

## Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) *Osbeck* pelo método da coacervação simples

J. K. M. C. Gonsalves<sup>1</sup>; A. M. B. Costa<sup>1</sup>; D.P. de Sousa<sup>2</sup>; S.C.H. Cavalcanti<sup>3</sup>; R. S. Nunes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico-DFS, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Química de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos -DFS, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Química Farmacêutica -DFS, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

rogeriabr@hotmail.com

(Recebido em 30 de outubro de 2009; aceito em 30 de novembro de 2009)

A dengue, um dos principais problemas de saúde pública no mundo, é transmitida pelo *Aedes aegypti*. O controle químico, principalmente por organofosforados, é um dos instrumentos mais efetivos. Entretanto, a resistência mostra-se como um dos principais problemas. Uma alternativa viável do controle do vetor seria o uso de monoterpenos ou suas misturas complexas (óleos essenciais). O limoneno, principal constituinte do óleo essencial de *Citrus sinensis*, apresenta intensa atividade larvicida frente às larvas do *Aedes aegypti*. Logo, a utilização deste óleo no controle larvicida do *Aedes aegypti* mostra-se adequada. No entanto a baixa estabilidade do óleo essencial (volatilidade, oxidação dos constituintes, entre outros), desfavorece sua utilização direta sendo necessária a sua microencapsulação. Neste sentido microcápsulas foram preparadas por coacervação simples e caracterizadas por FTIR. A quitosana foi utilizada como polímero formador de parede apresentando grau de desacetilação de 87,31%, o rendimento do processo de formação de microcápsulas foi de 82,81% e a eficiência de encapsulação do óleo essencial foi de 31,16%. Com a caracterização espectroscópica foi possível observar a reticulação da quitosana pelo glutaraldeído (formação de grupamento imina – 1656 cm<sup>-1</sup>).

Palavras chaves: Quitosana, microencapsulação, óleo essencial

Dengue, a major public health problem in the world, is transmitted by *Aedes aegypti*. The chemical control, mainly organophosphates, is one of the most effective. However, the resistance shows up as a major problem. A viable alternative vector control would be the use of monoterpenes or their complex mixtures (essential oils). Limonene, the main constituent of essential oil of *Citrus sinensis*, has strong larvicidal activity against larvae of *Aedes aegypti*. Therefore, the use of oil in the larvicidal control of *Aedes aegypti* proved to be adequate. However, the low stability of essential oil (volatility, oxidation of the constituents, among others), use direct disadvantage and needs to be microencapsulation. In this sense microcapsules were prepared by simple coacervation and characterized by FTIR. Chitosan was used as a polymer forming wall showed a degree of deacetylation of 87.31%, the yield of the process of formation of microcapsules was 82.81% and the encapsulation efficiency of the essential oil was 31.16%. With the spectroscopic characterization was possible to observe the cross-linking of chitosan by glutaraldehyde (formation of imine grouping - 1656 cm<sup>-1</sup>).

Keywords: Chitosan, microencapsulation, essential oil

### 1. INTRODUÇÃO

Substâncias ativas de origem vegetal, como os monoterpenos e suas misturas complexas (os óleos essenciais) apresentam uma variedade de propriedades dentre as quais de interesse biológico. Entretanto, algumas limitações relacionadas à estabilidade destas substâncias e suas misturas podem ser observadas na utilização direta de uma forma geral (rápida volatilização, oxidação dos constituintes químicos do óleo, entre outros). Estas limitações podem ser solucionadas com a utilização de sistemas carreadores, como as microcápsulas.

A microencapsulação é uma técnica utilizada como ferramenta para proteção e modulação da liberação de substâncias. Vem sendo aplicada com sucesso na proteção de

substâncias sensíveis à temperatura, oxidação, umidade e reações indesejáveis, permitindo que os produtos microencapsulados tenham melhor potencial de uso [14; 18].

A escolha do método de microencapsulação depende das propriedades do material a ser encapsulado (especialmente a solubilidade) e do tipo de partícula desejada (proteção e liberação) [7], além da finalidade (modificações na liberação) do produto [16]. O processo microencapsulação por coacervação está relacionado com o fenômeno de separação espontânea de fases que ocorre quando polieletrólitos são misturados em um meio aquoso [13; 9; 19]. Com a saída do solvente, as moléculas do polímero se aproximam e formam aglomerados [23; 11]. A eficiência da microencapsulação por coacervação está associada às características dos polímeros envolvidos, do complexo formado e do recheio a ser encapsulado.

Biopolímeros diversos são muito utilizados na microencapsulação de substâncias [4] por apresentarem características ideais a microencapsulação. A quitosana, presente nas carapaças dos crustáceos, nos exoesqueletos dos insetos e nas paredes celulares de fungos [8], é um polímero atóxico, biocompatível, biodegradável, e suas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações médicas, industriais e tecnológicas ao longo dos anos [1]. Sua estrutura química é formada pelos copolímeros  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino 2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida 2-desoxi-D-glicose com a presença de grupos amino e grupos hidroxila primário e secundário [6].

A quitosana pode ser obtida a partir da desacetilação da quitina, polissacarídeo derivado da celulose, embora não ocorra em organismos que a produzem [10]. De acordo com o grau médio de acetilação podem-se obter diversas quitosanas variando-se, assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade [21].

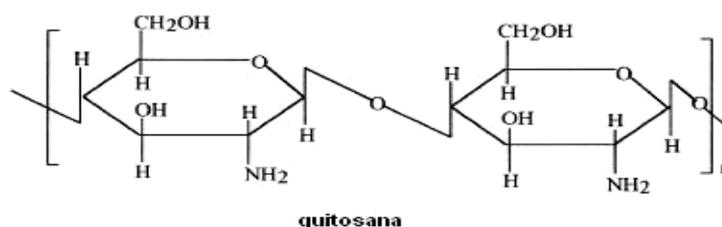


Figura1: Estrutura química da quitosana. [1]

Estudos demonstram que a quitosana pode ser utilizada para preparar microcápsulas para diferentes propósitos, desde produção de microcápsulas contendo antibióticos e antineoplásicos [20; 10], a substâncias nutracêuticas [12]. A variedade dos tipos de quitosana permite a preparação de microcápsulas de diferentes formas e tamanhos. Quando comparada a outros polímeros, a grande quantidade de orifícios/poros se mostra de maneira linear desde a superfície até seu interior, provendo desta maneira uma grande difusão do substrato [1]. Devido ao seu grande uso em sistemas de liberação modificada de fármacos, a quitosana tem sido largamente estudada pela indústria farmacêutica [2].

Assim, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar microcápsulas de quitosana por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) contendo o óleo essencial *C. sinensis* (*L*) *Osbeck* (óleo de laranja) como material de recheio.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Grau Médio de Desacetilação

O grau médio de desacetilação da quitosana (SIGMA de médio peso molecular) foi determinado pela técnica de condutimetria segundo SANTOS *et al.* (2003) e modificado para este trabalho. Foram pesados 100 mg de quitosana e agitadas com 80 mL de solução de ácido clorídrico (ISOFAR) 1 mol.L<sup>-1</sup>. A amostra foi titulada com solução de NaOH (VETEC) 0,0986 mol.L<sup>-1</sup> à temperatura de 25°C. As variações de condutância durante a titulação foram medidas por condutivímetro c708 Analion<sup>®</sup> e a porcentagem dos grupos amino livres na molécula de quitosana foi determinada utilizando-se a equação abaixo:

$$\%NH_2 = \frac{161 \cdot [base] \cdot (V_2 - V_1)}{M} \times 100 \quad (1)$$

Onde  $V_1$  e  $V_2$  correspondem aos volumes de base usados na neutralização do excesso de ácido e para a neutralização da amostra de quitosana protonada, respectivamente;  $[base]$  é a concentração da base usada e  $M$  é a massa de quitosana.

## 2.2. Preparação das Microcápsulas de Quitosana

As microcápsulas de quitosana foram preparadas pelo método de coacervação simples em meio aquoso proposto por OZÓRIO (2007), e adaptadas de acordo com o nosso propósito. Inicialmente uma solução de 100 mL de quitosana 1,5% (p/v) em ácido acético (SYNTH) 1% (v/v) foi preparada sob agitação magnética. A essa solução foram acrescidas 0,5 mL de Tween 80 e 1 mL de óleo essencial de laranja, preparando-se uma emulsão primária. A emulsificação foi obtida em um tempo de dois minutos com a utilização de um dispersor (Quimis®), a uma velocidade de 10.000 rpm.

A emulsão primária foi lentamente aspergida, na vazão de 9 mL/min utilizando uma bomba peristáltica através de uma mangueira de silicone até um bico de atomização com abertura de 1,2 mm e fluxo de 20 L/min, com a utilização de um atomizador de bancada (Biotecnosis do Brasil BP 5.0) em 1 litro de uma solução 0,2 M de NaOH com suave agitação a fim de induzir a coacervação e formação das microcápsulas.

A preparação ocorreu de acordo com as seguintes etapas:

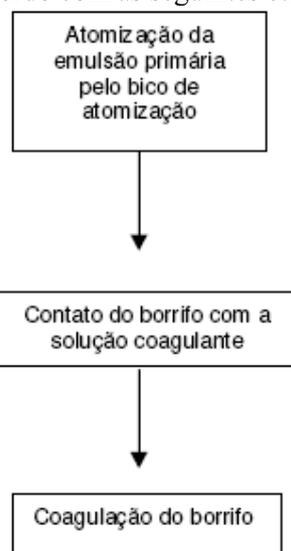


Figura 2. Preparação das microcápsulas.

## 2.3. Reticulação das Microcápsulas

As microcápsulas obtidas foram reticuladas com solução de glutaraldeído (VETEC) a 25%. Adicionou-se 20 mL do agente reticulante às microcápsulas, em agitação magnética. O glutaraldeído tem como função reagir com os grupos amino residuais da molécula de quitosana. Em seguida, as microcápsulas foram lavadas com água destilada para a remoção do excesso de glutaraldeído e filtradas a vácuo. As microcápsulas foram congeladas e posteriormente liofilizadas (Liofilizador Terroni®).

## 2.4. Caracterização das Microcápsulas

### 2.4.1. Rendimento do processo de microencapsulação

As microcápsulas liofilizadas foram pesadas em balança analítica (DENVER INSTRUMENT) para a determinação do rendimento do processo, utilizando a seguinte equação:

$$\text{Rendimento do processo (\%)} = \frac{\text{Quantidade real de amostra}}{\text{Quantidade teórica da amostra}} \times 100 \quad (2)$$

#### 2.4.2. Eficiência de encapsulação

A quantidade de óleo encapsulado foi determinada gravimetricamente. As microcápsulas secas foram trituradas em um dispersor, por dois minutos, na presença de diclorometano. Após a trituração das partículas, foi adicionado sulfato de sódio para remover a água residual. O material foi filtrado a vácuo, o filtrado foi transferido para balão de fundo redondo e rotaevaporado para eliminação do solvente orgânico. A eficiência de encapsulação foi definida como a quantidade de óleo recuperada por grama de microcápsula em relação ao óleo inicialmente inserido.

#### 2.4.3. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em equipamento Perkin Elmer FT-IR System Spectrum BX, na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  e acúmulo de 64 espectros por medida. As amostras foram preparadas em KBr sob a forma de pastilha.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Grau Médio de Desacetilação

O grau médio de desacetilação da quitosana pode ser definido como o número de grupamentos amino livres em relação aos grupos amidas livres contidos na quitosana. O grau médio é dado em percentagem e determinado por diversas técnicas, tais como a titulação condutimétrica [17].

A amostra de quitosana de média viscosidade (MV), solubilizada em meio ácido para permitir o carregamento dos grupos amino, foi titulada com solução de NaOH. Os dados foram expressos em forma de gráfico (Figura 3). No gráfico observam-se três seguimentos de retas: o primeiro seguimento expressa à neutralização do ácido, usado para o carregamento dos grupos amino protonáveis, o segundo representa a neutralização dos prótons dos grupos amino da quitosana e o terceiro refere-se ao excesso de base. Os três seguimentos de reta geram dois pontos de inflexão que correspondem os volumes  $V_1$  e  $V_2$ .

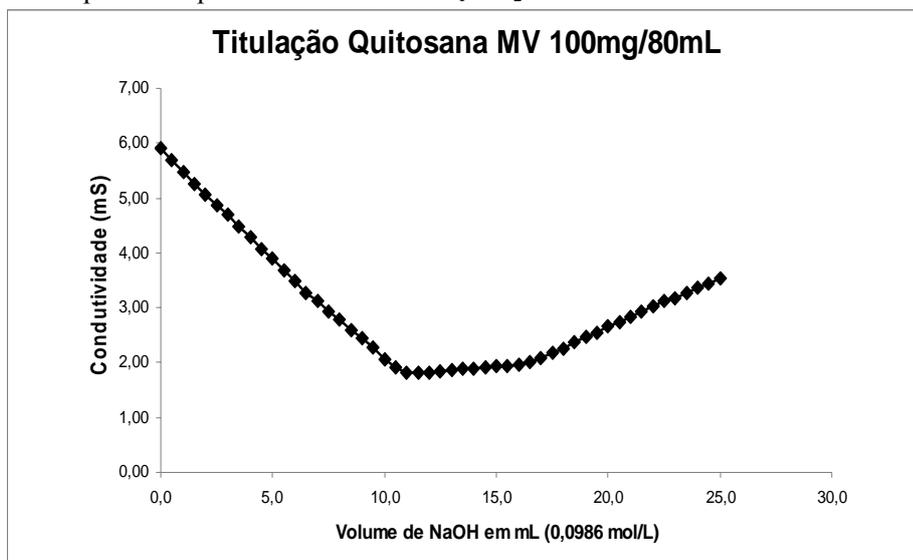


Figura 3. Grau Médio de Desacetilação da Quitosana MV.

A partir da análise do gráfico (Figura 3) e da Equação 1 pode-se determinar em termos de percentagem o grau médio de desacetilação.

Logo, o grau de desacetilação da quitosana foi de 87,31%, coerente com esperado, visto que o grau médio apresentado por quitosanas comercializadas encontra-se numa faixa que vai de 40 até 98%.

### 3.2. Determinação do Rendimento do Processo de Obtenção das Microcápsulas e Eficiência de Microencapsulação

Os resultados do rendimento e da eficiência de encapsulação estão apresentados nas tabelas abaixo.

Tabela 1. Avaliação do rendimento do processo de microencapsulação.

Quantidade Teórica (g)	Quantidade Real (g)	Rendimento do Processo (%)
2,32	1,9212	82,81

Tabela 2. Avaliação da eficiência de encapsulação das microcápsulas contendo o óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Amostra	Massa (g)	Quantidade teórica de óleo (g)	Quantidade Real de óleo (g)	Eficiência de Encapsulação (%)
1	1,7674	0,6246	0,10	16,12%
2	1,9491	0,6889	0,20	30,36%
3	2,047	0,7235	0,34	46,99%
			Média	31,16% ± 15

Na análise dos dados expostos nas tabelas acima, podemos inferir que o rendimento do processo de microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck manteve-se ótimo. A eficiência de encapsulação mostrou um resultado considerado baixo. Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar este fato, como, a concentração do agente reticulante em função da concentração de quitosana, o tempo de reticulação, a baixa capacidade emulsificante da quitosana.

### 3.3. Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (IV).

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) estão representados na Figura 6. As principais bandas observadas no espectro da quitosana foram: banda de estiramento OH em torno de  $3430\text{ cm}^{-1}$ , a qual está sobreposta à banda de estiramento N-H; duas outras bandas em  $2944$  e  $2874\text{ cm}^{-1}$ , típicas de grupos C-H. Deformação axial C=O de amida I em torno de  $1662\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de N-H em torno de  $1560\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular simétrica de  $\text{CH}_3$  em torno de  $1380\text{ cm}^{-1}$  e aminas alifáticas entre  $1080$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$ . O espectro obtido mostrou-se semelhante aos descritos na literatura [3; 17; 22; 15; 5].

A quitosana é um biopolímero constituído de unidades *D*-glicosamina e *N*-acetil-*D*-glicosamina. A presença de grupos reativos, tais como  $\text{NH}_2$  e OH em sua estrutura, possibilita modificações químicas através da inserção de ramificações na quitosana, promovendo alterações na estrutura e propriedades físico-químicas do polímero, aumentando os seus campos de aplicação. Logo a modificação química da quitosana por glutaraldeído resultou no enrijecimento da parede da microcápsula, evento que influencia significativamente na retenção do material de núcleo da microestrutura.

Desta forma a modificação da estrutura da quitosana pode ser observada pela avaliação do espectro de absorção para as microcápsulas inertes (MC-INERTE). As principais regiões do espectro de IV da MC-INERTE, que apresentaram diferenças quando comparadas ao espectro

da quitosana, foram: o surgimento de banda característica de grupos N=C ( $1656\text{ cm}^{-1}$ ), estrutura denominada imina obtida a partir da ligação entre as amins alifáticas com o grupamento aldeídico do glutaraldeído, e o aumento da intensidade da banda  $1560\text{ cm}^{-1}$  associada à ligação etilênica.

O espectro do óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis L. Osbeck*) apresenta como principais bandas  $1658$  a  $1645\text{ cm}^{-1}$  que caracterizam a deformação do carbono tri-substituído em alcenos, e as bandas na região  $1450$  a  $1370\text{ cm}^{-1}$  para a deformação angular C-H  $\text{cm}^{-1}$ . O espectro característico da molécula do d-limoneno (principal constituinte do óleo essencial de laranja, o qual corresponde um percentual em torno de 98%) está demonstrado na Figura 7.

Os espectros da MC-INERTE, MC-ÓLEO DE LARANJA e óleo de laranja foram comparados, sendo observada a presença no espectro da MC-ÓLEO DE LARANJA as bandas características observadas no espectro do óleo de laranja. Bandas em  $1450\text{ cm}^{-1}$  e  $825\text{ cm}^{-1}$ . As observações destas bandas caracterizam a presença do óleo essencial de laranja na estrutura da microcápsula.

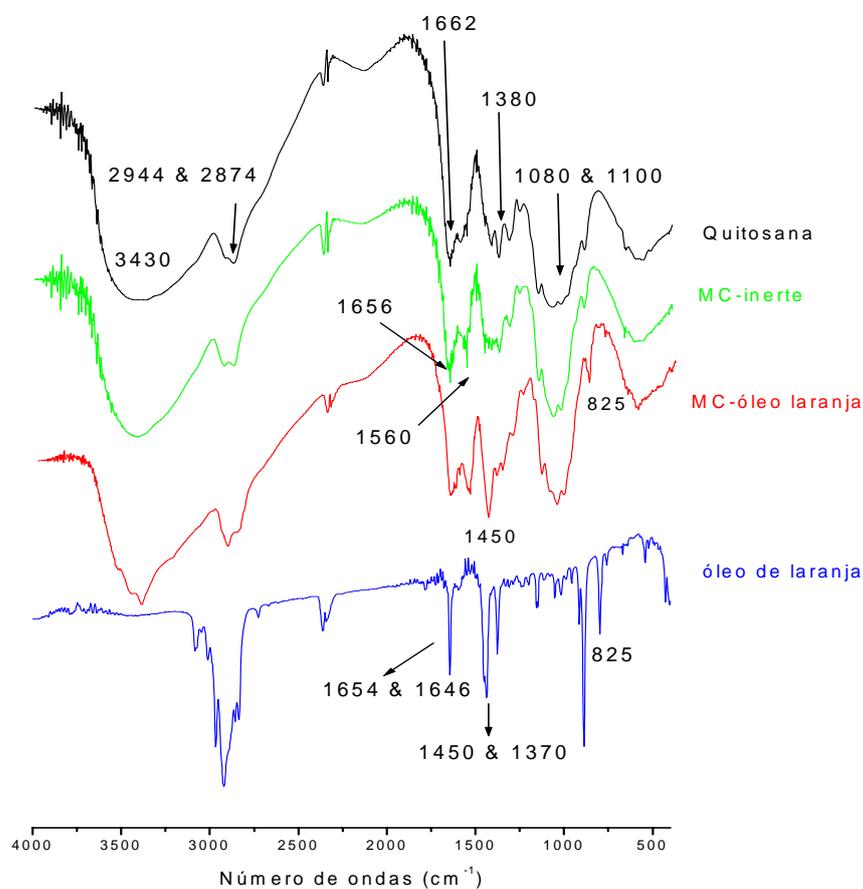


Figura 4: Espectro de absorção no infravermelho da quitosana, das microcápsulas inertes, das microcápsulas com óleo e do óleo essencial de laranja pêra.

#### 4. CONCLUSÃO

O processo de obtenção de microcápsulas de quitosana pelo método de coacervação simples em meio aquoso contendo o óleo essencial de laranja mostrou-se eficaz, reproduzível, simples e possível de se realizar em maior escala. No entanto a baixa eficiência de encapsulação mostra a necessidade da avaliação das variáveis que podem interferir efetivamente na eficiência

de encapsulação, uma vez que este parâmetro determina o perfil de utilização das microcápsulas (liberação e eficácia quanto à atividade esperada).

1. AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; FOOK, M.V.L.; COSTA, A.C.F.M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista eletrônica de materiais e processo*. 2: 27-34, 2007.
2. BANERJEE, T.; MITRA, S.; SING, A.K.; SHARMA, R.K.; MAITRA, A. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *Internationals Journal of Pharmacy*. 243: 93-105, 2002.
3. BRUNETON, J. **Pharmacognosie-Phytochimie Plantes Médicinales**. 2 ed. Technique et Documentation-Lavoisier, Paris, 1993.
4. CARDOSO, F.S.N. Produção de microencapsulados de amido com recobrimento em leiteo fluidizado. Campinas, 2000. 65p. [Dissertação de Mestrado em Alimentos e Nutrição. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
5. COSTA JUNIOR, E.S.; MANSUR, H.S. Preparação e Caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Química Nova*. v.31, n.6, p.1460-1466, 2008.
6. DE OLIVEIRA, I.R.W.Z.; VIEIRA, I.C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase vegetal em matriz de quitosana. *Química Nova*. 29: 932-939, 2006.
7. DHOOT, N.O. Microencapsulation for therapeutic applications. [http://dspace.library.drexel.edu/retrieve/47/dhoot\\_thesis.pdf](http://dspace.library.drexel.edu/retrieve/47/dhoot_thesis.pdf), ultimo acesso em 10/09/2008.
8. DIAS, F.S.; QUEIROZ, D.C.; NASCIMENTO, R.F.; LIMA, M.B. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. *Química Nova*. 31: 160-163, 2008.
9. DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, Y.; BOURY, F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*. 232: 239-247, 2004.
10. GUIMARÃES, T.F. Nanopartículas de quitosana como carreadoras de etoposide. Araraquara, 2005. 102p. [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"].
11. HASHIDZUME, A.; OHARA, T.; MORISHIMA, Y. Coacervation of hydrophobically modified polyanions by association with nonionic surfactants in water. *Langmuir*. 18: 9211-9218, 2002.
12. HIGUERA-CIAPARA, I.; FELIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F.M.; ARGUELLES-MONAL, W. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers*. v.56, p.41-45, 2004.
13. KAREL, M. Encapsulation and controlled release of food components in: DEKKER, M. *Biotechnology and Food Processes Engineering*. Eds: Henry G. Schwartzberg IFT Basic Symposium Series. 1990. Cap.9, p. 277-293.
14. MENGER, F.M.; PERESYPKIN, A.V.; CARAN, K.L.; APKARIAN, R.P.A. Sponge Microencapsulation Morphology in an Elementary Coacervate. *Langmuir*. 16: 9113-9116, 2000.
15. OZÓRIO, R.A. *Elaboração e caracterização de micropartículas de astaxantina com quitosana*. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias. Florianópolis: Universidade de Santa Catarina. 2007.
16. PRATA, A.S. Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa. 2006. 267p. [Dissertação de Doutorado em Alimentos e Nutrição - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
17. SANTOS, J.E. ; SOARES, J.P.; DOCKAL, E.R.; CAMPANA FILHO, S.P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. v.13, n.4, p.242-249, 2003.

18. SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 33: 501-547, 1993.
19. STRAUSS, G.; GIBSON, S.M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids*. 18: 81–89, 2004.
20. STULZER, H.K. *Desenvolvimento e avaliação de sistemas microparticulados de liberação modificada a base de quitosana contendo o antiviral aciclovir*. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. 2008.
21. SILVA, H.S.R.C.; DOS SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*. 29: 776-785, 2006.
22. TORRES, M.A.; VIEIRA, R.S.; BEPPU, M.M.; SANTANA, C.C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. *Polímeros: ciência e Tecnologia*. v.15, n.4, p.306-312, 2005.
23. WANG, Y.; KIMURA, K.; DUBIN, P.L.; JAEGER, W. Polyelectrolyte-Micelle Coacervation: Effects of Micelle Surface Charge Density, Polymer Molecular Weight, and Polymer/Surfactant Ratio. *Macromolecules*. 33: 3324-3331, 2000.