

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS
NA FOTOESTABILIDADE E NA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS
EUGENOL, ISOEUGENOL E DEHIDRODIEUGENOL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marinice Martins Reis

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS NA
FOTOESTABILIDADE E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EUGENOL, ISOEUGENOL
E DEHIDRODIEUGENOL**

Marinice Martins Reis

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Inorgânica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Villetti

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Martins Reis, Marinice

INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS NA FOTOESTABILIDADE E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EUGENOL, ISOEUGENOL E DEHIDRODIEUGENOL / Marinice Martins Reis.-2012.

124 p.; 30cm

Orientador: Marcos Antonio Villetti

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2012

1. Eugenol 2. Isoeugenol 3. Dehidrodieugenol 4. Nanopartículas 5. Fotólise I. Villetti, Marcos Antonio II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS NA
FOTOESTABILIDADE E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS
COMPOSTOS FENÓLICOS EUGENOL, ISOEUGENOL E
DEHIDRODIEUGENOL**

elaborada por
Marinice Martins Reis

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

Comissão Examinadora:

Marcos Antonio Villetti, Dr.
(Presidente/Orientador)

Irene Teresinha Santos Garcia, Dra. (UFRGS)

Letícia Cruz, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2012

*Aos meus pais **Maria Ines** e **Olibio**,
e ao meu companheiro **Oldinei**,
pelo amor, carinho e apoio que me
confiaram em todos os momentos da
vida, e pelo constante incentivo
durante esta jornada.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter recebido o dom da vida e a força e coragem diante das dificuldades.

Aos meus pais, pelos ensinamentos, amor incondicional, paciência, por dedicarem suas vidas pela minha formação, e por me darem o apoio de que precisei, sempre acreditando em mim. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

Ao meu esposo, Oldinei, pelo amor, companheirismo, paciência e compreensão durante esta jornada.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Química, pelas oportunidades oferecidas.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Villetti, pela orientação, dedicação, amizade, incentivo e conhecimento compartilhado durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa e Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho pela oportunidade de realização de experimentos em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck, Prof. Dr. Cristiano Giacomelli, Prof^a. Dra. Letícia Cruz e à Aline Ferreira Ourique, pela colaboração e pelas contribuições científicas para o aprimoramento deste trabalho.

À Prof^a. Dra. Cristiane de Bona da Silva e à Fernanda Flores, pelas análises de tamanho de partícula e potencial zeta.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química, em especial à Prof^a. Dra. Vânia Polli, pelo conhecimento compartilhado, amizade e apoio.

Às colegas e amigas do LEPOL e LACHEM, em especial à Fernanda Lima, pelo apoio, incentivo e conselhos.

E à todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento e concretização deste trabalho, o meu muito obrigada!

*Temos o destino que merecemos.
O nosso destino está de acordo
com os nossos méritos.*

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS NA FOTOESTABILIDADE E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EUGENOL, ISOEUGENOL E DEHIDRODIEUGENOL

AUTORA: Marinice Martins Reis

ORIENTADOR: Marcos Antonio Villetti

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2012.

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais no organismo. Esses radicais são necessários em muitos processos biológicos, mas também podem estar relacionados a processos prejudiciais ao nosso organismo, tais como o estresse oxidativo, o qual está associado a doenças, tais como as neurodegenerativas e cardiovasculares, e ao envelhecimento.

Os compostos fenólicos eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol, são fenilpropanóides que apresentam propriedades antibacterianas, anestésicas, analgésicas, antialérgicas e anti-inflamatórias, além de possuírem propriedades antioxidantes, evitando lesões oxidativas de caráter cumulativo.

Visando compreender melhor o comportamento desses antioxidantes, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante do eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol frente ao radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), bem como a atividade antirradicalar destes compostos frente ao radical hidroxil (gerado fotoquimicamente pela decomposição do peróxido de hidrogênio), preparar nanocarreadores com diferentes organizações estruturais (nanocápsulas e nanoemulsões), e verificar a capacidade destas nanoestruturas em aumentar a fotoestabilidade (radiação UV-C) quando comparadas aos compostos livres em solução, na presença e na ausência do radical hidroxil (HO•).

As dispersões de nanocápsulas (NC) e nanoemulsões (NE) foram preparadas pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado (poli- ϵ -caprolactona) e emulsificação espontânea, respectivamente. Todas as formulações apresentaram uma alta eficiência de encapsulamento, tamanho médio nanométrico, baixo índice de polidispersão, potencial zeta negativo e valores de pH ácido, permanecendo estáveis após 7 meses de armazenamento.

No estudo cinético da fotodecomposição, as soluções dos antioxidantes apresentaram a seguinte estabilidade (na ausência do radical HO \bullet): eugenol > dehidrodieugenol > isoeugenol. As formulações nanoestruturadas protegeram os antioxidantes contra a fotodegradação UV-C, quando comparadas à solução hidroetanólica. A maior estabilidade das nanocápsulas comparada à solução livre pode ser atribuída à alta absorção do poliéster poli- ϵ -caprolactona na região do UV-C.

Na presença do radical HO \bullet , o dehidrodieugenol foi o antioxidante com maior atividade antirradicalar, seguido do eugenol e do isoeugenol. Os antioxidantes encapsulados em nanocápsulas e nanoemulsões apresentaram uma prolongada atividade antirradicalar quando comparada com a solução de eugenol e seus derivados.

Os testes de viabilidade celular mostraram que os sistemas nanoestruturados (NC e NE) não foram tóxicos para a concentração de antioxidante de até 1mg mL⁻¹. Esta baixa citotoxicidade das amostras indica que as nanocápsulas e nanoemulsões preparadas neste trabalho podem ser consideradas substratos favoráveis para as células vivas.

Palavras-chave: Eugenol. Isoeugenol. Dehidrodieugenol. Nanopartículas. Fotólise. Cinética de decomposição.

ABSTRACT

Master Dissertation
Postgraduate Program in Chemistry
Universidade Federal de Santa Maria

INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS NA FOTOESTABILIDADE E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EUGENOL, ISOEUGENOL E DEHIDRODIEUGENOL

AUTHOR: Marinice Martins Reis

ADVISOR: Marcos Antonio Villetti

Santa Maria, February 23, 2012.

There is a great interest in the study of antioxidants, mainly due to the findings on the effect of radicals in the body. These radicals are needed in many biological processes, but also may be related to processes harmful to our body, such as oxidative stress, which is associated with diseases such as neurodegenerative and cardiovascular diseases, and aging.

The phenolic compounds eugenol, isoeugenol and dehydrodieugenol are phenylpropanoids that have properties antibacterial, anesthetic, analgesic, antiallergic and anti-inflammatory, and antioxidant properties, preventing oxidative damage cumulative character.

To better understand the behavior of these antioxidants, this study aimed to evaluate the antioxidant activity of eugenol, isoeugenol and dehydrodieugenol against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), as well as the radical scavenging activity of these compounds front of the hydroxyl radical (photochemically generated from the decomposition of hydrogen peroxide), prepare nanocarrier with different structural organizations (nanocapsules and nanoemulsions), and verify the ability of these nanostructures to increase the photostability under UV-C compared to the free compounds in solution in the presence and absence of hydroxyl radical (HO•).

The dispersion of nanocapsules (NC) and nanoemulsions (NE) were prepared by the method of interfacial deposition of preformed polymer (poly- ϵ -caprolactone) and spontaneous emulsification, respectively. All formulations presented high encapsulation efficiency, nanometric size, low polydispersity index, negative zeta potential and acid pH values, remaining stable after 7 of storage months.

In the kinetic study of the photodecomposition, the compounds showed the following stability (in the absence of the radical HO \bullet): eugenol > dehydrodieugenol > isoeugenol. The nanostructured formulations antioxidants promoted the protection against UV-C photodegradation when compared to a hydroethanolic solution. The increased stability NC compared to the free solution can be attributed to the high absorption of polyester poly- ϵ -caprolactone in the UV-C.

In the presence of HO \bullet radical, the dehydrodieugenol was antioxidant the most active antiradicalar, followed by eugenol and isoeugenol. Antioxidants encapsulated in nanocapsules and nanoemulsions have a prolonged radical scavenging activity compared with the solution of eugenol and its derivatives.

Cell viability test shows that the nanostructured systems (NC and NE) were not toxic for antioxidant concentration at up to 1 mg mL⁻¹. This low cytotoxicity of the samples indicates that the nanocapsules and nanoemulsions prepared in this work may be considered favorable substrate for viable cell.

Keywords: Eugenol. Isoeugenol. Dehydrodieugenol. Nanoparticles. Photolysis. Kinetics of decomposition.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alguns radicais importantes nos organismos vivos e seus tempos de meia-vida estimados.....	37
Tabela 2 – Constantes cinéticas do eugenol e os tempos de meia-vida calculados pelo acompanhamento dos decaimentos cromatográficos.....	70
Tabela 3 – Constantes cinéticas do isoeugenol e os tempos de meia-vida calculados pelo acompanhamento dos decaimentos cromatográficos.....	71
Tabela 4 – Constantes cinéticas do dehidrodieugenol e os tempos de meia-vida calculados pelo acompanhamento dos decaimentos cromatográficos...	71
Tabela 5 – Constantes cinéticas do eugenol e isoeugenol, e seus respectivos tempos de meia-vida calculados pelo acompanhamento dos decaimentos no UV-Vis.....	81
Tabela 6 – Constantes cinéticas do eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol, e seus respectivos tempos de meia-vida calculados pelo acompanhamento dos decaimentos na fluorescência.	87
Tabela 7 – Propriedades físico-químicas das nanoestruturas (NC e NE): teor de antioxidante, eficiência de encapsulamento e pH (n=3).....	91
Tabela 8 – Propriedades físico-químicas das nanoestruturas (NC e NE): raio hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta (n=3)	91

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – a) Fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à membrana polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. (Adaptado de SCHAFFAZICK, S.R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003).....32
- Figura 2 – Procedimento geral dos diferentes métodos para a preparação das nanocápsulas. (Adaptado de MORA-HUERTAS, C. E. et al. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010).....34
- Figura 3 – Percursos de formação de EROs, do processo de peroxidação lipídica e do papel da glutatona (GSH) e outros antioxidantes (vitamina C, vitamina E, ácido lipóico) na gestão do estresse oxidativo (equações não-balanceadas). (Adaptado de VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007)36
- Figura 4 – Redução do oxigênio molecular na mitocôndria com formação de água. (Adaptado de FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997)37
- Figura 5 – Estrutura química dos antioxidantes estudados neste trabalho: a) eugenol, b) isoeugenol e c) dehidrodieugenol.38
- Figura 6 – Estrutura química do eugenol, isoeugenol e seus intermediários (Adaptado de ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and

isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. Toxicology in Vitro , v. 19, p. 1025, 2005)	40
Figura 7 – Reação do DPPH com espécies antioxidantes.	42
Figura 8 – Fluxograma do método ANCOMROS empregado para a determinação da capacidade antioxidante total contra o radical peroxil (Adaptado de: AMADO, L. L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. Science of the Total Environment , v. 407, p. 2115-2123, 2009; TAKANASHI et al. Fluorophotometric Quantitation of Oxidative Stress in the Retina In Vivo. Investigative Ophthalmology & Visual Science , v. 38, p. 2721-2728, 1997).	44
Figura 9 – Fluxograma do método ANCOMROS empregado para a determinação da capacidade antioxidante total contra o radical hidroxil (Adaptado de: AMADO, L. L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. Science of the Total Environment , v. 407, p. 2115-2123, 2009; TAKANASHI et al. Fluorophotometric Quantitation of Oxidative Stress in the Retina In Vivo. Investigative Ophthalmology & Visual Science , v. 38, p. 2721-2728, 1997).	45
Figura 10 – Estrutura do surfactante monoestearato de sorbitano (Span 60).	47
Figura 11 – Estrutura do surfactante polisorbato 80.....	47
Figura 12 – Procedimento geral do método de deposição interfacial para a preparação das nanocápsulas.	50
Figura 13 – Redução do MTT em cristais de formazan pela succinato desidrogenase.	58
Figura 14 – Curva de concentração do DPPH no $\lambda=515$ nm.....	60
Figura 15 – Decaimento da absorbância da solução de 1×10^{-4} mol L ⁻¹ de DPPH com $2,5 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ de eugenol.....	61

Figura 16 – Comportamento cinético do DPPH frente às diferentes concentrações de eugenol.....	62
Figura 17 – Decaimento da absorvância da solução de 1×10^{-4} mol L ⁻¹ de DPPH com $2,5 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ de isoeugenol.	62
Figura 18 – Comportamento cinético do DPPH frente às diferentes concentrações de isoeugenol.	63
Figura 19 – Comportamento cinético do DPPH frente às diferentes concentrações de dehidrodieugenol.....	64
Figura 20 – Porcentagem de atividade antioxidante do eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol nas diferentes concentrações.	65
Figura 21 – Decaimento cromatográfico do eugenol livre frente à fotólise na ausência de H ₂ O ₂ . Condições de análise: fase estacionária C18 Dionex (4,6mm x 150mm x 5µm), fase móvel acetonitrila 40% (v/v), pH≈6,0, com fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , injeção de 20 µL e pressão variável.	67
Figura 22 – Decaimento cromatográfico do isoeugenol livre frente à fotólise na ausência de H ₂ O ₂ . Condições de análise: fase estacionária C18 Dionex (4,6mm x 150mm x 5µm), fase móvel acetonitrila 40% (v/v), pH≈6,0, com fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , injeção de 20 µL e pressão variável.....	68
Figura 23 – Decaimento cromatográfico do dehidrodieugenol livre frente à fotólise na ausência de H ₂ O ₂ . Condições de análise: fase estacionária C18 Dionex (4,6mm x 150mm x 5µm), fase móvel acetonitrila 70% (v/v), pH≈6,0, com fluxo de 0,8 mL min ⁻¹ , injeção de 20 µL e pressão variável.....	68
Figura 24 – Decaimento cinético das soluções hidroetanólicas de eugenol (SE), isoeugenol (SI) e dehidrodieugenol (SD) e das suspensões de nanocápsulas contendo eugenol (E-NC), isoeugenol (I-NC) e dehidrodieugenol (D-NC).....	69
Figura 25 – Estrutura química dos flavonóides: a) rutina, b) quercetina e c) fisetina.	69

Figura 26 – Cromatograma do decaimento cinético da nanoemulsão contendo dehidrodieugenol.....	72
Figura 27 – Espectro de absorção UV-Vis do polímero PCL, dos filmes de NC e NE e das dispersões coloidais (NC e NE) preparadas sem os antioxidantes. 74	
Figura 28 – Curva de calibração do peróxido de hidrogênio, utilizada para quantificação da fotodecomposição do H ₂ O ₂	76
Figura 29 – Quantificação da fotodecomposição do H ₂ O ₂ frente à fotólise; [H ₂ O ₂] ₀ = 0,029 mol L ⁻¹	76
Figura 30 – Cromatograma do decaimento cinético da solução hidroetanólica de dehidrodieugenol, na presença de H ₂ O ₂	77
Figura 31 – Decaimento cinético das soluções hidroetanólicas de eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol e das soluções de nanocápsulas contendo eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol na presença de H ₂ O ₂ (SE + H ₂ O ₂ , SI + H ₂ O ₂ , SD + H ₂ O ₂ , E-NC + H ₂ O ₂ , I-NC + H ₂ O ₂ e D-NC + H ₂ O ₂ , respectivamente).....	78
Figura 32 – Decaimento da absorbância do eugenol na concentração de 3,5x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	79
Figura 33 – Decaimento da absorbância do isoeugenol na concentração de 1x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	80
Figura 34 – Decaimento da absorbância do dehidrodieugenol na concentração de 2x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	80
Figura 35 – Espectros de excitação e emissão do eugenol.	82
Figura 36 – Espectros de emissão fluorescente do eugenol na ausência do H ₂ O ₂ , λ _{excit} = 232 nm.....	83
Figura 37 – Espectros de emissão fluorescente do eugenol na presença do H ₂ O ₂ , λ _{excit} = 232 nm.....	83
Figura 38 – Espectros de excitação e emissão do isoeugenol.....	84

Figura 39 – Espectros de emissão fluorescente do isoeugenol na ausência do H ₂ O ₂ , $\lambda_{\text{excit}} = 258 \text{ nm}$	84
Figura 40 – Espectros de emissão fluorescente do isoeugenol na presença do H ₂ O ₂ , $\lambda_{\text{excit}} = 258 \text{ nm}$	85
Figura 41 – Espectros de excitação e emissão do dehidrodieugenol.....	86
Figura 42 – Espectros de emissão fluorescente do dehidrodieugenol na ausência do H ₂ O ₂ , $\lambda_{\text{excit}} = 230 \text{ nm}$	86
Figura 43 – Espectros de emissão fluorescente do dehidrodieugenol na presença do H ₂ O ₂ , $\lambda_{\text{excit}} = 230 \text{ nm}$	87
Figura 44 – Distribuição do raio hidrodinâmico das nanocápsulas de isoeugenol em triplicata.....	90
Figura 45 – Distribuição do potencial zeta das nanocápsulas de isoeugenol em triplicata.....	90
Figura 46 – Raio hidrodinâmico das nanocápsulas de eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol em função do tempo.	93
Figura 47 – Índice de polidispersão das nanocápsulas de eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol em função do tempo.	93
Figura 48 – Potencial zeta das nanocápsulas de eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol em função do tempo.	94
Figura 49 – I(q) versus vetor de onda para as nanocápsulas (NC), nanoemulsões (NE) e surfactantes (Span 60 e Tween 80).	95
Figura 50 – I(q) versus vetor de onda para a nanocápsula em branco (NC) e para a nanocápsula carregada com eugenol (E-NC).	95
Figura 51 – I(q) versus vetor de onda para as nanocápsulas (NC) em função da temperatura.....	96

- Figura 52 – I(q) versus vetor de onda para as nanoemulsões (NE) em função da temperatura.....96
- Figura 53 – Viabilidade de células expostas as nanocápsulas de eugenol (0,5 - 2 mg mL⁻¹) com 10 mg mL⁻¹ de polímero, pelo período de 1 e 4 horas. Os valores do controle de viabilidade estão representados pela linha pontilhada.....98
- Figura 54 – Viabilidade de células expostas as nanocápsulas de isoeugenol (0,5 - 2 mg mL⁻¹) com 10 mg mL⁻¹ de polímero pelo período de 1 e 4 horas. Os valores do controle de viabilidade estão representados pela linha pontilhada.....98
- Figura 55 – Viabilidade de células expostas as nanocápsulas sem o antioxidante, com diferentes concentrações do polímero PCL (2 - 10 mg mL⁻¹) pelo período de 1 e 4 horas. Os valores do controle de viabilidade estão representados pela linha pontilhada.....99
- Figura 56 – Viabilidade de células expostas as nanocápsulas de eugenol (0,5 mg mL⁻¹) com diferentes concentrações de polímero (2 - 10 mg mL⁻¹) pelo período de 1 e 4 horas. Os valores do controle de viabilidade estão representados pela linha pontilhada.....99
- Figura 57 – Viabilidade de células expostas as nanocápsulas de isoeugenol (0,5,mg mL⁻¹) com diferentes concentrações de polímero (2 - 10 mg mL⁻¹) período de 1 e 4 horas. Os valores do controle de viabilidade estão representados pela linha pontilhada..... 100
- Figura 58 – Viabilidade de células expostas as nanoemulsões de eugenol (0,5 mg mL⁻¹), isoeugenol (0,5 mg mL⁻¹) e a nanoemulsão sem o antioxidante, pelo período de 1 e 4 horas. Os valores do controle de viabilidade estão representados pela linha pontilhada..... 100
- Figura 59 – RMN ¹H do dehidrodieugenol.....115
- Figura 60 – Decaimento da absorbância da solução de 1x10⁻⁴ mol L⁻¹ de DPPH com 5x10⁻⁵ mol L⁻¹ de eugenol..... 116

Figura 61 - Decaimento da absorvância da solução de 1×10^{-4} mol L ⁻¹ de DPPH com 1×10^{-4} mol L ⁻¹ de eugenol.....	116
Figura 62 - Decaimento da absorvância da solução de 1×10^{-4} mol L ⁻¹ de DPPH com 5×10^{-5} mol L ⁻¹ de isoeugenol.....	117
Figura 63 - Decaimento da absorvância da solução de 1×10^{-4} mol L ⁻¹ de DPPH com 1×10^{-4} mol L ⁻¹ de isoeugenol.....	117
Figura 64 – Cromatograma do decaimento cinético da nanocápsula contendo eugenol.....	118
Figura 65 – Cromatograma do decaimento cinético da nanocápsula contendo isoeugenol.....	118
Figura 66 – Cromatograma do decaimento cinético da nanocápsula contendo dehidrodieugenol.....	119
Figura 67 - Cromatograma do decaimento cinético da nanoemulsão contendo eugenol.....	119
Figura 68 - Cromatograma do decaimento cinético da nanoemulsão contendo isoeugenol.....	120
Figura 69 – Cromatograma do decaimento cinético da nanocápsula contendo eugenol, na presença de H ₂ O ₂	120
Figura 70 – Cromatograma do decaimento cinético da nanocápsula contendo isoeugenol, na presença de H ₂ O ₂	121
Figura 71 – Decaimento da absorvância do eugenol na concentração de $3,5 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ , na presença de H ₂ O ₂	122
Figura 72 – Decaimento da absorvância do isoeugenol na concentração de 1×10^{-4} mol L ⁻¹ , na presença de H ₂ O ₂	122
Figura 73 – Distribuição do raio hidrodinâmico das nanocápsulas de eugenol em triplicata.....	123

Figura 74 – Distribuição do raio hidrodinâmico das nanocápsulas de dehidrodieugenol em triplicata.....	123
Figura 75 – Distribuição do potencial zeta das nanocápsulas de eugenol em triplicata.....	124
Figura 76 – Distribuição do potencial zeta das nanocápsulas de dehidrodieugenol em triplicata.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
ABAP	2,2'-azobis,2-metilpropionamidina dihidroclorato
Abs	Absorbância
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANCOMROS	Capacidade antioxidante contra os radicais peroxil e hidroxil
CAT	Catalase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
D	Dehidrodieugenol
DCFH₂-DA	2',7' diclorofluoresceína diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
E	Eugenol
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA	Administração de Alimentação e Medicamentos
GPx	Glutathione peroxidase
I	Isoeugenol
k	Constante cinética
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NC	Nanocápsula
NE	Nanoemulsão
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução tampão fosfato
PCL	Poli-ε-caprolactona
PGA	Poli(ácido glicólico)
PHB	Poli(hidroxibutirato)
PLA	Poli(ácido láctico)
PLA-co-PEG	Poli(ácido láctico-co-etileno glicol)
PLA-co-PGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
R_h	Raio hidrodinâmico
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixos ângulos

SDH	Succinato desidrogenase
SOD	Superóxido dismutase
Span 60	Monoestearato de sorbitano
TCM	Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico
Tween 80	Polisorbato 80
UV	Radiação ultravioleta
Vis	Radiação visível
β-CD	β -ciclodextrina
ξ	Potencial zeta

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Espectro de RMN ¹ H do dehidrodieugenol.....	115
ANEXO B – Espectrofotogramas do decaimento da absorbância da reação do DPPH frente ao eugenol e seus derivados.....	116
ANEXO C – Cromatogramas.....	118
ANEXO D – Espectrofotogramas do decaimento da absorbância das soluções de eugenol e isoeugenol na presença de H ₂ O ₂	122
ANEXO E – Gráficos de tamanho de partícula e potencial zeta.....	123

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 Nanotecnologia: sistemas nanoestruturados.....	31
3.2 Antioxidantes e os radicais	35
3.3 Atividade antioxidante	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Reagentes e soluções.....	47
4.2 Síntese do dehidrodieugenol	48
4.3 Ensaio da capacidade antioxidante frente ao DPPH	49
4.4 Preparação das nanoestruturas.....	49
4.5 Caracterização físico-química das nanoestruturas	51
4.5.1 Determinação do teor de antioxidante e eficiência de encapsulamento	51
4.5.2 Determinação do pH, raio hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta.....	52
4.5.3 Análise dos aspectos estruturais por SAXS	52
4.6 Reator fotoquímico.....	53
4.7 Ensaio por Espectrofotometria UV-Vis.....	53

4.8 Ensaio por Espectrofotometria de Fluorescência	54
4.9 Ensaio por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	54
4.10 Atividade antirradicalar frente ao radical HO•	55
4.11 Estudo <i>in-vitro</i> de viabilidade celular	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 Análise quantitativa da atividade antioxidante do eugenol e seus derivados frente ao radical DPPH.....	60
5.2 Fotoestabilidade dos compostos fenólicos	65
5.2.1 Perfil cinético reacional do eugenol e seus derivados, encapsulados e não encapsulados na ausência e na presença do radical HO•	66
5.2.1.1 Ensaio por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	66
5.2.1.2 Ensaio por espectrofotometria UV-Vis.....	79
5.2.1.3 Ensaio por espectrofotometria de fluorescência	82
5.3 Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados.....	88
5.3.1 Teor de antioxidante, eficiência de encapsulamento, raio hidrodinâmico, índice de polidispersão, mobilidade, potencial zeta e pH	88
5.3.2 Estabilidade físico-química das nanocápsulas em função do tempo.....	92
5.3.3 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).....	94
5.3.4 Resultados da viabilidade celular	96
6 CONCLUSÕES.....	102
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
8 ANEXOS.....	115

1 INTRODUÇÃO

O corpo humano é continuamente exposto a radicais derivados do oxigênio, chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs), de origem endógena ou exógena, os quais podem levar ao estresse oxidativo. As EROs formam a classe mais importante de espécies de radicais gerados em sistemas vivos. No organismo, as EROs são derivadas do metabolismo celular aeróbico do oxigênio que resulta na formação de água. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperóxil ($HO_2^{\bullet-}$), hidroxil (HO^{\bullet}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).¹

Além disso, as EROs podem ser geradas na prática de exercícios físicos extenuantes, por reações inflamatórias, lesões isquêmicas e oxidação do colesterol (LDL). As fontes externas de EROs incluem as radiações ionizantes (raio-x e raio- γ), luz ultravioleta, calor, fumaça do cigarro, solventes orgânicos e pesticidas, ingestão de bebidas alcoólicas, medicamentos como morfina e alucinógenos (cocaína), contaminação por metais como chumbo, alumínio, mercúrio e ferro.²

Descobertas recentes têm mostrado que as EROs em baixas concentrações são indispensáveis em muitos processos biológicos, tais como: produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, mensagens intracelulares, diferenciação celular, apoptose, imunidade e defesa contra micro-organismos.^{3,4}

Em condições normais, existe um equilíbrio entre os níveis de radicais e os níveis de espécies antioxidantes, o qual é essencial para a sobrevivência e saúde dos organismos. Contudo, o estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio na quantidade de EROs, ou seja, a geração de EROs excede a capacidade do sistema biológico de eliminar os intermediários reativos ou reparar os danos causados por eles,⁵ e/ou há um decréscimo das defesas antioxidantes do organismo.⁶ O estresse oxidativo tem sido associado a uma lista crescente de doenças, tais como as cardiovasculares e as neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), artrites, câncer, catarata, choque hemorrágico e envelhecimento.^{5,7}

Normalmente, as células do organismo são capazes de se defender contra os danos produzidos pelas EROs com a utilização de substâncias de origem endógena, como as enzimas (glutathione peroxidase, superoxidase dismutase, catalases,

lactoperoxidases e peroxirredoxinas), ou de origem exógena, como o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), β -caroteno, licopeno, selênio, carotenoides e compostos fenólicos (por exemplo, resveratrol, rutina e eugenol). Estas moléculas provenientes da dieta alimentar desempenham um importante papel como antioxidantes celulares.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devido as suas propriedades redutoras e estrutura química.⁸ Eles funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na de propagação dos processos oxidativos. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias.

O eugenol, o isoeugenol e o dehidrodieugenol são compostos fenólicos que apresentam propriedades antioxidantes, antibacterianas, anestésicas, analgésicas, antialérgicas e anti-inflamatórias.⁹⁻¹⁴ O eugenol e seus derivados são eficazes para prevenir a peroxidação lipídica e inibir a atividade de algumas enzimas, como a xantina-oxidase (cuja função é catalisar a oxidação da hipoxantina em xantina e a formação de ácido úrico a partir da xantina). Contudo estes compostos podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições. Publicações recentes têm mostrado que os compostos eugenol e isoeugenol quando expostos a radiação visível geram grandes quantidades de EROs devido a produção de radicais fenoxil.¹⁵ Além disso, alguns trabalhos têm mostrado que a inclusão molecular do eugenol em β -ciclodextrina¹⁶⁻¹⁸ ou em nanocápsulas poliméricas¹⁹ protege este composto fenólico da oxidação induzida por luz visível, durante o armazenamento.

Sistemas nanoestruturados (NC e NE) podem ser empregados com a finalidade de modificar a biodisponibilidade e distribuição de fármacos. Eles apresentam uma alta área superficial, o que os torna altamente eficazes para o encapsulamento de substâncias lipofílicas, podendo promover uma liberação homogênea do fármaco²⁰. O eugenol e seus derivados apresentam uma baixa solubilidade em água, e o seu encapsulamento pode ser uma alternativa para aumentar a sua biodisponibilidade. O uso destes compostos em sistemas nanoestruturados é ainda pouco estudado.

Visto que, até o presente momento, não existe nenhum trabalho publicado na literatura que investiga a cinética de fotodegradação dos antioxidantes eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol encapsulados em nanoestruturas, e a atividade

antirradicalar destes compostos frente ao radical HO•, gerado fotoquimicamente, este trabalho tem por objetivo preparar nanocarreadores com diferentes organizações estruturais (nanocápsulas e nanoemulsões), verificar a capacidade destas estruturas em aumentar a fotoestabilidade do eugenol e seus derivados frente à radiação UV-C e determinar a ação antirradicalar frente ao radical HO•, gerado artificialmente pela decomposição do peróxido de hidrogênio.

A administração de eugenol e seus derivados por meio de nanovetores pode ser útil para diminuir os efeitos adversos de EROs geradas a partir de fontes exógenas, evitando o estresse oxidativo. Desta maneira, as propriedades antioxidantes benéficas destes compostos fenólicos nanoencapsulados podem ser aproveitadas na indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo avaliar a cinética de decomposição fotolítica e atividade antirradicalar dos compostos eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol, livres e encapsulados, em nanocápsulas e nanoemulsões.

2.2 Objetivos Específicos

- Síntese do dehidrodieugenol, a partir do eugenol;
- Avaliar a atividade antioxidante das soluções de eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol frente ao radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil);
- Determinar as constantes de decomposição fotolítica do eugenol e seus derivados, livres e encapsulados em nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona e em nanoemulsões, na presença e na ausência do radical HO•, utilizando-se as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), espectroscopia UV-Vis e de fluorescência;
- Realizar a caracterização físico-química das nanoestruturas (NC e NE) por meio da determinação de seu conteúdo de droga, eficiência de encapsulamento, pH, raio hidrodinâmico (R_h), índice de polidispersão, potencial zeta (ξ) e da estabilidade em função do tempo;
- Avaliar os aspectos estruturais das nanoestruturas destes sistemas por medidas de espalhamento de raios-x a baixos ângulos (SAXS);
- Avaliar a viabilidade celular, através da realização de testes “*in vitro*” da redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], após o tratamento das células com as nanoestruturas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Nanotecnologia: sistemas nanoestruturados

A nanotecnologia pode ser definida como um campo científico multidisciplinar baseado no desenvolvimento, na caracterização, na produção e na aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas com forma e tamanho na escala nanométrica.²¹ As nanopartículas poliméricas são dispersões coloidais que apresentam um diâmetro que varia de 10 a 1000 nm.²²

Na última década, um grande número de trabalhos tem sido devotado ao estudo de nanopartículas poliméricas visando aplicações terapêuticas, sendo planejados principalmente para administração oral, parenteral, tópica e oftálmica.^{23,24} Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de genes e fármacos, tais como os antioxidantes¹⁹, os anticancerígenos²⁵ e os antibióticos²⁶. O encapsulamento dos agentes terapêuticos visa: (a) diminuir os efeitos colaterais, como a irritação da mucosa intestinal, (b) promover a proteção da droga contra a degradação catalisada por luz durante o armazenamento, (c) evitar a degradação da droga no trato gastrointestinal, devido ao pH, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos, (d) controlar a taxa de liberação dos fármacos diminuindo os efeitos colaterais devido à absorção sistêmica, bem como (e) aumentar a estabilidade de substâncias ativas.²⁷

As principais características que as nanopartículas poliméricas devem possuir para serem utilizadas em sistemas de liberação de agentes terapêuticos são: biocompatibilidade, não serem imunogênicas e, dependendo da via de administração, se degradarem em metabólitos que são absorvidos ou excretados pelo organismo.^{28,29}

Neste campo de pesquisa, três tipos de sistemas são utilizados para a preparação de nanopartículas: polímeros naturais, polímeros sintéticos e lipídios.³⁰ Cada sistema possui suas próprias características com relação ao tempo de circulação, degradação, capacidade de armazenamento e perfil de liberação do fármaco.³¹

Os polímeros sintéticos têm como vantagem sobre os polímeros naturais a alta pureza e reprodutibilidade. Dentre os polímeros sintéticos, a família dos poliésteres é de grande interesse devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, (promovem a sua biodegradação *in vivo* e conseqüente remoção do organismo). Os poliésteres mais utilizados para a produção das nanopartículas são o poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(hidroxibutirato) (PHB) e copolímeros como poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLA-co-PGA), poli(ácido lático-co-etileno glicol) (PLA-co-PEG).³² A degradação destes materiais produz os correspondentes hidroxiácidos, tornando-os seguros para utilização *in vivo*.

As nanopartículas poliméricas podem ser classificadas como nanocápsulas e nanoesferas, as quais podem atuar como nanocarreadores, e que diferem entre si segundo a composição e a organização estrutural. As nanocápsulas apresentam uma estrutura tipo vesicular e as nanoesferas uma estrutura tipo matriz,³³ conforme ilustrado na Figura 1.

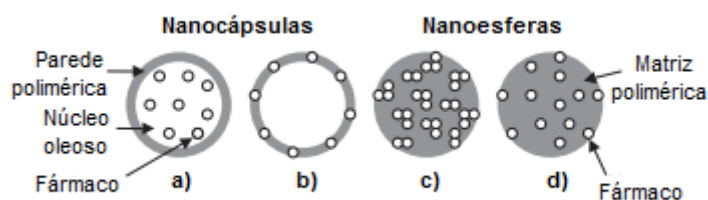


Figura 1 – a) Fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à membrana polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. (Adaptado de SCHAFFAZICK, S.R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003).

Nanocápsulas podem ser comparadas a sistemas vesiculares, nos quais o fármaco é confinado numa cavidade constituída de um líquido interno rodeado por um invólucro polimérico.²⁷ Contudo, de um ponto de vista mais geral, as nanocápsulas podem ser definidas como sistemas nanovesiculares que apresentam uma estrutura tipo coroa-núcleo, na qual o fármaco é confinado em um reservatório,

rodeado por uma membrana polimérica. Além disso, levando-se em conta as limitações operacionais do método de preparação das nanocápsulas, o fármaco pode estar também adsorvido à parede polimérica.³⁴ A cavidade pode conter o princípio ativo na forma sólida, líquida ou como uma dispersão molecular.³⁵ Conforme o método de preparação e as matérias-primas empregadas, o reservatório pode ser lipofílico ou hidrofílico.

Por outro lado, as nanoesferas são aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica (agregação física), a qual não apresenta líquido interno em sua composição.³⁶⁻³⁸ As nanocápsulas e nanoesferas são estabilizadas por surfactantes (tensoativos) na interface partícula/água, os quais ajudam a impedir a aglomeração destas partículas.

Da mesma forma que as nanopartículas poliméricas, as nanoemulsões também têm sido investigadas como nanocarreadores de fármacos. Estes sistemas coloidais são preparados sem o polímero e constituídos por nanogotas oleosas estabilizadas por surfactantes em meio aquoso.⁵

Diferentes métodos para a preparação de nanopartículas têm sido descritos na literatura, os quais têm evoluído no sentido da utilização de solventes e componentes menos tóxicos e na simplificação do processo, objetivando-se aperfeiçoar as técnicas em termos de rendimento e de eficiência de encapsulamento de fármacos.³⁰ Estes diferentes métodos permitem a modulação da estrutura, da composição e das propriedades fisiológicas das nanopartículas.

A escolha do método de preparo e o eficiente desenvolvimento de formulações de nanopartículas poliméricas dependem da escolha do sistema polimérico mais apropriado para se obter um máximo encapsulamento e da solubilidade do fármaco a ser encapsulado. Estes métodos podem ser classificados em duas categorias principais, sendo elas, a polimerização *in situ* de monômeros dispersos³⁹ e a dos polímeros pré-formados.^{40,41} Independentemente do método de preparação, os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas. Neste trabalho foi utilizado o método do polímero pré-formado para a preparação das nanocápsulas, por isso será abordado a seguir.

Genericamente, existem seis métodos clássicos para a preparação de nanopartículas a partir dos polímeros pré-formados: nanoprecipitação (deposição interfacial ou deslocamento do solvente), emulsão-difusão, dupla emulsão, emulsão-

coacervação, polímero de revestimento e camada por camada (layer-by-layer). O procedimento geral para obtenção de nanopartículas a partir destes métodos é apresentado na Figura 2.

As nanocápsulas preparadas neste trabalho empregam o método da deposição interfacial do polímero pré-formado, desenvolvido por Fessi e colaboradores³⁵ e utilizou-se o poliéster poli- ϵ -caprolactona como membrana polimérica. Este método é amplamente utilizado para encapsulação de fármacos, como anti-inflamatórios e analgésicos,⁴²⁻⁴⁷ antineoplásicos,⁴⁸ antipneumonia,⁴⁹ antibactericida,^{41,43,50} antiacne,⁵¹ antifúngico,^{52,53} anticonvulsivante,⁵⁴ radiomarcador,⁵⁵ imunomodulador,⁵⁶⁻⁵⁹ imunossupressor,⁶⁰ antiestrogênico⁶¹ e antioxidantes.^{5,62,63}

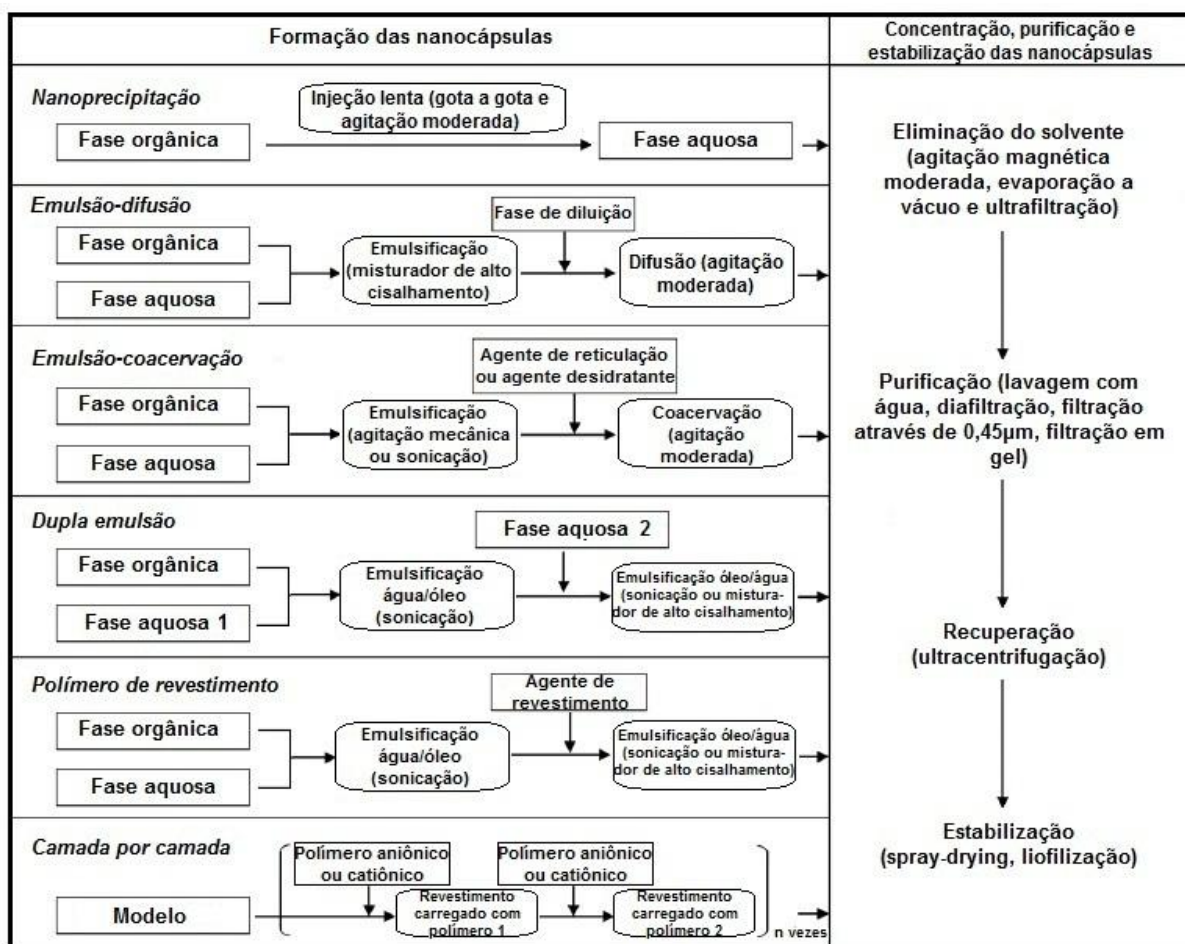


Figura 2 – Procedimento geral dos diferentes métodos para a preparação das nanocápsulas. (Adaptado de MORA-HUERTAS, C. E. et al. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 113-142, 2010).

3.2 Antioxidantes e os radicais

Além da escolha do polímero e do método de preparação das nanocápsulas, outro aspecto importante relacionado aos sistemas envolvendo o encapsulamento de princípios ativos em nanopartículas, é a escolha do fármaco. Nos últimos anos, uma das classes de fármacos mais utilizada nos processos de encapsulamento é a dos chamados antioxidantes, pois previnem o envelhecimento e as doenças degenerativas, relacionadas aos danos causados ao organismo pelos radicais que podem levar a enfermidades como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, diminuição do sistema imunológico e disfunções cerebrais.⁶⁴

Os radicais são átomos ou moléculas, formados em reações de oxido-redução,³ que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Essa configuração faz dos radicais, moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas,⁶ pois podem ceder o elétron desemparelhado, oxidando-se, ou receber outro, reduzindo-se. Com isso, eles propiciam reações em cadeia que terminam alterando a conformação, a estrutura ou as funções de diversos componentes celulares.⁶⁵

O excesso de radicais, nocivos ao organismo, é combatido por compostos antioxidantes produzidos pelo corpo (defesas antioxidantes) ou absorvidos da dieta, que estabilizam ou desativam os mesmos, evitando lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) ou, não-enzimaticamente, a exemplo da glutathione (GSH), peptídeos de histidina e proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina).

São conhecidos três sistemas enzimáticos antioxidantes (Figura 3): o primeiro é composto por dois tipos de enzimas SOD, que catalisam a destruição do radical ânion superóxido, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. O segundo é formado pela enzima CAT que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. O terceiro sistema é composto pela GPx que reduz o peróxido de hidrogênio em água.⁴

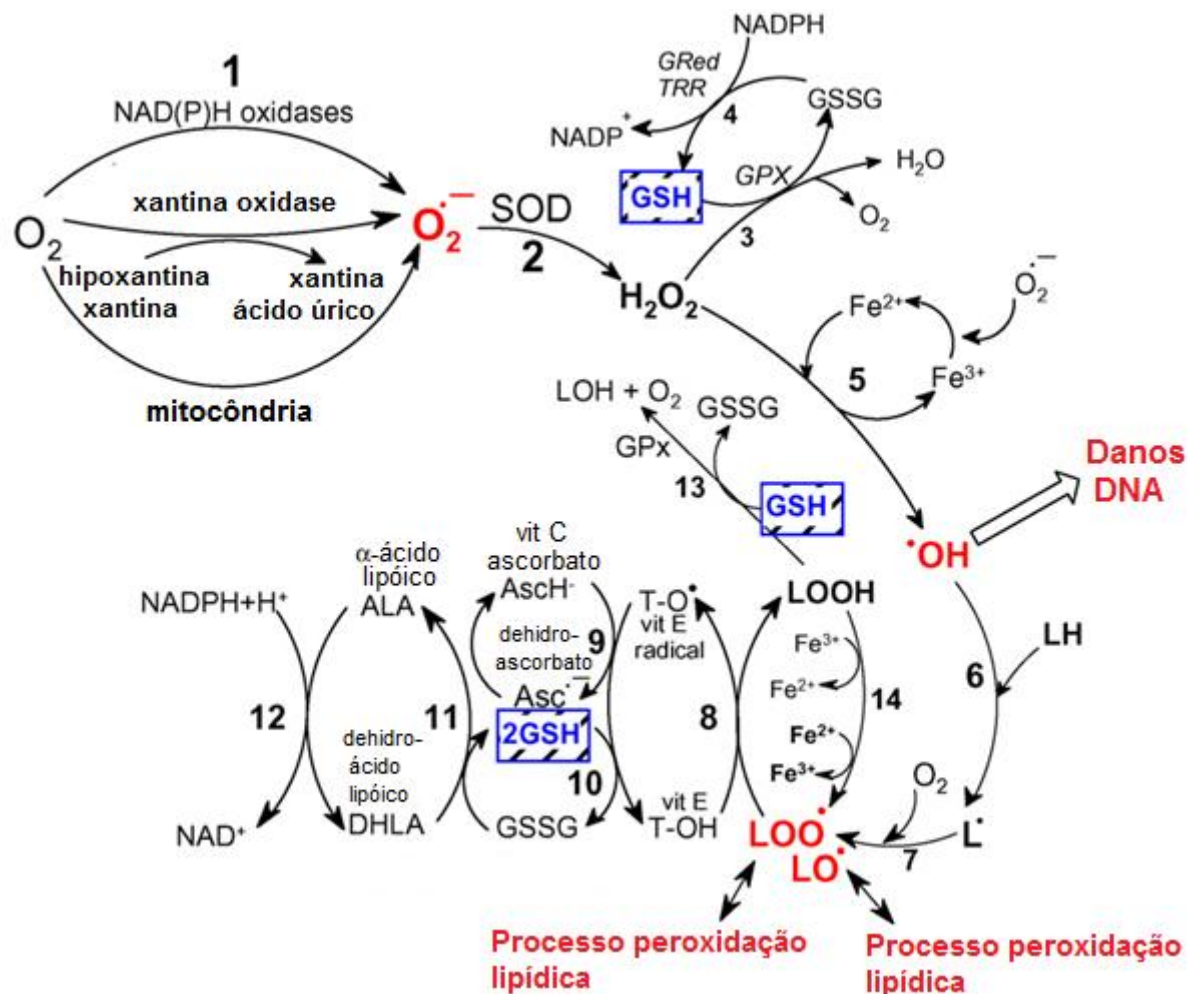


Figura 3 – Percursos de formação de EROs, do processo de peroxidação lipídica e do papel da glutathiona (GSH) e outros antioxidantes (vitamina C, vitamina E, ácido lipóico) na gestão do estresse oxidativo (equações não-balanceadas). (Adaptado de VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007).

Em condições normais do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução na mitocôndria, resultando na formação de H_2O . Durante este processo ocorre a formação de vários intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoxil ($HO_2^{\bullet-}$), hidroxil (HO^{\bullet}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme mostrado na Figura 4. O radical hidroxil é o radical mais reativo conhecido, pelo fato de possuir um tempo de meia-vida muito curto (Tabela 1),⁶⁶ fazendo com que haja uma combinação extremamente rápida deste radical com metais ou outros compostos, no próprio sítio onde foi produzido, confirmando assim, sua alta reatividade. Assim, se o radical HO^{\bullet} for produzido próximo ao DNA, poderão ocorrer

modificações de bases nitrogenadas, levando a inativação ou mutação do DNA. Além disso, o radical HO• pode inativar várias proteínas ao oxidar seus grupos sulfidrílicos formando pontes dissulfeto e iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (lipoperoxidação) das membranas celulares.^{3,67}

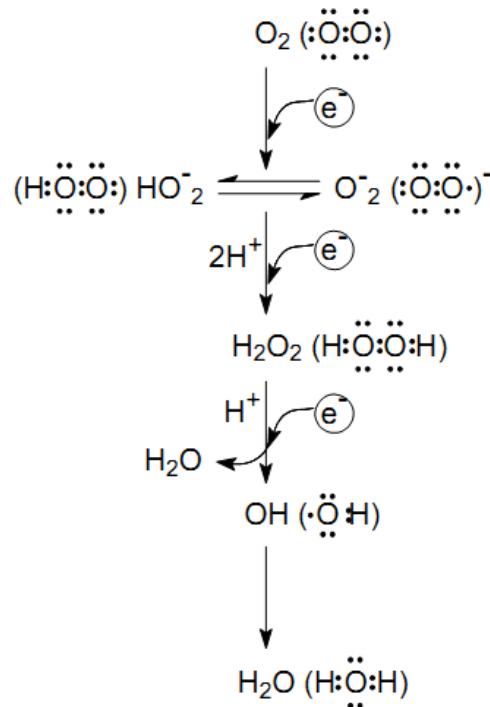


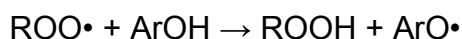
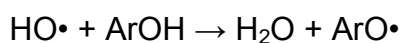
Figura 4 – Redução do oxigênio molecular na mitocôndria com formação de água. (Adaptado de FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997).

Tabela 1 – Alguns radicais importantes nos organismos vivos e seus tempos de meia-vida estimados.

Radical	t ½ (s)
Hidroxil (HO•)	10 ⁻⁹
Alcoxil (RO•)	10 ⁻⁶
Peroxil (ROO•)	10 ⁻¹

Fonte: RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience journal**. v. 21, n. 3, p.133-149, 2005.

Os antioxidantes, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao oxidante, são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos. Basicamente, isto se dá por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres na etapa de iniciação; e o segundo abrange a eliminação dos radicais produzidos na etapa de propagação, como hidroxil (HO•) e peroxil (ROO•), através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia.⁶⁸ Este mecanismo é ilustrado nas reações abaixo:



Devido à importância dos antioxidantes na prevenção das mais diversas doenças no organismo, e considerando a grande variedade de compostos com atividade antirradicalar, escolhemos trabalhar com três antioxidantes da classe dos compostos fenólicos: eugenol (E), isoeugenol (I) e dehidrodieugenol (D), cuja estrutura está representada na Figura 5.

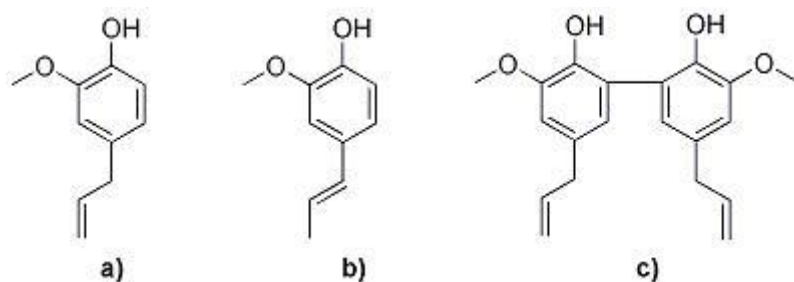


Figura 5 – Estrutura química dos antioxidantes estudados neste trabalho: a) eugenol, b) isoeugenol e c) dehidrodieugenol.

O eugenol e seus derivados possuem capacidade antioxidante para inibir a peroxidação lipídica induzida por espécies reativas de oxigênio.⁹ O eugenol (2-metóxi-4-prop-2-enilfenol ou 4-alil-2-metóxfenol) é um fenilpropanóide conhecido

como essência de cravo, pois está presente em grande quantidade no óleo essencial de cravo da Índia (*Eugenia aromatica*), podendo também ser extraído da canela, pimenta, noz moscada, cânfora, louro e alguns outros óleos naturais. Este composto é amplamente utilizado em odontologia, como material para formar o cimento dentário com óxido de zinco, fazer o capeamento da polpa do dente, restauração temporária e selar o canal da raiz, ou como agente sedativo.¹⁰ É também empregado na indústria de cosméticos. Além disso, este composto apresenta propriedades antioxidantes, analgésicas, antissépticas, antialérgicas, anti-inflamatórias e antibacterianas.¹¹

O isoeugenol (2-metóxi-4-prop-1-enilfenol), um isômero do eugenol, pode ser extraído do cáamo, cananga do Japão (ylang-ylang), manjeriço, cravo, noz-moscada, semente de endro, tabaco, junquilha, sândalo, gardênia, petúnia e outras flores ou pode ser sintetizado pela isomerização do eugenol.¹² Por possuir uma fragrância com o odor picante do cravo, ele é incorporado em vários produtos cosméticos e de higiene pessoal, incluindo perfumes, loções creme, sabonetes e detergentes. Como um agente aromatizante, o isoeugenol é adicionado às bebidas não alcoólicas, alimentos cozidos e gomas de mascar.¹³

O dehidrodieugenol, um dímero do eugenol, é obtido pelo acoplamento oxidativo do eugenol com hexacianoferrato (III) de potássio.¹⁴ Este composto possui também propriedades antimutagênicas, antibacterianas e anti-inflamatórias.

Os comitês de aditivos alimentares da FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação) e da OMS (Organização Mundial da Saúde) têm permitido uma ingestão diária de eugenol para os seres humanos de 2,5 mg/Kg da massa corporal. Este composto é considerado não carcinogênico e não mutagênico e reconhecido como seguro pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos. Por outro lado, um aspecto muito importante em relação ao eugenol e isoeugenol, e que motivou a realização deste trabalho, é o fato de que estes compostos podem apresentar tanto atividade antioxidante como pró-oxidante sob determinadas condições.⁶⁹⁻⁷¹ Em geral, a baixas concentrações, o eugenol atua como um antioxidante com efeitos benéficos de anti-inflamatório. Contudo, a altas concentrações estes compostos podem apresentar diversos efeitos adversos como sensibilização da pele, reações alérgicas e inflamatórias devido a sua capacidade pró-oxidante, possivelmente devido ao estresse oxidativo. Como estes compostos são utilizados diretamente em contato com a pele ou com a mucosa da cavidade

bucal, o estresse oxidativo induzido pela luz e/ou oxigênio molecular pode desempenhar um papel crucial na sua citotoxicidade.¹⁵

A citotoxicidade destes compostos pode ser atribuída a atividade biológica e a estabilidade por ressonância dos radicais fenoxil ($\text{ArO}\cdot$) formados durante a exposição a luz e oxigênio.⁷² A formação dos radicais fenoxil ocorre através do mecanismo de transferência de um elétron. A Figura 6 apresenta as estruturas dos radicais fenoxil formados durante o estresse oxidativo do eugenol e isoeugenol. O radical fenoxil formado a partir do eugenol pode sofrer posterior oxidação a quinonametide, ao passo que o obtido a partir do isoeugenol pode originar um radical benzil. Thompson e colaboradores^{73,74} mostraram que a quinonametide, formada a partir do eugenol, é capaz de ligar-se covalentemente ao grupo tiol das proteínas, formando glutatona conjugados, levando a efeitos citotóxicos pela diminuição da capacidade antioxidante celular em cultura de células vivas.

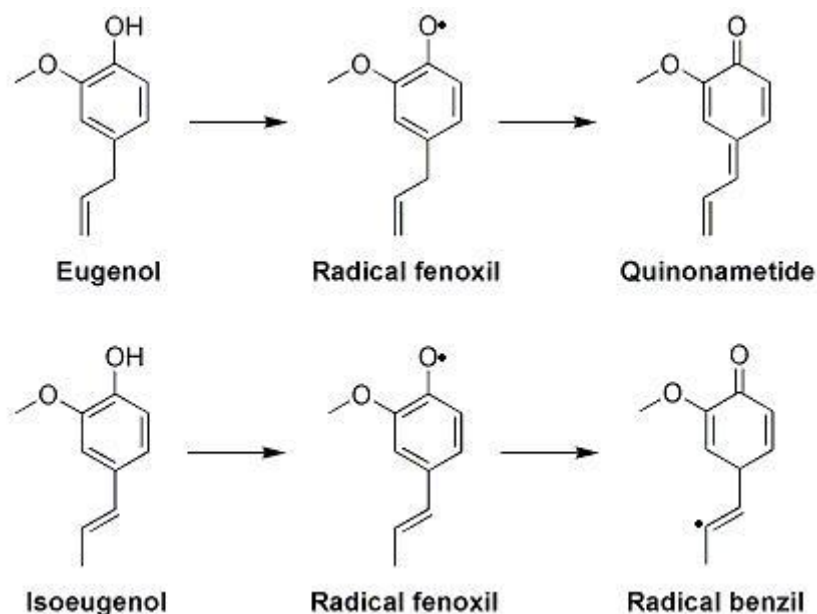


Figura 6 – Estrutura química do eugenol, isoeugenol e seus intermediários (Adaptado de ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 1025, 2005).

Atsumi e colaboradores⁷⁵ demonstraram nos seus experimentos que grande quantidade de EROs foram encontradas quando o eugenol era exposto a luz visível

e/ou em meio alcalino, e que a quantidade de EROs aumentava com o tempo de exposição a radiação visível e/ou com o aumento do pH, resultando num aumento da citotoxicidade. Estes autores sugerem ainda que as EROs sejam produzidas pelos radicais fenoxil do eugenol.

Na literatura, são poucos os trabalhos que têm sido publicados sobre a inclusão do eugenol em β -ciclodextrinas (β -CD)¹⁶⁻¹⁸ ou sua associação em uma matriz, como nas nanopartículas poliméricas.¹⁹ As ciclodextrinas são capazes de formar complexos supramoleculares com uma grande variedade de moléculas de baixa massa molecular, como os compostos fenólicos, e de maneira geral, esta inclusão aumenta a estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade da molécula hóspede.^{76,77}

Zhan e colaboradores¹⁷ mostraram que β -CD forma facilmente complexos de inclusão com eugenol em pH neutro e levemente ácido e que as forças de Van der Waals e as interações hidrofóbicas contribuem para este processo. Choi e colaboradores¹⁹ evidenciaram que o método da emulsão-difusão foi mais efetivo que o método da inclusão em β -CD para proteger o eugenol da oxidação pela luz visível durante o tempo de armazenamento.

3.3 Atividade antioxidante

Uma grande quantidade de radicais é gerada no organismo e os compostos fenólicos e polifenólicos desempenham um importante papel como antioxidantes celulares. A seguir será descrito os mecanismos de atuação dos antioxidantes e os principais métodos utilizados para avaliar a atividade antirradicalar.

A quantificação da atividade antioxidante total é descrita na literatura por diversas metodologias, principalmente, para amostras de fluidos biológicos, extratos de alimentos e plantas, e compostos puros. Cada método varia quanto ao tipo de radical gerado e ao método de detecção e quantificação usado.^{78,79}

Os ensaios antioxidantes podem ser classificados em dois grupos: os métodos diretos (ensaios baseados em estudos de cinética química) e os métodos indiretos (ensaios mediados pela transferência de elétrons).⁸⁰

Os radicais podem ser gerados por processos físico-químicos, químicos ou enzimáticos. Os métodos físico-químicos envolvem técnicas como fotólise ou oxidação fotodinâmica. Já os métodos químicos, utilizam sistemas, por exemplo, reação de Fenton, que contém um agente redutor e um íon metálico. E, por fim, os métodos enzimáticos empregam principalmente as reações da xantina oxidase e da NAD(P)H oxidase na geração de radicais.

Entre as metodologias mais conhecidas para determinação da atividade antioxidante de extratos e substâncias puras, estão os ensaios de captura de radicais, como o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)⁸¹ e o ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)].⁸² O DPPH é um radical estável, de coloração púrpura que absorve num comprimento de onda de 515 nm.⁸³ Na presença de antioxidante, o DPPH recebe H• sofrendo redução, passando a ter uma coloração amarelada, conforme ilustrado na Figura 7. A quantificação do DPPH é realizada utilizando-se a absorbância na região do visível. O ensaio é iniciado pela adição do DPPH à amostra. Então, a capacidade da amostra de reduzir o DPPH, é evidenciada pela porcentagem de DPPH restante no sistema, a qual é inversamente proporcional à concentração de antioxidante.^{84,81}

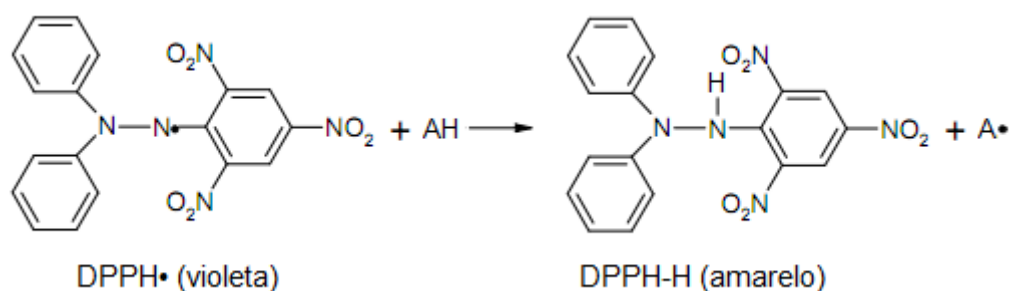


Figura 7 – Reação do DPPH com espécies antioxidantes.

Recentemente, Montserrat e colaboradores⁸⁵ propuseram o método ANCOMROS para a determinação da capacidade antioxidante total, baseada na interação do antioxidante com EROs. A nova metodologia proposta detecta as EROs por fluorescência e emprega o composto DCFH-DA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) como substrato. Resumidamente, o antioxidante é exposto ao radical

peroxil gerado pela decomposição térmica do ABAP (2,2'-azobis,2-metilpropionamida dihidroclorato) na temperatura de 35°C. Ao sistema é adicionado o reagente DCFH-DA, após ter sido desacetilado empregando-se o método de Takanashi,⁸⁶ gerando o composto DCFH. O composto não fluorescente DCFH é oxidado pelo radical peroxil, gerando a molécula fluorescente DCF•, o qual é detectado por uma emissão fluorescente no comprimento de onda de 525 nm quando excitado em 488 nm. A decomposição térmica do ABAP e consequente formação do ROO• é monitorada por 30 min, com leituras a cada 5 min. O esquema geral do método é mostrado na Figura 8. A capacidade antioxidante total (CA_{total}) contra o radical peroxil é estimada utilizando-se a Equação 1.

Equação 1

$$CA_{total} = \frac{(A_{ABAP} - A_{S/ABAP})}{A_{S/ABAP}}$$

onde A_{ABAP} e $A_{S/ABAP}$ representam as áreas do espectro de fluorescência com e sem ABAP, respectivamente. A diferença relativa entre a área com e sem ABAP é considerada uma medida da capacidade antioxidante, com uma alta diferença significando uma baixa capacidade antioxidante, pois altos níveis de fluorescência são obtidos após a adição de ABAP devido a baixa capacidade do antioxidante de neutralizar os radicais peroxil.

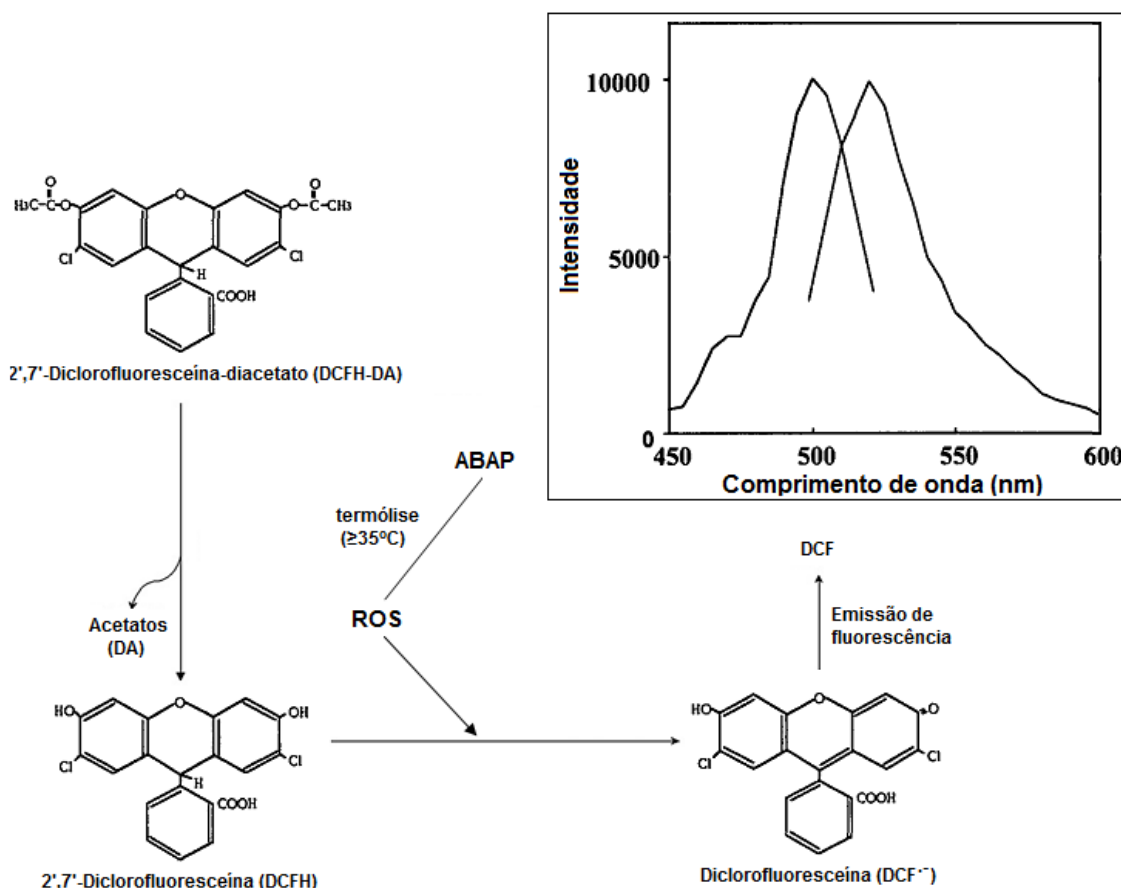


Figura 8 – Fluxograma do método ANCOMROS empregado para a determinação da capacidade antioxidante total contra o radical peroxil (Adaptado de: AMADO, L. L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 2115-2123, 2009; TAKANASHI et al. Fluorophotometric Quantitation of Oxidative Stress in the Retina In Vivo. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 38, p. 2721-2728, 1997).

Outra possibilidade do método ANCOMROS é substituir o ABAP pelo sistema $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, gerando $\text{HO}\cdot$, de acordo com a reação Fenton:



O composto não fluorescente DCFH é oxidado pelo radical hidroxil gerando a molécula fluorescente $\text{DCF}\cdot$, a qual é detectada por uma emissão fluorescente no

comprimento de onda de 525 nm, quando excitado em 488 nm. O esquema geral do método é mostrado na Figura 9.

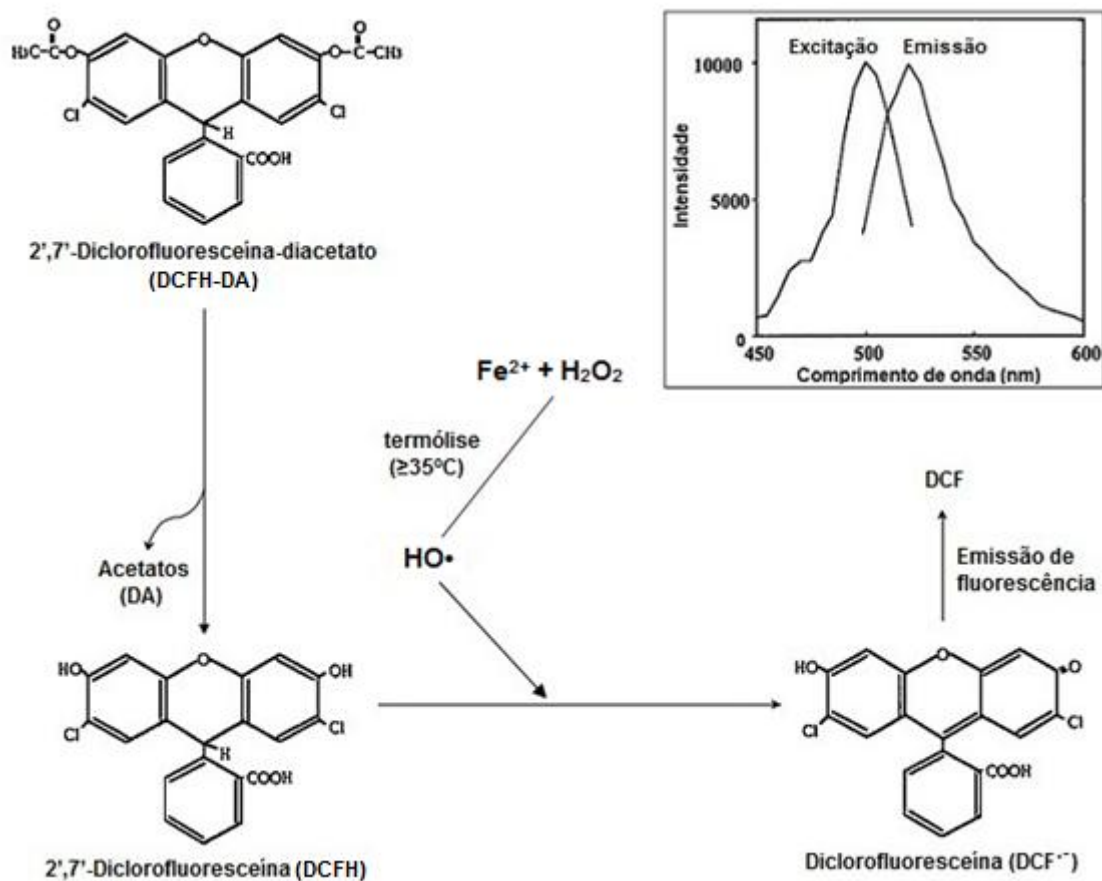


Figura 9 – Fluxograma do método ANCOMROS empregado para a determinação da capacidade antioxidante total contra o radical hidroxil (Adaptado de: AMADO, L. L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 2115-2123, 2009; TAKANASHI et al. Fluorophotometric Quantitation of Oxidative Stress in the Retina In Vivo. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, p. 2721-2728, 1997).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

Todos os solventes (acetonitrila, acetona, etanol e metanol) e reagentes utilizados foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q). Os reagentes eugenol (99%), isoeugenol (98%), hidróxido de amônio (NH₄OH), hexacianoferrato (III) de potássio [K₃Fe(CN)₆], ácido clorídrico (HCl), monoestearato de sorbitano (Span 60), polisorbato 80 (Tween 80), poli-ε-caprolactona (PCL, M_w = 70 kD à 90 kD) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). O peróxido de hidrogênio, H₂O₂, (30% v/v) foi obtido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e os triglicérides dos ácidos cáprico e caprílico (TCM) da Delaware (Porto Alegre, Brasil). A acetonitrila, acetona, metanol e etanol foram adquiridos da Tedia Brazil.

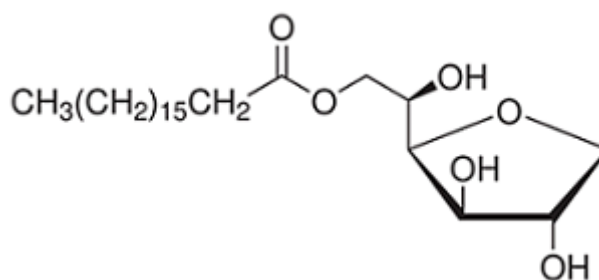


Figura 10 – Estrutura do surfactante monoestearato de sorbitano (Span 60).

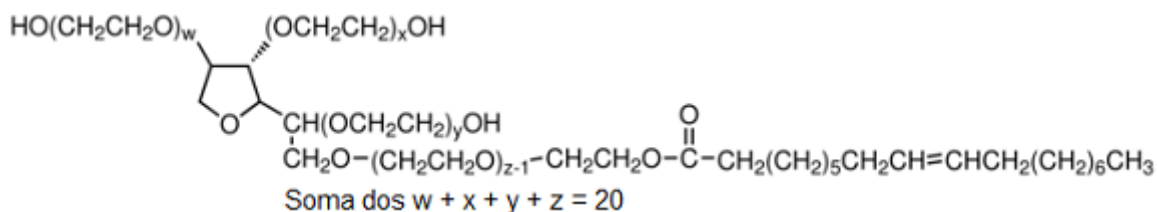
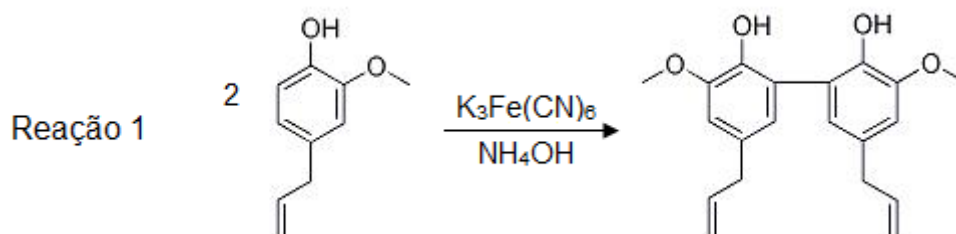


Figura 11 – Estrutura do surfactante polisorbato 80.

As soluções padrão dos antioxidantes eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol foram preparadas em solvente hidroetanólico 10% (v/v) e armazenadas ao abrigo da luz e a baixas temperaturas, quando necessário.

4.2 Síntese do dehidrodieugenol

A síntese do antioxidante dehidrodieugenol foi feita pelo acoplamento oxidativo do eugenol com $K_3Fe(CN)_6$ como agente oxidante (conforme Reação 1), seguindo o método descrito por *De Farias Dias*.^{14,87} A uma solução de eugenol (1,0g, 6,1mmol) em uma mistura de acetona e água (2:1, v/v, 30mL), foram adicionados 18mL de solução aquosa de NH_4OH (28%) e a mistura foi agitada por 10 minutos.



Após, uma solução aquosa saturada de $K_3Fe(CN)_6$ (2,0g, 6,1mmol) foi adicionada a essa mistura, gota a gota, por um período de 4h a 5h, e em seguida, foi acrescentado 18mL de solução aquosa de NH_4OH (28%). A mistura foi agitada por 16h adicionais, à temperatura ambiente, e em seguida neutralizada com HCl 10%. Houve a formação de um precipitado sólido que foi filtrado, lavado três vezes com água ultrapura e seco à temperatura ambiente. O produto bruto foi cristalizado com etanol e após, descolorido com carvão ativado. Em seguida o produto obtido da cristalização foi recristalizado com uma mistura de hexano/diclorometano. Para confirmação da estrutura do composto dehidrodieugenol foi feito espectro de RMN 1H (ver anexo A). Foi feita a seguinte atribuição dos picos de RMN 1H ($CDCl_3/TMS$):

δ 3.352 (d, 4H, $J = 6.602$ Hz, CH₂-7, CH₂-7'), 3.901 (s, 6H, OCH₃-10, OCH₃-10'), 5.038 - 5.115 (m, 4H, CH₂-9, CH₂-9'), 5.928 – 6.029 (m, 2H, CH₂-8, CH₂-8'), 6.716 (d, 2H, $J = 1.956$, CH-2, CH-2'), 6.745 (d, 2H, $J = 1.956$, CH-6, CH-6').

4.3 Ensaio da capacidade antioxidante frente ao DPPH

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante frente ao DPPH foi feita seguindo metodologia descrita na literatura,^{88,89} monitorando-se o consumo do radical DPPH pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorvância das soluções, nos tempos 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 20; 30; 40; 50 e 60 min.

As amostras monitoradas foram preparadas em metanol e analisadas em diferentes concentrações dos antioxidantes ($2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, 5×10^{-5} mol L⁻¹ e 1×10^{-4} mol L⁻¹) e uma concentração inicial de DPPH igual a 1×10^{-4} mol L⁻¹. O monitoramento das medidas de absorvância foi feito em triplicata, na temperatura de 20°C, sob agitação magnética constante, no espectrofotômetro UV-Vis Cary 50 Bio (Varian) e, no comprimento de onda (λ) de 515 nm.

4.4 Preparação das nanoestruturas

As nanocápsulas foram preparadas em triplicata, pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, proposto por Fessi e colaboradores.³⁵ Em um béquer de 100 mL foram dissolvidos em 67mL de acetona, o antioxidante (0,025g), o surfactante Span 60 (0,1915g), o PCL (0,25g) e o TCM (0,825mL), sob agitação magnética, à temperatura de 40°C, por uma hora. Separadamente, o surfactante Tween 80 (0,1915g) foi dissolvido em água (134mL), sob agitação magnética, à temperatura ambiente. Em seguida, a fase orgânica, totalmente solubilizada, foi vertida lentamente e sob agitação moderada, à temperatura ambiente, através de um funil, sobre a fase aquosa. Após, as suspensões foram mantidas sob agitação

moderada durante 10 minutos à temperatura ambiente. O procedimento geral de obtenção das nanocápsulas pelo método da deposição interfacial é ilustrado na Figura 12. A seguir, procedeu-se à evaporação sob pressão reduzida de cada suspensão de nanocápsulas em rotaevaporador (60 rpm e banho termostático de 40°C), chegando a um volume final de 25 mL para eliminação da acetona e ajuste da concentração final do antioxidante (1mg mL^{-1}). Em seguida, as dispersões coloidais foram armazenadas ao abrigo da luz.

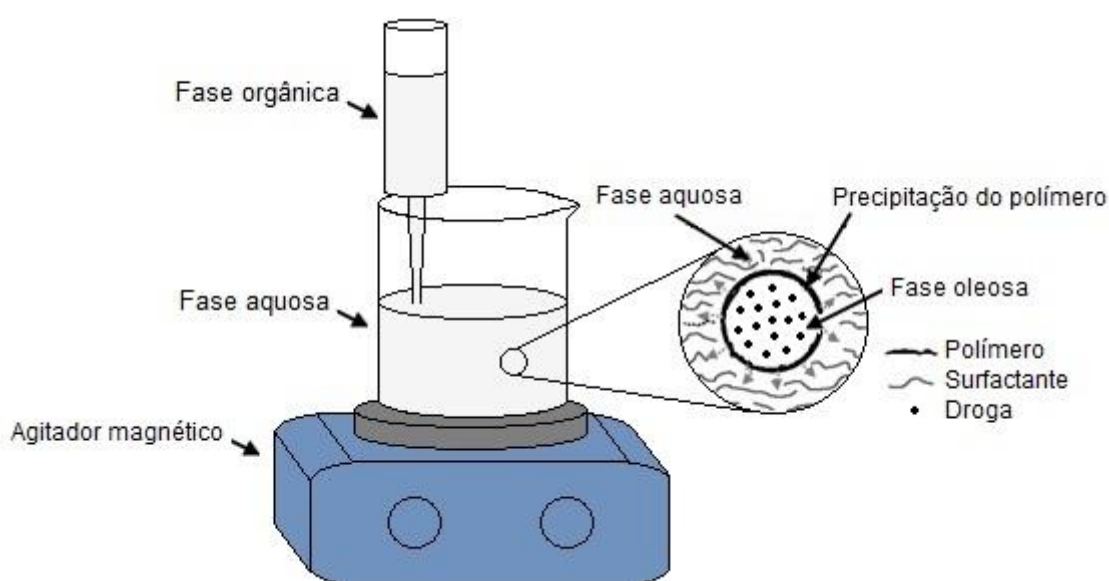


Figura 12 – Procedimento geral do método de deposição interfacial para a preparação das nanocápsulas.

As nanoemulsões foram preparadas pelo método da emulsificação espontânea.⁹⁰ Neste método, o polímero poli- ϵ -caprolactona não está presente na formulação.

Do mesmo modo de preparo das nanoemulsões, contudo sem o óleo e sem o polímero, foram preparadas ainda, dispersões coloidais (nanodispersões) contendo os surfactantes Span 60, Tween 80 e a mistura Span 60/Tween 80 (1:1 m/m), com o objetivo de realizar os experimentos de SAXS.

4.5 Caracterização físico-química das nanoestruturas

As nanopartículas foram caracterizados por meio do teor de antioxidante, eficiência de encapsulamento, raio hidrodinâmico, índice de polidispersão, pH, potencial zeta e estabilidade em função do tempo de armazenamento. Além disso, os seus aspectos estruturais foram analisados por SAXS.

4.5.1 Determinação do teor de antioxidante e eficiência de encapsulamento

O teor de antioxidante foi determinado, em triplicata, após a dissolução das nanocápsulas ou nanoemulsões em acetonitrila (0,375mL de suspensão e completou-se até 5mL de acetonitrila), agitação magnética durante 10 minutos e filtração (VertiClean™, NYLON, 25mm, 0,45µm, Vertical, Bangkok, Tailândia). Após, o teor de antioxidante foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

O antioxidante livre foi determinado no ultrafiltrado, após separação das nanopartículas pela técnica de ultrafiltração/centrifugação (Amicon® Ultra, 0,5mL, 10000 MW, Millipore, Carrigtwohill, Irlanda), em 5460 rpm, durante 10 minutos.

A eficiência de encapsulamento (%EE) foi calculada segundo a Equação 2:

$$\text{Equação 2} \quad \% \text{ EE} = \frac{\text{DE}}{\text{TTD}} \times 100$$

onde DE é a droga encapsulada (diferença entre a concentração de droga total e a concentração de droga livre) e TTD é o teor total de droga.

4.5.2 Determinação do pH, raio hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta

Os valores de pH das suspensões foram determinados em triplicata no pHmetro DM-20 (Digimed). O raio hidrodinâmico e o índice de polidispersão também foram medidos em triplicata, após diluição (1:500) das suspensões em água ultrapura e filtração (NYLON, 0,45 μ m), por espectroscopia de correlação de fótons (3 medidas/lote; 7 corridas de 30s/medida) utilizando-se o equipamento Nano ZS, Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Essas medidas foram feitas num ângulo de espalhamento de luz de 173° a 25°C.

A mobilidade eletroforética e o valor do potencial zeta foram determinados (3 medidas/lote; 12 corridas/medida a 25°C) após diluição (1:500) das suspensões em 10 mmol L⁻¹ de NaCl e filtração (NYLON, 0,45 μ m) (Nano ZS, Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

4.5.3 Análise dos aspectos estruturais por SAXS

O espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) foi realizado na linha D11A-SAXS2 no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS, Campinas-SP, Brasil). Foi usado para o experimento um detector bidimensional, sensível a posição, com uma distância de 956,46 mm da amostra e um feixe monocromático de comprimento de onda 1,488 Å. O tempo de exposição de cada medida foi de 600 s e a faixa do vetor de onda foi $0,13 < q \text{ (nm}^{-1}\text{)} < 3,4$. Um porta-amostra de mica foi utilizado para todas as amostras e a célula da amostra foi introduzida em uma câmara de vácuo para diminuir o espalhamento por parasitas. Um banho térmico foi usado para manter a temperatura constante durante as análises, as quais foram feitas em 25, 35, 45, 55, 65 e 75°C. O espalhamento do solvente foi subtraído da intensidade total e o perfil de espalhamento foi corrigido para absorção da amostra e a resposta do detector.

4.6 Reator fotoquímico

Os sistemas de irradiação já desenvolvidos para a destruição de matéria orgânica não podem ser utilizados para o estudo da ação antirradicalar de espécies antioxidantes, uma vez que empregam lâmpadas de alta potência que provocam uma alta velocidade reacional de formação do radical HO•, além de degradar o antioxidante em poucos segundos por fotólise direta e por reações secundárias.

Neste trabalho foi utilizado um sistema de irradiação que consiste numa lâmpada UV-C de 15W (Philips; $\lambda = 200$ a 290 nm) inserida numa caixa retangular com dimensões de 53 cm de comprimento, 22 cm de largura e 24 cm de altura. Para a irradiação das amostras foi utilizado uma cubeta retangular de quartzo com 10 mm de aresta, 4,5 cm de altura e capacidade máxima para 3,5 mL de amostra, a qual permaneceu, durante a irradiação, a uma distância de 14,8 cm da lâmpada contida no sistema.

4.7 Ensaios por Espectrofotometria UV-Vis

Os espectros de absorção molecular foram obtidos entre 200 e 600 nm, determinando o comprimento de onda com máxima absorvidade molar de cada antioxidante ($\lambda_{\text{máx}}=279$, 257 e 287 nm para o eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol, respectivamente). As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis da Cary 50 Bio (Varian), utilizando uma cubeta de quartzo de 10 mm de espessura do caminho óptico.

As características ópticas dos filmes e dispersões coloidais (NC e NE) foram monitoradas com base em sua absorbância, numa faixa de comprimento de onda de 190 a 800 nm. As medidas foram feitas à temperatura ambiente, e todos os espectros foram corrigidos por um fundo de compensação (placa de quartzo e água para filmes e dispersões coloidais, respectivamente). Os filmes de PCL, NC e NE foram obtidos por evaporação da acetona da solução de PCL e das dispersões

coloidais de NC e NE em uma placa de quartzo a 25°C. Após a evaporação, os filmes foram secos na capela, por 12 horas.^{91,92} As dispersões coloidais de NC e NE foram preparadas como descrito acima, na ausência dos antioxidantes e diluídas em água (1:500) antes das medidas de espectros no UV-Vis.

4.8 Ensaios por Espectrofotometria de Fluorescência

Os espectros de excitação foram obtidos entre 200 e 400 nm. Os espectros de emissão foram obtidos fixando-se os comprimentos de onda de excitação de cada antioxidante com máxima intensidade. Para o eugenol fixou-se o comprimento de onda em 232 nm e utilizou-se slit de 5 nm, para o isoeugenol fixou-se o comprimento de onda em 258 nm e slit 10 nm, e para o dehidrodieugenol fixou-se o comprimento de onda em 230 nm e utilizou-se slit 5 nm. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse (Varian), utilizando uma cubeta de quartzo de 10 mm de espessura do caminho óptico.

4.9 Ensaios por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As medidas por CLAE foram realizadas num equipamento P680 da Dionex, acoplado a detector UV-Vis UVD-170 (Dionex), e as medidas foram realizadas nos comprimentos de onda de absorção máxima de cada composto. Foi utilizado coluna de separação C18 de dimensões 4,6 mm x 150 mm x 5 µm (Dionex) e como fase móvel acetonitrila 40% (v/v) (Tedia), grau HPLC, em água ultrapura, e fluxo de 1,0 mL min⁻¹, para os ensaios com os antioxidantes eugenol e isoeugenol. Para o dehidrodieugenol, utilizou-se acetonitrila 70% (v/v) em água ultrapura, e fluxo 0,8 mL min⁻¹.

4.10 Atividade antirradicalar frente ao radical HO•

O estudo da atividade antirradicalar do eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol frente ao HO• foi realizado utilizando-se as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), espectrofotometria UV-Vis e de fluorescência.

Primeiramente foi investigado o efeito da fotólise direta sobre o eugenol e seus derivados, livres e nanoencapsulados (nanocápsulas e nanoemulsão). Posteriormente, esses sistemas foram investigados na presença do radical HO•, gerado pela decomposição fotolítica do peróxido de hidrogênio, a fim de avaliar a atividade antirradicalar.

Os ensaios por espectrofotometria UV-Vis foram realizados em triplicata, com a adição de 30µL de peróxido de hidrogênio 30% (29 mmol L⁻¹) em 10 mL de uma solução padrão de cada antioxidante, com concentração de 3,5x10⁻⁴ mol L⁻¹, 1x10⁻⁴ mol L⁻¹ e 2x10⁻⁴ mol L⁻¹, para o eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol, respectivamente. Os mesmos ensaios foram realizados na ausência do peróxido de hidrogênio.

Os ensaios por espectrofotometria de fluorescência também foram realizados em triplicata, com adição de 30µL de peróxido de hidrogênio 30% (29 mmol L⁻¹) em 10 mL de uma solução padrão de cada antioxidante, com concentração de 1,5x10⁻⁴ mol L⁻¹, 6x10⁻⁷ mol L⁻¹ e 5x10⁻⁶ mol L⁻¹, para o eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol, respectivamente. Os mesmos ensaios foram realizados na ausência do peróxido de hidrogênio.

Os ensaios cromatográficos foram realizados, em triplicata, para a determinação da constante cinética dos compostos frente ao radical HO•. Nestes experimentos, foi adicionado 30µL de peróxido de hidrogênio 30% (29 mmol L⁻¹) em 10mL de suspensão de nanocápsulas (1mg mL⁻¹ de antioxidante). As mesmas foram fotolisadas, extraídas com acetonitrila (1,3mL da formulação fotolisada e completou-se até 5mL com acetonitrila), deixadas sob agitação magnética durante 10 minutos, filtradas em 0,45 µm (Nylon) e injetadas (20µL) no CLAE. Os mesmos ensaios foram realizados na ausência do peróxido de hidrogênio.

As constantes cinéticas de primeira ordem da decomposição fotolítica dos antioxidantes, na presença e na ausência do radical HO•, gerado pela

fotodecomposição do peróxido de hidrogênio, foram calculadas conforme Equação 3:

$$\text{Equação 3} \quad \ln \left(\frac{[A]}{[A]_0} \right) = -kt$$

onde, k é a constante cinética de primeira ordem. Na técnica cromatográfica, $[A]_0$ representa a área do pico no tempo zero, detectado no comprimento de onda específico de cada antioxidante, e $[A]$ é área deste mesmo pico no instante t . O coeficiente angular da reta no gráfico de $\ln ([A]/[A]_0)$ em função do tempo fornece o valor de k .

Na espectrofotometria UV-Vis as constantes cinéticas de primeira ordem foram calculadas conforme Equação 4, onde $[A]_0$ é a absorbância da espécie antioxidante no instante inicial, $[A]$ é a absorbância no instante t , e $[A]_\infty$ é absorbância no tempo infinito.

$$\text{Equação 4} \quad \ln \left(\frac{[A] - [A]_\infty}{[A]_0 - [A]_\infty} \right) = -kt$$

Na técnica de espectrofotometria de fluorescência as constantes cinéticas de primeira ordem foram calculadas conforme Equação 5, onde $[I]_0$ é a intensidade da emissão do antioxidante no instante inicial, $[I]$ é a intensidade num instante t qualquer, e $[I]_\infty$ é a intensidade no t infinito.

$$\text{Equação 5} \quad \ln \left(\frac{[I] - [I]_\infty}{[I]_0 - [I]_\infty} \right) = -kt$$

Os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$), para as reações de primeira ordem foram calculadas utilizando-se a Equação 6.

Equação 6
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

4.11 Estudo *in-vitro* de viabilidade celular

O estudo da viabilidade celular foi realizado utilizando-se macrófagos obtidos de camundongos Swiss.

Os camundongos foram sacrificados em atmosfera de CO₂ e tiveram a cavidade peritoneal lavada com 10mL de solução tampão fosfato (PBS) com auxílio de uma seringa estéril. Após obtenção, o lavado peritoneal foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 1mL de meio RPMI (mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular) suplementado com soro fetal bovino (10%, SFB) e antibiótico (ciprofloxacina e glutamina). Para determinar o total de células recuperadas, alíquotas da solução, contendo células, foram misturadas com azul de Tripán e contadas utilizando microscópio óptico com auxílio da câmara de Neubauer. Em seguida, as células ($2,5 \times 10^5$ macrófagos) foram adicionadas em placas de 96 poços. As células foram incubadas por 24 horas em atmosfera com 5% de CO₂, a 37°C. Após a incubação, foi realizado o tratamento das células com as amostras.

O teste de viabilidade celular pela redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] é um teste colorimétrico rápido que detecta as células vivas.⁹³ Este ensaio é baseado na atividade mitocondrial das células pela redução do MTT através da clivagem do sal de tetrazólio, de coloração amarelada, em cristais de formazan, de coloração azul escuro, pela enzima succinato desidrogenase (SDH) presente nas mitocôndrias ativas (ver Figura 13). A quantidade de cristais formada é diretamente proporcional ao número de células

vivas. A densidade óptica resultante do teste MTT é determinada espectrofotometricamente (570 nm).

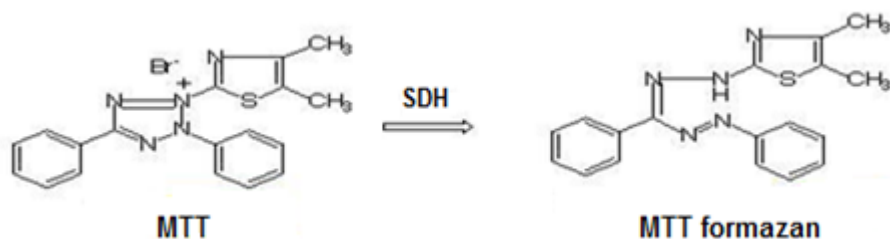


Figura 13 – Redução do MTT em cristais de formazan pela succinato desidrogenase.

As células foram incubadas com as substâncias e mantidas em atmosfera com 5% de CO₂, a 37°C, pelo período de 1 e 4 horas. Depois do tempo de incubação, adicionou-se 22,5 µL da solução de MTT (5mg mL⁻¹) e incubadas por 4h na estufa de CO₂ a 37°C. Após o período de incubação o sobrenadante foi removido e sobre as células foram adicionados 150 µL de DMSO, por poço, para diluir os cristais de MTT. Em seguida, o material foi incubado por 15 minutos e submetido à leitura em espectrofotômetro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise quantitativa da atividade antioxidante do eugenol e seus derivados frente ao radical DPPH

Primeiramente, foi construída a curva de calibração do DPPH, para quantificação do consumo de DPPH durante os ensaios da atividade antioxidante (Figura 14) dos compostos fenólicos por espectrofotometria no UV-Vis. A curva de calibração apresentou linearidade, com coeficiente de correlação (R) igual a 0,9998. A equação da curva de calibração do DPPH obtida foi $Abs = 9,80015 [DPPH]$, onde [DPPH] corresponde à concentração de DPPH no meio e Abs é a absorbância medida no comprimento de onda de 515 nm.

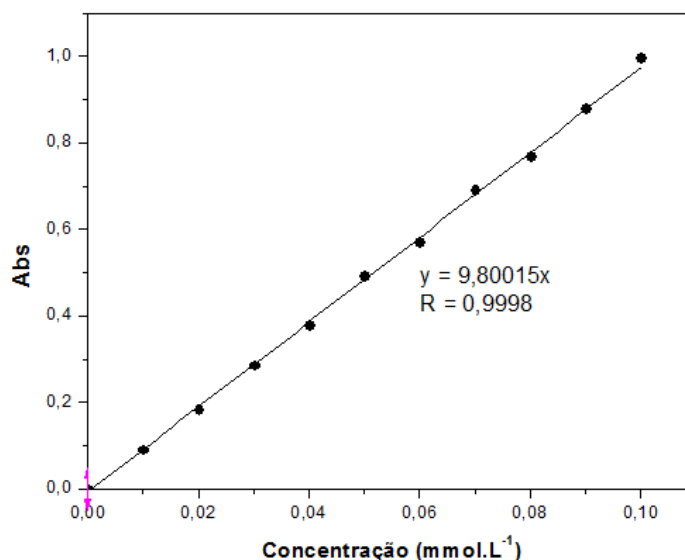


Figura 14 – Curva de concentração do DPPH no $\lambda=515$ nm.

Na Figura 15 temos o espectrofotograma do decaimento da absorbância da reação de 1×10^{-4} mol L⁻¹ de DPPH com o eugenol na concentração de $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Os resultados do DPPH (1×10^{-4} mol L⁻¹) com o eugenol nas concentrações de 5×10^{-5} mol L⁻¹ e 1×10^{-4} mol L⁻¹, respectivamente, são apresentados no anexo B.

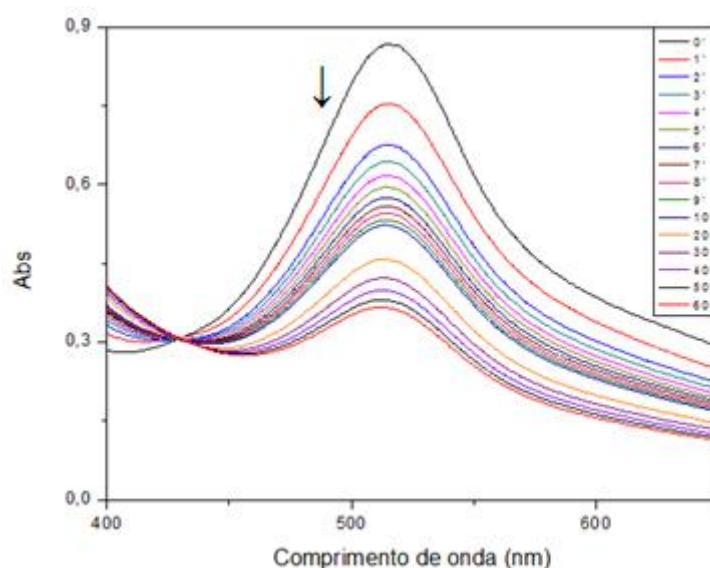


Figura 15 – Decaimento da absorvância da solução de 1×10^{-4} mol L⁻¹ de DPPH com $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de eugenol.

A partir da equação da curva de calibração do DPPH e dos valores de absorvância para cada concentração testada de eugenol, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (%DPPH_{REM}), conforme a Equação 7:

$$\text{Equação 7} \quad \% \text{DPPH}_{\text{REM}} = \frac{[\text{DPPH}]_t}{[\text{DPPH}]_{t=0}} \times 100$$

O comportamento cinético da reação do DPPH com o eugenol nas concentrações de $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, 5×10^{-5} mol L⁻¹ e 1×10^{-4} mol L⁻¹, é mostrado na Figura 16, através da curva de decréscimo da porcentagem remanescente de DPPH em função do tempo.

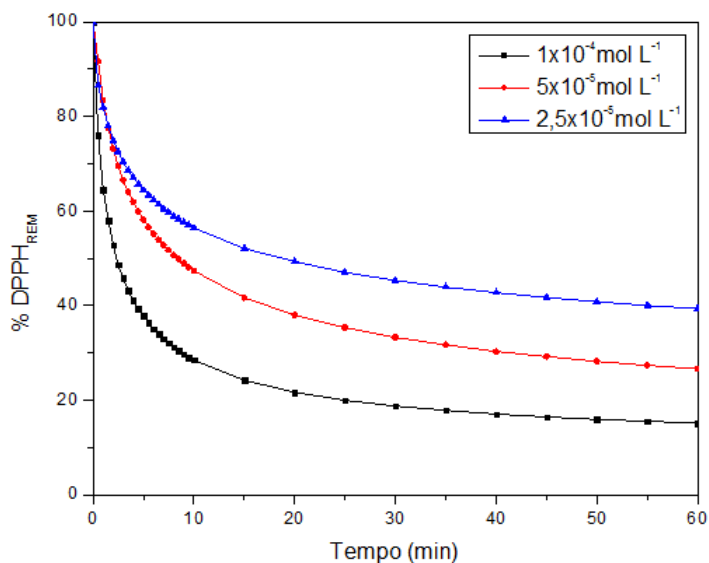


Figura 16 – Comportamento cinético do DPPH frente às diferentes concentrações de eugenol.

Na Figura 17 temos o espectrofotograma do decaimento da absorvância da reação de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DPPH com o isoeugenol na concentração de $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados do DPPH ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com o isoeugenol nas concentrações de $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, são apresentados no anexo B.

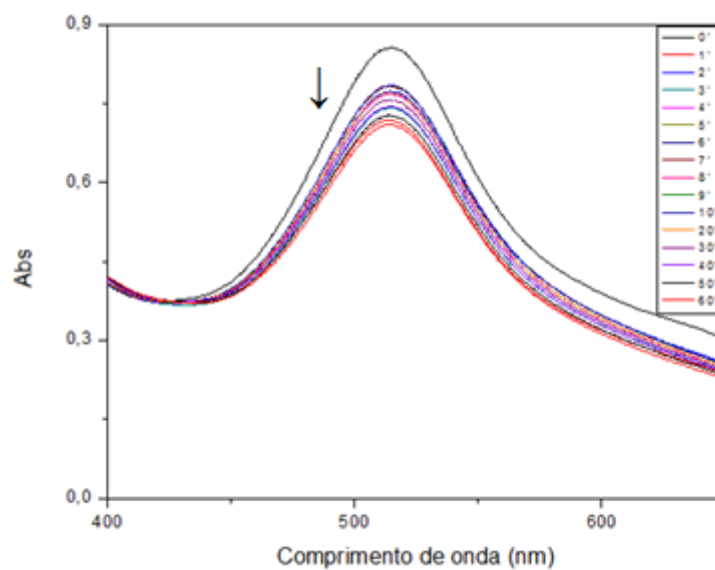


Figura 17 – Decaimento da absorvância da solução de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DPPH com $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoeugenol.

O comportamento cinético da reação do DPPH com o isoeugenol nas concentrações de $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, é mostrado na Figura 18, através da curva de decréscimo da porcentagem remanescente de DPPH em função do tempo.

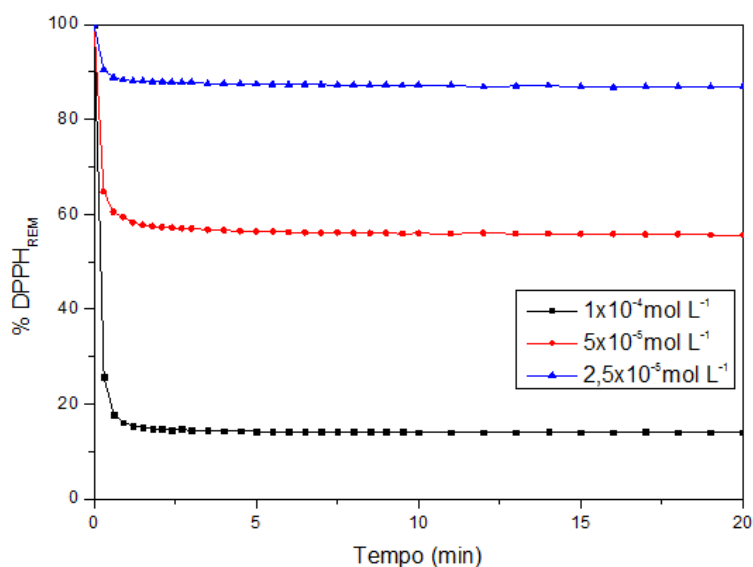


Figura 18 – Comportamento cinético do DPPH frente às diferentes concentrações de isoeugenol.

O comportamento cinético da reação do DPPH com o dehidrodieugenol nas concentrações de $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, é mostrado na Figura 19 através da curva de decréscimo da porcentagem remanescente de DPPH em função do tempo.

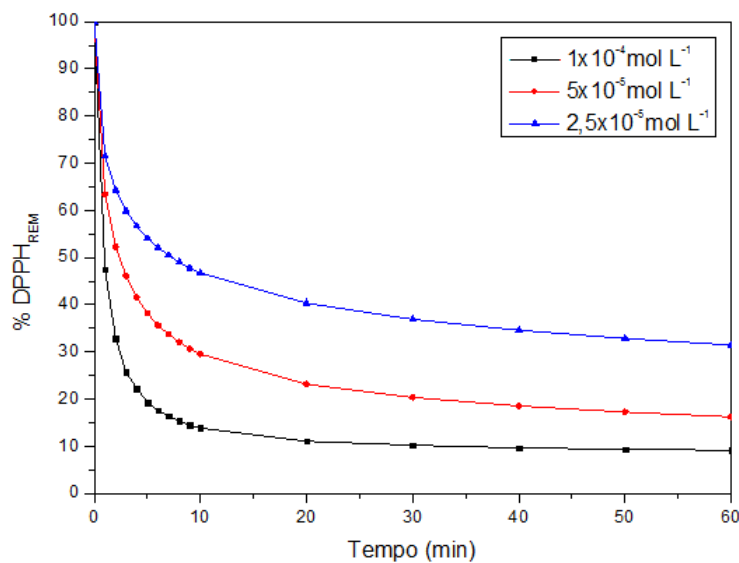


Figura 19 – Comportamento cinético do DPPH frente às diferentes concentrações de dehidrodieugenol.

Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min, foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (%AA) de cada composto (conforme Figura 20), a qual foi determinada pela Equação 8.⁶⁴

$$\text{Equação 8} \quad \%AA = \frac{[Abs_{\text{controle}} - (Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}})] \times 100}{Abs_{\text{controle}}}$$

onde Abs_{controle} é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH, Abs_{amostra} é a absorvância da mistura reacional (DPPH + amostra) e Abs_{branco} é a absorvância da solução metanólica do antioxidante.

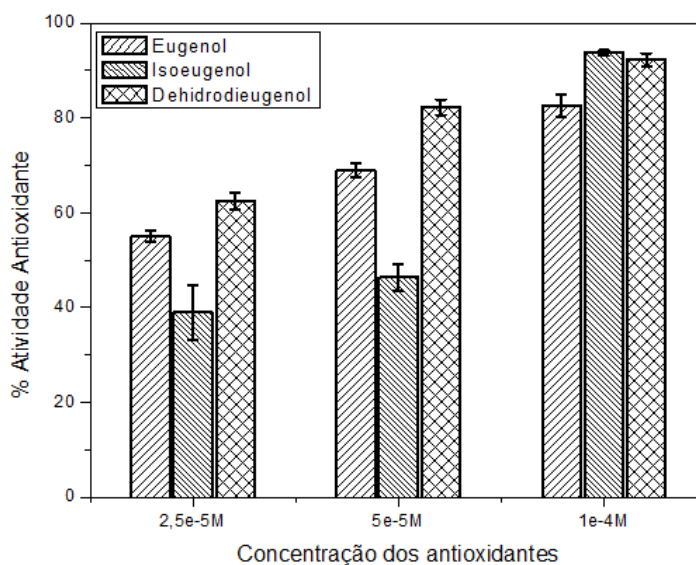


Figura 20 – Porcentagem de atividade antioxidante do eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol nas diferentes concentrações.

A atividade antirradicalar dos compostos fenólicos frente ao radical DPPH aumenta com o aumento da concentração do antioxidante e atinge seu máximo na concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Os ensaios da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos frente ao radical DPPH mostraram que o dehidrodieugenol é o que apresenta a maior atividade antioxidante. A sua maior capacidade de capturar o DPPH deve estar relacionado ao fato deste composto possuir em sua estrutura dois prótons passíveis de serem doados ao DPPH. Este fato está de acordo com os dados da literatura que apontam que compostos diméricos tem uma atividade antioxidante maior que compostos monoméricos.⁹⁴ O isoeugenol apresentou maior atividade antioxidante que o eugenol somente na maior concentração estudada.

5.2 Fotoestabilidade dos compostos fenólicos

A radiação ultravioleta é dividida em três faixas de comprimento de onda, denominadas de UV-A (400 a 320 nm), UV-B (320 a 290 nm) e UV-C (290 a 200 nm). Portanto, os compostos fenólicos que absorvem nesta região UV são capazes

de agir como filtros, protegendo assim os tecidos subjacentes de danos fotossintéticos.

5.2.1 Perfil cinético reacional do eugenol e seus derivados, encapsulados e não encapsulados na ausência e na presença do radical HO•

As constantes cinéticas de decomposição fotolítica dos compostos fenólicos foram determinados utilizando-se o método de CLAE, espectrofotometria UV-Vis e fluorescência. Independente do método utilizado, o perfil de fotodecomposição dos antioxidantes é de uma típica cinética de primeira ordem, tanto para os compostos encapsulados como para os não encapsulados. Aplicando-se a Equação 3, Equação 4 e Equação 5 obtivemos uma relação linear entre as variáveis x e y das respectivas equações, com coeficientes de correlação muito próximos a 1, o que torna possível o uso da Equação 6 para o cálculo do tempo de meia vida dos antioxidantes.

5.2.1.1 Ensaios por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Iniciamos os estudos utilizando a CLAE, pois esta técnica é mais indicada no estudo cinético, visto que ela permite a separação cromatográfica de todos os compostos gerados durante a fotólise. Inicialmente analisamos a decomposição do eugenol e seus derivados por fotólise direta, na ausência de H_2O_2 , para os compostos livres (não encapsulados) e nanoencapsulados.

Na Figura 21, Figura 22 e Figura 23 são apresentados os decaimentos cromatográficos das soluções hidroetanólicas de eugenol ($1,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}), de isoeugenol ($1,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}), e de dehidrodieugenol ($3,8 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) frente à fotólise direta, respectivamente. Para o composto eugenol observamos que, à medida que o tempo de exposição à radiação UV-C aumenta, o pico correspondente ao composto puro (tempo de retenção igual a 10,5 min) diminui de intensidade, devido a sua decomposição fotolítica. Observamos também o aparecimento de picos

secundários nos tempos de retenção próximos a 2,5 e 8,2 min, possivelmente devido aos produtos da decomposição induzida pela luz ultravioleta, visto que estes picos não estão presentes no tempo zero. Resultados similares foram observados nos cromatogramas do isoeugenol e dehidrodieugenol (ver Figura 22 e Figura 23), contudo, neste último, os picos dos subprodutos são menores. Para o eugenol e isoeugenol observamos picos em 12,5 min possivelmente devido ao fato da amostra não ser 100% pura.

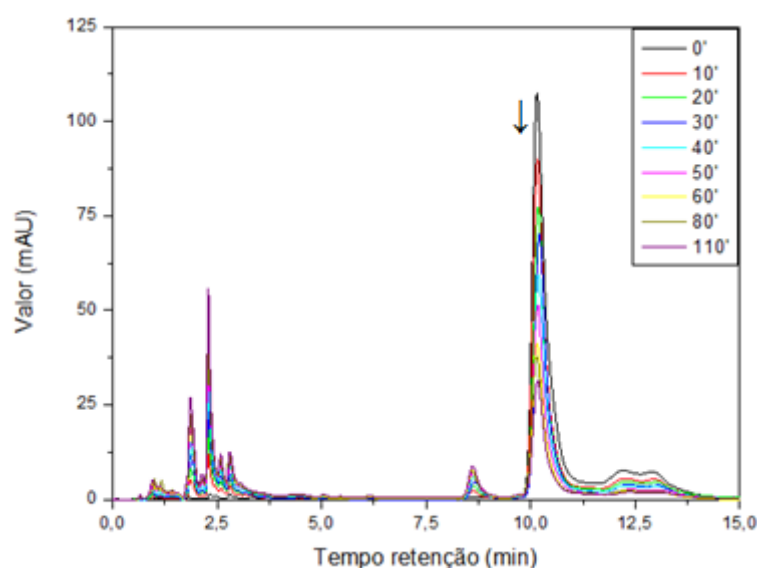


Figura 21 – Decaimento cromatográfico do eugenol livre frente à fotólise na ausência de H_2O_2 . Condições de análise: fase estacionária C18 Dionex (4,6mm x 150mm x 5 μ m), fase móvel acetonitrila 40% (v/v), pH \approx 6,0, com fluxo de 1,0 mL min $^{-1}$, injeção de 20 μ L e pressão variável.

A Figura 24 mostra o decaimento cinético das soluções hidroetanólicas de eugenol (SE), isoeugenol (SI) e dehidrodieugenol (SD). Os resultados indicam que estas espécies antioxidantes são fotoinstáveis nas condições empregadas, ou seja, a radiação UV-C é capaz de decompor os antioxidantes fenólicos devido ao seu elevado conteúdo energético. Lima e colaboradores⁶⁵ têm evidenciado que os compostos polifenólicos, como a rutina, quercetina e fisetina, na ausência de H_2O_2 , são relativamente fotoestáveis frente à radiação UV (lâmpada de mercúrio: UVC-UVA). Este resultado pode estar associado às condições experimentais utilizados pelos autores, como a potência e as linhas de emissão da lâmpada UV. Outra

explicação da fotoestabilidade destes compostos polifenólicos em comparação aos compostos fenólicos eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol pode estar associado à estrutura química destes flavonóides (ver Figura 25). A presença de vários anéis condensados nas moléculas dos flavonóides sugere que diferentes partes da molécula podem absorver a radiação UV, levando a uma maior estabilidade quando comparada aos compostos fenólicos estudados neste trabalho.

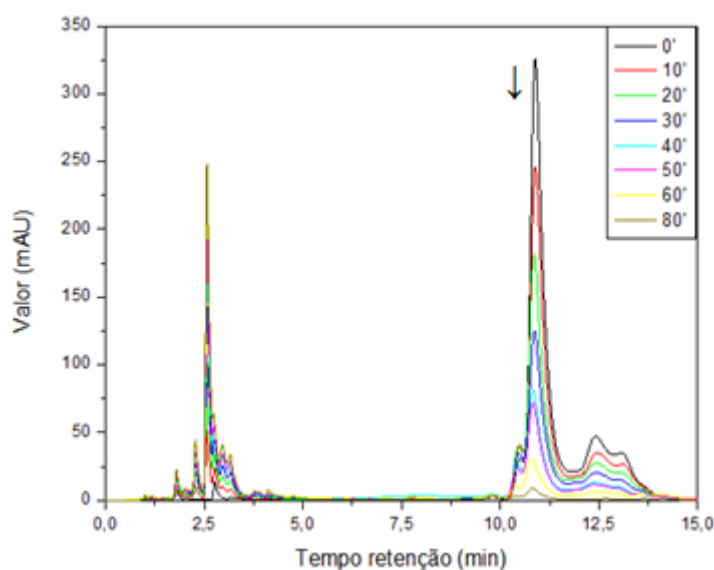


Figura 22 – Decaimento cromatográfico do isoeugenol livre frente à fotólise na ausência de H_2O_2 . Condições de análise: fase estacionária C18 Dionex (4,6mm x 150mm x 5 μ m), fase móvel acetonitrila 40% (v/v), pH \approx 6,0, com fluxo de 1,0 mL min $^{-1}$, injeção de 20 μ L e pressão variável.

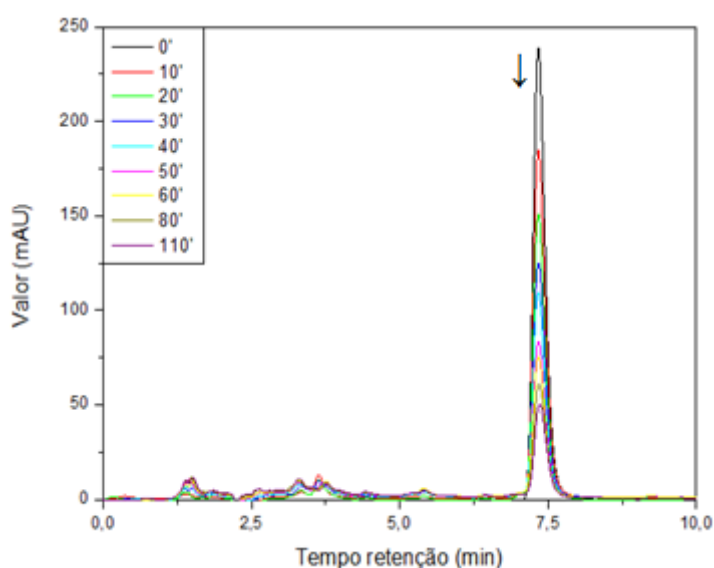


Figura 23 – Decaimento cromatográfico do dehidrodieugenol livre frente à fotólise na ausência de H_2O_2 . Condições de análise: fase estacionária C18 Dionex (4,6mm x 150mm x 5 μ m), fase móvel acetonitrila 70% (v/v), pH \approx 6,0, com fluxo de 0,8 mL min $^{-1}$, injeção de 20 μ L e pressão variável.

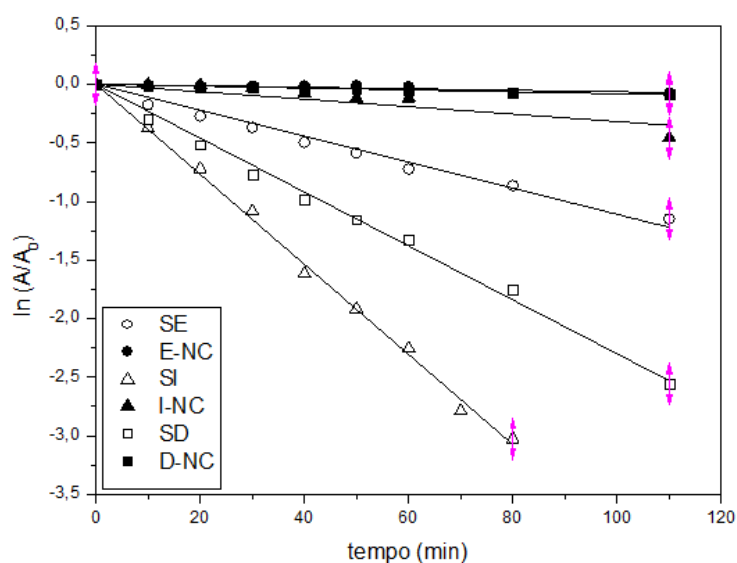


Figura 24 – Decaimento cinético das soluções hidroetanólicas de eugenol (SE), isoeugenol (SI) e dehidrodieugenol (SD) e das suspensões de nanocápsulas contendo eugenol (E-NC), isoeugenol (I-NC) e dehidrodieugenol (D-NC).

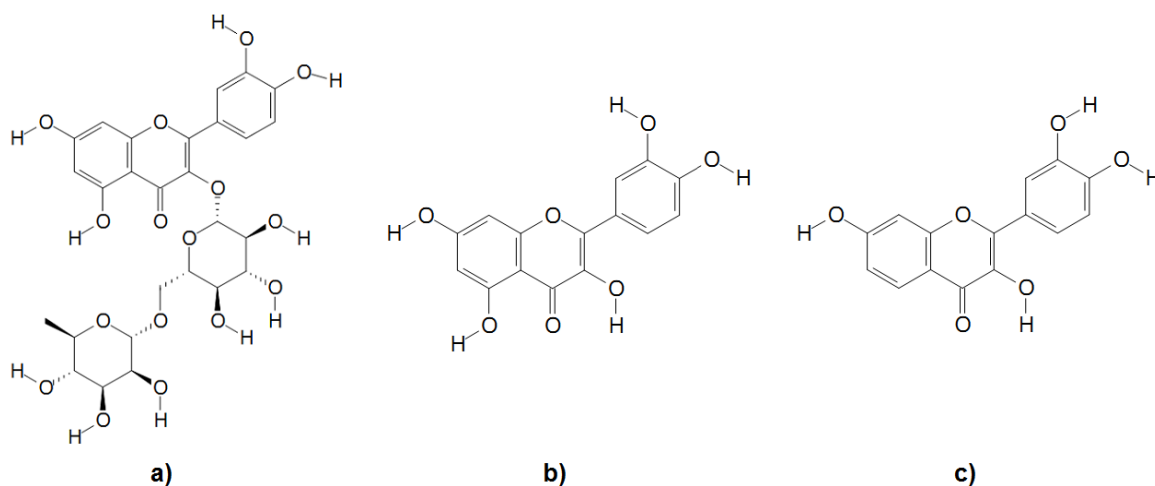


Figura 25 – Estrutura química dos flavonóides: a) rutina, b) quercetina e c) fisetina.

Outro aspecto importante relacionado à Figura 24 é a comparação da fotoestabilidade entre os diferentes compostos fenólicos. Podemos ver claramente que o composto isoeugenol é o mais instável dentre os compostos, seguido do dehidrodieugenol e do eugenol. Uma possível explicação para esta instabilidade é

que a ligação dupla no isoeugenol é mais próxima do anel aromático, conferindo uma maior estabilidade ao radical formado na fotólise, devido às estruturas de ressonância, quando comparado ao radical formado na fotodecomposição do eugenol e do dehidrodieugenol.

Ao analisarmos os valores numéricos das constantes cinéticas de decomposição fotolítica (k_{hv}) e os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) do eugenol e seus derivados, fica-se mais evidente que os aspectos estruturais desempenham um papel importante na fotoestabilidade destes compostos (ver Tabela 2, Tabela 3 e Tabela 4). Os resultados mostram que o eugenol apresenta uma fotoestabilidade 3,2 e 2,2 vezes maior que a do isoeugenol e dehidrodieugenol, respectivamente.

Tabela 2 – Constantes cinéticas do eugenol e os tempos de meia-vida calculados pelo acompanhamento dos decaimentos cromatográficos.

Sistemas		k (min^{-1})	R	$t_{1/2}$ (min)
SE + $h\nu$	k_{hv}	$1,11 \times 10^{-2} \pm 0,0004$	$-0,9965 \pm 0,0003$	62,44
SE + $h\nu$ + H_2O_2	$k_{hv+\text{HO}\cdot}$	$2,24 \times 10^{-2} \pm 0,0016$	$-0,9982 \pm 0,0015$	30,87
SE + H_2O_2	$k_{\text{HO}\cdot}$	$1,13 \times 10^{-2} \pm 0,0016$	-	61,07
E-NC + $h\nu$	k_{hv}	$6,68 \times 10^{-4} \pm 0,00006$	$-0,9945 \pm 0,0073$	1037,64
E-NC + $h\nu$ + H_2O_2	$k_{hv+\text{HO}\cdot}$	$2,12 \times 10^{-3} \pm 0,0003$	$-0,9961 \pm 0,0011$	326,96
E-NC + H_2O_2	$k_{\text{HO}\cdot}$	$1,45 \times 10^{-3} \pm 0,0003$	-	477,37
E-NE + $h\nu$	k_{hv}	$7,91 \times 10^{-4} \pm 0,00009$	$-0,9961 \pm 0,0022$	876,51

Tabela 3 – Constantes cinéticas do isoeugenol e os tempos de meia-vida calculados pelo acompanhamento dos decaimentos cromatográficos.

Sistemas		k (min^{-1})	R	$t_{1/2}$ (min)
SI + hv	k_{hv}	$3,60 \times 10^{-2} \pm 0,0021$	$-0,9984 \pm 0,0013$	19,25
SI + hv + H ₂ O ₂	$k_{hv+HO\cdot}$	$6,50 \times 10^{-2} \pm 0,0013$	$-0,9980 \pm 0,0004$	10,66
SI + H ₂ O ₂	$k_{HO\cdot}$	$2,90 \times 10^{-2} \pm 0,0013$	-	23,90
I-NC + hv	k_{hv}	$2,04 \times 10^{-3} \pm 0,00007$	$-0,9962 \pm 0,0008$	339,78
I-NC + hv + H ₂ O ₂	$k_{hv+HO\cdot}$	$3,92 \times 10^{-3} \pm 0,0002$	$-0,9952 \pm 0,0008$	176,60
I-NC + H ₂ O ₂	$k_{HO\cdot}$	$1,88 \times 10^{-3} \pm 0,0002$	-	367,72
I-NE + hv	k_{hv}	$5,70 \times 10^{-3} \pm 0,0002$	$-0,9958 \pm 0,0030$	121,53

Tabela 4 – Constantes cinéticas do dehidrodieugenol e os tempos de meia-vida calculados pelo acompanhamento dos decaimentos cromatográficos.

Sistemas		k (min^{-1})	R	$t_{1/2}$ (min)
SD + hv	k_{hv}	$2,46 \times 10^{-2} \pm 0,0022$	$-0,9977 \pm 0,0006$	28,21
SD + hv + H ₂ O ₂	$k_{hv+HO\cdot}$	$2,68 \times 10^{-2} \pm 0,0009$	$-0,9936 \pm 0,0042$	25,83
SD + H ₂ O ₂	$k_{HO\cdot}$	$2,27 \times 10^{-3} \pm 0,0009$	-	305,80
D-NC + hv	k_{hv}	$8,07 \times 10^{-4} \pm 0,00005$	$-0,9940 \pm 0,0022$	858,21
D-NC + hv + H ₂ O ₂	$k_{hv+HO\cdot}$	$1,56 \times 10^{-3} \pm 0,00009$	$-0,9944 \pm 0,0033$	445,27
D-NC + H ₂ O ₂	$k_{HO\cdot}$	$7,49 \times 10^{-4} \pm 0,00009$	-	925,43
D-NE + hv	k_{hv}	$1,50 \times 10^{-3} \pm 0,00005$	$-0,9738 \pm 0,0026$	463,13

Uma vez verificado que os compostos fenólicos estudados eram fotossensíveis, dirigimos nossos estudos visando a fotoproteção usando como alternativa, nanocápsulas e nanoemulsões. Primeiramente foram realizados os estudos do eugenol e seus derivados encapsulados em nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona. No Anexo C são apresentados os decaimentos cromatográficos das nanocápsulas contendo eugenol (1 mg mL^{-1}), isoeugenol (1 mg mL^{-1}), e dehidrodieugenol (1 mg mL^{-1}) frente à fotólise direta.

A Figura 24 mostra também o decaimento cinético das nanocápsulas contendo eugenol (E-NC), isoeugenol (I-NC) e dehidrodieugenol (D-NC). Quando comparamos estes resultados com o decaimento cinético dos compostos fenólicos livres, vemos claramente que as nanocápsulas poliméricas são efetivas na proteção dos antioxidantes, frente à radiação UV-C.

Na Figura 26 é apresentado o decaimento cromatográfico da nanoemulsão contendo dehidrodieugenol (1 mg mL^{-1}) frente à fotólise direta (decaimentos cromatográficos das nanoemulsões contendo eugenol e isoeugenol ver em Anexo C). Os valores das constantes cinéticas de decomposição fotolítica (k_{hv}) e os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) do eugenol e seus derivados encapsulados em nanoemulsão são apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4.

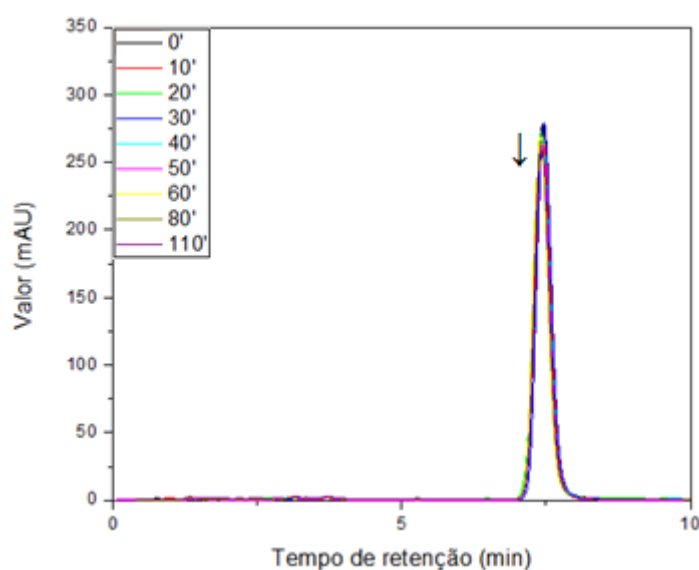


Figura 26 – Cromatograma do decaimento cinético da nanoemulsão contendo dehidrodieugenol.

As constantes de decomposição fotolítica do eugenol livre e encapsulado em nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona e nanoemulsão são $1,11 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, $6,68 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ e $7,91 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados mostram que a associação de eugenol em nanocápsulas e nanoemulsões leva a um aumento de 16,6 e 14,0 vezes na fotoestabilidade do eugenol, respectivamente, durante a exposição de 110 minutos. Pelos valores das constantes de velocidades, podemos observar que 96% e 95% do eugenol permanece “intacto” após 1 h de irradiação quando encapsulado em nanocápsula e nanoemulsão, respectivamente, contra 51% quando livre em solução. A fotoproteção propiciada pelas nanopartículas fica mais evidente quando avaliamos o tempo de meia vida. Soluções hidroetanólicas de eugenol apresentam um tempo de meia-vida de 62,44 minutos, de acordo com a equação cinética de primeira ordem, enquanto que o eugenol encapsulado em nanocápsulas e nanoemulsões mostra um tempo de meia-vida de 1037,64 e 876,51 minutos, respectivamente.

Analisando as constantes de velocidade para o isoeugenol e dehidrodieugenol, podemos ver que a fotoestabilidade aumenta 17,6 e 30,5 vezes para os antioxidantes encapsulados em NC e 6,3 e 16,4 vezes para as NE, respectivamente, quando comparados com o antioxidante livre em solução. Da mesma forma, o tempo de meia-vida do isoeugenol e dehidrodieugenol encapsulados é muito superior ao dos compostos livres (ver Tabela 3 e Tabela 4).

Comparando os diferentes sistemas nanoestruturados, podemos ver que as NC são mais efetivas do que as NE em proteger o antioxidante contra a radiação UV. A Figura 27 mostra o espectro de absorção UV-Vis do polímero PCL, dos filmes de NC e NE, bem como as dispersões coloidais (NC e NE) preparadas sem os antioxidantes. O espectro do PCL exibe uma absorbância característica com um máximo em 206 nm. Portanto, a melhor proteção apresentada pelas NC, comparadas com as NE, pode ser explicada, parcialmente, pela habilidade do poliéster PCL em absorver fótons na região UVC do espectro eletromagnético. Outra possibilidade, sugerida por Jiménez et al.⁹⁵, é que a fotoproteção em NC pode ser devido a cristalinidade do PCL, o qual reflete e dispersa a radiação UV.

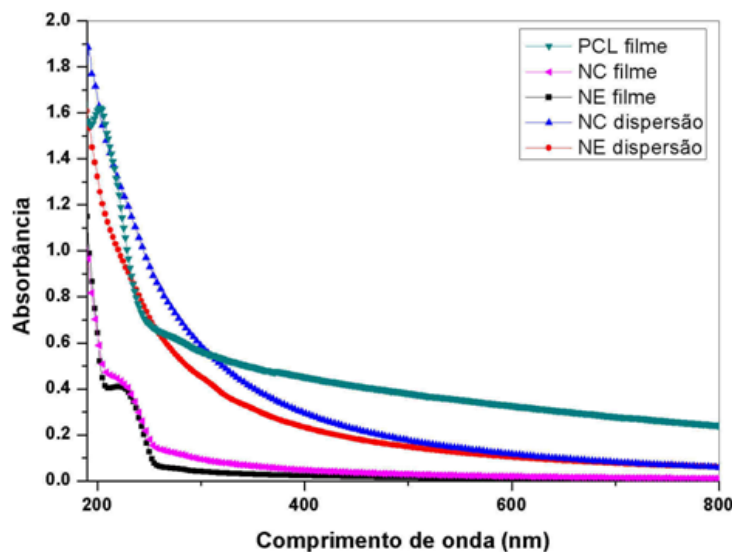


Figura 27 – Espectro de absorção UV-Vis do polímero PCL, dos filmes de NC e NE e das dispersões coloidais (NC e NE) preparadas sem os antioxidantes.

Portanto, a encapsulação do eugenol e seus derivados, em nanocápsulas e nanoemulsões, aumenta a fotoestabilidade do antioxidante e representa um sistema em potencial para administração deste antioxidante na forma tópica, enteral, parenteral e oftalmológica. Nossos resultados apontam na mesma direção de trabalhos recentes, demonstrando a fotoproteção de sistemas nanoestruturados como niossomas⁹⁶, lipossomas⁹⁷, nanocápsulas⁵¹ e β -ciclodextrina.⁹⁸

A atividade antirradicalar do eugenol e seus derivados, livres e encapsulados em NC, foi determinada frente ao radical $HO\bullet$, que é o radical mais nocivo sob condições fisiológicas. Uma quantidade conhecida de H_2O_2 (30 μ L em 10mL de solução ou suspensão das nanocápsulas) foi adicionada às amostras antes da irradiação, sendo que o peróxido de hidrogênio está em excesso em relação aos compostos fenólicos. Sabe-se que a exposição do H_2O_2 à radiação UV gera artificialmente radicais $HO\bullet$, de acordo com a Equação 9:



A constante cinética ($k_{HO\bullet}$) para a reação do eugenol e seus derivados com o radical $HO\bullet$ foi determinada utilizando-se a Equação 10:

$$\text{Equação 10} \quad k_{HO\bullet} = k_{HO\bullet+h\nu} - k_{h\nu}$$

onde $k_{HO\bullet+h\nu}$ e $k_{h\nu}$ representam as constantes cinéticas determinadas pelo decaimento dos compostos fenólicos frente à fotólise por UV na presença e na ausência de H_2O_2 , respectivamente. O cálculo da $k_{HO\bullet}$ permite um estudo comparativo da atividade antirradicalar dos compostos fenólicos frente ao radical $HO\bullet$. Segundo Almeida e colaboradores⁵ uma alta atividade antirradicalar está relacionada a um maior tempo de permanência do antioxidante no meio, ou seja, uma baixa constante de velocidade ($k_{HO\bullet}$) frente a mesma concentração de radical hidroxil.

Para quantificarmos a quantidade de radical $HO\bullet$ gerado ao longo do tempo durante a fotodecomposição do H_2O_2 , traçamos inicialmente uma curva de calibração, utilizando-se a espectroscopia UV-Vis. Foram preparadas soluções padrão com diferentes concentrações de H_2O_2 e medidas as absorvâncias nos comprimentos de onda de 220, 230 e 240 nm.

A curva de calibração é mostrada na Figura 28 e observa-se uma boa linearidade entre absorvância e concentração do H_2O_2 , com coeficientes de correlação muito próximos a 1. A seguir foram realizados os ensaios de fotólise do H_2O_2 em função do tempo, e os resultados da concentração de H_2O_2 , medidos em 230 nm, são mostrados na Figura 29. No mesmo gráfico está representada a quantidade de radical $HO\bullet$ gerado ao longo do tempo, calculada a partir da concentração inicial de H_2O_2 :

$$[H_2O_2]_0 = [H_2O_2] + \frac{[HO\bullet]}{2}$$

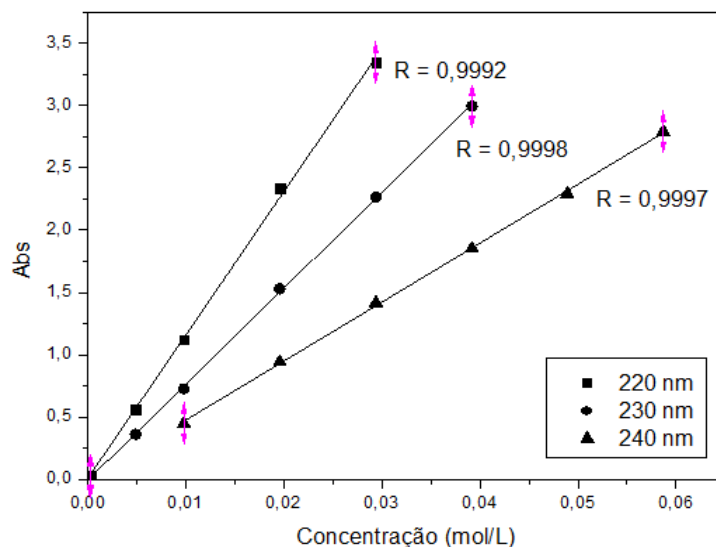


Figura 28 – Curva de calibração do peróxido de hidrogênio, utilizada para quantificação da fotodecomposição do H_2O_2 .

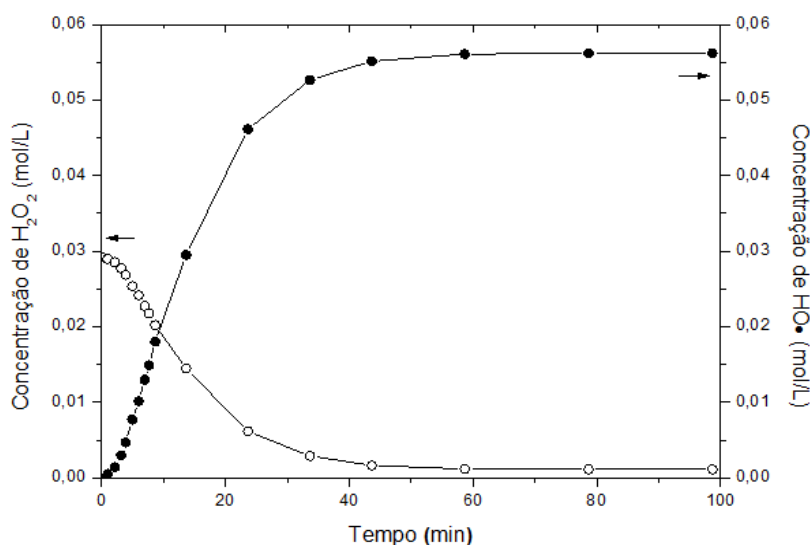


Figura 29 – Quantificação da fotodecomposição do H_2O_2 frente à fotólise; $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 0,029 \text{ mol L}^{-1}$.

Podemos observar a partir da Figura 29, que a fotodecomposição do peróxido de hidrogênio inicia-se simultaneamente com a exposição à radiação UV, sendo que em 12 min de irradiação a concentração de H_2O_2 reduz, aproximadamente, 50% de seu valor inicial. A fotodecomposição completa do H_2O_2 se dá com, aproximadamente, 42 min de irradiação. Além disso, podemos observar que a

concentração do radical HO• aumenta rapidamente com o tempo, tornando-se praticamente constante quando todo H₂O₂ foi decomposto. Como a concentração do HO• varia com o tempo, a constante cinética ($k_{HO\bullet}$) determinada experimentalmente é uma constante cinética aparente. Contudo, esta constante cinética pode ser usada para comparar a atividade antirradicalar dos diferentes antioxidantes com o radical HO•, pois num determinado instante de tempo todos os compostos fenólicos estão reagindo com a mesma quantidade de radicais.

A título de ilustração, a Figura 30 apresenta o cromatograma do decaimento cinético da solução hidroetanólica de dehidrodieugenol, na presença do H₂O₂. Percebemos então, que esses decaimentos cinéticos são mais rápidos comparados com os decaimentos na ausência do peróxido de hidrogênio. Os valores das constantes cinéticas de decomposição fotolítica na presença do H₂O₂ ($k_{HO\bullet+h\nu}$), as constantes $k_{HO\bullet}$ calculadas pela Equação 10 e os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) do eugenol e seus derivados livres são apresentados na Tabela 2, Tabela 3 e Tabela 4.

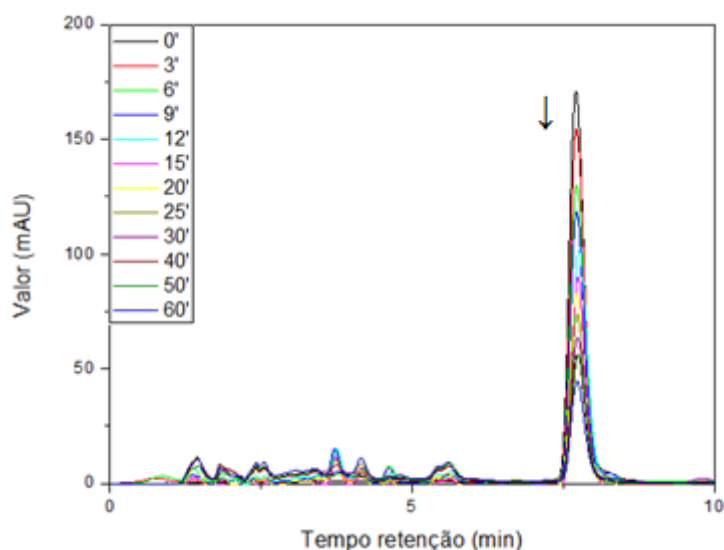


Figura 30 – Cromatograma do decaimento cinético da solução hidroetanólica de dehidrodieugenol, na presença de H₂O₂.

As constantes de velocidade ($k_{HO\bullet}$) para a SE, SI e SD são $1,13 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, $2,90 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ e $2,27 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, respectivamente. Nós podemos ver que o dehidrodieugenol reage mais lentamente (baixa constante de velocidade) contra a

mesma concentração do radical HO•, quando comparado com o eugenol e isoeugenol. Assim, podemos dizer que o primeiro tem uma maior atividade antirradicalar, seguido pelos outros compostos fenólicos estudados aqui, visto que ele permanece mais tempo no meio (maior tempo de meia-vida). Estes resultados estão de acordo com os obtidos da atividade antioxidante dos compostos fenólicos frente ao DPPH.

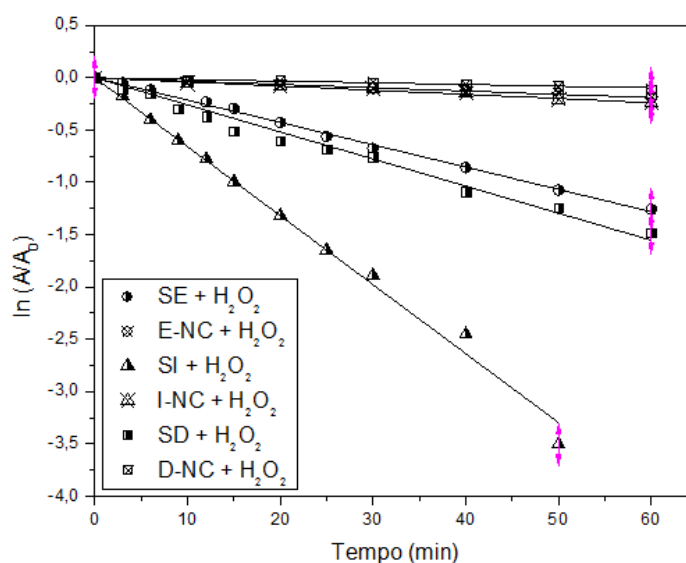


Figura 31 – Decaimento cinético das soluções hidroetanólicas de eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol e das soluções de nanocápsulas contendo eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol na presença de H₂O₂ (SE + H₂O₂, SI + H₂O₂, SD + H₂O₂, E-NC + H₂O₂, I-NC + H₂O₂ e D-NC + H₂O₂, respectivamente).

A Figura 31 apresenta os decaimentos cinéticos das SE, SI, SD, E-NC, I-NC e D-NC na presença do H₂O₂, respectivamente. Podemos ver claramente que, para os três sistemas até o tempo de fotólise de 110 min, a nanocápsula protege os antioxidantes da reação com o radical HO•.

Analisando as constantes de velocidade ($k_{HO\bullet}$) para E-NC, I-NC and D-NC, podemos ver que o decaimento cinético está, aproximadamente, 7,8, 15,4 e 3,0 vezes menor que seus respectivos antioxidantes livres em solução. Os resultados mostraram que para o eugenol e seus derivados nanoencapsulados, a presença do PCL foi crucial para obter uma prolongada atividade antirradicalar contra o extremamente reativo HO•, comparado com os antioxidantes não encapsulados.

Portanto, estes resultados demonstram que a associação de eugenol e seus derivados a nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona representa uma alternativa promissora no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

5.2.1.2 Ensaio por espectrofotometria UV-Vis

Nas Figura 32, Figura 33 e Figura 34 são apresentados, respectivamente, os espectros de absorção das soluções dos antioxidantes eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol, em diferentes tempos de decomposição fotolítica, na ausência de H_2O_2 . As absorções máximas do eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol ocorrem nos comprimentos de onda de 279, 257 e 287 nm, respectivamente.

Os espectros de decaimento da absorbância das soluções dos antioxidantes eugenol e isoeugenol, na presença de H_2O_2 , estão no Anexo D.

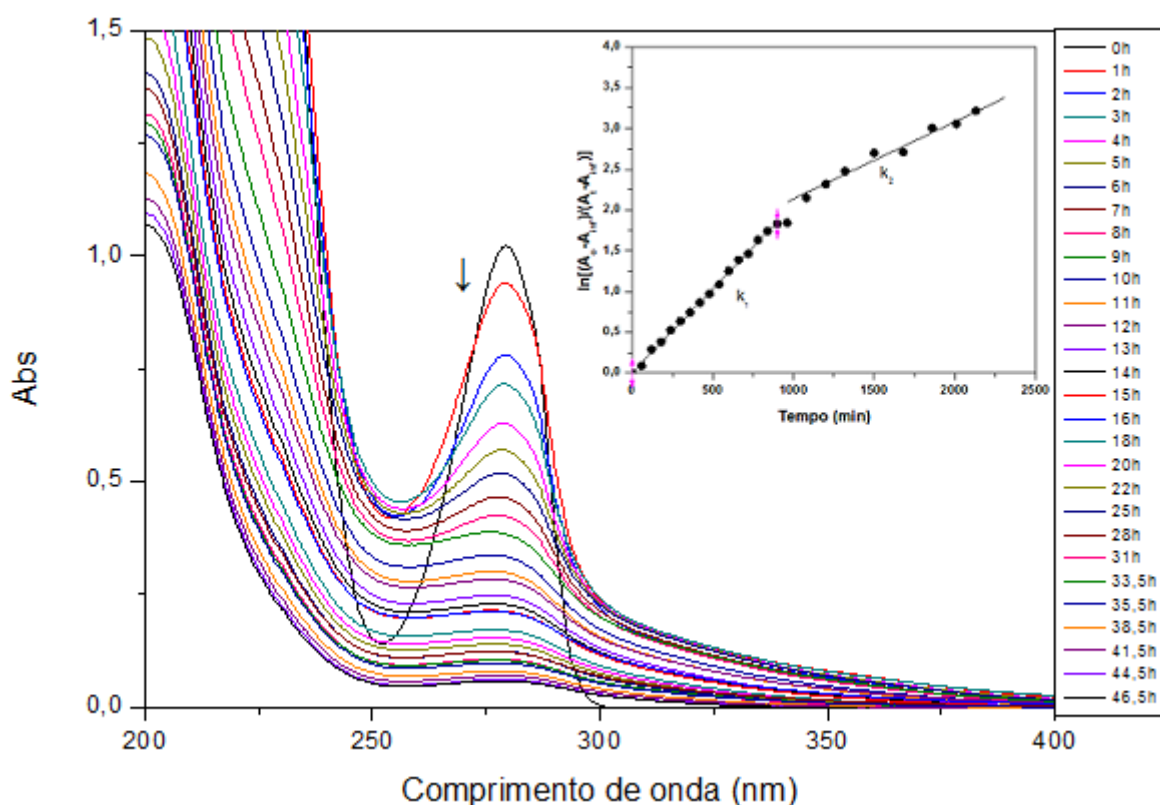


Figura 32 – Decaimento da absorbância do eugenol na concentração de $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

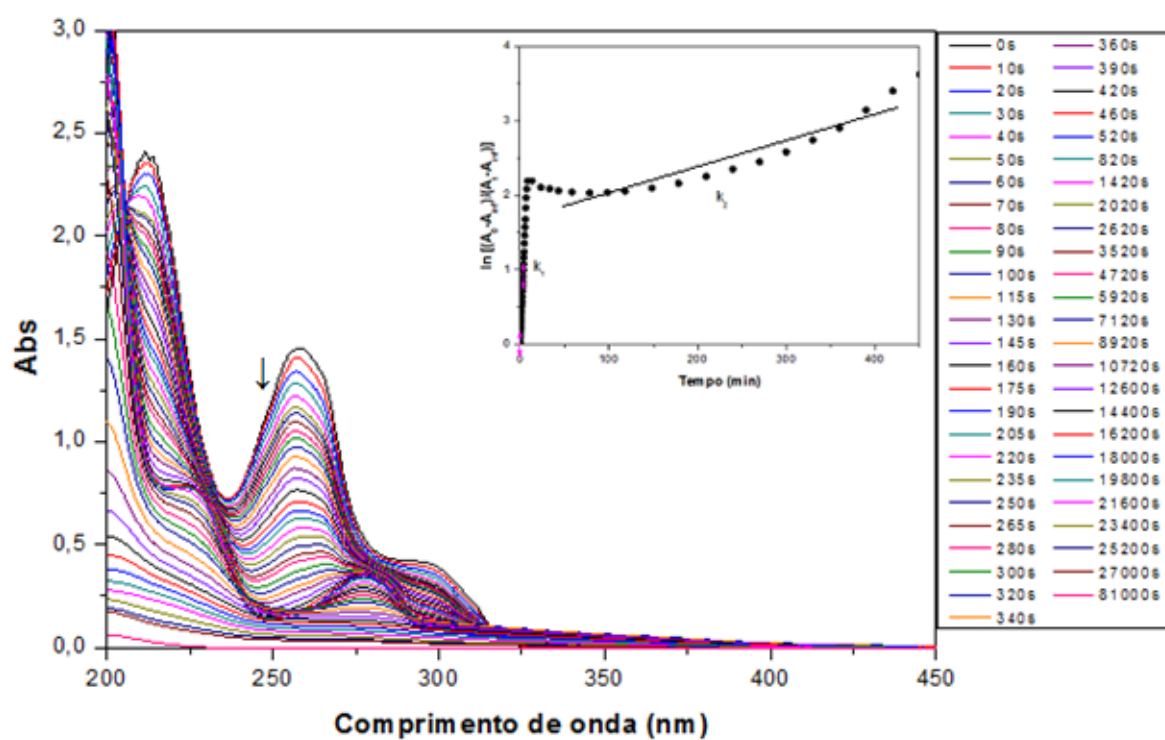


Figura 33 – Decaimento da absorvância do isoeugenol na concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

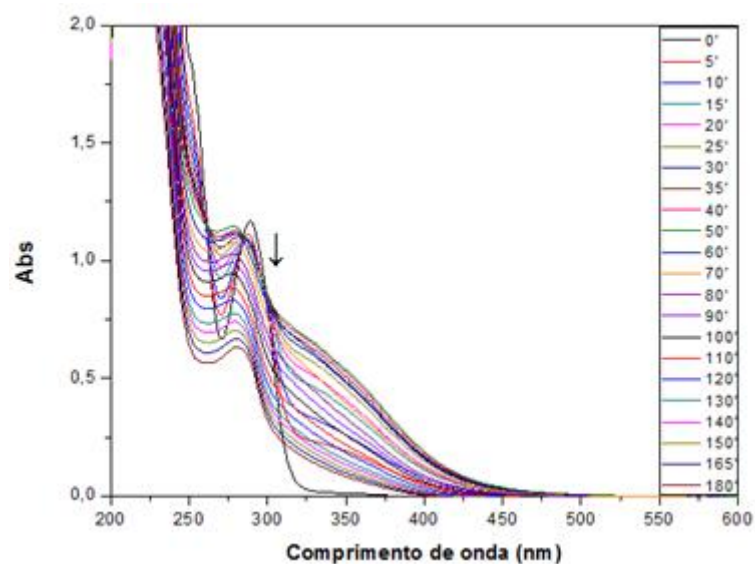


Figura 34 – Decaimento da absorvância do dehidrodieugenol na concentração de $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Na Tabela 5 temos os valores numéricos das constantes cinéticas de decomposição fotolítica e os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) do eugenol e seus derivados, os quais foram calculadas utilizando-se as Equações 4 e 6, na presença e na ausência do H_2O_2 .

Tabela 5 – Constantes cinéticas do eugenol e isoeugenol, e seus respectivos tempos de meia-vida calculados pelo acompanhamento dos decaimentos no UV-Vis.

Sistemas		k (min ⁻¹)	R	t _{1/2} (min)
SE + hν	k _{hν}	1,80x10 ⁻³ ± 0,0002	0,9950 ± 0,0045	385,79
SE + hν + H ₂ O ₂	k _{hν+HO•}	2,73x10 ⁻² ± 0,0021	0,9919 ± 0,0013	25,40
SE + H ₂ O ₂	k _{HO•}	2,55x10 ⁻² ± 0,0021	-	27,19
SI + hν	k _{hν}	2,46x10 ⁻¹ ± 0,0281	0,9970 ± 0,0042	2,81
SI + hν + H ₂ O ₂	k _{hν+HO•}	4,45x10 ⁻¹ ± 0,0446	0,9984 ± 0,0005	1,55
SI + H ₂ O ₂	k _{HO•}	1,98x10 ⁻¹ ± 0,0446	-	3,49

Nos ensaios da interação direta dos compostos fenólicos com H_2O_2 , sem incidência da radiação UV, não foi observado o decaimento de absorbância para o eugenol e seus derivados, uma vez que sem a influência da radiação não ocorre a formação do radical HO•.

Comparando-se os valores das constantes de velocidade dos antioxidantes livres, obtidos por CLAE e espectrofotometria UV-Vis, na ausência do peróxido de hidrogênio, podemos observar que os resultados obtidos não são da mesma ordem de grandeza. Além disso, podemos dizer que os resultados de UV-Vis podem estar equivocados, visto que os produtos formados durante a fotólise podem estar absorvendo próximo ao comprimento de onda de absorção máxima do antioxidante e, conseqüentemente, interferindo na absorbância do mesmo. Resultados similares são observados na presença do H_2O_2 .

5.2.1.3 Ensaios por espectrofotometria de fluorescência

Na Figura 35 são apresentados os espectros de excitação e emissão do eugenol na concentração de $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Nota-se que a curva de excitação possui dois máximos de intensidade, em 232 nm e 279 nm. Nos experimentos de decomposição fotolítica, as curvas de emissão de fluorescência do eugenol foram obtidas utilizando-se o comprimento de onda de excitação de 232 nm.

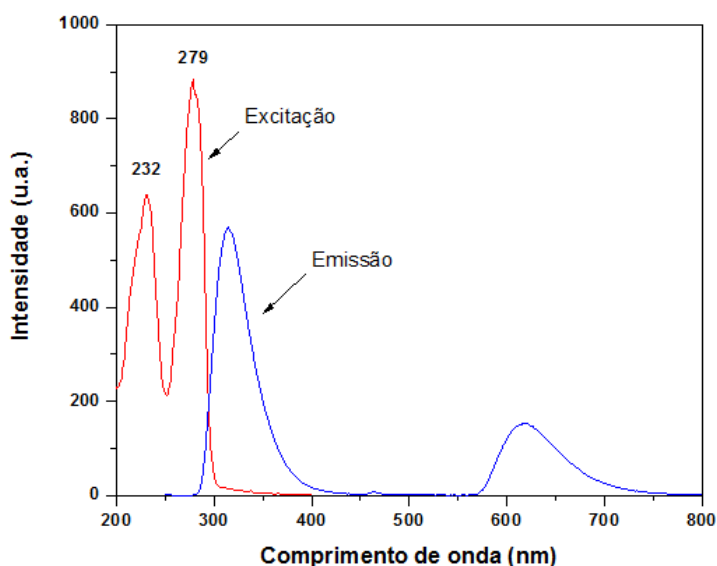


Figura 35 – Espectros de excitação e emissão do eugenol.

O decaimento da intensidade de emissão fluorescente do eugenol, frente à fotólise na ausência e na presença de H₂O₂, está representado na Figura 36 e Figura 37, respectivamente.

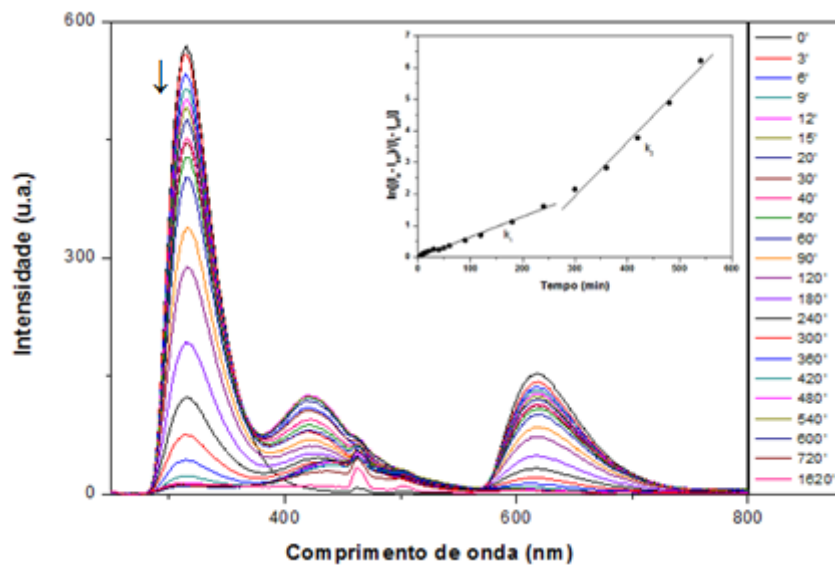


Figura 36 – Espectros de emissão fluorescente do eugenol na ausência do H_2O_2 , $\lambda_{\text{excit}} = 232$ nm.

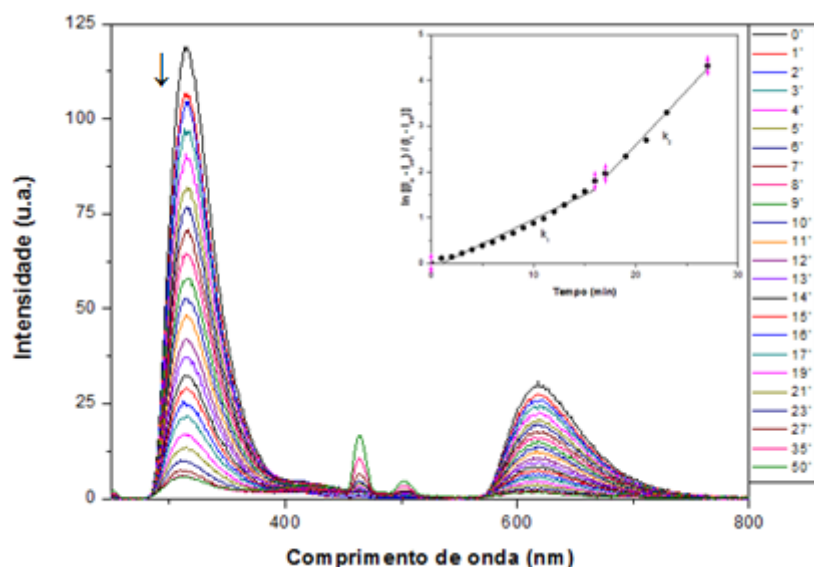


Figura 37 – Espectros de emissão fluorescente do eugenol na presença do H_2O_2 , $\lambda_{\text{excit}} = 232$ nm.

Na Figura 38 são apresentados os espectros de excitação e emissão do isoeugenol na concentração de $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Nota-se que a curva de excitação possui três máximos de intensidade, em 215, 258 e 298 nm. Nos experimentos de decomposição fotolítica, as curvas de emissão de fluorescência do isoeugenol foram obtidas utilizando-se um comprimento de onda de excitação de 258 nm.

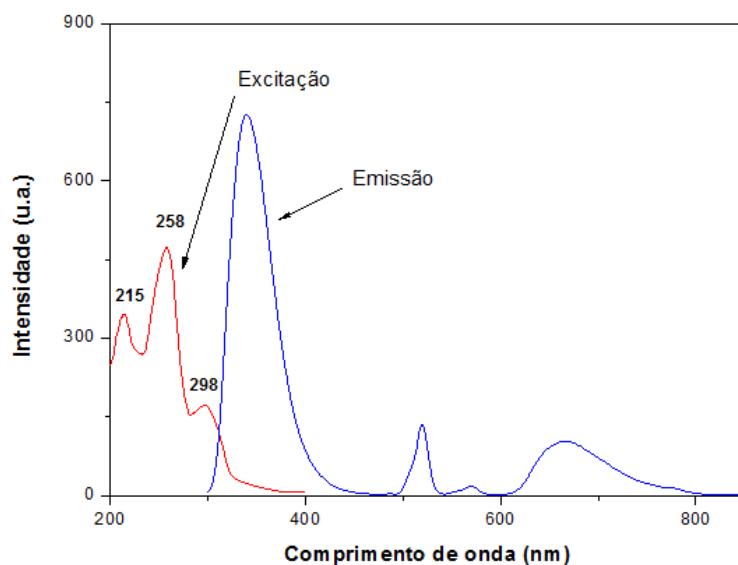


Figura 38 – Espectros de excitação e emissão do isoeugenol.

O decaimento da intensidade de emissão fluorescente do isoeugenol, frente à fotólise, na ausência e na presença de H_2O_2 , está representado na Figura 39 e Figura 40, respectivamente.

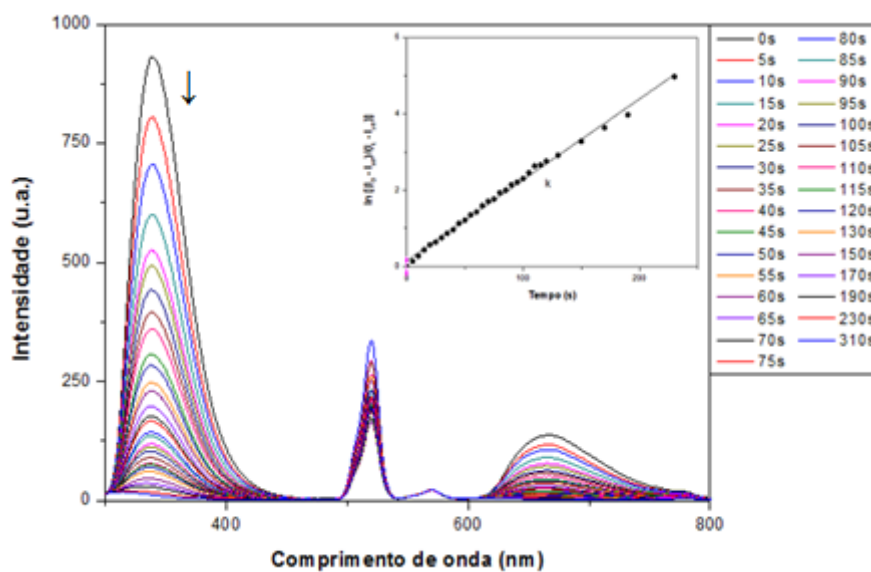


Figura 39 – Espectros de emissão fluorescente do isoeugenol na ausência do H_2O_2 , $\lambda_{\text{excit}} = 258 \text{ nm}$.

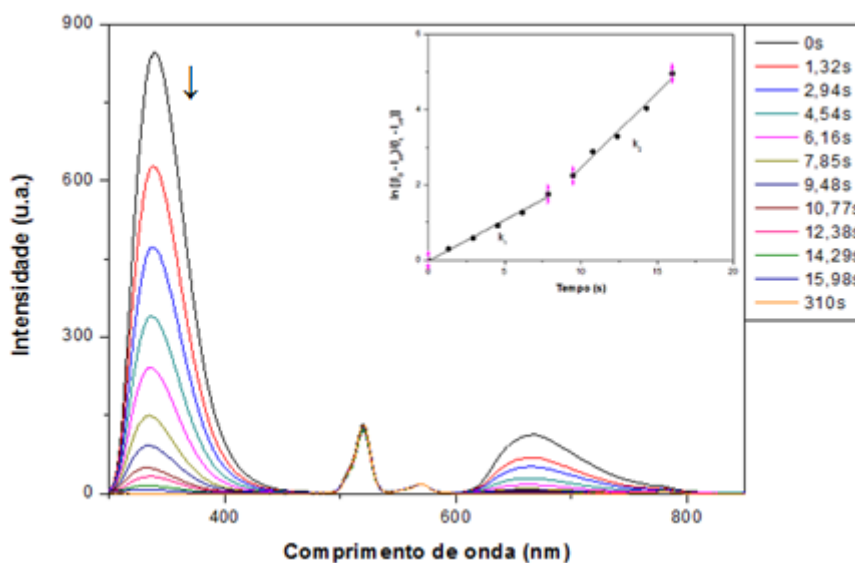


Figura 40 – Espectros de emissão fluorescente do isoeugenol na presença do H₂O₂, $\lambda_{\text{excit}} = 258$ nm.

Na Figura 41 são apresentados os espectros de excitação e emissão do dehidrodieugenol na concentração de 5×10^{-6} mol L⁻¹. Nota-se que a curva de excitação possui dois máximos de intensidade, em 230 e 291 nm. Nos experimentos de decomposição fotolítica as curvas de emissão de fluorescência do dehidrodieugenol foram obtidas utilizando-se um comprimento de onda de excitação de 230 nm.

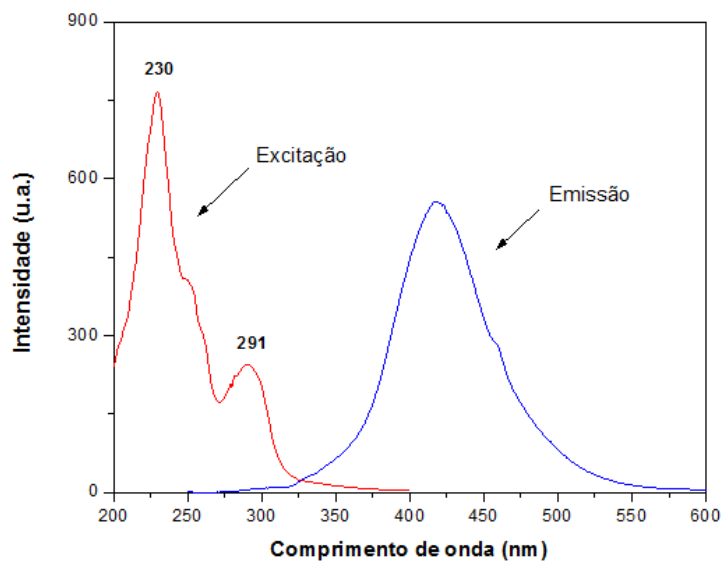


Figura 41 – Espectros de excitação e emissão do dehidrodieugenol.

O decaimento da intensidade de emissão fluorescente do dehidrodieugenol, frente à fotólise, na ausência e na presença de H_2O_2 , está representado na Figura 42 e Figura 43, respectivamente.

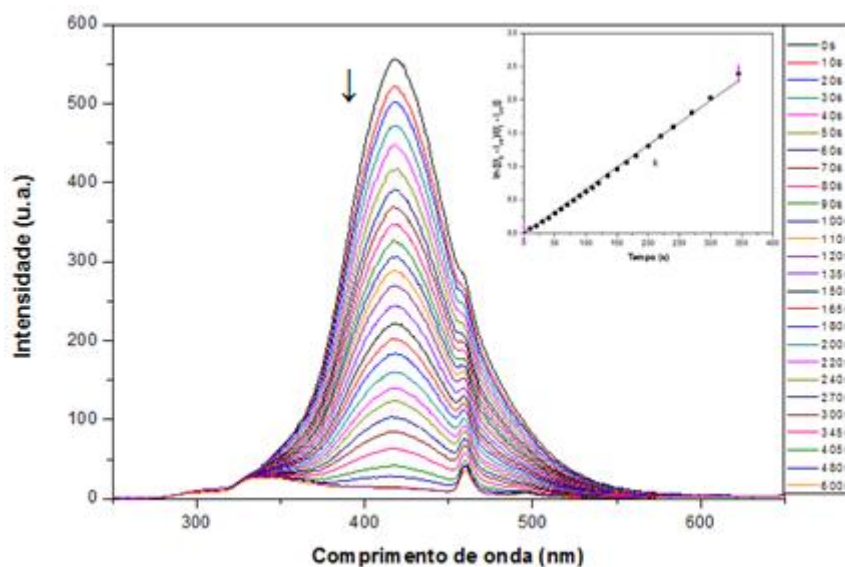


Figura 42 – Espectros de emissão fluorescente do dehidrodieugenol na ausência do H_2O_2 , $\lambda_{\text{excit}} = 230$ nm.

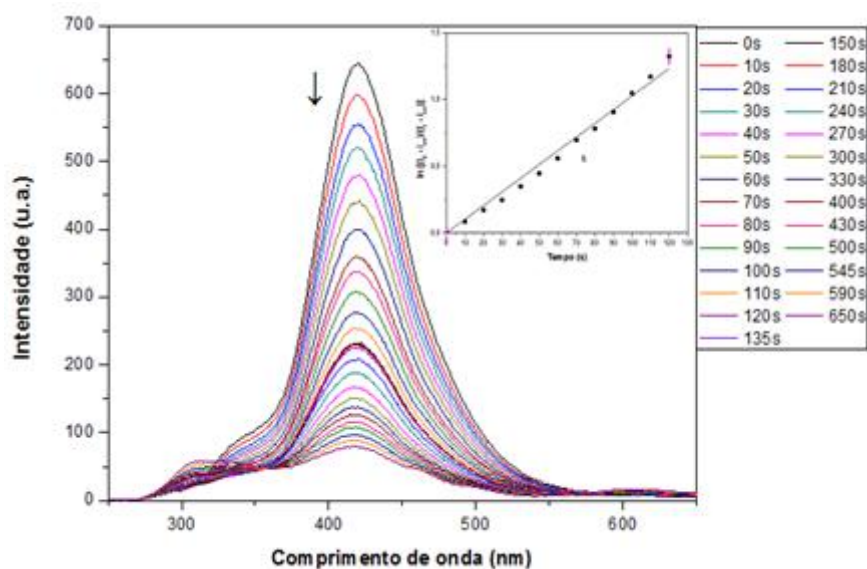


Figura 43 – Espectros de emissão fluorescente do dehidrodieugenol na presença do H_2O_2 , $\lambda_{\text{excit}} = 230 \text{ nm}$.

Tabela 6 – Constantes cinéticas do eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol, e seus respectivos tempos de meia-vida calculados pelo acompanhamento dos decaimentos na fluorescência.

Sistemas		$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$	R	$t_{1/2} \text{ (min)}$
SE + $h\nu$	$k_{h\nu}$	$7,11 \times 10^{-3} \pm 0,00005$	$0,9967 \pm 0,0014$	97,42
SE + $h\nu + \text{H}_2\text{O}_2$	$k_{h\nu+\text{HO}\cdot}$	$8,82 \times 10^{-2} \pm 0,0090$	$0,9955 \pm 0,0009$	7,86
SE + H_2O_2	$k_{\text{HO}\cdot}$	$8,10 \times 10^{-2} \pm 0,0090$	-	8,55
SI + $h\nu$	$k_{h\nu}$	$2,25 \times 10^{-2}$	0,9985	30,81
SI + $h\nu + \text{H}_2\text{O}_2$	$k_{h\nu+\text{HO}\cdot}$	$2,83 \times 10^{-1} \pm 0,0344$	$0,9927 \pm 0,0032$	2,44
SI + H_2O_2	$k_{\text{HO}\cdot}$	$2,61 \times 10^{-1} \pm 0,0344$	-	2,65
SD + $h\nu$	$k_{h\nu}$	$7,07 \times 10^{-3} \pm 0,0004$	$0,9991 \pm 0,0001$	98,08
SD + $h\nu + \text{H}_2\text{O}_2$	$k_{h\nu+\text{HO}\cdot}$	$1,09 \times 10^{-2} \pm 0,0007$	$0,9953 \pm 0,0031$	63,22
SD + H_2O_2	$k_{\text{HO}\cdot}$	$3,90 \times 10^{-3} \pm 0,0007$	-	177,88

Comparando-se os valores das constantes de velocidade dos antioxidantes livres, obtidos por CLAE e espectrofotometria de fluorescência, na ausência do peróxido de hidrogênio, podemos observar que os resultados obtidos são relativamente próximos. Este fato pode ser explicado considerando-se que nem todos os produtos da fotólise são fluorescentes, tornando esta técnica mais apropriada, comparada com as medidas de espectrofotometria UV-Vis. Neste último, podemos considerar que a probabilidade dos produtos da fotólise interferirem na absorção do antioxidante é alta.

5.3 Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados

Todas as formulações preparadas neste trabalho apresentaram-se macroscopicamente homogêneas e possuem um aspecto opalescente levemente azulado, devido ao efeito Tyndall, independente do tipo de nanoestrutura (nanocápsula ou nanoemulsão). Os sistemas nanoestruturados foram caracterizados por meio do teor de antioxidante, eficiência de encapsulamento, raio hidrodinâmico, índice de polidispersão, pH e potencial zeta. Além disso, foi determinada a estabilidade em função do tempo de armazenamento do eugenol e seus derivados encapsulados em nanocápsulas.

5.3.1 Teor de antioxidante, eficiência de encapsulamento, raio hidrodinâmico, índice de polidispersão, mobilidade, potencial zeta e pH

A título de ilustração, é mostrado na Figura 44 e Figura 45 o gráfico da distribuição do tamanho (R_h) e do potencial zeta (ξ) das nanocápsulas de isoeugenol, respectivamente. Os gráficos para o eugenol e dehidrodieugenol se encontram no anexo E. As características físico-químicas das nanocápsulas e nanoemulsões são apresentadas nas Tabela 7 e Tabela 8.

Como pode ser visto, as dispersões coloidais apresentaram uma boa eficiência de encapsulamento (maior que 97% e 91% para NC e NE, respectivamente), tamanho de partícula na escala nanométrica (R_h para NC entre 112 e 118 nm e para NE entre 97 e 102 nm), baixo índice de polidispersão (abaixo de 0,15 e de 0,24 para NC e NE, respectivamente), indicando uma pequena distribuição de tamanho das nanopartículas e, conseqüentemente, uma boa homogeneidade desses sistemas,^{51,90} e potencial zeta negativo (entre -14.3 e -15.6 mV para NC e entre -13,7 e -19,6 mV para NE).

Outro aspecto interessante é que o potencial zeta das nanopartículas não depende necessariamente da natureza do antioxidante, visto que as nanocápsulas e nanoemulsões brancas (sem a presença do antioxidante) não apresentaram valores de potencial zeta muito divergentes daqueles encontrados para as NC e NE contendo antioxidante. Estes resultados concordam com trabalhos publicados anteriormente,^{21,38} os quais sugerem que o potencial zeta resultante depende da força iônica do meio, do pH, da natureza química do polímero e dos agentes estabilizantes (surfactantes). Mora-Huertas²⁷ et al. sugerem que o potencial zeta negativo das nanocápsulas preparadas com um poliéster, tal como o PCL, usando surfactantes não iônicos, é devido a presença dos grupos carboxílicos terminais do polímero. O potencial zeta negativo das nanoestruturas (NC e NE), preparadas com os estabilizantes Tween 80 e Span 60, permite prever que tais partículas não irão agregar ao longo do tempo devido à alta barreira de energia de ativação entre eles. Além disso, outro fator que contribui para a estabilidade físico-química das partículas coloidais é o efeito estérico do surfactante (Tween 80; alto valor de EHL - equilíbrio hidrófilo-lipófilo), adsorvido na nanocápsulas (interface partícula/água).

Além disso, a presença dos antioxidantes eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol praticamente não influencia nas características físico-químicas das nanoestruturas. O eugenol e seus derivados encapsulados em NC têm um maior raio hidrodinâmico do que suas correspondentes NE, evidenciando a influência do sistema nanoestruturado no tamanho da partícula.

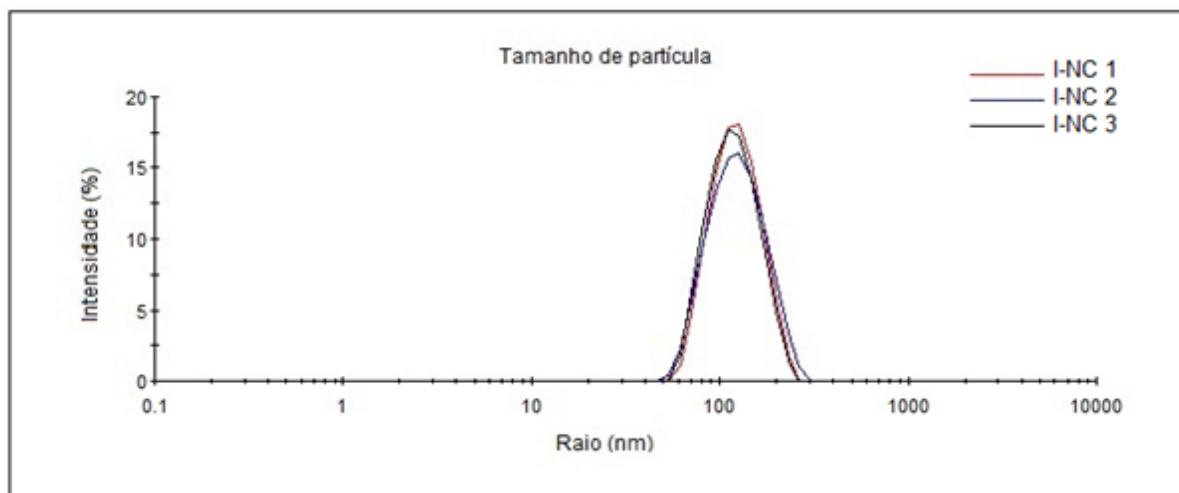


Figura 44 – Distribuição do raio hidrodinâmico das nanocápsulas de isoeugenol em triplicata.

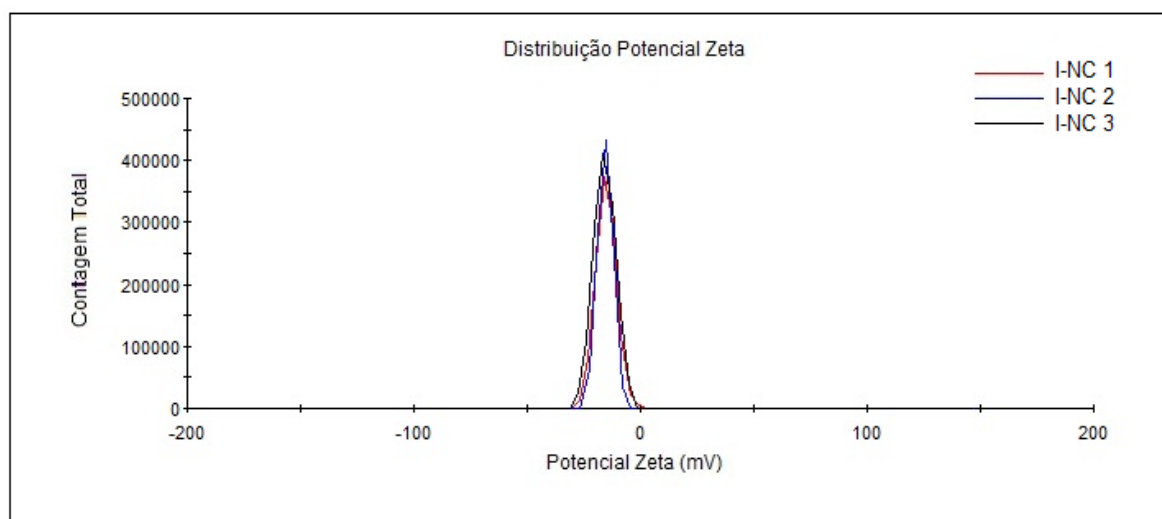


Figura 45 – Distribuição do potencial zeta das nanocápsulas de isoeugenol em triplicata.

Na tabela 7 observamos que o teor de antioxidante obtido nas NC e NE é menor do que o valor teórico (1 mg mL^{-1}) e este fato pode estar associado as condições de preparo das amostras como aquecimento e vácuo os quais podem reduzir a quantidade do fármaco nas nanoestruturas. Além disso, o teor de antioxidante nas NC é sempre maior do que nas NE, evidenciando que o polímero PCL diminui a volatilização dos fármacos.

Tabela 7 – Propriedades físico-químicas das nanoestruturas (NC e NE): teor de antioxidante, eficiência de encapsulamento e pH (n=3).

Formulações	Teor de antioxidante (mg mL⁻¹)	Eficiência de Encapsulamento (%)	pH
E-NC	0,87 ± 0,009	97,15 ± 0,21	6,04 ± 0,58
I-NC	1,01 ± 0,053	98,13 ± 0,20	5,81 ± 0,39
D-NC	0,77 ± 0,045	99,24 ± 0,07	5,97 ± 0,31
E-NE	0,52 ± 0,004	91,35 ± 1,06	6,33 ± 0,06
I-NE	0,64 ± 0,015	96,65 ± 0,18	6,45 ± 0,07
D-NE	0,69 ± 0,001	99,98 ± 0,01	6,07 ± 0,09

Tabela 8 – Propriedades físico-químicas das nanoestruturas (NC e NE): raio hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta (n=3)

Formulações	Raio hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
B-NC	109,2 ± 1,3	0,15 ± 0,01	-10,0 ± 0,7
E-NC	115,6 ± 1,0	0,15 ± 0,01	-14,3 ± 0,2
I-NC	112,9 ± 2,6	0,09 ± 0,02	-15,6 ± 0,3
D-NC	118,5 ± 3,3	0,12 ± 0,03	-14,3 ± 0,1
B-NE	102,3 ± 0,9	0,19 ± 0,01	-10,5 ± 0,6
E-NE	97,7 ± 4,8	0,18 ± 0,03	-17,2 ± 0,8
I-NE	97,9 ± 1,6	0,18 ± 0,01	-19,6 ± 0,9
D-NE	102,0 ± 1,6	0,24 ± 0,04	-13,7 ± 1,3

5.3.2 Estabilidade físico-química das nanocápsulas em função do tempo

A literatura tem mostrado que as NC são mais promissoras que as NE para encapsulação de fármacos devido a sua estrutura casca-núcleo, o qual leva a um aumento da estabilidade quando ministrado via oral. As NE podem ser rompidas quando submetidas as condições do trato gastrointestinal. Levando em consideração estes aspectos, neste trabalho avaliamos apenas a estabilidade físico-química das nanocápsulas em função do tempo.

No período de 7 meses de armazenamento ao abrigo da luz, as nanocápsulas contendo eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol mantiveram seu característico aspecto opalescente. A Figura 46, Figura 47 e Figura 48 apresentam os valores de raio hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta, respectivamente, ao longo do tempo. Analisando-se os valores numéricos destes parâmetros, podemos considerar que as nanocápsulas contendo eugenol e seus derivados são estáveis neste período de tempo. Cabe salientar ainda que, para todas as nanopartículas, o potencial zeta permaneceu negativo durante o tempo de armazenamento, podendo ser considerado um aspecto positivo em termos de estabilidade físico-química, visto que sugere uma baixa probabilidade de agregação. Contudo, observamos uma pequena diminuição (em módulo) do potencial zeta para o sistema D-NC. Considerando todos estes resultados relacionados à estabilidade, podemos então enfatizar a importância do poliéster PCL para prevenir a coalescência (agregação) das nanocápsulas, ao longo do tempo.

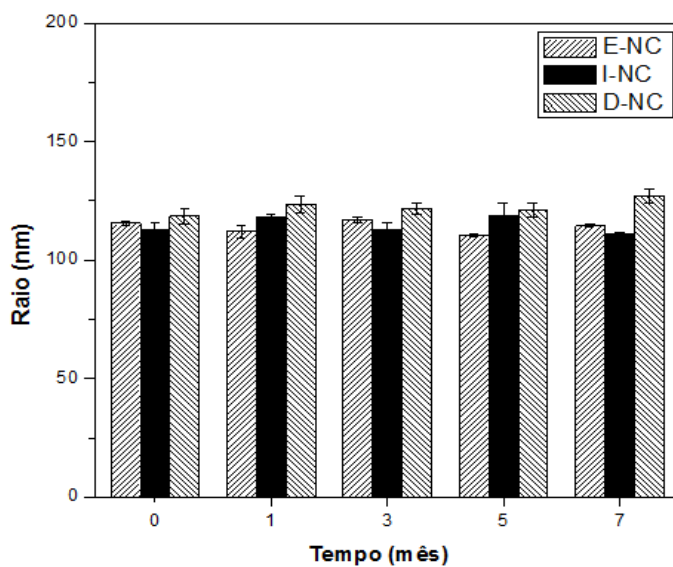


Figura 46 – Raio hidrodinâmico das nanocápsulas de eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol em função do tempo.

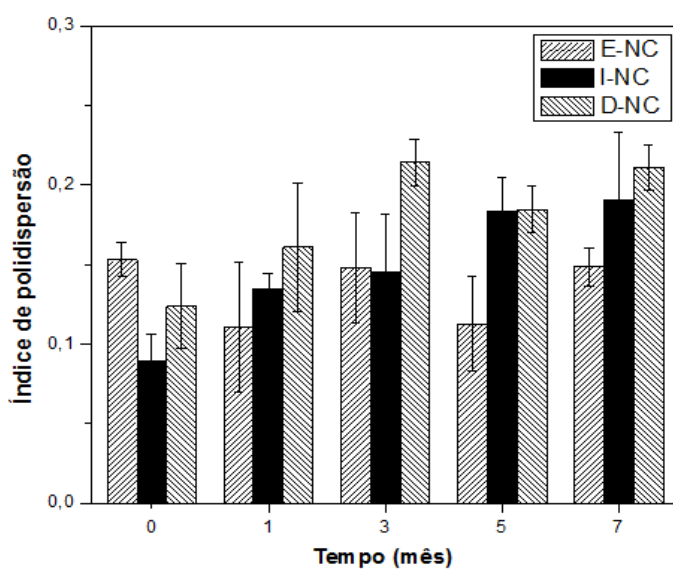


Figura 47 – Índice de polidispersão das nanocápsulas de eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol em função do tempo.

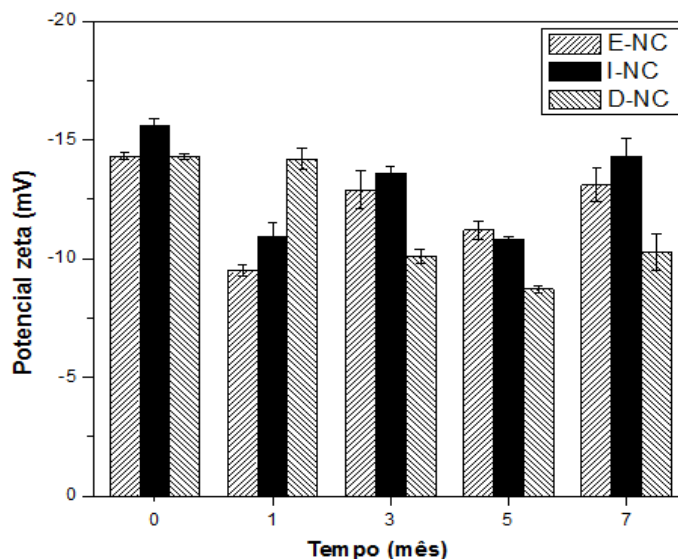


Figura 48 – Potencial zeta das nanocápsulas de eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol em função do tempo.

5.3.3 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

As medidas de SAXS foram realizadas para as NC, NE, dispersões aquosas de Span 60, Tween 80 e a mistura de Span 60 e Tween 80 com o objetivo de avaliar os aspectos estruturais dos sistemas estudados. Os resultados de intensidade de radiação espalhada versus vetor de onda para os sistemas estudados estão mostrados na Figura 49, Figura 50, Figura 51 e Figura 52.

Podemos observar na Figura 49 que as curvas de SAXS dos surfactantes Tween 80, Span 60 e a mistura dos mesmos, são típicas de estrutura micelar (modelo coroa-núcleo) com forma esférica. A curva de SAXS da mistura dos surfactantes pode ser devido à formação de micelas mistas de Span 60 e Tween 80 ou a soma do espalhamento das micelas distintas. No intervalo de vetor de onda estudado ($0,13 < q(\text{nm}^{-1}) < 3,4$) não podemos observar o tamanho real das nanopartículas, isto somente seria possível se as medidas de SAXS fossem realizadas num menor intervalo de vetor de onda. Supondo que as nanoestruturas (NC e NE) possuem uma forma esférica, no intervalo de vetor de onda estudado, poderíamos estar observando na curva de SAXS parte do espalhamento, correspondente as 2^a ou 3^a oscilações do fator de forma. Na Figura 50 podemos

observar que o eugenol não altera o perfil da curva, indicando que o antioxidante não modifica a estrutura (forma) da nanocápsula. Nas Figuras 51 e 52 podemos observar que o aumento da temperatura não altera o tamanho da NC e NE, pois a $I(q)$ é igual para as diferentes temperaturas, quando $q < 0,4 \text{ nm}^{-1}$. A alteração no perfil da curva de SAXS com a temperatura pode estar relacionada com a camada de surfactante que vai se alterando com o aquecimento.

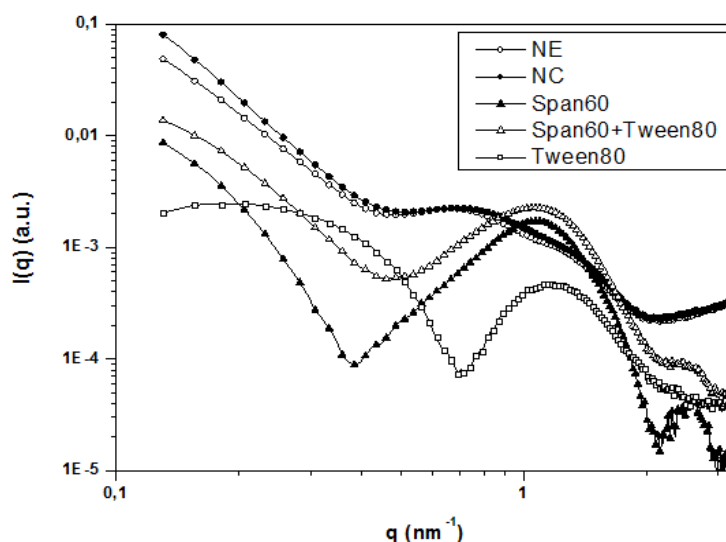


Figura 49 – $I(q)$ versus vetor de onda para as nanocápsulas (NC), nanoemulsões (NE) e surfactantes (Span 60 e Tween 80).

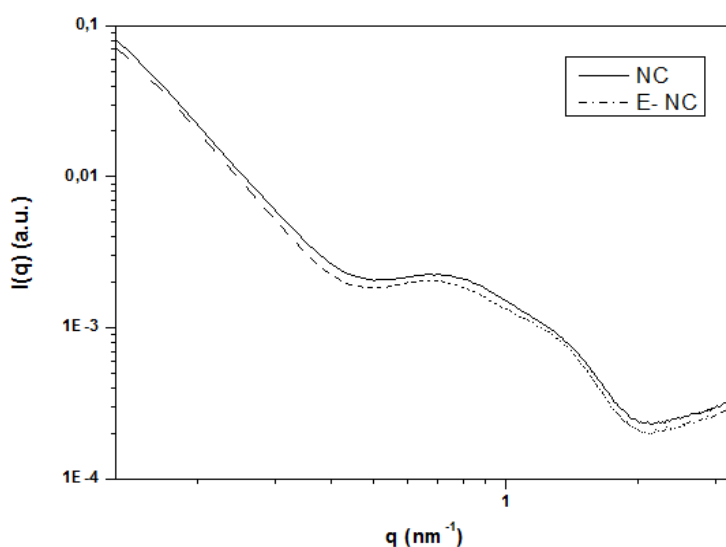


Figura 50 – $I(q)$ versus vetor de onda para a nanocápsula em branco (NC) e para a nanocápsula carregada com eugenol (E-NC).

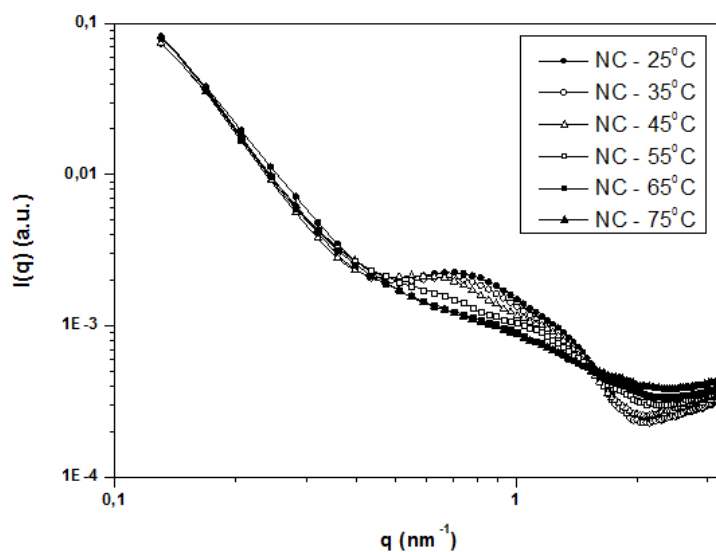


Figura 51 – $I(q)$ versus vetor de onda para as nanocápsulas (NC) em função da temperatura.

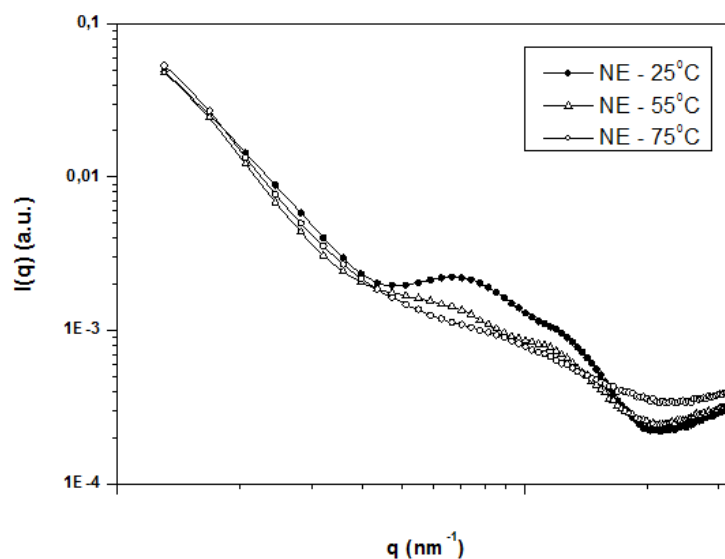


Figura 52 – $I(q)$ versus vetor de onda para as nanoemulsões (NE) em função da temperatura.

5.3.4 Resultados da viabilidade celular

Os testes de viabilidade celular foram realizados visando encontrar uma futura aplicação terapêutica das nanoestruturas produzidas, em interação direta com as

células dos tecidos. A viabilidade celular frente aos sistemas nanoestruturados (NC e NE) contendo eugenol e isoeugenol foi avaliada através da medição da atividade mitocondrial de células vivas usando o método do MTT.⁹³ Macrófagos peritoneais foram cultivados na presença dos antioxidantes encapsulados em NC e NE por períodos de até 4h, e os resultados da viabilidade celular foram comparados com o grupo controle.

A Figura 53 e Figura 54 mostram os resultados da viabilidade celular para as nanocápsulas de eugenol e isoeugenol, respectivamente, em diferentes concentrações dos antioxidantes (0,5, 1 e 2 mg mL⁻¹) em um tempo de exposição de 1 e 4h. Nossos resultados mostram que o número de células vivas é alto para todas as concentrações de isoeugenol e tempos de incubação. Portanto, as I-NC podem ser consideradas não tóxicas em cultura de células, porque mais de 90% das células sobreviveram no período de 4h.

Os mesmos resultados podem ser observados para as E-NC quando as culturas de células foram expostas à concentração de eugenol de até 1 mg mL⁻¹. No entanto, após o tempo de exposição de 4h, os efeitos citotóxicos começaram a tornar-se mais evidentes, a viabilidade celular sofreu um claro declínio na concentração de eugenol de 2 mg mL⁻¹.

Nas Figuras 55, 56 e 57 foi avaliado o efeito da concentração do polímero sobre a viabilidade celular. Podemos observar que o PCL pode ser considerado não tóxico, pois este manteve a atividade mitocondrial das células vivas.

A Figura 58 mostra os resultados da viabilidade celular para as nanoemulsões de eugenol e isoeugenol, na concentração de 0,5 mg mL⁻¹ do antioxidante em um tempo de exposição de 1 e 4h. Como pode ser visto, os antioxidantes encapsulados em NE também não foram tóxicos em culturas de células, pois nenhum efeito perceptível sobre a viabilidade celular foi observada, mesmo após 4h de incubação. Portanto, o eugenol e isoeugenol, encapsulados em nanoestruturas, mantêm atividade mitocondrial reduzida das células, reduzindo o MTT, pelo menos para a concentração de antioxidantes de até 1 mg mL⁻¹, e pode ser considerado um substrato favorável para a cultura de células vivas. Uma avaliação mais aprofundada sobre a resposta celular para as nanoestruturas em relação a aplicações específicas será realizada em breve.

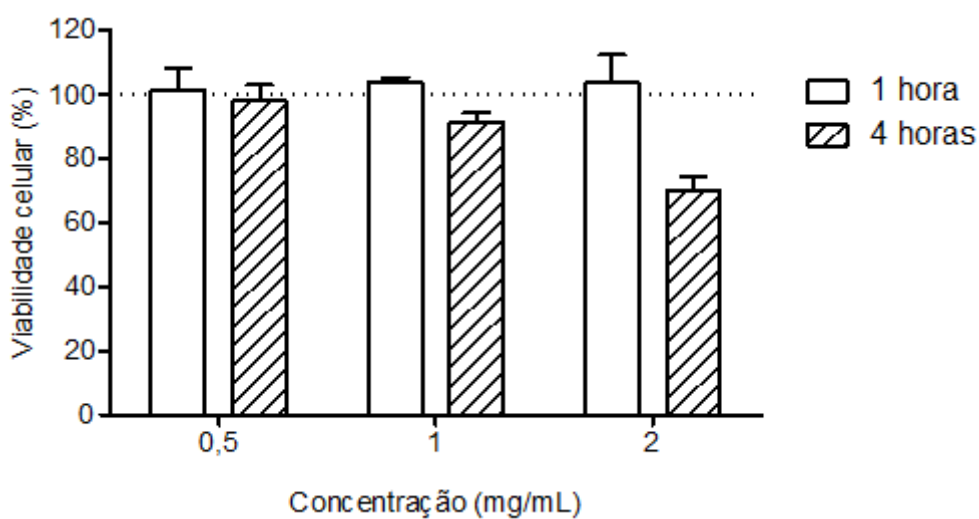


Figura 53 – Viabilidade de células expostas as nanocápsulas de eugenol ($0,5 - 2 \text{ mg mL}^{-1}$) com 10 mg mL^{-1} de polímero, pelo período de 1 e 4 horas. Os valores do controle de viabilidade estão representados pela linha pontilhada.

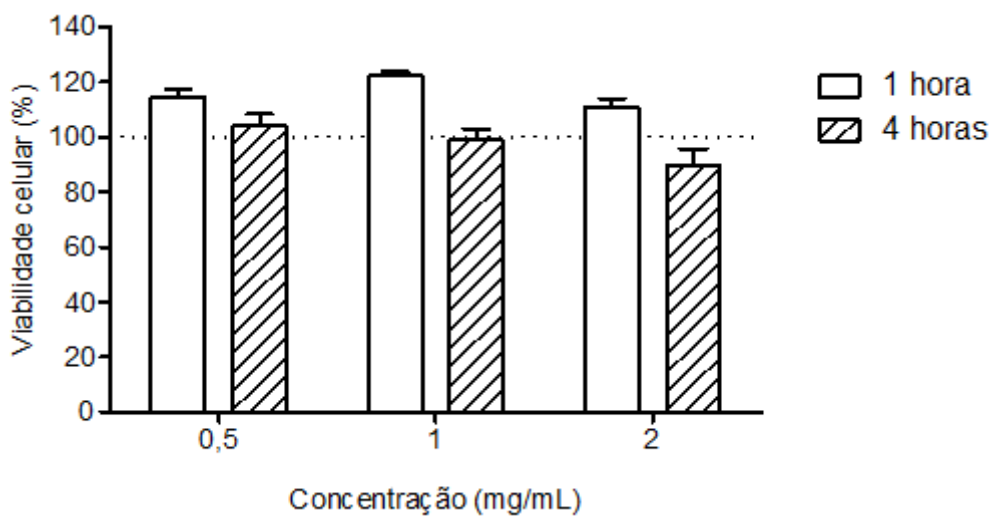


Figura 54 – Viabilidade de células expostas as nanocápsulas de isoeugenol ($0,5 - 2 \text{ mg mL}^{-1}$) com 10 mg mL^{-1} de polímero pelo período de 1 e 4 horas. Os valores do controle de viabilidade estão representados pela linha pontilhada.

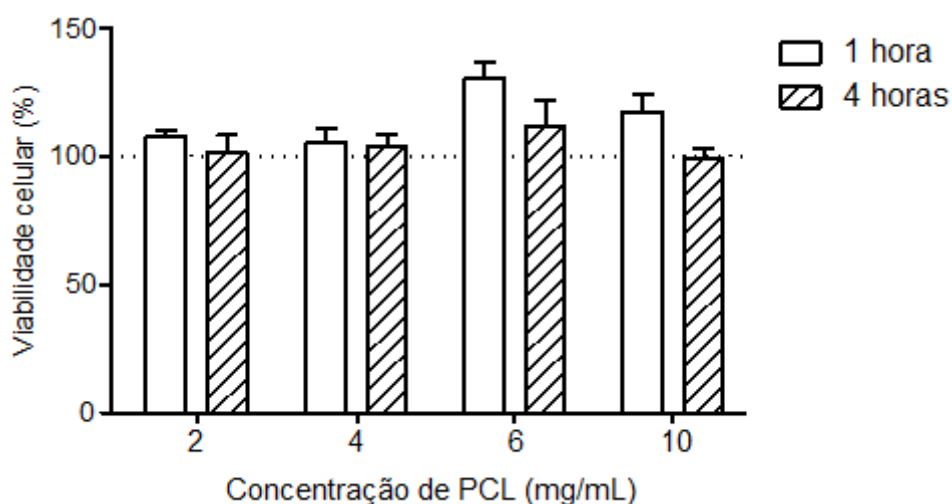


Figura 55 – Viabilidade de células expostas as nanocápsulas sem o antioxidante, com diferentes concentrações do polímero PCL (2 - 10 mg mL⁻¹) pelo período de 1 e 4 horas. Os valores do controle de viabilidade estão representados pela linha pontilhada.

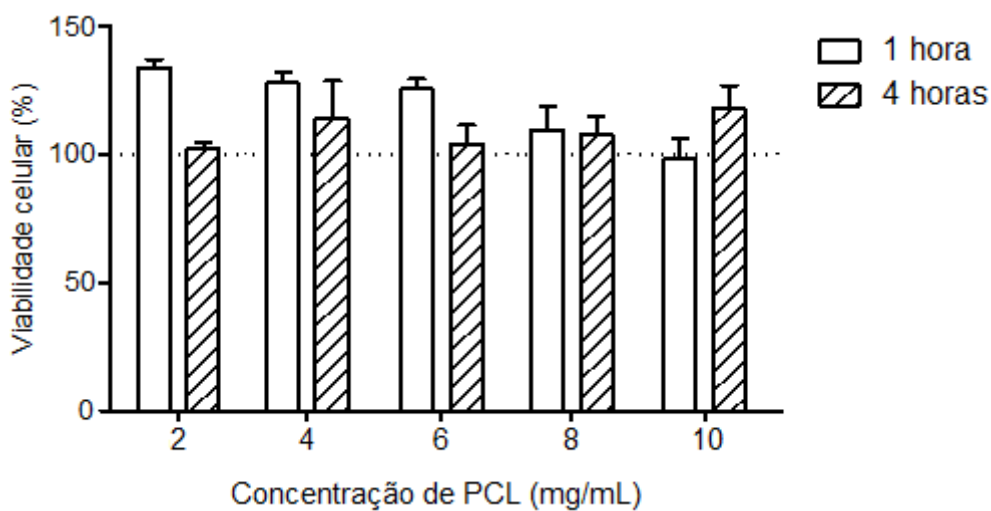


Figura 56 – Viabilidade de células expostas as nanocápsulas de eugenol (0,5 mg mL⁻¹) com diferentes concentrações de polímero (2 - 10 mg mL⁻¹) pelo período de 1 e 4 horas. Os valores do controle de viabilidade estão representados pela linha pontilhada.

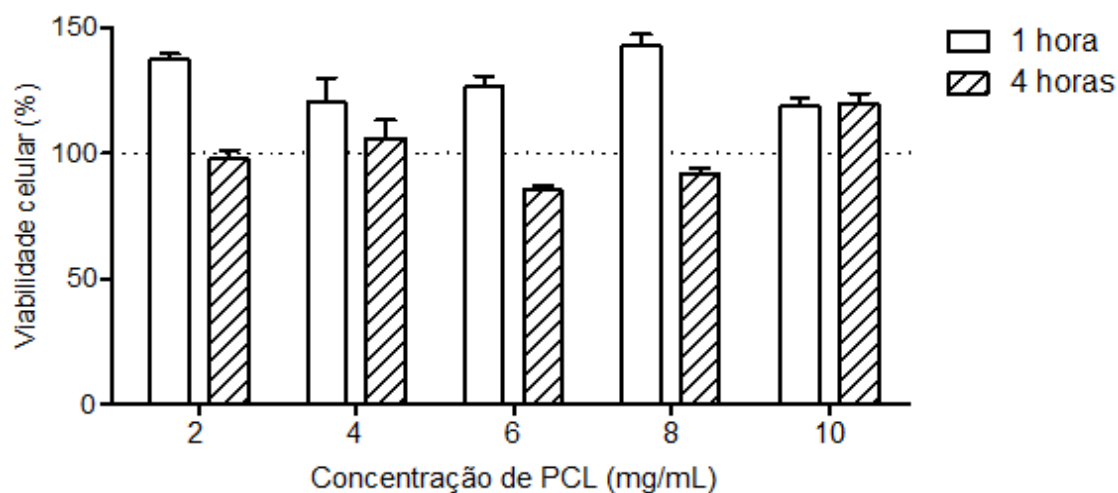


Figura 57 – Viabilidade de células expostas as nanocápsulas de isoeugenol ($0,5, \text{mg mL}^{-1}$) com diferentes concentrações de polímero ($2 - 10 \text{ mg mL}^{-1}$) período de 1 e 4 horas. Os valores do controle de viabilidade estão representados pela linha pontilhada.

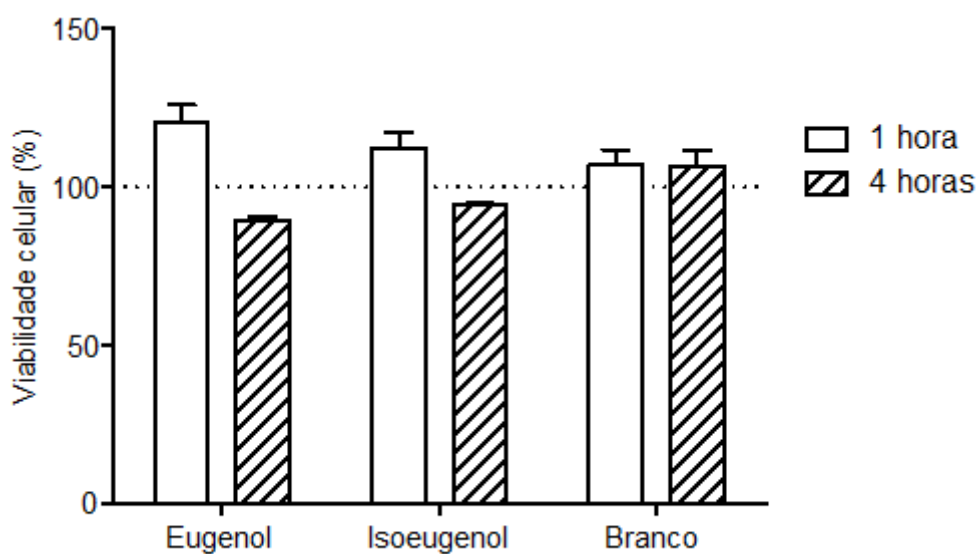


Figura 58 – Viabilidade de células expostas as nanoemulsões de eugenol ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$), isoeugenol ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e a nanoemulsão sem o antioxidante, pelo período de 1 e 4 horas. Os valores do controle de viabilidade estão representados pela linha pontilhada.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou, pela primeira vez, o aumento da fotoestabilidade e da atividade antirradicalar do eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol encapsulados em nanocápsulas (NC) e nanoemulsão (NE). As NC e NE contendo os antioxidantes apresentaram um raio hidrodinâmico nanométrico, alta eficiência de encapsulamento, baixo índice de polidispersão, pH levemente ácido e potencial zeta negativo. No período de 7 meses de armazenamento ao abrigo da luz as nanocápsulas contendo os antioxidantes fenólicos apresentaram uma boa estabilidade físico-química.

A associação do eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol em NC levou a um aumento de 16,6, 16,9 e 30,9 vezes, respectivamente, na fotoestabilidade destes compostos, quando comparados aos antioxidantes livres após 110 min de radiação UV-C. Comparando os diferentes sistemas nanoestruturados, a NC mostrou-se mais efetiva que a NE para aumentar a fotoproteção devido à capacidade do PCL em absorver fótons na região ultravioleta do espectro eletromagnético.

Os resultados cinéticos também indicaram uma prolongada atividade antirradicalar do eugenol e seus derivados quando associados em nanoestruturas.

Os testes de viabilidade celular mostraram que os sistemas nanoestruturados (NC e NE) foram atóxicos para as concentrações de antioxidante de até 1 mg mL^{-1} e podem ser considerados substratos favoráveis para células vivas.

Nanoestruturas contendo eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol representam alternativas para o desenvolvimento de inovações na nanomedicina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.
- 2 PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035–1042, 2000.
- 3 FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.
- 4 BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- 5 ALMEIDA, J. S. et al. Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, p. 1603-1610, 2010.
- 6 BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- 7 CHEN, F. et al. Antioxidant and Antibacterial Activities of Eugenol and Carvacrol-Grafted Chitosan Nanoparticles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, p. 30-39, 2009.
- 8 DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- 9 HIDALGO, M. E. et al. Antioxidant capacity of eugenol derivatives. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1467-1470, 2009.
- 10 MARKOWITZ, K. B. et al. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol: A clinically oriented review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 73, p. 729-737, 1992.

11 DOBLE, M.; HEMAISWARYA S. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, v. 16, p. 997-1005, 2009.

12 CERVENY, L. et al. Isomerization of eugenol of isoeugenol. **Reaction kinetics and catalysis letters**, v. 33, n. 2, p. 471-476, 1987.

13 BADGER, D. A. et al. Disposition and metabolism of isoeugenol in the male Fischer 344 rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1757-1765, 2002.

14 DIAS, A. DE F. An improved high yield synthesis of dehydrodieugenol. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3008-3009, 1988.

15 ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 1025, 2005.

16 YANG, Y.; SONG, L. X. Study on the Inclusion Compounds of Eugenol with α -, β -, γ - and Heptakis (2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 53, p. 27-33, 2005.

17 ZHAN, H. et al. Molecular microcapsules and inclusion interactions of eugenol with β -cyclodextrin and its derivatives. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 5, p. 1507-1513, 2008.

18 SONG, L. X. et al. Experimental and Theoretical Studies on the Inclusion Complexation of Syringic Acid with α -, β -, γ - and Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 4, p. 468-474, 2008.

19 CHOI, M. J. et al. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion-diffusion method. **Food Research International**, v. 42, p. 148-156, 2009.

20 GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

21 SANTOS, R. M. M. dos; FIALHO, S. L. Nanopartículas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 37, p. 52-59, 2007.

- 22 RIEUX, A. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, p. 1-27, 2006.
- 23 MAGNIN, D. et al. Physicochemical and structural characterization of a polyionic matrix of interest in biotechnology, in the pharmaceutical and biomedical fields. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 437, 2004.
- 24 CHELLAT, F. et al. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 51, p. 107-116, 2000.
- 25 YOO, H. S. et al. *In vitro* and *in vivo* anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. **Journal Controlled Release**, v. 68, p. 419-431, 2000.
- 26 PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 155-168, 2000.
- 27 MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.
- 28 SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.
- 29 BENOIT, J. P. et al. "Carrier" or "modulated distribution" forms, new systems for drug administration. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 41, p. 319-329, 1986.
- 30 QUINTANAR-GUERRRERO, D. et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 1113-1128, 1998.
- 31 DOUGLAS, K. L.; TABRIZIAN, M. Effect of experimental parameters on the formation of alginate-chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. **Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition**, v. 16, n. 1, p. 43-56, 2005.

-
- 32 UHRICH, K. E. et al. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 3181-3198, 1999.
- 33 OURIQUE, A. F. et al. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 95-101, 2011.
- 34 KHOEE, S.; YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2392-2399, 2009.
- 35 FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.
- 36 VAUTHLER-HOLTZSCHERER, C. et al. Methodology for the Preparation of Ultra-Dispersed Polymer Systems. **STP Pharma Sciences**, v. 1, n.2, p. 109-116, 1991.
- 37 ALLEMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Drug-loaded nanoparticles. Preparation methods and drug targeting issues. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 39, p. 173-191, 1993.
- 38 SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- 39 LAMBERT, G. et al. Polyisobutylcyanoacrylate Nanocapsules Containing an Aqueous Core as a Novel Colloidal Carrier for the Delivery of Oligonucleotides. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 6, p. 707-714, 2000.
- 40 GUTERRES, S. S. et al. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57-63, 1995.
- 41 SANTOS-MAGALHÃES, N. S. et al. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal Pharmaceutics**, v. 208, p. 71-80, 2000.

42 POHLMANN, A. R. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305-312, 2002.

43 POHLMANN, A. R. et al. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, p. 288-293, 2008.

44 CRUZ, L. et al. Physico-Chemical Characterization and *In Vivo* Evaluation of Indomethacin Ethyl Ester-Loaded Nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, Interfacial Alkaline Hydrolysis and Antiedematogenic Activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, n. 9-10, p. 3154-3162, 2006.

45 CRUZ, L. et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2006.

46 POLETTI, F.S. et al. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, p. 472-478, 2008.

47 SCHAFFAZICK, S.R. et al. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 501-505, 2003.

48 STELLA, B. et al. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 71-77, 2007.

49 DALENÇON, F. et al. Atovaquone and rifabutine-loaded nanocapsules: formulation studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 153, p. 127-130, 1997.

50 FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

51 OURIQUE, A. F. et al. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 1-4, 2008.

- 52 ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly-ε-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 261-267, 2005.
- 53 DE ASSIS, D. N. et al. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of ^{99m}Techetium-fluconazole nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, p. 152-160, 2008.
- 54 FERRANTI, V. et al. Primidone-loaded poly-ε-caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 107-111, 1999.
- 55 PEREIRA, M. A. et al. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with ^{99m}Techetium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, p. 42-51, 2008.
- 56 TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: Formulation aspects, liquid phase interations and particles characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 63, 2006.
- 57 TEWA-TAGNE, P. et al. Spray-drying nanocapsules in presence of colloidal silica as drying auxiliary agent: Formulation and process variables optimization using experimental designs, **Pharmaceutical Research**, v. 24, p. 650-661, 2007.
- 58 TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterisation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, p. 124-135, 2007.
- 59 JAGER, A. et al. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 297-305, 2007.
- 60 NASSAR, T. et al. Novel double coated nanocapsules for intestinal delivery and enhanced oral bioavailability of tacrolimus, a P-gp substrate drug. **Journal of Controlled Release**, v. 133, p. 77-84, 2009.

61 AMELLER, T. et al. Polyester-Poly(Ethylene Glycol) Nanoparticles Loaded with the Pure Antiestrogen RU 58668: Physicochemical and Opsonization Properties. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 7, p. 1063-1070, 2003.

62 SCHAFFAZICK, S.R. et al. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 64-71, 2008.

63 CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation of nanoparticles with a membrane contactor. **Journal of Membrane Science**, v. 266, n.1-2, p. 115-120, 2005.

64 SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

65 LIMA, F. O. Estudo fotoquímico da ação anti-radicalar de compostos polifenólicos empregando espectrofotometria e HPLC-UV. Dissertação de Mestrado em Química; Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

66 RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p.133-149, 2005.

67 VELLOSA J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 119-130, 2007.

68 SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

69 OGATA, M. et al. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 10, p. 1467-1469, 2000.

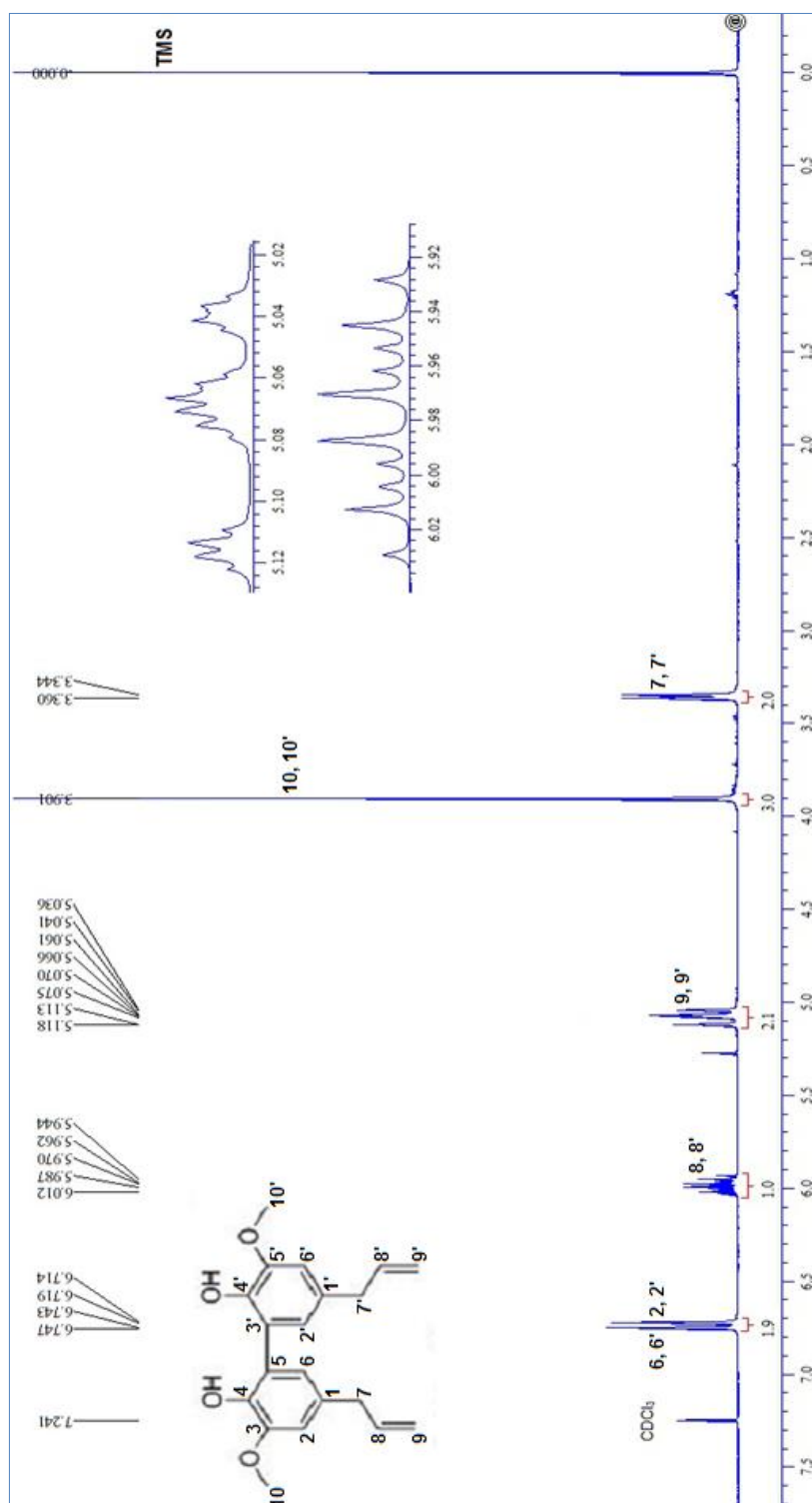
70 ATSUMI, T. et al. Cytotoxicity and radical intensity of eugenol, isoeugenol or related dimers. **Anticancer Research**, v. 20, p. 2519-2524, 2000.

- 71 FUJISAWA, S. et al. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity **Toxicology**, v. 177, p. 39-54, 2002.
- 72 FUJISAWA, S. et al. Radical generation, radical-scavenging activity, and cytotoxicity of eugenol-related compounds. **In Vitro Molecular Toxicology**, v. 13, p. 269-280, 2000.
- 73 THOMPSON, D. C. et al. o-Methoxy-4-alkylphenols that form quinone methides of intermediate reactivity are the most toxic in rat liver slices. **Chemical Research in Toxicology**, v. 8, p. 323-327, 1995.
- 74 THOMPSON, D. C.; BARHOUMI, R.; BURGHARDT, R. C. Comparative Toxicity of Eugenol and its Quinone Methide Metabolite in Cultured Liver Cells Using Kinetic Fluorescence Bioassays. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 149, p. 55-63, 1998.
- 75 ATSUMI, T. et al. Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. **Biomaterials**, v. 22, p. 1459-1466, 2001.
- 76 BUSCHMANN, H. J.; KNITTEL, D.; SCHOLLMEYER, E. New Textile Applications of Cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 40, n. 3, p. 169-172, 2001.
- 77 BREWSTER, M. E.; NEESKENS, P.; PEETERS, J. Solubilization of itraconazole as a function of cyclodextrin structural space. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 57, p. 561-566, 2007.
- 78 RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- 79 SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.
- 80 HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

- 81 MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.
- 82 PERES-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 185-191, 2008.
- 83 ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.
- 84 SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**. v. 8, p. 121–137, 2002.
- 85 AMADO, L. L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 2115-2123, 2009.
- 86 TAKANASHI, T. et al. Fluorophotometric quantization of oxidative stress in the retina in vivo. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, p. 2721-2728, 1997.
- 87 BORTOLOMEAZZI, R. et al. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 118, p. 256-265, 2010.
- 88 BONDET V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.
- 89 SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity of selected red and white wine, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 1301-1304, 1999.
- 90 ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.

- 91 MARTINS-FRANCHETTI, S. M.; DOMINGOS, R. N.; TROMBINI, R. C. Modifications on PVC films by ultrasound. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 9, p. 139-141, 2002.
- 92 LEE H. et al. Highly Homogeneous Carbon Nanotube-Polycaprolactone Composites with Various and Controllable Concentrations of Ionically-Modified-MWCNTs. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 32, n. 1, p. 157-161, 2011.
- 93 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- 94 OGATA, M. Antioxidant and antibacterial activities of dimeric phenol compounds. **The Pharmaceutical Society of Japan**, v. 128, p. 1149-1158, 2008.
- 95 JIMÉNEZ, M. M. et al. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 272, p. 45-55, 2004.
- 96 MANCONI, M. et al. Niosomes as carriers for tretinoin: II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, p. 261-272, 2003.
- 97 IOELE, G. et al. Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, p. 251-260, 2005.
- 98 LIN, H. S. et al. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin increases aqueous solubility and photostability of all-*trans*-retinoic acid. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 25, p. 265-269, 2001.

8 ANEXOS

ANEXO A: Espectro de RMN ^1H do dehidrodieugenol.Figura 59 – RMN ^1H do dehidrodieugenol.

ANEXO B: Espectrofotogramas do decaimento da absorbância da reação do DPPH frente ao eugenol e seus derivados.

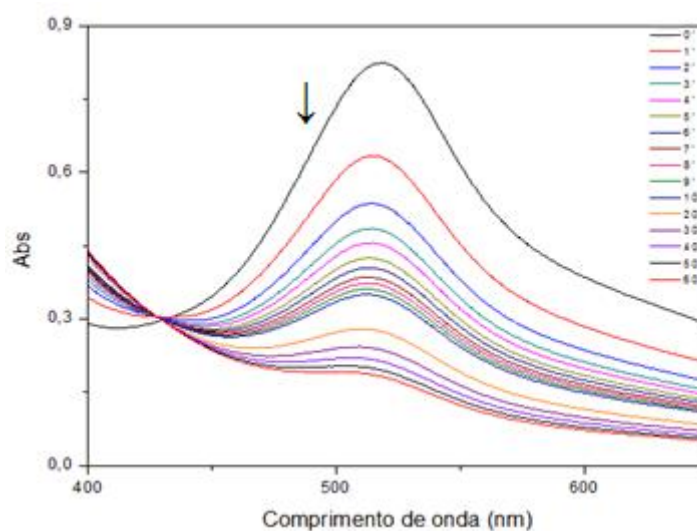


Figura 60 – Decaimento da absorbância da solução de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DPPH com $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de eugenol.

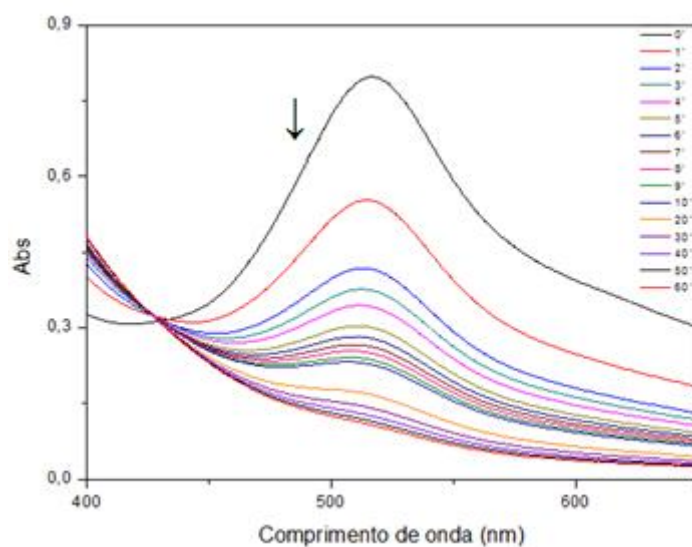


Figura 61 - Decaimento da absorbância da solução de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DPPH com $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de eugenol.

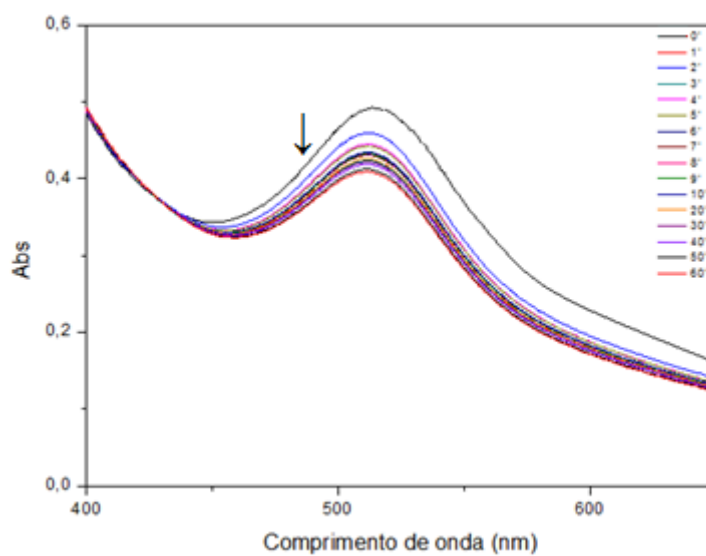


Figura 62 - Decaimento da absorvância da solução de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DPPH com $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoeugenol.

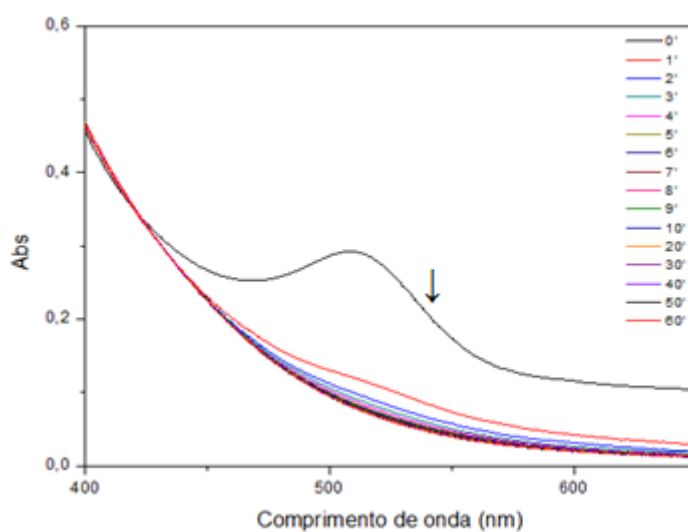


Figura 63 - Decaimento da absorvância da solução de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DPPH com $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de isoeugenol.

ANEXO C: Cromatogramas

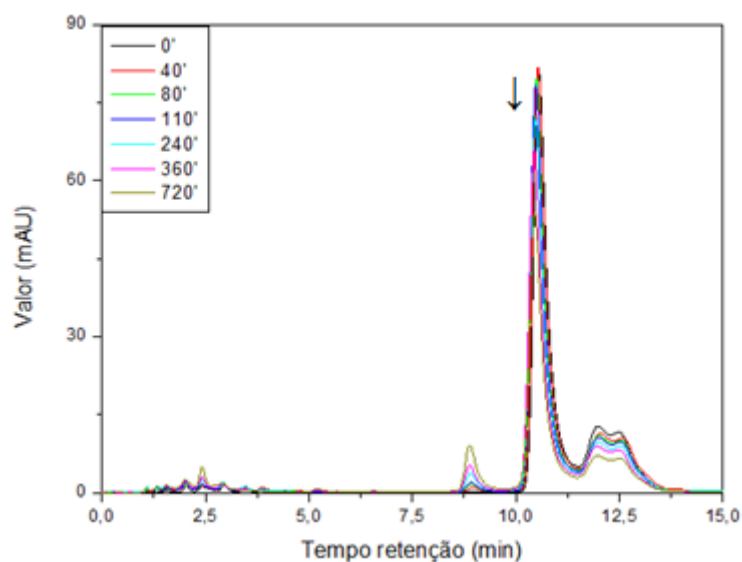


Figura 64 – Cromatograma do decaimento cinético da nanocápsula contendo eugenol.

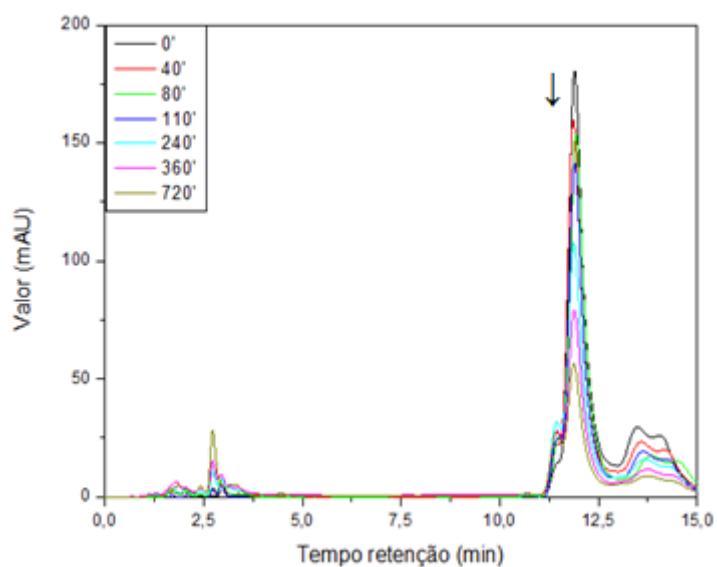


Figura 65 – Cromatograma do decaimento cinético da nanocápsula contendo isoeugenol.

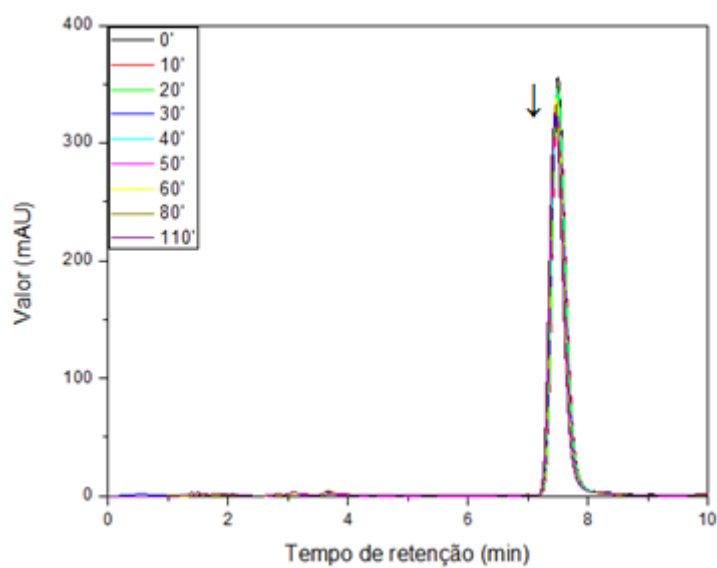


Figura 66 – Cromatograma do decaimento cinético da nanocápsula contendo dehidrodieugenol.

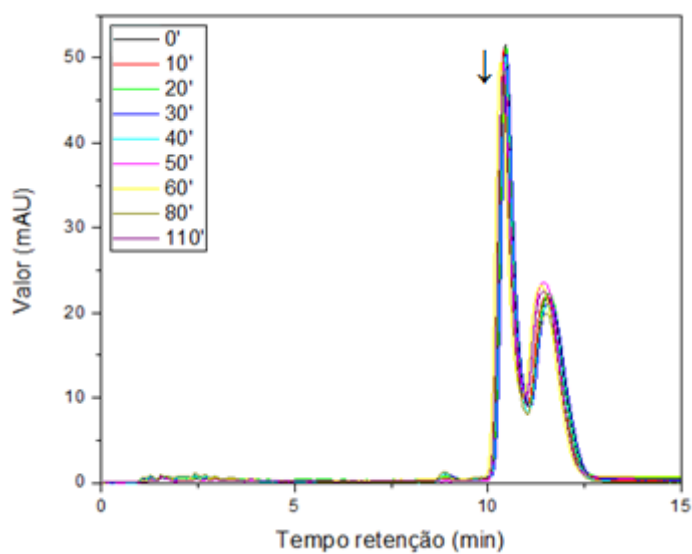


Figura 67 - Cromatograma do decaimento cinético da nanoemulsão contendo eugenol.

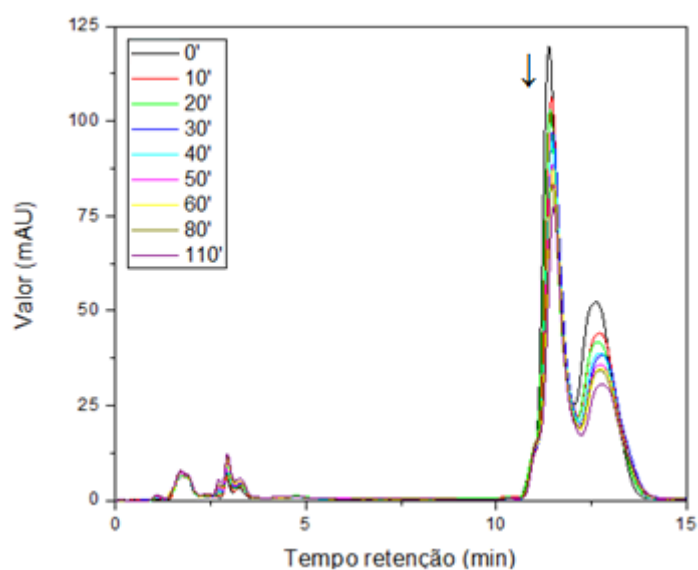


Figura 68 - Cromatograma do decaimento cinético da nanoemulsão contendo isoeugenol.

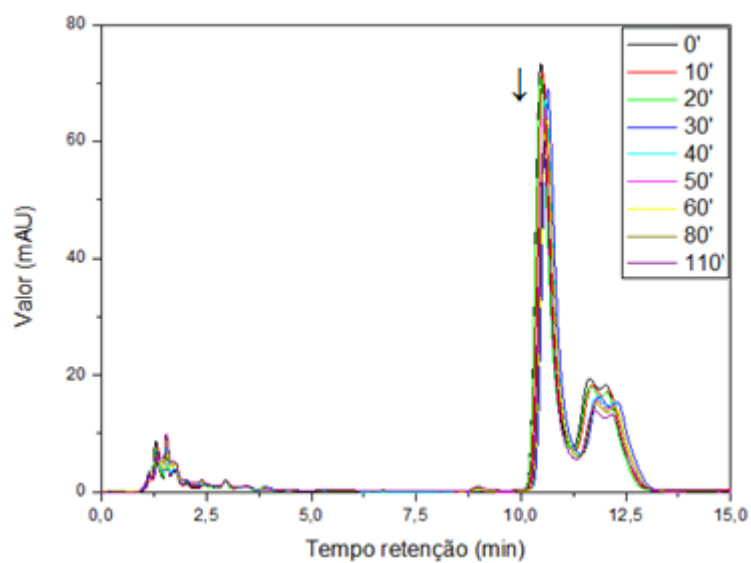


Figura 69 – Cromatograma do decaimento cinético da nanocápsula contendo eugenol, na presença de H_2O_2 .

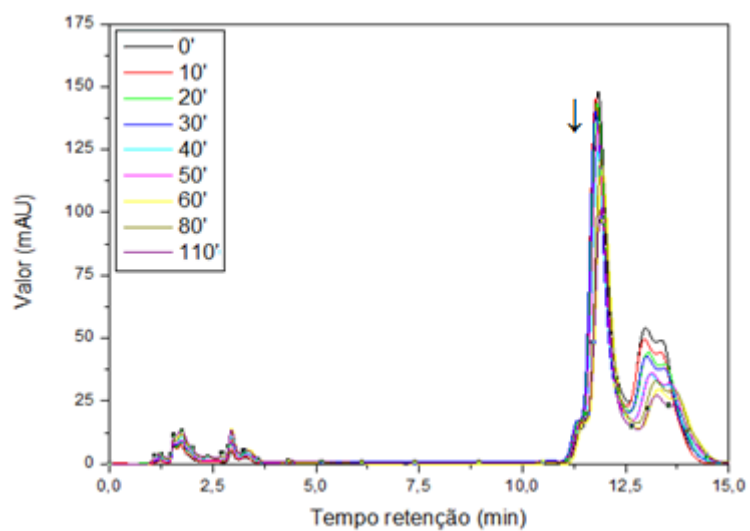


Figura 70 – Cromatograma do decaimento cinético da nanocápsula contendo isoeugenol, na presença de H₂O₂.

ANEXO D: Espectrofotogramas do decaimento da absorbância das soluções de eugenol e isoeugenol na presença de H_2O_2 .

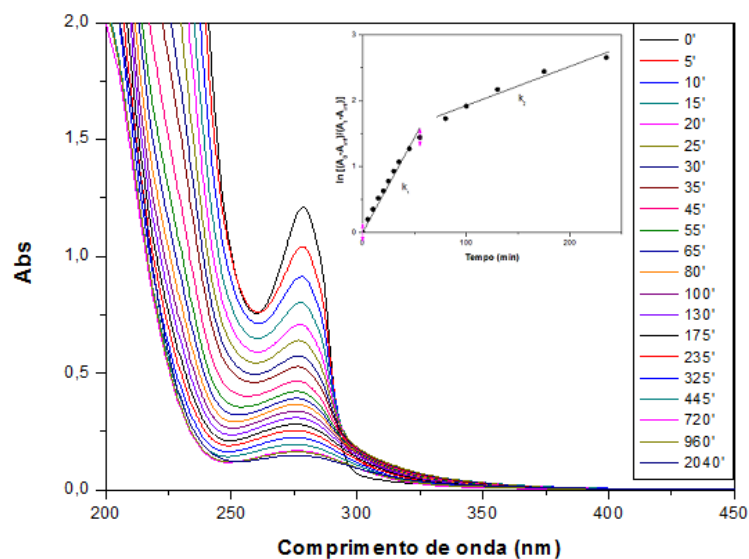


Figura 71 – Decaimento da absorbância do eugenol na concentração de $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, na presença de H_2O_2 .

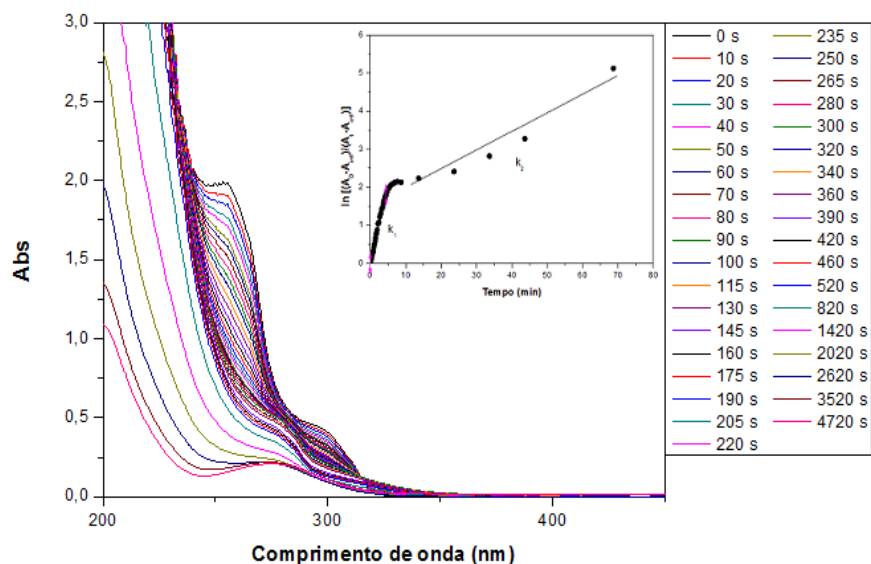


Figura 72 – Decaimento da absorbância do isoeugenol na concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, na presença de H_2O_2 .

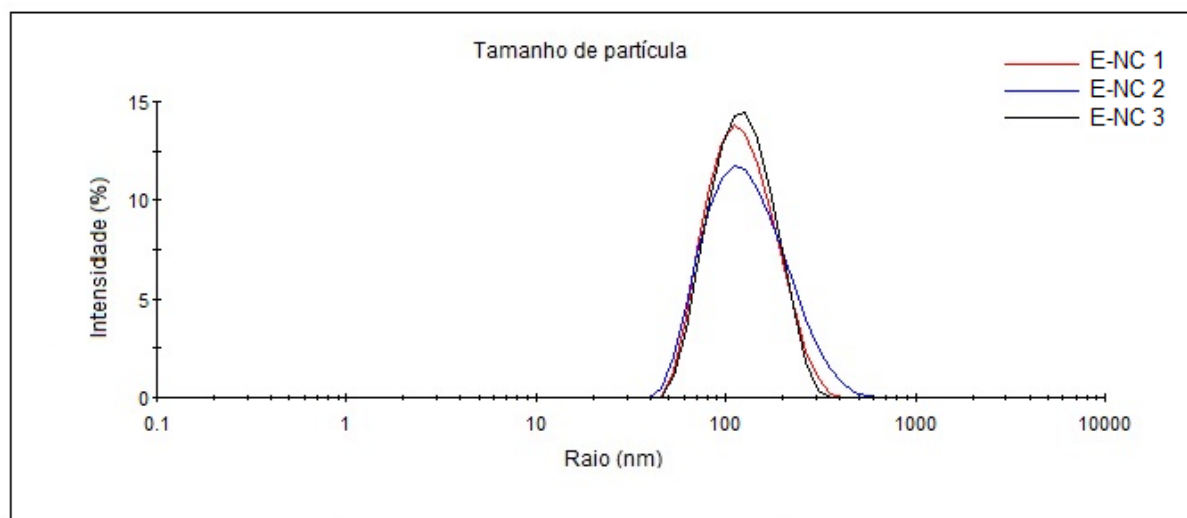
ANEXO E: Gráficos de tamanho de partícula e potencial zeta.

Figura 73 – Distribuição do raio hidrodinâmico das nanocápsulas de eugenol em triplicata.

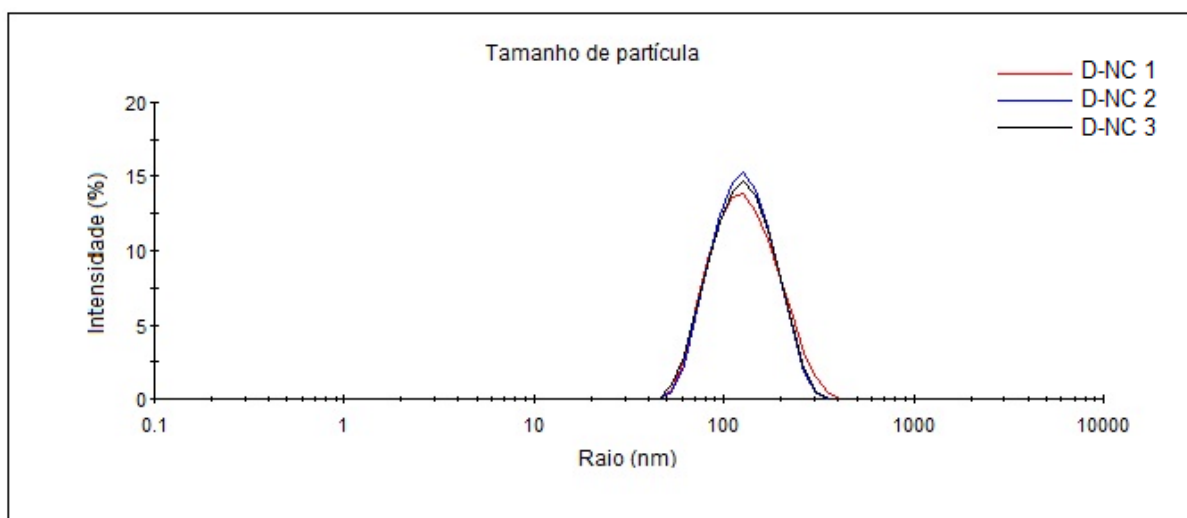


Figura 74 – Distribuição do raio hidrodinâmico das nanocápsulas de dehidrodieugenol em triplicata.

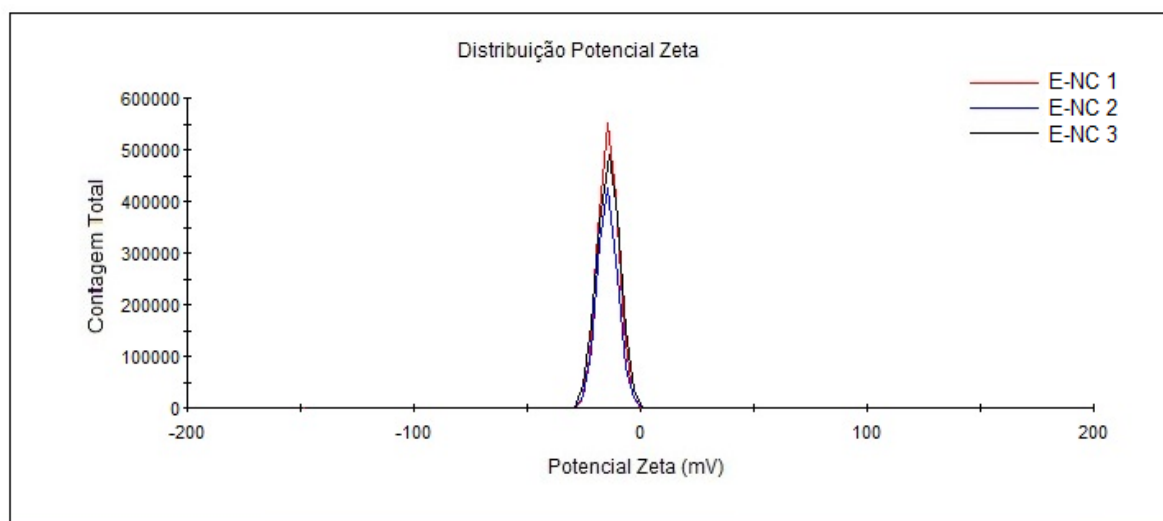


Figura 75 – Distribuição do potencial zeta das nanocápsulas de eugenol em triplicata.

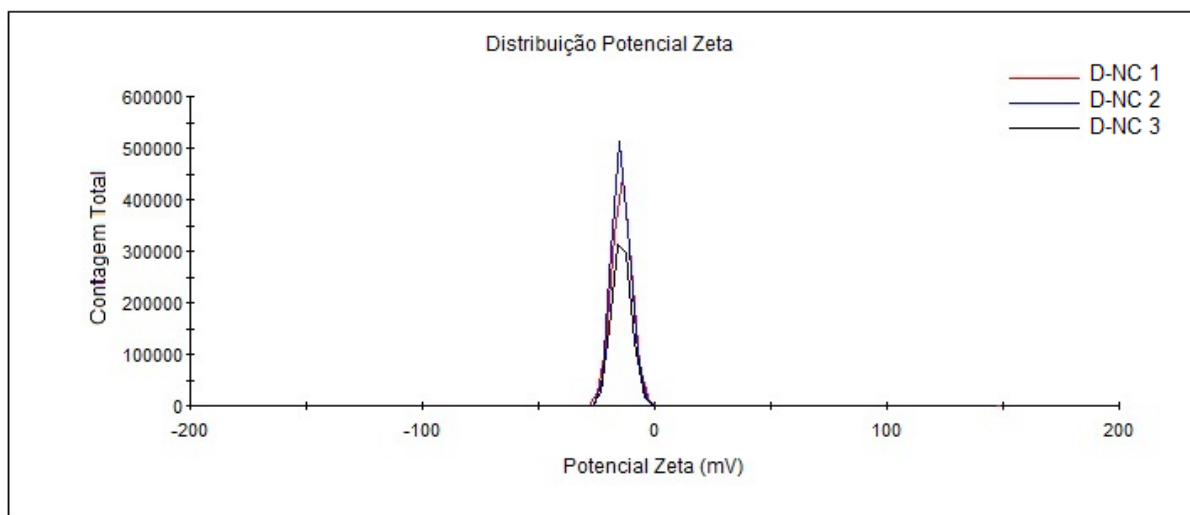


Figura 76 – Distribuição do potencial zeta das nanocápsulas de dehidrodieugenol em triplicata.