



DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL CONTENDO EUGENOL.

Eloá Reami dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Marcia Portilho (Co-Orientador); Edeilza Gomes Brescansin (Orientadora), e-mail: egbrescansin@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Farmácia/Maringá, PR.

Palavras-chave: eugenol, lipossoma, atividade antioxidante.

Resumo:

O eugenol é um derivado fenólico presente em óleos essenciais (OEs) de cravo da Índia, na canela do Ceilão, sassafrás e mirra. Possui propriedades farmacológicas marcantes entre elas a atividade antioxidante. Entretanto este composto é muito instável quimicamente e uma das estratégias disponíveis consiste em associar o eugenol a um sistema transportador. Entre os sistemas carreadores, os lipossomas merecem destaque. Esses sistemas proporcionam proteção às moléculas encapsuladas, aumentando sua estabilidade na formulação. No presente projeto, desenvolvemos lipossomas convencionais objetivando a encapsulação do eugenol. A formulação lipossomal, contendo o eugenol, foi obtida pelo método do filme lipídico e foram realizadas análises de teor de encapsulação e determinação da atividade antioxidante do eugenol. Os resultados obtidos mostraram um teor médio de encapsulação de 21,70% e uma atividade antioxidante média de cerca de 30%.

Introdução

O eugenol é um derivado fenólico de nome químico 1,2-dimethoxi-4-(2-propenil) benzeno. Este composto possui muitas propriedades farmacológicas, que incluem atividade antimicrobiana, antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, antiparasitária e balsâmica (DUSAN et al., 2006).

Alguns componentes dos óleos essenciais, como o eugenol, são muito instáveis quimicamente, sofrendo degradação oxidativa e uma das estratégias, atualmente disponíveis, consiste em associar os componentes dos óleos a um sistema transportador. Entre os sistemas, os lipossomas proporcionam





proteção às moléculas encapsuladas, aumentando a estabilidade das mesmas, na formulação.

No presente projeto desenvolvemos formulação lipossomal, objetivando a encapsulação do eugenol, análise da eficiência de encapsulação e determinação da atividade antioxidante.

Materiais e métodos

O Eugenol foi obtido da empresa Maquira Indústria de produtos odontológicos LTDA. Nome químico: 1,2-dimethoxi-4-(2-propenil) benzeno. Lote: 453914. Validade: 08/2016; Diestearoilfosfatidilcolina/1,2-Distearoyl-nsglycero-3-phosphocholine (DSPC). Obtido da empresa Echelon Biosciences, Inc. 98% de pureza. Lote W0388-15; Colesterol (CH), obtido da empresa Sigma-Aldrich. 99% de pureza. Lote #089K5312.

Reagentes e Soluções: Cloreto de Sódio P.A. (NaCl, 8,76g/L); Álcool etílico P.A., Nuclear; Clorofórmio P.A., Nuclear; Metanol P.A., Vetec.

Outros Materiais: Barra magnética; Membrana de policarbonato, diâmetro do poro de 100 nm.

Equipamentos: Agitador magnético com aquecimento, Fisatom, 752A; Balança analítica (Bioprecisa-Electonic Balance FA-2104 N); Banho de água circulante, Microquímica Ind. e Comércio LTDA. Modelo MQBTC99-20; Centrifuge Allegra 64R. Beckman Coulter; Espectrofotômetro de UV/Visível Varian-Cary 50; Mini Extrusora, Avanti Polar Lipids. Rotaevaporador.

Obtenção e Extrusão da formulação Lipossomal

Os lipídios DSPC e CH, juntamente com o eugenol foram dissolvidos em mistura de clorofórmio e metanol (50/50 %, v/v). Os solventes, evaporados em rotaevaporador à pressão reduzida, em temperatura entre 55 e 60° C. O filme seco obtido foi mantido sob vácuo por 24 horas, em dessecador, para assegurar a completa evaporação do solvente orgânico e após esse período, foi hidratado com salina, numa temperatura acima da temperatura de transição fase do fosfolipídio. Na obtenção da formulação estudada foram utilizados DSPC (1 mg/mL), colesterol (0,5 mg/mL) e eugenol (0,1 mg/mL).

Para a diminuição do tamanho das vesículas foi empregado o método de extrusão com auxílio de mini extrusora, utilizando membrana de policarbonato com poros de 0,1 µm.

Separação do eugenol livre do encapsulado:

Para a separação utilizamos o método de centrifugação, a 20.000 rpm/2 h.

Determinação da Eficiência de Encapsulação:





Uma alíquota da formulação lipossomal, contendo somente o eugenol encapsulado, foi tomada e diluída em etanol, para o rompimento das vesículas e liberação do composto encapsulado. A determinação da concentração do eugenol foi realizada por espectrofotometria na região do UV, a um λ de 282 nm, utilizando como branco uma solução etanólica de lipossomas vazios. As análises foram realizadas em duplicata.

Determinação da Atividade antioxidante “in vitro”, (SEBAALY, 2015):

Foram adicionados 2 ml de solução etanólica contendo DPPH (0,125 mM) a 1 ml de solução eugenol livre em salina e a 1 ml de suspensão lipossomal contendo eugenol encapsulado. As misturas foram incubadas durante 1 h a 25° C, na ausência de luz e, em seguida, foram centrifugadas a 15000 rpm por 30 min. Os sobrenadantes foram separados e as absorbâncias medidas a 517 nm. Para branco do eugenol livre, foram preparadas misturas de salina com solução etanólica de DPPH e para branco do eugenol encapsulado foi utilizada suspensão lipossomal sem eugenol e solução etanólica de DPPH.

O percentual correspondente à atividade antioxidante foi calculado como se segue: $SA\% = (1 - A_S/A_0) \times 100$, onde: SA% corresponde a atividade antioxidante, A_S é a absorbância da amostra de eugenol livre ou lipossomas contendo eugenol e A_0 é a absorbância da amostra branco. A atividade antioxidante do eugenol livre e encapsulado foi determinada em duplicata.

Resultados e Discussão

Eficiência de Encapsulação:

A eficiência alcançada da formulação pelo do método do filme foi de $21,70 \pm 1,28\%$ do total de eugenol que compõe a formulação.

Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre:

Com a finalidade de avaliar a capacidade do eugenol encapsulado em lipossomas e livre dissolvido em salina, em capturar radicais livres, tais como, DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foram determinadas as atividades antioxidantes. Constatou-se que o eugenol na suspensão lipossomal, contendo 0,23 mg/mL de eugenol encapsulado, apresentou atividade antioxidante de $29,63 \pm 0,33\%$. Entretanto, a mesma concentração de eugenol livre contida em salina, não apresentou atividade antioxidante significativa ($< 1\%$). Este resultado pode indicar uma possível degradação oxidativa do eugenol antes





que pudesse exercer sua atividade antioxidante, uma vez que se encontrava livre em solução.

Conclusões

O estudo revelou que o método do filme lipídico é eficiente na obtenção de suspensões lipossomais, porém o método deve ser aperfeiçoado com o objetivo de melhorar a eficiência de encapsulação. Além disso, outras concentrações de eugenol e DPPH devem ser testadas na intenção de confirmar e investigar melhor os resultados referentes ao potencial antioxidante do eugenol encapsulado em lipossomas.

Agradecimentos: Fundação Araucária, Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão (LEPEMC)-UEM e UEM.

Referências

SEBAALY, C. A. Jraij, H. Fessi, C. Charcosset, H. Greige-Gerges. **Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes.** Food Chemistry, 178 (2015), pp. 52–62.

DUSAN F.; Sabol M.; Domaracka K.; Bujnakova D. **Essential oils – their antimicrobial activity against Escherichia coli and effect on intestinal cell viability.** Toxicology in Vitro. V. 20, n. 8, 2006.

