



# AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE DE CARVACROL ENCAPSULADO EM NANOCÁPSULAS DE MUCILAGEM DE CHIA

T. Benincá<sup>1</sup>, L. Schmidt<sup>1</sup>, I. A. Peixoto<sup>1</sup>, W. Ávila<sup>1</sup>, P. S. Malheiros<sup>1</sup>, P. R. Augusti<sup>1</sup>

1- Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEP: 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-6674 – e-mail: ([thais\\_beninca@hotmail.com](mailto:thais_beninca@hotmail.com))

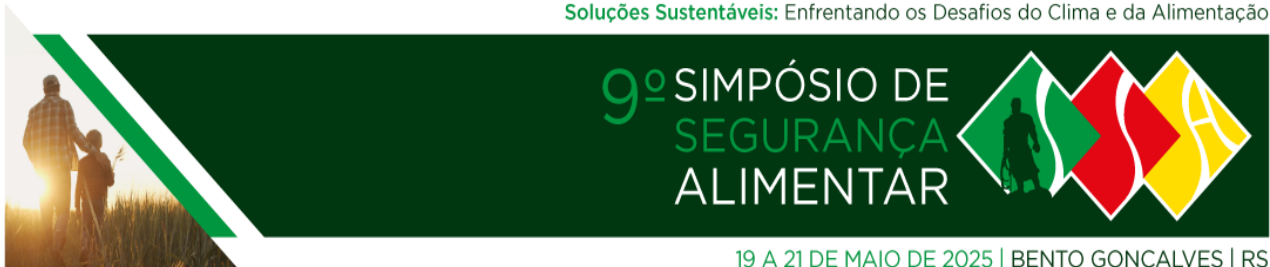
**RESUMO** – O carvacrol é um composto extraído de orégano e tomilho conhecido por sua ação antioxidante. Sua aplicação direta em alimentos pode alterar características organolépticas e a nanoencapsulação surge como solução para evitar esses efeitos. No entanto, para aplicar carvacrol em alimentos é necessário conhecer a segurança desse composto nanoencapsulado. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante e a toxicidade do carvacrol encapsulado em nanocápsulas de mucilagem de chia. A atividade antioxidante do carvacrol foi determinada através da capacidade de remoção do radical ABTS enquanto a toxicidade foi avaliada utilizando nematoides *Caenorhabditis elegans*. O carvacrol encapsulado apresentou maior eficiência antioxidante e menor toxicidade em relação ao carvacrol puro. Estes resultados sugerem que a encapsulação do carvacrol em nanocápsulas de mucilagem de chia pode ser uma alternativa para aumentar para aplicação do carvacrol em alimentos, embora estudos de toxicidade crônica devam ser conduzidos no futuro.

**PALAVRAS-CHAVE:** ABTS; *Caenorhabditis elegans*; mucilagem de chia; nanotecnologia.

## 1. INTRODUÇÃO

O carvacrol é um composto orgânico pertencente à classe dos monoterpenos fenólicos sendo extraído principalmente dos óleos essenciais de orégano e tomilho (Gholijani *et al.*, 2015). Seu uso é permitido em pequenas concentrações como ingrediente aromatizante em algumas categorias de alimentos (FDA, 2023). O carvacrol possui uma ampla gama de atividades biológicas relatadas na literatura, como ação antimicrobiana e antioxidante, podendo atuar como um conservante natural em alimentos. Sua ação antioxidante é capaz de prevenir e/ou reduzir danos oxidativos gerados por radicais livres e ou espécies reativas em sistemas biológicos e alimentares (Kandemir *et al.*, 2021).

Entretanto, a utilização de carvacrol puro em alimentos pode influenciar negativamente suas características organolépticas, como sabor e aroma (Szczepanski; Lipski, 2013). Assim, a nanoencapsulação surge como uma estratégia promissora para solucionar esses fatores (Cacciatore *et al.*, 2020). A mucilagem de chia tem se mostrado um material de parede adequado em processos de nanoencapsulação, além de ser uma alternativa natural aos compostos normalmente utilizados no



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

processo (De Campo et al., 2017). No entanto, para que nanocápsulas de carvacrol possam ser aplicadas em matrizes alimentares é necessário conhecer sua segurança. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e toxicidade aguda de carvacrol encapsulado em nanocápsulas de mucilagem de chia.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Encapsulação de carvacrol em nanocápsulas de mucilagem de chia

Uma solução de carvacrol não encapsulado (livre) foi preparada misturando carvacrol (CAS: 499-75-2) ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), polissorbato – 80 ( $\geq 99\%$ , Neon Suzano, Brasil), e água MILI-Q. As nanocápsulas foram produzidas conforme metodologia descrita por De Campo *et al.* (2017). Para a formação das nanocápsulas foram utilizadas duas fases, orgânica e aquosa. A fase aquosa foi preparada por meio da hidratação da mucilagem de chia seca em água destilada enquanto a fase orgânica foi composta por Tween 80 e carvacrol dissolvidos em etanol absoluto (Dinâmica, São Paulo, Brasil).

### 2.2 Determinação da atividade antioxidante das nanocápsulas contendo carvacrol

A capacidade antioxidante foi determinada através da avaliação da capacidade das amostras (carvacrol puro e nanoencapsulado) de eliminar o radical sintético ABTS, conforme metodologia descrita por Rufino et al. (2007). A capacidade das amostras foi apresentada como percentual de remoção do radical ABTS.

### 2.3 Avaliação da toxicidade aguda das nanocápsulas contendo carvacrol

Para avaliação da toxicidade aguda das amostras, nematoides *C. elegans* (cepa N2) foram obtidas do *Caenorhabditis* Gene Center (Minnesota, EUA) e mantidas a 20°C com *E. coli* OP50 como fonte de nutrientes. A etapa de sincronização foi obtida pela lavagem dos nematoides grávidos das placas contendo meio de crescimento para nematoide (NGM) para tubos de centrifugação (Thermofischer Scientific Sorvall ST16R) e lise da cutícula usando uma mistura de NaCl 1% e NaOH 0,25 M. Os ovos foram lavados com solução tampão M9 e, posteriormente, incubados durante a noite (12 h) em placas estéreis de ágar NGM sem bactérias (Charão *et al.*, 2015). 2.500 vermes em estágio larval L1 foram expostos a cinco concentrações (0,01, 0,05, 0,1 e 0,5 mg mL<sup>-1</sup>) das amostras durante



30 minutos sob agitação (Homogeneizador hematológico H32) a 20°C. Posteriormente, os tratamentos foram removidos dos vermes através de três lavagens com solução tampão NaCl (0,5%) e os nematoides foram colocados em placas NGM semeadas com *E. coli* OP50. Após 24h de incubação, o número de vermes sobreviventes em cada placa foi contabilizado com auxílio de lupa (Charão *et al.*, 2015) e os resultados foram apresentados como % de vermes sobreviventes.

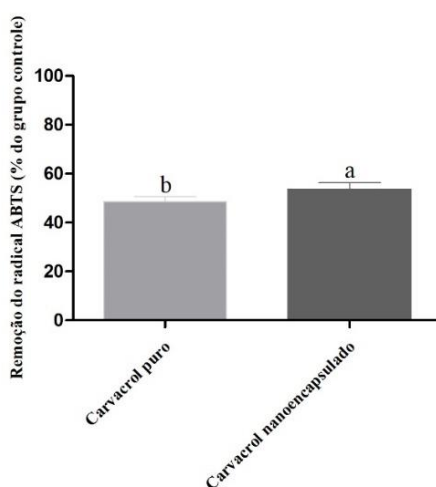
## 2.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos das análises antioxidante e toxicológica foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey quando necessário. As diferenças foram consideradas significativas quando ( $p < 0,05$ ). As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA).

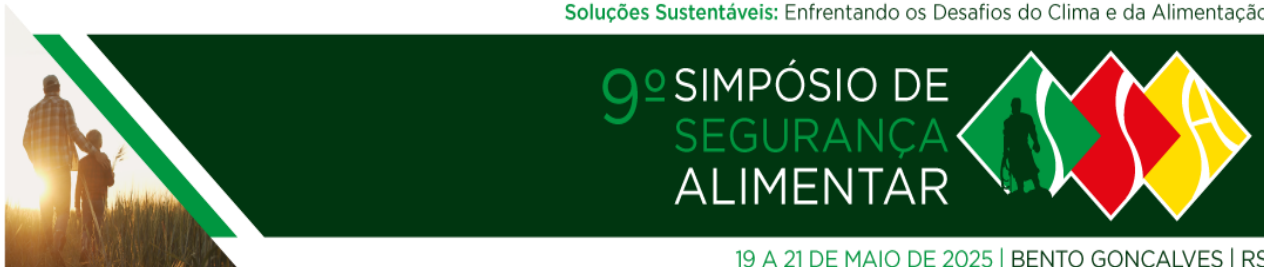
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Atividade antioxidante das nanocápsulas contendo carvacrol

As nanocápsulas de carvacrol apresentaram capacidade de remoção do radical ABTS significativamente maior quando comparado ao carvacrol puro (53,71%, vs. 48,66%,  $p < 0,05$ ) (Figura 1). Resultados semelhantes foram observados por Di Matteo *et al.* (2024), que encontraram que CAR removeu em 50% o radical ABTS. A ação antioxidante do carvacrol pode ser explicada pelo seu potencial de fornecer átomos de hidrogênio para as ER, neutralizando-as e prevenindo danos causados pelo estresse oxidativo às biomoléculas (de Oliveira *et al.*, 2021).



**Figura 1** – Capacidade de remoção do radical ABTS (%) no carvacrol puro e nanoencapsulado.



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

A nanoencapsulação do carvacrol potencializou sua ação antioxidante, o que está em acórdância com estudos anteriores. Nanopartículas (NP) de ouro e prata carregadas com óleo essencial de *Mentha Spicata* exibiram maior atividade antioxidante na eliminação do radical ABTS em comparação com o óleo essencial livre (Moosavy et al., 2023). Hadidi et al. (2020) também relataram maior atividade antioxidante para NP de quitosana carregadas com óleo essencial de cravo (15,9 – 71,8%) em comparação com o óleo livre (15,4 – 60,4%). Assim, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o encapsulamento protege o CAR contra efeitos como oxigênio e temperatura, diminuindo a taxa de evaporação do composto e liberando-o de forma controlada durante o ensaio (Ghahfarokhi et al., 2016; Hadidi et al., 2020).

### 3.2 Taxa de sobrevivência de *Caernohabditis elegans* expostos a nanocápsulas contendo carvacrol

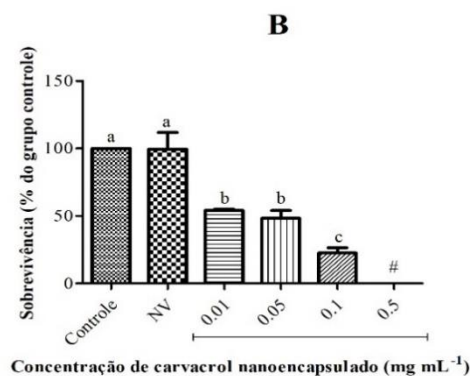
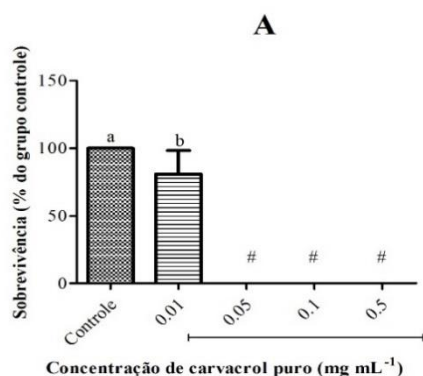
Com exceção da concentração de 0,01 mg mL<sup>-1</sup> (taxa de sobrevivência de 55,56%) (Figura 2A) todas as demais concentrações de carvacrol puro causaram a morte de 100% dos nematoides. O efeito tóxico agudo do carvacrol puro pode ser atribuído a posição do grupo hidroxila do composto, uma vez que a estrutura molecular determina propriedades importantes, como a capacidade das moléculas de carvacrol penetrarem na cutícula dos nematoides, causando seu rompimento (Fuentes et al., 2022). Um estudo anterior verificou que o carvacrol puro (0,67 mM) apresentou efeito nematicida contra *C. elegans* causando mortalidade de 100% dos nematoides tratados. Os vermes apresentavam corpos curvados ou fragmentados após o tratamento com o composto (Lei; Leser; Enan, 2010). Apesar disso, um estudo de fase clínica I demonstrou a segurança de carvacrol para humanos (dose oral até 2 mg kg<sup>-1</sup>/dia) após trinta dias (Ghorani et al., 2021).

O tratamento dos vermes com todas as concentrações de carvacrol nanoencapsulado (figura 2B) também causou letalidade, embora a taxa de sobrevivência seja visivelmente maior (56,64%, 36,11%, 22,67% e 3,68% para as doses de 0,01, 0,05, 0,1 e 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente). As nanocápsulas vazias não causaram redução significativa da taxa de sobrevivência (99,61%). Neste estudo observou-se que a encapsulação atenuou a mortalidade dos nematoides causada pelo carvacrol. Em acordo, Boelter et al. (2023) relataram que a encapsulação de nisina em lipossomas protegeu *C. elegans* quanto aos efeitos tóxicos do composto livre. Nisina livre na concentração de 0,25 mg mL<sup>-1</sup> causou a morte de 54% dos nematoides, enquanto 100% dos vermes expostos a mesma concentração de lipossomas carregadas com nisina sobreviveram. **Desta maneira, as nanocápsulas de mucilagem**



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

de chia carregadas com carvacrol tem maior durabilidade, melhor capacidade antioxidante e menor toxicidade quando comparado ao composto puro.



apsulado.

ias (sem

carvacrol).

## 4. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que o carvacrol nanoencapsulado **apresentou maior capacidade antioxidante e menor toxicidade** em comparação ao carvacrol não encapsulado. Isso sugere que o carvacrol encapsulado em nanocápsulas de chia poderia ser uma alternativa para a aplicação do composto em alimentos. **No entanto, o trabalho indica a necessidade de pesquisas adicionais em outros modelos animais, considerando a atividade nematicida do carvacrol, além de estudos sobre toxicidade crônica, para determinar sua dose segura de ingestão e confirmar sua eficácia.**

## REFERÊNCIAS

BOELTER, J. F., GARCIA, S.C., GÖETHEL, G., CHARÃO, M.F., de MELO, L.M., BRANDELLI, A. Acute Toxicity Evaluation of Phosphatidylcholine Nanoliposomes Containing Nisin in *Caenorhabditis elegans*. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 563, 2023.

CACCIATORE, A. F., DALMÁS, M., MADERS, C., ISAÍÁ, H.A., BRANDELLI, A., MALHEIROS, P.S. Carvacrol encapsulation into nanostructures: Characterization and antimicrobial activity against foodborne pathogens adhered to stainless steel. **Food Research International**, v. 133, p. 109143, 2020.

CHARÃO, M. F., SOUTO, C., BRUCKER, N., BARTH, A., JORNADA, D., FAGUNDEZ, D., ÁVILA, D., EIFLER-LIMA, V., GUTERRES S., POHLMANN, A., GARCIA, S. *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5093–5106, 2015.

DE CAMPO, C., DOS SANTOS, P.P., COSTA, T.M.H., PAESE, K., GUTERRES, S.S., RIOS, A. de O., FLORES, S.H. Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v. 234, p. 1–9, 2017.

**DE OLIVEIRA, A. S., LLANES, L. C., NUNES, R. J., NUCCI-MARTINS, C., DE SOUZA, A. S., PALOMINO-SALCEDO, D. L., DÁVILA-RODRÍGUEZ, M. J., FERREIRA, L. L. G., SANTOS, A. R. S., &**



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

ANDRICOPULO, A. D. Antioxidant Activity, Molecular Docking, Quantum Studies and In Vivo Antinociceptive Activity of Sulfonamides Derived From Carvacrol. **Frontiers in Pharmacology**, 12, 2021.

DI MATTEO, A., LAVORGNA, M., RUSSO, C., ORLO, E., & ISIDORI, M. Natural plant-derived terpenes: Antioxidant activity and antibacterial properties against foodborne pathogens, food spoilage and lactic acid bacteria. **Applied Food Research**, 4 (2), p. 100528, 2024.

FDA (2023). Chapter I - Food and Drug Administration, Department of Health and Human. Subchapter B - Food for Human Consumption. Part 172 - Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption. Subpart F - Flavoring Agents and Related Substances. Food & Drug Administration. [ S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-172/subpart-F/section-172.515>

FUENTES, C., VERDÚ, S., FONTES, A., RUIZ, M.J., BARAT, J.M. Effects of essential oil components exposure on biological parameters of *Caenorhabditis elegans*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 159, p. 112763, 2022.

GHAHFAROKHI, M.G., BARZEGAR, M., SAHARI, M.A., AZIZI, M.H. Enhancement of thermal stability and antioxidant activity of thyme essential oil by encapsulation in chitosan nanoparticles. **J. Agr. Sci. Tech**, v.18, p. 1781-1792, 2016.

GHOLIJANI, N., GHARAGOZLOO, M., KALANTAR, F., RAMEZANI, A., AMIRGHOFRAN, Z. Modulation of cytokine production and transcription factors activities in human jurkat t cells by thymol and carvacrol. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, p. 653–660, 2015.

GHORANI, V., ALAVINEZHAD, A., RAJABI, O., MOHAMMADPOUR, A.H., BOSKABADY, M.H. Safety and tolerability of carvacrol in healthy subjects: a phase I clinical study. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 177-189, 2021.

HADIDI, M., POURAMIN, S., ADINEPOUR, F., HAGHANI, S., JAFARI, S.M. Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, p. 116075, 2020.

KANDEMIR, F. M., CAGLAYAN, C., DARENDELIOGLU, E., KÜÇÜKLER, S., IZOL, E., KANDEMIR, O. Modulatory effects of carvacrol against cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity by molecular targeting regulation. **Life Sciences**, v. 277, p. 119610, 2021.

LEI, J., LESER, M., ENAN, E. Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 7, p. 1062–1071, 2010.

MOOSAVY, M.-H., DE LA GUARDIA, M., MOKHTARZADEH, A., KHATIBI, S. A., HOSSEINZADEH, N., & HAJIPOUR, N. Green synthesis, characterization, and biological evaluation of gold and silver nanoparticles using *Mentha spicata* essential oil. **Scientific Reports**, 13, 7230, 2023.

RUFINO, M. Do S. M., ALVES, R.E., DE BRITO, E.S., MORAIS, S.M., SAMPAIO, C.G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALISTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Comunicado técnico, 2007. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426954/1/Cot128.pdf>

SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 224–229, 2013.