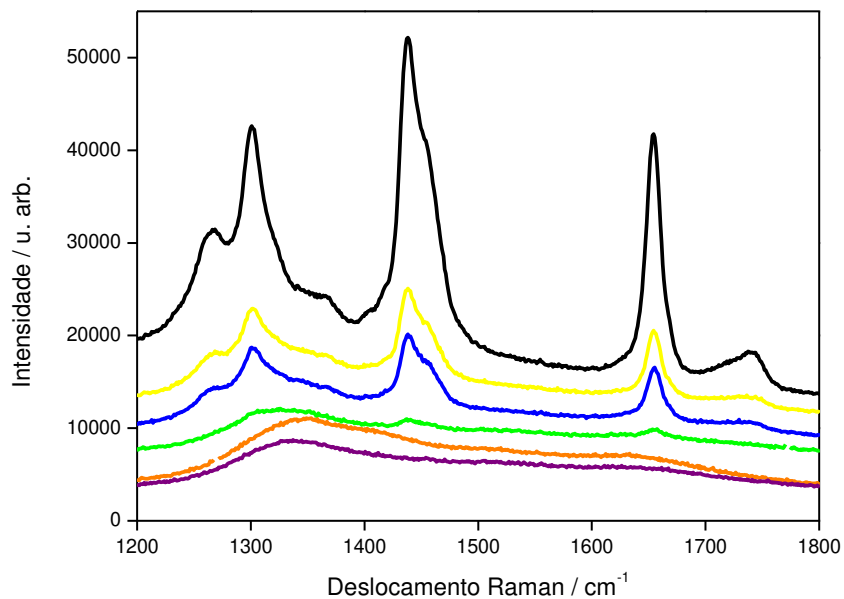
Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.1.1 Caracterização por Espectroscopia Raman das cápsulas dos ensaios preliminares

Os materiais sintetizados nos ensaios preliminares foram caracterizados por Espectroscopia Raman e os resultados são mostrados na Figura 16. O espectro do óleo essencial apresentou cinco picos que foram devidamente identificados no Capítulo 3, item 3.7. Os picos identificados foram 1275 cm^{-1} (éter (Ar-O)), 1300 cm^{-1} (atribuído a benzeno do eugenol), 1440 cm^{-1} (atribuído a grupos CH_3 e CH_2), 1650 cm^{-1} (atribuído a $\text{C}=\text{C}$) e 1740 cm^{-1} (atribuído a modo de alongamento $\text{C}=\text{O}$ de um éster). Esses picos também foram identificados na

superfície das cápsulas, como pode ser observado na Figura 16, indicando que uma quantidade residual de OEC não é encapsulado. Para certificar que o óleo estava presente no interior da cápsula, foi utilizado um bisturi para cortar a cápsula ao meio e feita a análise em uma das bandas cortadas. Como pode ser observado na Figura 16 (curva em azul), a presença dos picos característicos do óleo essencial confirma a sua presença no interior da cápsula. Os picos característicos do OEC são observados na emulsão de alginato e óleo essencial (curva na cor verde), porém, com uma intensidade inferior. Os espectros do alginato de sódio (curva na cor roxa) e cápsulas sem óleo (curva na cor laranja), não apresentaram os picos característicos do OEC, confirmando o encapsulamento do óleo.

Figura 16 – Espectro Raman do óleo essencial do cravo-da-índia puro (preto), cápsula superfície (amarelo), interior da cápsula (azul), emulsão (alginato, óleo essencial e SDS) (verde), cápsula sem óleo essencial (laranja) e alginato de sódio (roxo).



Fonte: Elaborada pela autora.

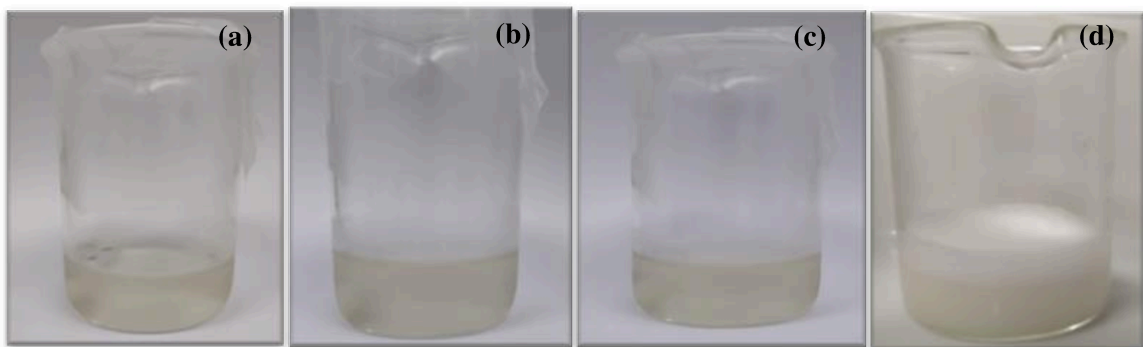
4.1.2 Cápsulas obtidas por microfluídica

Como mencionado no item 2.5.2, foram obtidas diferentes cápsulas empregando diferentes condições. A quantidade de OEC, solução de alginato, solução de SDS e de cloreto de cálcio foram respectivamente:

- OEC-CapA: 0,0751 g; 20 mL; 4,00 mL e 20,00 mL
- OEC-CapB: 0,0751 g; 20 mL; 4,00 mL e 40,00 mL
- OEC-CapC: 0,0375 g; 10 mL; 1,00 mL e 40,00 mL
- OEC-CapD: 0,150 g; 10 mL; 1,00 mL e 40,00 mL

As emulsões para obtenção das cápsulas por microfluídica são mostradas na Figura 17. Todas as emulsões ficaram com aspecto homogêneo inicialmente. Porém, no momento da agitação, a emulsão OEC-CapD apresentou bastante espuma devido ao surfactante e uma maior quantidade de óleo, após deixar a emulsão sem agitação, toda a espuma foi absorvida como mostra a Figura 18.

Figura 17 - Emulsão do óleo essencial, SDS e solução de alginato (a) OEC-CapA, (b) OEC-Cap B, (c) OEC-CapC e (d) OEC-CapD



Fonte: Elaborada pela autora.

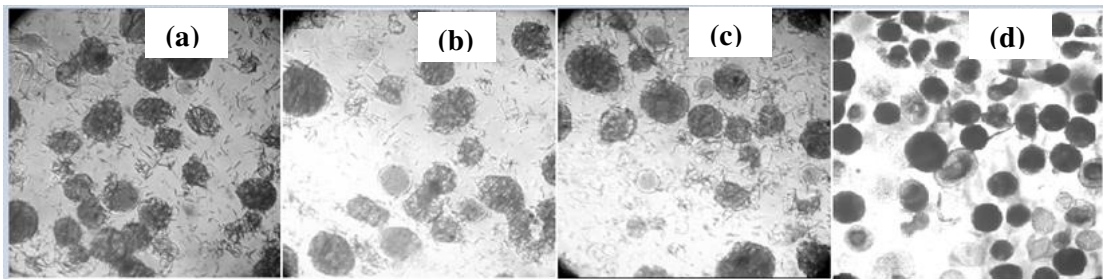
Figura 18 - Emulsão do óleo essencial, SDS e solução de alginato, amostra OEC-CapD sem agitação



Fonte: Elaborada pela autora.

As cápsulas OEC-CapA, OEC-Cap B, OEC-CapC e OEC-CapD produzidas por microfluídica também foram analisadas por Microscopia óptica (Figura 19), sendo possível observar a uniformidade das cápsulas, que apresentaram um tamanho de $197,2 \pm 0,04 \mu\text{m}$, $222,4 \pm 0,05 \mu\text{m}$, $227,6 \pm 0,08 \mu\text{m}$ e $164,7 \pm 0,03 \mu\text{m}$, para as amostras OEC-CapA, OEC-Cap B, OEC-CapC e OEC-CapD, respectivamente. Pode-se observar que OEC-CapD Figura 19(d) apresentou uma coloração mais intensa, possivelmente devido à maior quantidade de óleo presente.

Figura 19 - Imagem de Microscopia Óptica dos materiais obtidos por microfluídica(a) OEC-CapA, (b) OEC-Cap B, (c) OEC-CapC e (d) OEC-CapD



Fonte: Elaborada pela autora.

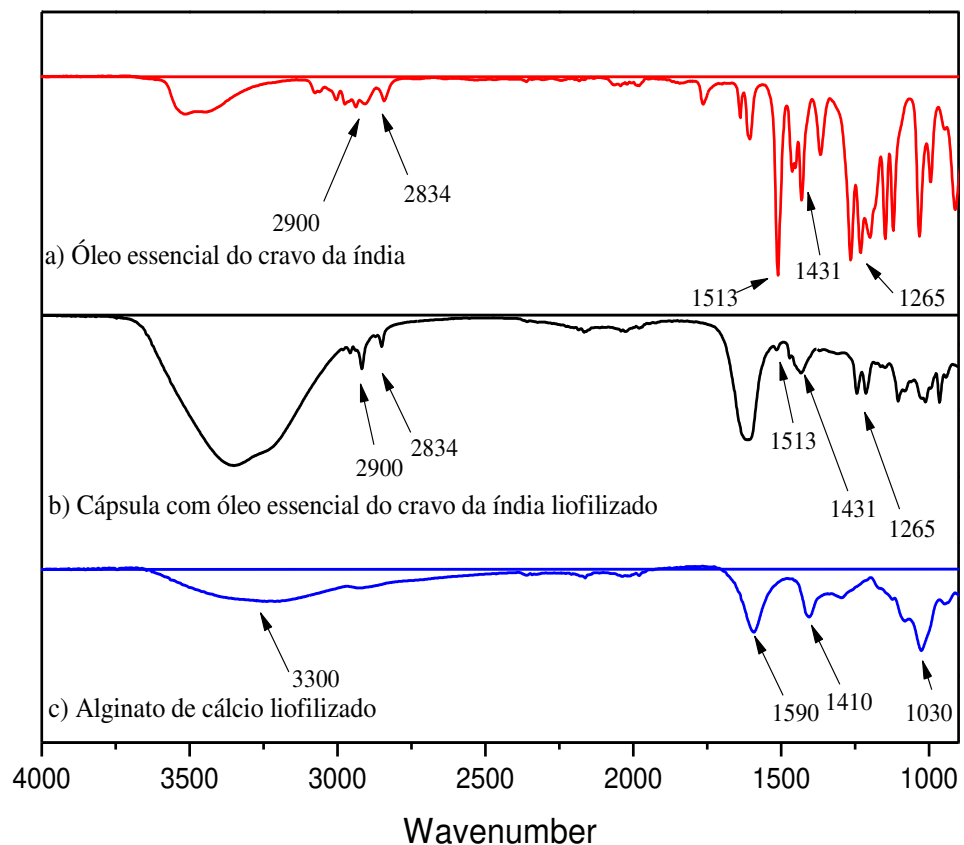
4.1.4 Caracterização por Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os materiais obtidos por microfluídica foram analisados por Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e os resultados são mostrados na Figura 20. Na Figura 20(a) é mostrado o espectro do óleo essencial, em que foram observadas bandas em 3516 cm^{-1} (atribuída O-H ligado ao benzeno), 3068 cm^{-1} (C-H do anel de benzeno), 2900 cm^{-1} (atribuído a $-\text{CH}_2$ e CH_3), 2834 cm^{-1} (atribuída ao $-\text{CH}_2$), 1612 cm^{-1} (atribuídos ao C=C), 1513 e 1431 cm^{-1} (atribuído ao anel fenil), a banda 1639 cm^{-1} (atribuído ao C=C), 1265 cm^{-1} (atribuído ao C-O do grupo fenólico), 1231 cm^{-1} (atribuída a deformação do éter C-O-C), 1148 cm^{-1} e 1033 cm^{-1} (atribuído ao éter aromático).

As cápsulas contendo óleo essencial do cravo-da-índia liofizadas, mostradas na Figura 20(b) apresentou picos característicos do óleo essencial do cravo da índia em 2900 cm^{-1} , 2834 cm^{-1} e 1265 cm^{-1} e uma banda fraca em 1513 cm^{-1} e uma banda em 1431 cm^{-1} . As cápsulas

alginate de cálcio liofilizado, entretanto, não apresentou os picos característicos do OEC, que estão presentes na cápsula contendo o OEC, como é mostrado na Figura 20 (c). O espectro obtido do alginato de cálcio foi semelhante ao encontrado por Martín *et al.* (2019), os quais encontraram uma banda larga em 3300 cm^{-1} , correspondendo à vibração de estiramento dos grupos hidroxila. Além disso, picos fortes em 1590 cm^{-1} e 1410 cm^{-1} atribuídos ao alongamento assimétrico e simétrico dos grupos carboxila. Um sinal em 1030 cm^{-1} foi atribuído à vibração simétricas e assimétricas de ligações C-O-C típicas dos anéis de polissacarídeo, também detectado (MARTÍN et al., 2019). Esses resultados sugerem que o óleo essencial do cravo-da-índia foi encapsulado.

Figura 20 - FTIR (a) do óleo essencial do cravo-da-índia (b) cápsulas de alginato de cálcio contendo óleo essencial do cravo da índia liofilizadas, (c) Alginato de cálcio liofilizado

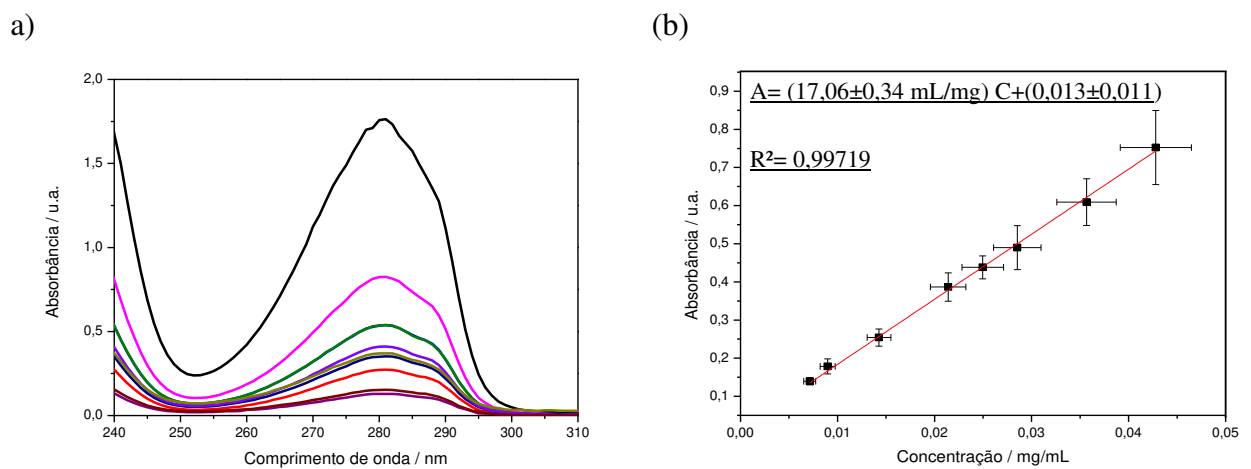


Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.5 Obtenção do rendimento de encapsulação por Espectroscopia UV-Vis

Para obtenção da eficiência de encapsulamento, primeiramente, foi construída uma curva analítica, cujos espectros obtidos para as diferentes concentrações do óleo essencial podem ser visualizados na Figura (21), com comprimento de onda máximo de absorção (λ máx) de 280 nm.

Figura 21 - (a) Espectros do óleo essencial do cravo-da-índia em diferentes concentrações (b) curva analítica obtida para o comprimento de onda 280 nm.



Fonte: Elaborada pela autora.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos dados obtidos, foi construída a curva analítica que é mostrada na Figura 21(b), que apresentou um bom ajuste linear, avaliado pelo coeficiente de determinação (0,997).

Para avaliar a eficiência de encapsulação do óleo essencial pela técnica de microfluídica, foram feitas leituras das alíquotas das soluções de óleo essencial liberado das cápsulas, cujo processo de liberação foi descrito no Capítulo 2, item 2.7. A partir das absorbâncias obtidas das soluções contendo o OEC liberado, foi possível determinar a concentração da solução de OEC encapsulado, que teve a sua massa determinada. A eficiência foi calculada de acordo com a Eq. 5. As eficiências obtidas foram de $(55,0 \pm 6,3) \%$, $(29,0 \pm 7,2) \%$, $(59,9\% \pm 11,2) \%$ e $(63,7 \pm 14,0) \%$ para as amostras OEC-CapA, OEC-CapB, OEC-CapC e OEC-CapD, respectivamente.

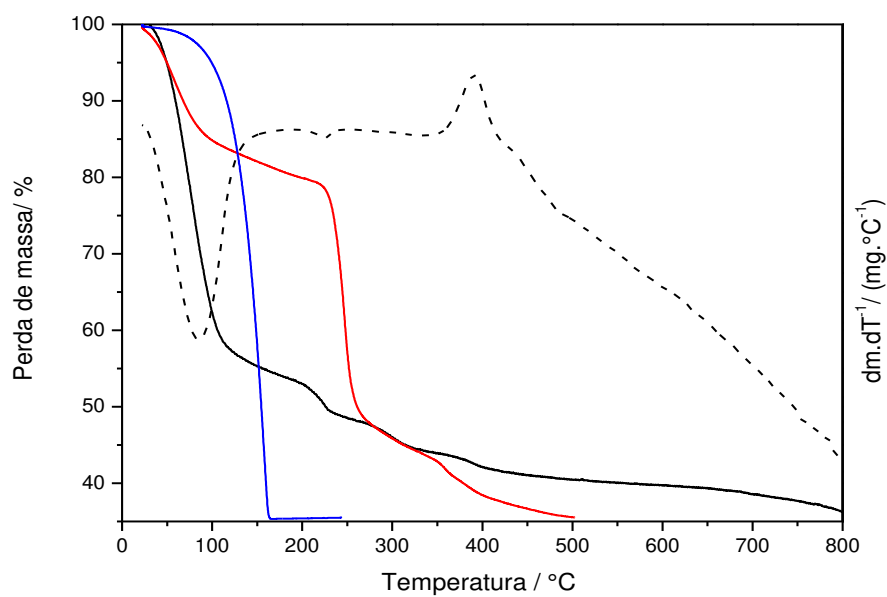
Diante dos tratamentos realizados, pode-se concluir que, exceto pelo material OEC-CapB, os rendimentos são praticamente os mesmos, indicando que não há modificações na

eficiência de encapsulamento quando se varia o volume de solução de cloreto de cálcio, usado no processo para gelificar as cápsulas e nem quando se varia a quantidade de óleo usada no processo. O baixo rendimento de OEC-CapB pode estar associado à etapa de produção das cápsulas, uma vez que as cápsulas foram inicialmente recolhidas em placa de Petri, e na sequência, foram transferidas para potes de plástico para serem colocadas no liofilizador. Foi utilizado a placa de Petri para facilitar na produção das cápsulas, uma vez que possui um diâmetro maior que os potes utilizados no liofilizador. Possivelmente, algumas cápsulas permaneceram na placa de Petri e, por isso, a eficiência foi menor.

4.1.6. Análise Termogravimétrica das cápsulas liofilizadas

Os materiais também foram caracterizados por análise termogravimétrica, cujos resultados são mostrados na Figura 22. Para a amostra da cápsula de alginato contendo o óleo essencial do cravo-da-índia, representado pela cor preta na Figura 22, nota-se três eventos térmicos significativos, que são confirmados pela curva de DTG (curva tracejada da Figura 22).

Figura 22 - TGA do alginato (vermelho), cápsula liofilizada contendo óleo essencial do cravo-da-índia (preto) e óleo essencial do cravo da índia (azul). DTG da cápsula contendo óleo essencial do cravo da índia liofilizada em linhas tracejadas (preto).



Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação à capsula contendo o óleo, há uma perda de massa de 40 % na temperatura em torno de 100 °C (primeiro evento térmico). Segundo Paula *et al.*, (2010), esse evento térmico pode ser atribuído à evaporação da água presente na amostra, devido ao caráter hidrofílico do alginato de cálcio. O segundo evento que ocorre em torno de 230 °C, com uma perda de massa de mais 26 % da amostra, pode ser atribuída à formação de carbonato de sódio (DIAS *et al.*, 2020). O terceiro evento, na temperatura em torno de 400 °C pode ser atribuída à carbonização das cadeias poliméricas do alginato e, portanto, a degradação da amostra (PAULA *et al.*, 2010).

O alginato puro, representado pela curva em vermelho na Figura 22, apresenta um evento térmico em torno de 100 °C, devido à perda de massa de aproximadamente 20 % da massa, também pode ser atribuída à umidade da amostra. Entre 250 e 500° ocorre a degradação total do alginato (DIAS *et al.*, 2020). A curva do óleo essencial representada pela cor azul, foi devidamente discutida no capítulo 4 item 3.4, na qual a amostra é degradada em 162 °C. Analisando a curva da cápsula contendo óleo essencial, a curva de alginato puro e o comportamento termogravimétrico do CaCl₂, discutido no trabalho de Barreneche *et al.* (2014), pode-se observar que o primeiro evento térmico da cápsula de alginato cálcio contendo OEC tem uma maior umidade em comparação ao alginato puro, devido à presença do CaCl₂ na amostra. Esse composto aumenta a capacidade de absorver água.

Sendo assim, pode-se concluir que a cápsula de alginato de cálcio contendo OEC, aumenta a estabilidade térmica do óleo essencial de 162 °C para 230 °C.

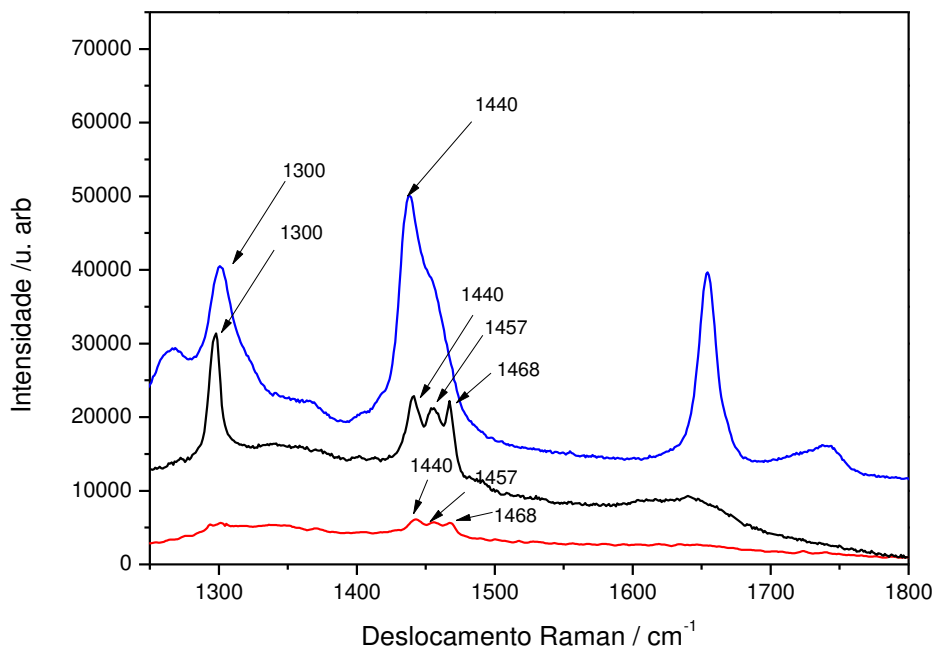
4.1.7 Espectroscopia Raman das cápsulas liofilizadas

As cápsulas de alginato de cálcio com e sem o OEC liofilizadas foram analisadas por Espectroscopia Raman e os resultados são mostrados na Figura 23. Nota-se que nas cápsulas de alginato de cálcio contendo óleo, representado pela cor preta, foram observados picos característicos do OEC (curva azul), que foram descritos no capítulo 3, item 3.7. Os picos encontrados foram 1300 cm⁻¹ (atribuído ao benzeno do eugenol) e 1440 cm⁻¹ (atribuído a grupos CH₃ e CH₂).

Observando o espectro do alginato de cálcio liofilizado sem o óleo (curva na cor vermelha), observa-se bandas de menor intensidade em 1440, 1457 e 1468 cm⁻¹, que apresenta deslocamento na mesma região do óleo. Essas bandas podem ser atribuídas à deformação

assimétrica do CH₂ e deformação assimétrica do CH₃ (JENTZSCH *et al.*, 2018). De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o que óleo essencial foi encapsulado.

Figura 23 - Espectroscopia Raman do óleo essencial do cravo-da-índia (azul), cápsula de alginato contendo óleo essencial do cravo da índia (preto) liofilizado e alginato de cálcio (vermelho)



Fonte: Elaborada pela autora.

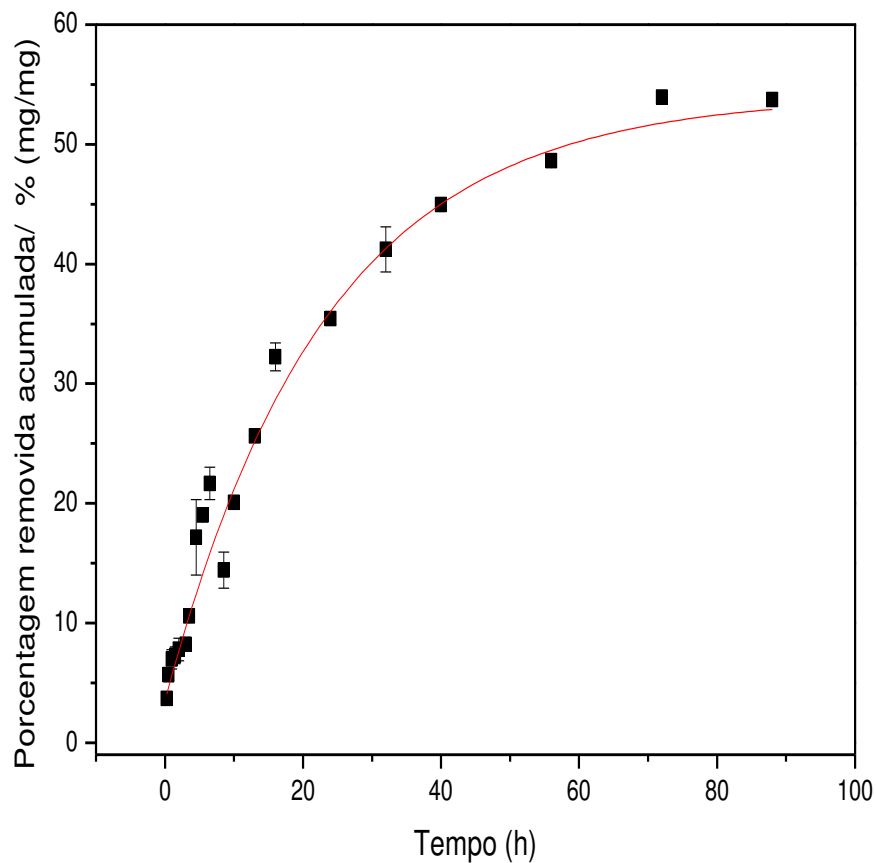
4.1.8 Liberação controlada

O perfil de liberação do óleo essencial do cravo da índia encapsulado em alginato de cálcio é mostrado na Figura 24. Nota-se que a primeira etapa de liberação apresenta uma pequena variação na liberação ($\cong 10\%$), que pode ser atribuída ao óleo, possivelmente, presente na superfície da cápsula. A partir daí, tem-se uma liberação gradual, cujos dados obtidos foram submetidos a ajuste não linear.

A liberação lenta do óleo essencial do cravo da índia presente nas cápsulas de alginato de cálcio após a primeira hora, podem ser explicadas pelas rígidas cadeias poliméricas que não permitem a difusão do óleo essencial do cravo da índia (DIMA *et al.*, 2015). A adição de NaOH

na amostra aumenta o pH do sistema, causando a precipitação do ácido algínico possibilitando a liberação controlada das cápsulas (CULPI *et al.*, 2010). Observa-se que o sistema em 72 h, representou um teor de 54% de óleo removido da cápsula, mantendo-se constante em 88 horas. Os baixos valores dos erros apresentados na Figura 24, mostram que as porcentagens de OEC liberadas no experimento, feito em duplicata, foram semelhantes, podendo constatar que as cápsulas são homogêneas.

Figura 24 - Liberação controlada das cápsulas de alginato de cálcio contendo óleo essencial do cravo-da-índia



Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 11, pode-se observar a equação e o coeficiente de determinação obtidos por meio do ajuste exponencial.

Tabela 11 - Equação de regressão ajustada para a liberação das cápsulas de alginato de cálcio contendo OEC e o coeficiente de determinação ajustado

Equação	R ² aj
$P=p_{\max}(1+a \cdot e^{-t/f})$	0,9956

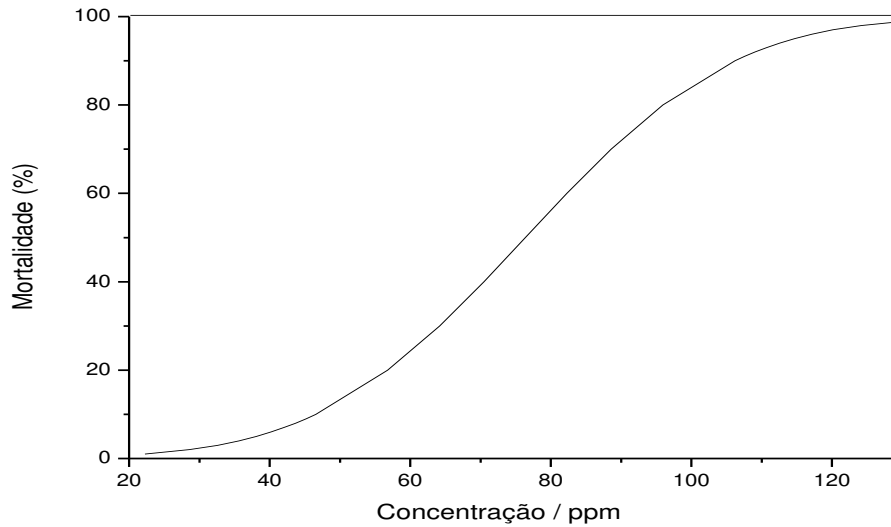
Fonte: Elaborada pela autora.

Em que, P = porcentagem removida acumulada; $p_{\max} = (54,1 \pm 1)\%$; $a = -0,93$ $f = 23$ h

4.1.9 Aplicação das microcápsulas de óleo essencial do cravo-da-índia

Na aplicação do óleo essencial do cravo-da-índia em larvas de *Aedes aegypti*, foi necessário fazer a solução de DMSO a 1%. No controle negativo desse solvente (DMSO), não se obteve nenhuma mortalidade, o que era esperado para o experimento. Os dados de mortalidade para o OEC foram tratados com auxílio do software Minitab, sendo obtida uma curva com o modelo probit, rodado com uma distribuição normal, que é mostrada na Figura 25. A concentração letal de 50%, isto é, a concentração em que se observa a morte de 50% da população de larvas foi de $76,4 \pm 2,2$ ppm, enquanto a concentração letal de 90% foi de $106,5 \pm 3,5$. Pode-se concluir que o óleo essencial do cravo da índia é tóxico para as larvas. Resultados semelhantes de CL_{50} contra larvas *Aedes aegypti* foram encontrados por Furtado *et al.*, 2005 e George; Paari, (2019), que encontraram 71,3 e 76,9 ppm, respectivamente.

Figura 25 - Curva de mortalidade da larva do *Aedes aegypti* em relação a concentração de óleo essencial do cravo-da-índia



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 12 - Concentração letal do óleo essencial do cravo da índia nas larvas do *Aedes aegypti*

	N°	CL ₅₀ (µg mL ⁻¹)	CL ₉₀ (µg mL ⁻¹)	p-Valor
OEC em DMSO 1%	1200	76,4 (74,2-78,6)	106,5 (102,9-110,0)	< 0,001

N°= número de larvas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após certificar que o óleo essencial do cravo da índia é tóxico para as larvas, foi realizado um experimento com as cápsulas obtidas. Os resultados da mortalidade das larvas em cada concentração de OEC podem ser observados na Tabela 12. Nota-se que, as réplicas não foram repetitivas no experimento realizado, obtendo-se um desvio padrão relativo (RSD) alto, como é mostrado na Tabela 13. Esse resultado pode estar associado ao fato de algumas cápsulas permanecerem no fundo dos recipientes de vidro usadas no procedimento. Como o óleo estava protegido pelo material de parede, todas as larvas, teoricamente, teriam se alimentado delas, sendo assim, intoxicadas.

No controle negativo realizado, as cápsulas de alginato de cálcio sem OEC não matou nenhuma larva, confirmando assim, que somente o OEC presente nas cápsulas que causou a morte das larvas. No entanto, mesmo que o experimento não tenha sido repetitivo, é possível afirmar que as cápsulas foram tóxicas para larvas.

Tabela 13 - Letalidade das larvas do *Aedes aegypti* em diferentes concentrações de óleo essencial de cravo-da-índia (ppm) contido nas cápsulas OEC-CapD

Letalidade das larvas do <i>Aedes aegypti</i> (n*=25)											
R**	80 ppm	90 ppm	100 ppm	110 ppm	120 ppm	130 ppm	140 ppm	150 ppm	160 ppm	170 ppm	180 ppm
1	21	16	8	20	21	23	22	20	23	17	25
2	19	8	14	7	16	20	25	16	25	24	21
3	20	19	5	18	24	22	21	24	22	25	25
4	11	12	5	11	24	16	16	25	23	20	20
RSD* **	25,8	34,8	53,0	43,2	17,8	15,3	17,8	19,4	5,4	17,2	11,6

*N= Número total de larvas em cada frasco. **R= Réplica de cada concentração. *RSD= Desvio padrão relativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

5 Conclusão parcial

Por meio dos resultados obtidos neste capítulo, pode-se concluir que o óleo essencial do cravo-da-índia foi encapsulado com sucesso. Os dados apresentados nas análises de Espectroscopia Raman, e FTIR mostraram evidências do óleo essencial do cravo da índia presente nas cápsulas obtidas. Por Microscopia Óptica pôde-se verificar que foram obtidas cápsulas uniformes com tamanhos de $164,7 \pm 0,03 \mu\text{m}$. As análises feitas por UV-vis mostraram que a eficiência de encapsulamento foi superior a 60%, e por análise termogravimétrica foi verificado que óleo foi protegido. Também foi possível concluir que tanto as cápsulas obtidas quanto o óleo essencial do cravo-da-índia são tóxicos para as larvas do *Aedes aegypti*.

6 Conclusão geral

Neste presente trabalho, o óleo essencial do cravo-da-índia foi obtido com êxito, evidenciando seu composto majoritário, o eugenol. As microcápsulas contendo o óleo essencial do cravo-da-índia foram desenvolvidos com sucesso por meio da técnica de extrusão utilizando um dispositivo de microfluídica, mostrando que essa técnica é eficiente e pode ser utilizada

quando se pretende obter cápsulas uniformes e homogêneas. O alginato, material de parede utilizado para encapsular o óleo essencial do cravo-da-índia, é um polímero natural que viabiliza a aplicação dessas cápsulas em diferentes seguimentos.

A tecnologia de microencapsulamento para proteção do óleo essencial do cravo-da-índia, desenvolvida neste trabalho, apresentou aplicabilidade larvicida no controle das larvas de *Aedes aegypti*. Essa aplicação tem o intuito de minimizar o foco da dengue, utilizando um produto natural, levando em consideração os princípios da química verde, o que torna o seu uso ainda mais interessante, uma vez que pode ser uma alternativa menos danosa ao meio ambiente.

7 Perspectivas futuras

Como proposta para trabalhos futuros, pretende-se fazer um delineamento experimental, a fim de aumentar a eficiência de encapsulamento. Além disso, pretende-se melhorar o planejamento experimental, a fim de se determinar a CL₅₀ e CL₉₀ das cápsulas contendo OEC em *Aedes aegypti*.

8 Referências

- AGÜERO, L. et al. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 32–43, Mar, 2017.
- ALI, A. M.; IBRAHIM, A. M. A. Castor and camphor essential oils alter hemocyte populations and induce biochemical changes in larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 21, n. 2, p. 631–637, Apr, 2018.
- ALVES, S. F. et al. Microencapsulation of Essential Oil from Fruits of *Pterodon emarginatus* Using Gum Arabic and Maltodextrin as Wall Materials: Composition and Stability. **Drying Technology**, v. 32, n. 1, p. 96–105, Dec, 2014.
- ANTUNES, J. C. et al. Eugenol-containing essential oils loaded onto chitosan/polyvinyl alcohol blended films and their ability to eradicate *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa* from infected microenvironments. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 1–22, Feb, 2021.
- ARASU, M. V. et al. Essential oil of four medicinal plants and protective properties in plum fruits against the spoilage bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 133, p. 54–62, Feb, 2019.
- AYOUB, A. et al. Microencapsulation and its applications in food technology. **Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi**, v. 16, n. 1, p. 77–86, Apr, 2019.
- AZIZ, Z. A. A. et al. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. **Current Drug Metabolism**, v. 19, n. 13, p. 1100–1110, May, 2018.
- BAKRY, A. M. et al. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143–182, Nov, 2016.
- BARRENECHE, C. et al. Thermophysical characterization of sorption TCM. **Energy Procedia**, v. 48, p. 273–279, Feb, 2014.
- BATALHA, L. S. Encapsulamento de bacteriófagos em diferentes matrizes e avaliação do potencial para a fagoterapia. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.
- BENMOUSSA, H. et al. Enhanced solvent-free microwave extraction of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil seeds using double walled reactor. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 3863–3870, Feb, 2019.
- BEZERRA, F. M. et al. Controlled release of microencapsulated citronella essential oil on cotton and polyester matrices. **Cellulose**, v. 23, n. 2, p. 1459–1470, Feb, 2016.
- BOGGIONE, D. M. G. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Evaluation of microencapsulation of the UFV-AREG1 bacteriophage in alginate-Ca microcapsules using microfluidic devices. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 158, p. 182–189, June, 2017.
- BOH, B.; KNEZ, E. Microencapsulation of essential oils and phase change materials for applications in textile products. **Indian Journal of Fibre and Textile Research**, v. 31, n. 1, p. 72–82, Mar, 2006.

BORGES, L.P; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas secondary plant metabolites. **Agrotecnologia**, v.11, n.1, p.54-67, 2020.

BOYAS, M.E.S.; PACHECO, Z.N. C.; BANOS, S. B.; RANGEL, M. L. C. LWT - Food Science and Technology Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 15–20, Nov, 2017.

BRINGAS-LANTIGUA, M.; VALDÉS, D.; PINO, J. A. Influence of spray-dryer air temperatures on encapsulated lime essential oil. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 7, p. 1511–1517, Feb, 2012.

BROCHOT, A. et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 4, p. 1–6, Jan, 2017.

CANBAY-GOKCE, E. et al. Characterization of solution blown thermoplastic polyurethane nanofibers modified with *Szygium aromaticum* extract. **Journal of the Textile Institute**, v. 111, n. 1, p. 10–15, June, 2019.

CAO, Y. et al. Biosynthesis and production of sabinene: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 4, p. 1535–1544, May, 2018.

CARVALHO, I. T.; ESTEVINHO, B. N.; SANTOS, L. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - A review. **International Journal**

CERCEAU, C. I. et al. ¹H-NMR and GC for detection of adulteration in commercial essential oils of *Cymbopogon* ssp. **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 1, p. 88–97, June, 2020.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Essential Oils: A Natural Alternative to Combat Antibiotics Resistance. A Natural Alternative to Combat Antibiotics Resistance. **Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches**, p. 227–237, July, 2016.

CHOWDHRY, B. Z. et al. Infrared and Raman Spectroscopy of Eugenol, Isoeugenol, and Methyl Eugenol: Conformational Analysis and Vibrational Assignments from Density Functional Theory Calculations of the Anharmonic Fundamentals. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 119, n. 46, p. 11280–11292, Oct, 2015.

CHRYSARGYRIS, A. et al. Salinity and cation foliar application: Implications on essential oil yield and composition of hydroponically grown spearmint plants. **Scientia Horticulturae**, v. 256, p. 108581, Nov, 2019.

CULPI, T. A. et al. Importância de parâmetros de controle na elaboração de micropartículas de ca²⁺- alginato. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 1, p. 38–44, Set, 2010.

ALMEIDA, L. DE F. DE. et al. Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 74, n. 5, p. 393–398, Apr, 2016.

DIAS, M. R.; COSTA, LEÃO RAYANE CRISLEY, H. D. S. Obtenção e caracterização de microesferas de alginato / vidro bioativo. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 12, p. 122–137, Set, 2020.

- DIMA, C. et al. The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of *Coriandrum sativum* L . essential oil from chitosan / alginate / inulin microcapsules. *Food Chemistry*, v. 195, p. 39–48. May, 2015.
- EDRIS, A. Ranking the Antimicrobial Activity of Four Principle Essential Oil Components Against Some Food Pathogenic Bacteria Ranking the Antimicrobial Activity of Four Principle Essential, **International Journal of Microbiological Research**. v.11, p. 1–4,Jan, 2020.
- SOLIMAN, E. A. et al. Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. **Gazi Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi**, v. 9, n. 2, p. 97–106, Mar,1992.
- FAJRIN, A.; MARLIANA, S.D.; HANDAYANI, D.S. Synthesis of Eugenol – Lauryl Methacrylate Copolymers via Cationic Polymerization. **Materials Science and Engineering** v.349,p. 1–6, Jan, 2018.
- FALCÓ, I. et al. Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 51,p. 220–228, Nov, 2019.
- FANG, Y. et al. Morphology and characteristics of 3D nanonetwork porous starch-based nanomaterial via a simple sacrifice template approach for clove essential oil encapsulation. **Industrial Crops and Products**, v. 143, p. 1–8, Oct, 2020.
- FORMIGHIERI, C.; MELIS, A. Cyanobacterial production of plant essential oils. **Planta**, v. 248, n. 4, p. 933–946, Oct, 2018.
- FURTADO, R. F. et al. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 843–847, 2005.
- GEDIKOĞLU, A.; SÖKMEN, M.; ÇIVIT, A. Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. **Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 5, p. 1704–1714, Feb, 2019.
- GEORGE, J. A.; PAARI, J. G. B. K. A. Characterisation and Evaluation of Anti-Larval Properties of Aromatic Plants Against *Aedes aegypti*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* v. 11, n. 4, p. 286–294, Aug, 2019.
- GOMES, P. R. B. et al. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 47, n. 1, p. 37–52, Dec, 2018.
- GONZALEZ-RIVERA, J. et al. In situ microwave assisted extraction of clove buds to isolate essential oil, polyphenols, and lignocellulosic compounds. **Industrial Crops and Products**, p. 161, Dec, 2021.
- GRANT, GREGOR T. et al. Biological interactions between polysaccharides. **Reviews in medical virology**, v. 16, n. 6, p. 393–403, Feb, 1973.
- GUO, X. et al. Structures, properties and application of alginic acid: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 618–628, June, 2020.

HADIDI, M. et al. Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, p. 116075, Nov, 2020.

HANUŠ, L. O.; HOD, Y. Terpenes/Terpenoids in Cannabis: Are They Important?. **Medical Cannabis and Cannabinoids**, v. 3, n. 1, p. 25–60, Aug, 2020.

HAUENSTEIN, O. et al. Bio-based polycarbonate from limonene oxide and CO₂ with high molecular weight, excellent thermal resistance, hardness and transparency. **Green Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 760–770, Jul, 2016.

HERRERA, A. et al. Antifungal and physicochemical properties of inclusion complexes based on β -cyclodextrin and essential oil derivatives. **Food Research International**, v. 121, p. 127–135, Mar, 2019.

HOYOS-LEYVA, J. D. et al. Microencapsulation using starch as wall material: A review. **Food Reviews International**, v. 34, n. 2, p. 148–161, Jan, 2018.

IRSHAD, M. et al. Biological Importance of Essential Oils. **Intech**, v. 1, p. 13, Dec, 2019.

JACUMAZO, J. et al. Development, characterization and antimicrobial activity of sodium dodecyl sulfate-polysaccharides capsules containing eugenol. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, n. November 2019, p. 115562, Dec, 2020.

JENTZSCH, P. V.; GUALPA, F.; RAMOS, L. A. Adulteration of clove essential oil: Detection using a handheld Raman spectrometer. 2017, p. 184–190, June, 2018.

JIANG, Q. et al. Development of essential oils as skin permeation enhancers: Penetration enhancement effect and mechanism of action. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1592–1600, Apr, 2017.

JÚNIOR, F. G. et al. Extração de óleos essenciais e verificação da atividade antifúngica. **Revista das Faculdades de Educação, Ciências e Letras e Psicologia Padre Anchieta**, n. 14, p. 49–65, maio 2006.

KAPADIYA, S. K.; DESAI, M. A. Isolation of essential oil from buds of *Syzygium aromaticum* using hydrodistillation: multi-response optimization and predictive modelling. **International Journal of Advance Research in Science and Engineering**, v. 6, n. 01, p. 405–418, Jan, 2017.

KARAN, N. B. Influence of lavender oil inhalation on vital signs and anxiety: A randomized clinical trial. **Physiology and Behavior**, v. 211, p. 11267, Aug, 2019.

KEMPRAI, P. et al. A ¹H NMR spectroscopic method for the quantification of propenylbenzenes in the essential oils: Evaluation of key odorants, antioxidants and post-harvest drying techniques for Piper betle L. **Food Chemistry**, v. 331, p. 127278, Jan, 2020.

KHALIL, A. A. et al. The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. **RSC Advances**, v. 7, n. 52, p. 32669–32681, June, 2017.

KHALIL, H. P. S. et al. Seaweed based sustainable films and composites for food and pharmaceutical applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, p. 353–362, Apr, 2017.

KHORSHIDIAN, N. et al. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 62–72, Aug, 2018

KIM, J. et al. Development of Natural Insect-Repellent Loaded Halloysite Nanotubes and their Application to Food Packaging to Prevent *Plodia interpunctella* Infestation. *Journal of Food Science*, v. 81, n. 8, p. E1957-E1965, Dec, 2016.

LEE, H. et al. Antioxidative and cholesterol-lowering effects of lemon essential oil in hypercholesterolemia-induced rabbits. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 23, n. 1, p. 8–14, Mar, 2018.

LONE, J.; YUN, J. W. Monoterpene limonene induces brown fat-like phenotype in 3T3-L1 white adipocytes. **Life Sciences**, v. 153, p. 198–206, Apr, 2016.

LUCY, L. et al. Microencapsulation : concepts , mechanisms , methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v.44, n.7,p. 1304–1311, July, 2014.

MAHAPATRA, S. K.; ROY, S. Phytopharmacological approach of free radical scavenging and anti-oxidative potential of eugenol and *Ocimum gratissimum* Linn. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. S1, p. S391–S397, Aug, 2014.

MANAF, M. et al. Microencapsulation Methods of Volatile Essential Oils - A Review. **Advanced Materials Research**, v. 1113, p. 679–683, Mar, 2015.

MANVILLE, R. W.; ABBOTT, G. W. Cilantro leaf harbors a potent potassium channel-activating anticonvulsant. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 10, p. 11349–11363, Oct, 2019.

MÁRQUEZ-GÓMEZ, M. et al. Spray-dried microencapsulation of orange essential oil using modified rice starch as wall material. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 2, p. 1-9, June, 2018.

MARTÍN, M. C. et al. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Immobilization of enological pectinase in calcium alginate hydrogels : A potential biocatalyst for winemaking. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. 101091, March, 2019.

MARTINS, I. M. et al. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 245, p. 191–200, Feb, 2014.

MATOS, S. P. De et al. Essential Oils and Isolated Terpenes in Nanosystems Designed for Topical Administration : A Review. **biomolecules**, p. 1–19, Apr, 2019.

MEIRELES, M. A. A. Extração Supercrítica : Aspectos Técnicos e Econômicos. **Revista fitos**, v.2,n.1, p. 65-72, Jan, 2006.

MENDES, L. A. et al. Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 684–689, July 2017.

- MERGHNI, A. et al. Assessment of the antibiofilm and anti-quorum sensing activities of Eucalyptus globulus essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 74–80, Jan, 2018.
- MILENKOVIĆ, L. et al. New technology in basil production with high essential oil yield and quality. **Industrial Crops and Products**, v. 140, Apr, 2019.
- MUHAMMAD, D. R. A. et al. Antioxidant activity and quality attributes of white chocolate incorporated with Cinnamomum burmannii Blume essential oil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 1731–1739, Dec, 2019.
- MYODA, T. et al. Components of essential oil of the Japanese mint ‘Hokuto’ and its deodorization effects against human malodors. **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, n. 6, p. 431–436, Aug, 2018.
- NASCIMENTO, K. F. DO. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of Psidium guineense Sw. and spathulenol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, n. May 2017, p. 351–358, 2018.
- NAG, D.; AND BIPUL NATH. Review on Solvent Evaporation Technique: a Promising Method for Microencapsulation. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 11, p. 356–372, Apr, 2018.
- NIRMALA, M. J. et al. Anticancer and antibacterial effects of a clove bud essential oil-based nanoscale emulsion system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 6439–6450, June, 2019.
- ORLANDO, J. B. et al. Genotoxic effects induced by beta-myrcene following metabolism by liver HepG2/C3A human cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 82, n. 3, p. 176–185, Feb, 2019.
- OZEL, B. et al. Digestion of animal- and plant-based proteins encapsulated in κ -carrageenan/protein beads under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 137, p. 109662, Sept, 2020.
- PANDEY, A. K.; SINGH, P. The Genus Artemisia: a 2012–2017 Literature Review on Chemical Composition, Antimicrobial, Insecticidal and Antioxidant Activities of Essential Oils. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 68, Sept . 2017
- PANDIYAN, G. N.; MATHEW, N.; MUNUSAMY, S. Ecotoxicology and Environmental Safety Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against Aedes aegypti. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p. 549–556, Mar, 2019.
- PAULA, H. C. B. DE et al. Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton Zehntneri Pax et Hoffm ALG / Ca Beads as an Encapsulation Agent of Croton Zehntneri Pax et Hoffm Essential Oil. **Polimeros**, v. 20, p. 112–120, Aug, 2010.
- PAVELA, R. et al. Microemulsions for delivery of Apiaceae essential oils—Towards highly effective and eco-friendly mosquito larvicides? **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 631–640, Dec, 2019.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. **Structure Determination of Organic Compounds**, Berlin: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-62439-5>. Acesso em: 08 de out,2021.

PUSCASELU, R. G. et al. Alginate: From food industry to biomedical applications and management of metabolic disorders. **Polymers**, v. 12, n. 10, p. 1–30, Oct, 2020.

QUESADA, H. B. et al. Chitosan, alginate and other macromolecules as activated carbon immobilizing agents: A review on composite adsorbents for the removal of water contaminants. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2535–2549, Aug, 2020.

QUIROGA, P. R.; NEPOTE, V.; BAUMGARTNER, M. T. Contribution of organic acids to α -terpinene antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 277, p. 267–272, Oct, 2019.

RADÜNZ, M. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum* , L .) essential oil. **Food Chemistry**, v. 276, p. 180–186, Sept, 2019.

REYES-JURADO, F. et al. Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 258, p. 1–10, Mar, 2019.

RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 61, p. 132–140, Nov,2017.

ROMERO, A.G.C. et al. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 14, n. 6, p. 549–562, Dec, 2000.

JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 382–387, Out, 2007.

SALHA, B, GHADA; ABDERRABBA, MANEF ; LABIDI, JALEL. "A status review of terpenes and their separation methods" **Reviews in Chemical Engineering**, vol. 37, n. 3, pp. 433-447, Sept, 2021.

SANTOS, A. B. DA S. et al. Óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* Blume e *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng como agentes larvicidas frente as larvas do *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 22355–22369, Abr, 2020.

MESQUITA, L. S.S. DE. et al. Exploring the anticancer properties of essential oils from family Lamiaceae. **Food Reviews International**, v. 35, n 2, p. 105–131, May, 2019.

SARKIC, A.; STAPPEN, I. Essential oils and their single compounds in cosmetics-a critical review. **Cosmetics**, v. 5, n. 1, p. 1–21, Jan, 2018.

SCHRODER, T. et al. Antifungal activity of essential oils against fungi isolated from air. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 23, n. 3, p. 181–186, Mar,2018.

SINGH, S. P.; CHANDEL, V. S.; MANOHAR, R. Dielectric study of Clove oil. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 53–56, Dec,2018.

SOONWERA, M.; PHASOMKUSOLSIL, S. Effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass)

and *Syzygium aromaticum* (clove) oils on the morphology and mortality of *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus* larvae. **Original paper**. v.115. p. 1691–1703, Jan, 2016.

SOULIMANI, R.; BOUAYED, J.; JOSHI, R. K. Limonene : Natural monoterpene volatile compounds of potential therapeutic interest. v. 7, n. 4, p. 1–10, Sept,2019.

SOUTAR, O.; COHEN, F.; WALL, R. Essential oils as tick repellents on clothing. **Experimental and Applied Acarology**, v. 79, n. 2, p. 209–219, Oct, 2019.

SOUZA, S. DE et al. Industrial Crops & Products Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes*. **Industrial Crops & Products**, v. 108, p. 684–689, May, 2017.

SUTAPHANIT, P.; CHITPRASERT, P. Optimisation of microencapsulation of holy basil essential oil in gelatin by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 150, p. 313–320, Nov,2014.

TARIQ, S. et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 134, p. 103580, March ,2019.

TEIXEIRA, A. P. DE C. et al. Antifungal activity study of the monoterpene thymol against *Cryptococcus neoformans*. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–4, Dec, 2018.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 1–8, Jan. 2019.

TOSUN, Ş. Y. et al. Effects of essential oils on the survival of *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on fresh Atlantic salmon (*Salmo salar*) during storage at 2 ± 1 °C. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 1, p. 6–11, Sept,2018.

TUNÇ, M. T.; KOCA, İ. Ohmic heating assisted hydrodistillation of clove essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 141, Sept, 2019.

UYEN, N. T. T. et al. Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 1035–1046, Nov, 2020.

VASHIST, H.; CHANDEL, A. A Review Report on Microencapsulation. **Innovat International Journal of Medical & Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 1–7, Feb,2018.

VEIGA, R. D. S. DA et al. Essential oils microencapsulated obtained by spray drying: a review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 6, p. 457–473, May,2019.

VEL, E. VAN DE; SAMPERS, I.; RAES, K. A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, Oct, 2019.

VERMA, R. S. et al. Productivity and essential oil composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) harvested at different growth stages under the subtropical region of north India. **Journal of Essential Oil Research**, v. 51, p. 1–6, Dec,2019.

VONCINA, B. et al. Encapsulation of Rosemary oil in ethylcellulose microcapsules. **Taiwan**

Textile Research Journal, v. 1, n. 1, p. 10–15, Jan, 2009.

WANG, L. Preparation and Characterization of Natural Fragrant Microcapsules. **Journal of Fiber Bioengineering and Informatics**, v. 1, n. 4, p. 293–299, Dec, 2008.

WANG, Y. K. et al. Role of metabolic activation in elemicin-induced cellular toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 29, p. 8243–8252, Jan, 2019.