

Nanoencapsulamento de óleo essencial de *Lippia gracilis* para preparação de revestimento antifúngico pós-colheita

Naiane Rodrigues¹; Dirliane Santos Duarte²; Ana Valéria Vieira de Souza³; Douglas de Britto⁴

Resumo

O óleo essencial de *Lippia gracilis* apresenta atividade antifúngica, muito útil em revestimentos pós-colheita. Com a finalidade de potencializar e preservar esta atividade em condições in vivo, foi realizado o estudo do encapsulamento deste óleo essencial em nanopartículas. O processo consistiu em adição contínua de solução de tripolifosfato (TPP) em solução de quitosana dissolvida em HCl ou CH₃COOH diluídos. Foram realizados testes de adição do óleo essencial pré-emulsionado na solução de quitosana, solução de TPP e interação posterior com as nanopartículas isoladas. Os resultados indicam que o sistema pré-emulsionado em solução de quitosana apresentou maior eficiência. No entanto, o teste de interação posterior com as nanopartículas isoladas resultou em maior taxa de liberação do óleo essencial. Este último sistema parece promissor, visto que dispensa o emprego do solvente ciclohexano, usado na pré-emulsão.

Palavras-chave: quitosana, fungicida, Fitopatologia, polissacarídeos.

Introdução

Os óleos essenciais (OEs) possuem várias atividades biológicas, destacando-se suas propriedades antimicrobianas tanto em testes in vivo (efeito fitoterapêutico) como em testes in vitro contra um expressivo número de fungos, bactérias, vírus e ácaros (Carvalho et al., 2013; Cruz et al., 2013; Niculau et al., 2013).

¹Estudante de Química — IF Sertão Pernambucano, bolsista Pibic, Petrolina, PE.

²Licenciada em Química, IF Sertão Pernambucano, Petrolina, PE.

³Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Agronomia, pesquisadora Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁴Químico, D.Sc. em Química, pesquisador Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, douglas.britto@embrapa.br.

Nos biomas brasileiros Cerrado e Caatinga são encontrados uma diversidade muito grande de plantas medicinais produtoras de OEs como as Verbenaceae, e.g. e *Lippia* sp. Particularmente, o OE obtido de *L. gracilis* tem apresentado atividade antifúngica contra fungos patógenos da pós-colheita (Carvalho et al., 2013). Além da atividade fungicida, os OEs de *Lippia* sp. têm apresentado também outras atividades de interesse para a agricultura como inseticida (Niculau et al., 2013) e acaricida (Cruz et al., 2013). Assim, OE de *L. gracilis* tem potencial de aplicação em formulação e coberturas ativas para a proteção de frutos na pós-colheita.

No entanto, dada a sua volatilidade e instabilidade química, os OEs podem perder suas atividades, dependendo do processo de preparação da formulação ou do tempo de exposição em condições adversas. Para isso, vem sendo empregado o processo de encapsulamento em nanopartículas (NP) (Hosseini et al., 2013), baseado em polissacarídeos como a quitosana, considerando-se a propriedade quelante e biodegradabilidade deste material (Britto et al., 2014).

Assim, visando a melhor condição de síntese e encapsulamento das NP com OE de *L. gracilis*, este trabalho empregou diferentes condições como adição do OE durante a síntese ou posterior à síntese (NP isoladas). As diferentes condições foram avaliadas principalmente quanto à eficiência de encapsulamento e capacidade de liberação do OE.

Material e Métodos

Folhas de *L. gracilis* foram colhidas no Campo Experimental da Caatinga, pertencente à Embrapa Semiárido. As mesmas foram secas em estufa (30 °C) e uma massa de 100 g foi submetida à extração do OE por hidrodestilação em aparelho Clevenger. Os reagentes foram adquiridos comercialmente.

Foram realizados quatro métodos comparativos de síntese das NP, detalhados a seguir. Pré-emulsão em solução de quitosana (método tradicional): as NP foram sintetizadas seguindo-se a metodologia previamente reportada (Britto et al., 2014). Consistiu na preparação de 50 mL de soluções de quitosana a 3 mg/mL em HCl ou ácido acético a 0,5% (v/v) + 100 mg do surfactante Tween 80.

Em seguida, foi preparada a pré-emulsão com 80 mg de OE dissolvido em 4 mL de ciclohexano e adicionado à solução de quitosana, utilizando-se um homogeneizador a 12.000 r.p.m. Finalmente, as NP foram formadas pela adição da solução de TPP (0,6 mg/mL). Este teste foi denominado 00. Método

alternativo 1 (adição direta de OE com maior quantidade de surfactante) — Inicialmente foram preparados 50 mL soluções estoques de quitosana (3 mg/mL) e TPP (1,8 mg/ml). Separou-se uma alíquota de 10 mL da solução de quitosana, adicionou-se 50 mg de surfactante Tween 80 e procedeu-se a formação de NP com a adição da solução contendo 16 mg de OE + 3,5 mL da solução estoque de TPP e 6,5 mL água. Este teste foi denominado 1.1.

Um segundo teste foi preparado, adicionando-se os 50 mg de Tween 80 à solução de TPP, sendo denominado 1.2.

Método Alternativo 2 (adição direta de OE com maior quantidade de TPP) — seguiu-se a metodologia descrita no método 1, decrescendo a massa de surfactante Tween 80 para 20 mg e aumentando a alíquota da solução estoque de TPP para 10 mL. Neste caso, não houve a adição de água.

Método Alternativo 3 (interação direta de OE com as NP isoladas) — Inicialmente as NP foram obtidas em sua forma pura, pela adição da solução de TPP (em meio ácido de HCl ou CH₃COOH) à solução de quitosana. Em seguida, as NP foram isoladas por centrifugação e postas para interagir com 80 mg de OE em 10 mL de etanol/água a 50%. Este teste foi denominado 3.

A suspensão de NP foi analisada quanto à variação de turbidez por espectroscopia no UV-visível por 7 dias, em temperaturas ambiente e 10 °C. A eficiência de encapsulamento (EE) foi determinada, centrifugando-se a suspensão de NP (20.000 rpm, 20 minutos, 8 °C) e o sobrenadante quantificado por meio de curva de calibração por espectroscopia no UV-visível. O precipitado foi liofilizado para o cálculo do rendimento e depois ressuspensionado etanol/água para análise residual de OE.

Resultados e Discussão

A variação de transmitância no UV-visível fornece um parâmetro comparativo da turbidez do sistema que está diretamente relacionado com a estabilidade da suspensão formada.

A análise da variação da transmitância em função do comprimento de onda (200-800 nm) indica uma grande influência da temperatura de armazenamento para a amostra HAC 2.2 (Figura 1A), em que a condição refrigerada (10 °C) sofreu a maior variação de transmitância em relação à condição inicial. Isso é um indicativo da menor estabilidade do sistema à temperatura refrigerada.

No geral, para o encapsulamento de substâncias mais polares, condições mais altas de temperatura favorecem a aglomeração e precipitação das NPs

(Britto et al., 2014). No entanto, em se tratando de substâncias mais apolares como os OE, a temperatura baixa pode implicar em instabilidade físico-química entre OE e a água, causando a precipitação.

Todos os sistemas apresentaram comportamento semelhante, inclusive para as NP sintetizadas em meio HCl (Figura 1B). No entanto, o sistema HCl apresentou valores iniciais de transmitância bem maiores em comparação com o sistema HAc. Isso implica em baixa turbidez do sistema HCl e, portanto, este sistema foi menos favorável à formação de NP.

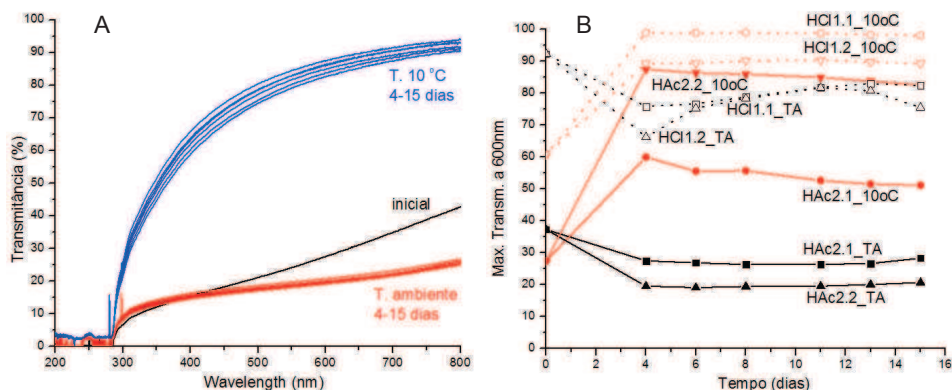


Figura 1. A) Variação da transmitância em função do comprimento de onda para a amostra HAC2.2; B) variação da máxima transmitância a 600 nm para as amostras em função do tempo de armazenamento.

As metodologias alternativas resultaram em valor de EE semelhantes em comparação com a síntese tradicional baseada na pré-emulsão com ciclohexano (amostras HCl00 e HAc00), exceto para amostra em HCl (Tabela 1). Embora alguns trabalhos com encapsulamento de OE reportem EE alta para esta metodologia alternativa (Jamil et al., 2016), a solubilidade do OE pode influenciar neste resultado. No entanto, a adição de surfactante Tween 80 à solução de TPP apresentou valor de EE bem inferior (Amostras HCl1.2 e HAc2.2) em comparação com aquelas em que o surfactante foi adicionado diretamente à solução de quitosana (Amostras HCl1.1 e HAc2.1). Isso evidencia a complexidade do sistema em que a ordem de adição, concentração, variação de pH entre outros têm um papel fundamental nas características da NP.

Tabela 1. Valores de rendimento e eficiência de encapsulamento (EE) das nanopartículas (NP) encapsuladas com óleo essencial (OE) de *Lippia gracilis*.

Amostras NP	Rendimento (mg)	EE (%)
HAc00	70,5	57,1
HCl00	15	47,0
HAc1.1	---	53,97
HAc1.2	---	64,09
HAc2.1	109,5	36,28
HAc2.2	168,0	55,53
HCl1.1	20	32,5
HCl1.2	22,6	19,7
HAc3	115,3	58,02
HCl3	147,1	33,15

Na análise do material liofilizado, observou-se alto conteúdo de OE, bem como boa ressuspensão, principalmente para a metodologia 3 (interação direta de OE com as NP isoladas), em que a interação do OE com as NP ocorreu após a síntese e separação.

Conclusão

Os sistemas alternativos apresentaram valores de eficiência de encapsulamento semelhante ao tradicional baseado em pré-emulsão com ciclohexano. Estes sistemas têm a vantagem de não empregarem solventes orgânicos usados para pré-emulsão. Estas condições são, portanto, interessantes para uso na área alimentícia. No entanto, ajustes nas condições de síntese serão necessários para aumentar o valor da eficiência de encapsulamento, bem como o rendimento.

Referências

BRITTO, D.; MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; PINOLA, F. G.; LUNDSTEDT, L. M.; ASSIS, O. B. G.; MATTOSO, L. H. C. Entrapment characteristics of hydrosoluble vitamins loaded into chitosan and N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles. *Macromolecular Research*, v. 22, n. 12, p. 1261-1267, 2014.

CARVALHO, R. R. C.; LARANJEIRA, D.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; SOUZA, P. E.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; JESUS, H. C. R.; WARWICK, D. R. N. In vitro activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 241-244, 2013.

CRUZ, E. M. O.; COSTA JÚNIOR, L. M.; PINTO, J. A. O.; SANTOS, D. A.; ARAÚJO, S. A.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BACCI, L.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. H.; BLANK, A. F. Aca-ricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1/2, p. 198-202, 2013.

HOSSEINI, S. F.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study. **Carbohydrate Polymers** v. 95, n. 1, p. 50-56, 2013.

JAMIL, B.; ABBASI, R.; ABBASI, S.; IMRAN, M.; KHAN, S. U.; IHSAN, A.; JAVED, S.; BOKHARI, H.; IMRAN, M. Encapsulation of cardamom essential oil in chitosan nano-composites: in-vitro efficacy on antibiotic-resistant bacterial pathogens and cytotoxicity studies. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5048087/>>. Acesso em: 7 maio 2018.

NICULAU, E. S.; ALVES, P. B.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; MATOS, A. P.; BERNARDES, A. R.; VOLANTE, A. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; CORREA, A. G.; BLANK, A. F.; SILVA, A. C.; RIBEIRO, L. P. Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* l'Herit e *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda*. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1391-1394, 2013.