

Alessandra Cristina de Meneses

**ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO DE CRAVO EM
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E POLIMÉRICAS EM
SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

De Meneses, Alessandra Cristina

Encapsulação de Óleo de Cravo em Nanopartículas Lipídicas e Poliméricas em Sistema Livre de Solvente / Alessandra Cristina de Meneses ; orientadora, Débora de Oliveira ; coorientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo - Florianópolis, SC, 2016.

115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Nanoencapsulaçã.. 3. Óleo de cravo. 4. Eugenol. I. De Oliveira, Débora. II. De Araújo, Pedro Henrique Hermes . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Alessandra Cristina de Meneses

**ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO DE CRAVO EM
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E POLIMÉRICAS EM
SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 10 de Março de 2016.

Prof.^a Cíntia Soares, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Prof.^a Débora de Oliveira, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.
Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof.^o Marco Di Luccio, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Claudia Sayer, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Alessandra Valério, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço às forças superiores que sempre me iluminam e abençoam nas escolhas da vida, e dentre uma delas estou aqui hoje.

Agradeço aos meus pais, pelos ensinamentos e a base de onde começar, sempre me deixando livre para tomar as decisões da minha vida, mas sempre me instruindo como agir corretamente, honestamente e trabalhar duro para alcançar os meus sonhos e objetivos. Vocês são meus pilares, obrigada por contribuir à formação da pessoa que sou hoje.

Agradeço aos meus queridos orientadores Dr^a. Débora e Dr. Pedro pela confiança depositada, pelos ensinamentos e pela flexibilidade que sempre foi oferecida.

Agradeço ao meu noivo Guilherme Zin, pela boa companhia, cumplicidade, amor e apoio oferecidos, não somente nesses dois anos, mas desde o dia em que se tornou parte da minha vida.

Agradeço às famílias Zin e Becker por terem me acolhido, e sempre me deixar muito confortável à sua companhia, por terem me aceitado como integrante da família. Em especial pra Rute, Pedro e Vó Cema que nesses dois anos foram pessoas muito especiais, e facilitaram muito a minha estadia aqui em Florianópolis.

Aos meus amigos e colegas do LCP pela ajuda que sempre foi oferecida desde o primeiro dia que cheguei ao laboratório, pelo carinho e compartilhamento de ideias. Agradeço também pelos momentos de descontração, pelos cafés de todo dia e almoços em boa companhia.

Gostaria de agradecer a Paula, minha coorientada de trabalho de conclusão de curso, pela ajuda na parte experimental, esforço, experiência de primeira orientação e, principalmente, pelo carinho.

Aos amigos do LABSEM, que me acolheram nos primeiros meses do mestrado, e sempre estiveram presentes durante esses dois anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC) pelas imagens de TEM.

Ao Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – UFSC, pelas análises de DSC.

“Don’t let the noise of other’s opinions drown out your own inner voice. And most important, have the courage to follow your heart and intuition. They somehow already know what you truly want to become. Everything else is secondary.”

(Steve Jobs, 2005)

RESUMO

A nanoencapsulação é utilizada para melhora da solubilidade de óleos essenciais em meios aquosos e aumentar a biodisponibilidade devido ao aumento da superfície de contato. Neste trabalho, foram produzidas nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas e nanopartículas poliméricas carregadas com óleo de cravo e avaliada a sua eficiência após o processo de encapsulação. As nanoemulsões foram formadas a partir da técnica de ultrasonicação, utilizando Crodamol, Pluronic® F-127 e diferentes concentrações de óleo de cravo, foram formadas nanopartículas esféricas de diâmetro médio entre 98 e 134 nm com a variação da concentração de óleo. As nanopartículas lipídicas sólidas foram produzidas através do método de emulsificação-ultrasonicação utilizando ácido esteárico, ou mistura de ácido esteárico com Crodamol e variação da concentração de óleo de cravo. O tamanho médio das partículas se manteve inferior a 312 nm, com formato esférico e com formação de imperfeições cristalinas na superfície das nanopartículas. As nanopartículas formadas com dois lipídios tiveram maior eficiência de encapsulação e maior retenção do óleo essencial após estocagem, em comparação às compostas por somente ácido esteárico. Análises de FT-IR e DSC comprovaram a redução da cristalinidade com a adição do lipídio líquido na formulação, devido à formação de mais imperfeições na rede cristalina do ácido graxo, consequentemente mais espaço para acomodação e retenção do composto bioativo. A formulação de nanoemulsão testada obteve um valor de Concentração Inibitória Mínima inferior às formulações testadas para nanopartículas lipídicas sólidas, e todas as formulações testadas obtiveram ótimos valores de atividade antioxidante. As nanopartículas poliméricas carregadas com óleo de cravo foram produzidas através do método de polimerização via tiol-eno em miniemulsão, utilizando um monômero dieno renovável derivado de óleo de mamona e isosorbídeo, um monômero ditiol, Lutensol AT 80 como surfactante não-iônico e diferentes concentrações de óleo de cravo. As nanopartículas produzidas apresentaram um diâmetro médio em intensidade entre 192 e 284 nm, com alta eficiência de encapsulação. A conversão final do monômero apresentou elevado decréscimo com o aumento da concentração de óleo de cravo na formulação. Este resultado é devido à reação do grupo fenol do eugenol com os radicais livres diminuindo a concentração destes no meio reacional com consequente redução da taxa de polimerização. Análises de DSC e GPC sugerem que o óleo de cravo foi parcialmente incorporado à cadeia polimérica, devido à redução do ponto de fusão e

da massa molar do polímero formado na presença de óleo de cravo na formulação. A reação pode se dar devido à reação do radical tiil com a insaturação do grupo alquila da molécula de eugenol formando uma ligação covalente entre a cadeia polimérica em crescimento e o eugenol. Por conter apenas uma insaturação em sua molécula, o eugenol age com um agente terminador de cadeia deste processo de polimerização, ocasionando a redução da massa molar do polímero formado. As baixas massas molares alcançadas e a incorporação da molécula de eugenol à cadeia polimérica reduzem também a temperatura de fusão do polímero, conforme observado por DSC. Na avaliação da atividade antioxidante foi verificado que a presença de óleo de cravo elevou a atividade antioxidante das nanopartículas.

Palavras-chave: Nanoencapsulação; Óleo de cravo; Eugenol.

ABSTRACT

Nanoencapsulation is used to improve water solubility of essential oils in aqueous media and improve bioavailability due to the increase of contact area. In this work were produced nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and polymeric nanoparticles loaded with clove oil and evaluated its efficiency after encapsulation process. Nanoemulsions were prepared through ultrasonication technique, using Crodamol, Pluronic® F-127 and different clove oil concentration; spherical nanoparticles were formed with average diameter between 98 and 134 nm when the oil concentration was varied. The solid lipid nanoparticles were produced using stearic acid or mixture of stearic acid and Crodamol, both cases was tested with clove oil concentration varying. The average particle size remained below 312 nm, with spherical shape and formation of crystalline imperfections on the surface of the nanoparticles. The samples tested with two lipids had higher encapsulation efficiency and better clove oil retention after storage than those composed by just one lipid. FT-IR and DSC analyses confirmed a reduction in lipid crystallinity when liquid lipid was added in formulation; it is because the liquid lipid is able to form more imperfections in the crystal lattice of fatty acid, consequently more room available to accommodation and retention of bioactive compound. The nanoemulsion formulation tested had a low Minimum Inhibitory Concentration than those formed with solid lipid, and all formulations tested showed a great antioxidant activity. Polymeric nanoparticles loaded with clove oil were produced by thiol-ene polymerization in miniemulsion, using a fully renewable diene monomer derived from castor oil and isosorbide, a dithiol monomer, Lutensol AT 80 as non ionic surfactant and different concentrations of clove oil. The polymeric nanoparticles presented an intensity average diameter between 192 and 284 nm with high encapsulation efficiency. The final polymer conversion showed a decrease with increasing concentration of clove oil in the formulation. This result could be attributed to the reaction of the phenyl group of eugenol with the free radicals decreasing their concentration in the reaction medium and thus the polymerization rate. DSC and GPC analyses suggested that the clove oil (eugenol) was partially incorporated to the polymer chain due to the decrease of the melting point and molecular weight of the polymer in the presence of clove oil in the formulation. This reaction can occur due to the reaction of the thyl radical with the double bond of the alkyl group from the molecule of eugenol creating a covalent bond between the growing

polymer chain and the eugenol. As eugenol contains just one insaturation, it acts as a capping agent for this polymerization process, resulting in the decrease of the molecular weight of the polymer that is being formed. The reduced molecular weight and the incorporation of eugenol to the polymer chain decrease the melting point as observed by DSC. The antioxidant activity evaluation showed that the presence of clove oil improve the antioxidant activity of nanoparticles.

Keywords: Nanoencapsulation; Clove oil; Eugenol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de constituintes de óleos essenciais.	34
Figura 2. Atividade antibacteriana e mecanismo de ação do eugenol.	36
Figura 3. Estrutura da gota formada em uma nanoemulsão contendo composto bioativo com emulsificante.	40
Figura 4. Esquema de formação de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando o processo de emulsificação-ultrasonicação.	44
Figura 5. Esquema de formação de nanopartículas poliméricas utilizando o processo de polimerização em miniemulsão.	48
Figura 6. Polimerização em cadeia do grupo tiol e a dupla ligação do grupo eno.	50
Figure 7. Solid Lipid Nanoparticles stability of particle average size (Dp) and polydispersity index (PdI) under refrigeration during 30 and 60 days of storage.	76
Figure 8. Nanoemulsion stability of particle average size (Dp) and polydispersity index (PdI) under refrigeration during 30 and 60 days of storage.	76
Figure 9. Particle size distribution for (a) NE 1 at first day and 30 day and (b) NE 3 at first and 60 day of storage.	78
Figure 10. FT-IR spectra of samples (a) pure stearic acid, (b) SLN 1, (c) SLN 2, (d) SLN 3, (e) SLN 4 and (f) SLN 5.	80
Figure 11. FT-IR spectra magnified in the range 1200-1350 cm ⁻¹ for (a) pure stearic acid, (b) SLN 1, (c) SLN 2, (d) SLN 3, (e) SLN 4 and (f) SLN 5.	80
Figure 12. Differential Scanning Calorimetry thermographs of (a) pure stearic acid, (b) SLN 1, (c) SLN 2, (d) SLN 3, (e) SLN 4 and (f) SLN 5.	82
Figure 13. TEM images of Nanoemulsion NE 2 composed by crodamol and 7 mg.mL ⁻¹ of CO.	82
Figure 14. TEM images of SLN 3 composed by stearic acid, crodamol and 250 µg.mL ⁻¹ of CO.	83
Figure 15. DPPH Scavenging of free clove oil, SLN 4 composed by stearic acid, crodamol and 450 mg.mL ⁻¹ of CO and NE 2 composed by crodamol and 7 mg.mL ⁻¹ of CO, diluted at same concentrations.	85
Figure 16. Chemical structure of poly-co-dianhydro-D-glucytil-diundec-10-enoate-co-1,4-butanedithiol (Machado <i>et al.</i> , 2016).	89
Figure 17. FT-IR spectra of nanoparticles obtained by: (a) Miniemulsion polymerization (NP 1); and (b) Emulsification/evaporation (NP 2).	91
Figure 18. TEM images of nanoparticles obtained by: (a) Miniemulsion polymerization (NP 1); and (b) Emulsification/evaporation (NP 2).	92
Figure 19. DPPH scavenging activity after 30 min of exposure at different PTEE concentrations. Results for PTEE nanoparticles obtained by: Miniemulsion polymerization (NP 1); and Emulsification/evaporation (NP 2).	93
Figure 20. Chemical structures of eugenol (a), 1-4, butanedithiol (b) and dianhydro-D-glucityl diundec-10-enoate (c).	99

Figure 21. Encapsulation efficiency for PTEE nanoparticles formulations in relation of clove oil loaded and bound to polymer chain in different ratios 6 (ME 02), 12 (ME 03) and 25% (ME 04).	107
Figure 22. Differential Scanning Calorimetry for PTEE NPs formulations (a) ME 0%, (b) ME 02, (c) ME 03 and (d) ME 04 with 0, 6, 12 and 25% of CO, respectively.....	108
Figure 23. FT-IR spectrums of (a) clove oil and dried PTEE nanoparticles samples (b) ME 01, (c) ME 02, (d) ME 03 and (e) ME 04.....	110
Figure 24. TEM micrographs of PTEE nanoparticles containing CO 6% (ME 02). A and B represent the views from different positions with different magnification factors.....	110

LISTA DE TABELAS

Table 1. Formulations of Solid Lipid Nanoparticles.....	68
Table 2. Formulations of Nanoemulsions.....	69
Table 3. Main components of essential oil of clove leaf as determined by GC-MS.....	73
Table 4. Solid Lipid Nanoparticles and Nanoemulsion characterization of average size ($D_p \pm S.D.$), polydispersity index ($PdI \pm S.D.$), encapsulation efficiency* ($E.E. \pm S.D.$) and zeta potential ($ZP \pm S.D.$). * Encapsulation Efficiency was determined just for SLN.....	74
Table 5. Differential scanning calorimetric results of melting peaks temperature (T_m) and enthalpies (ΔH_m) of clove oil loaded in Solid Lipid Nanoparticles.....	81
Table 6. Minimum Inhibitory Concentration for Solid Lipid Nanoparticles and Nanoemulsion loaded with clove oil in different concentration against Gram positive and Gram negative bacteria, Number of particles (N_p) and surface area (SA_i).....	84
Table 7. Formulation of PTEE Nanoparticles using miniemulsion (NP 1) with AIBN as initiator and emulsification/evaporation (NP 2).....	90
Table 8. Antioxidant Activity of Poly (thioether-ester) nanoparticles by DPPH free radical scavenging activity and β -carotene/linoleic acid assay.....	93
Table 9. Formulation of PTEE nanoparticles loaded with clove oil following Miniemulsion Method (1:1 of molar fraction between Bu(SH) ₂ and DGU).....	100
Table 10. Characterization of PTEE nanoparticles loaded or not with clove oil at first day of production and 30 days of storage at 4 °C: Particle Size ($D_p \pm S.D.$), Polydispersity index ($PdI \pm S.D.$) and Encapsulation efficiency ($E.E. \pm S.D.$).....	105
Table 11. Conversion, melting temperature (T_m), enthalpy (ΔH_m) and molar mass (M_w , M_n) of dried samples of the PTEE nanoparticles containing 0% (ME 01), 6% (ME 02), 12% (ME 03) and 25% (ME 04) of CO.....	105
Table 12. Antioxidant Activity of PTEE Nanoparticles by DPPH free radical scavenging activity and β -carotene-linoleic acid assay.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Antioxidant activity
Abs	Absorbance
AIBN	Azobisisobutyronitrile
BU(SH)₂	1-4,Butanedithiol
CO	Clove oil
DGU	Dianydro-D-glucityl diundec-10-enoate
DLS	Dinamic light scattering
Dp	Particle diameter
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl
DSC	Diferencial scanning calorimetry
E.E.	Encapsulation efficiency
EC₅₀	Half maximal effective concentration
EES	Emulsificação-evaporação de solvente
EO	Essential oil
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
GPC	Gel permeation chromatography
kDa	Kilodalton
MIC	Minimum inhibitory concentration
Mn	Number average molecular weight
m_t	Total mass
Mw	Weight average molecular weight
NE	Nanoemulsão / nanoemulsion
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
nm	Nanometer
Np	Number of nanoparticles
NPs	Nanoparticles
PdI	Polydispersion index
PTEE	Poly(thioether-ester)
PVA	Poly(vinyl alcohol)
SAt	Total surface area
SLN	Solid lipid nanoparticles
TEM	Transmission electron microscopy
THF	Tetrahydrofuran
T_m	Melting temperature
ρm	specific mass

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔH_m	Enthalpy of melting
$^{\circ} C$	Degrees Celsius
%	Percentage
wt.%	Weight percentage
w/v	Weight-to-volume ratio

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	25
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVOS	27
1.1.1 Objetivo Geral	27
1.1.2 Objetivos Específicos	27
CAPÍTULO II	29
2 ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS	29
2.1 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO.....	31
2.1.1 Atividade Antimicrobiana do Eugenol.....	33
2.1.2 Atividade Antioxidante do Eugenol.....	36
2.2 NANOEMULSÕES.....	38
2.3 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.....	43
2.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	46
2.4.1 Polimerização em miniemulsão.....	47
2.4.2 Polimerização via Tiol-eno.....	49
2.4.3 Polimerização via Tiol-eno em miniemulsão.....	52
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS REFERENTES AO ESTADO DA ARTE.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
CAPÍTULO III.....	65
3 ENCAPSULATION OF CLOVE OIL INTO SOLID LIPID NANOPARTICLES AND NANOEMULSION BY A SOLVENT FREE METHOD.....	65
3.1 INTRODUCTION.....	66
3.2 MATERIAL AND METHODS.....	67
3.2.1 Chemical reagents.....	67
3.2.2 Clove Oil composition.....	67
3.2.3 Solid Lipid Nanoparticles preparation.....	68
3.2.4 Nanoemulsion preparation.....	68
3.2.5 Droplet size measurement.....	69

3.2.6 Zeta potential (ZP).....	69
3.2.7 Encapsulation Efficiency.....	69
3.2.8 Stability studies.....	70
3.2.9 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR).....	70
3.2.10 Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	70
3.2.11 Transmission Electron Microscopy (TEM).....	71
3.2.12 Surface Area and Number of Particles	71
3.2.13 Antioxidant Activity	71
3.2.14 Antimicrobial Activity	72
3.3 RESULTS AND DISCUSSION	72
3.3.1 Clove Oil Composition	72
3.3.2 Particle Size and Polydispersity Index	73
3.3.3 Zeta Potential	73
3.3.4 Encapsulation Efficiency.....	75
3.3.5 Stability studies	75
3.3.6 Thermal and crystallinity study	79
3.3.7 Morphology	82
3.3.8 Antimicrobial activity.....	83
3.3.9 Antioxidant Activity.....	84
3.4 CONCLUSIONS	85
REFERENCES	86
CAPÍTULO IV.....	89
4 ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLY(THIOETHER-ESTER) NANOPARTICLES.....	89
REFERENCES	94
CAPÍTULO V.....	97
5 POLY(THIOETHER-ESTER) NANOPARTICLES ENTRAPPED WITH CLOVE OIL FOR ANTIOXIDANT ACTIVITY IMPROVEMENT.....	97
5.1 INTRODUCTION	98
5.2 MATERIALS AND METHODS.....	99
5.2.1 Materials.....	99

5.2.2 Preparation of nanoparticles via miniemulsion polymerization	99
5.2.3 Size and polydispersity index measurements	100
5.2.4 Encapsulation efficiency	100
5.2.5 Stability study	102
5.2.6 Differential Scanning Calorimetry (DSC)	102
5.2.7 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)	102
5.2.8 Gel Permeation Chromatography (GPC)	102
5.2.9 Transmission Electron Microscopy (TEM)	103
5.2.10 Antioxidant activity	103
5.3 RESULTS AND DISCUSSION	104
5.3.1 Droplet size, dispersion measurements and conversion rate	104
5.3.2 Encapsulation efficiency	106
5.3.3 Stability study	107
5.3.4 Thermal analysis	107
5.3.5 Molecular weight characterization	108
5.3.6 Chemical characterization	109
5.3.7 Morphology	110
5.3.8 Antioxidant activity	111
5.4 CONCLUSIONS	111
REFERENCES	112
CAPÍTULO VI	115
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
6.1 CONCLUSÃO	115

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são óleos naturais provenientes de diferentes partes de plantas e são muito versáteis, podendo ser empregados desde simples aromatizadores de ambientes até anticarcinogênicos. Dentre as atividades que desempenham, os óleos essenciais são amplamente conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas frente a vários microrganismos, incluindo bactérias patogênicas ou não e fungos, e também devido à sua atividade antioxidante capaz de neutralizar diversos radicais livres.

A composição de cada óleo essencial é responsável por suas atividades específicas. O óleo de cravo, extraído de qualquer parte da planta *Syzygium aromaticum*, tem como componente majoritário o eugenol, um fenol reconhecido pela alta eficiência contra microrganismos e radicais livres (SCOPEL *et al.*, 2014; GÜLÇİN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN, 2012). O óleo de cravo ainda possui outros compostos como β -cariofileno, acetato de eugenila, mirceno, α -terpineno (FAYEMIWO *et al.*, 2014) e o efeito sinérgico entre esses compostos com o eugenol ainda pode aumentar o seu espectro de ação.

Apesar de sua eficácia comprovada em diversas áreas ainda existem algumas limitações tecnológicas quanto à incorporação direta dos óleos essenciais em produtos ou matrizes complexas, devido à natureza hidrofóbica e volátil das moléculas bioativas. Estudos apontam que uma alternativa para solucionar este problema é a encapsulação (GARG; SING, 2011; DE OLIVEIRA; PAULA; PAULA, 2014; EL ASBAHANI *et al.*, 2015), que protege dentro de uma matriz inerte os ingredientes bioativos sensíveis dos compostos, mesmo em condições de meio desfavorável, melhorando a sua solubilidade em água, e também aliviando as incompatibilidades, mascarando o gosto e melhorando a biodisponibilidade de ingredientes no meio (SHAH; DAVIDSON; ZHONG, 2013), além da possibilidade da liberação controlada, prolongando a ação do composto bioativo (MOHAMMADI; HASHEMI; HOSSEINI, 2015).

Um ramo promissor e que vem sendo amplamente estudado é a nanotecnologia, definida como a criação, utilização e manipulação de materiais, dispositivos ou sistemas em escala nanométrica. A nanoencapsulação é um importante campo da nanotecnologia, que envolve o aprisionamento de agentes bioativos dentro de materiais de suporte, com uma dimensão em nanoescala (FATHI; MARTÍN;

McCLEMENTS, 2014). O tamanho reduzido das partículas formadas neste sistema tem inúmeras vantagens comparadas a sistemas convencionais de entrega, como alta estabilidade à agregação e separação gravitacional e ainda melhora na biodisponibilidade (JOYE; DAVIDOV-PARDO; McCLEMENTS, 2014) devido ao aumento da superfície de contato, tornando-se possível a utilização de concentrações que são suficientemente baixas para alterar a qualidade percebida do produto, mas por outro lado, são suficientemente elevadas para desempenho da ação à qual foi empregada (DONSI *et al.*, 2012). Vários tipos de sistemas nanocarreadores têm sido utilizados como potenciais carreadores de compostos bioativos, incluindo nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, nanolipossomas, nanopartículas poliméricas, micelas poliméricas, dentre outros.

As nanoemulsões e as nanopartículas sólidas vêm ganhando espaço e estão sendo investigadas como sistemas carreadores de compostos lipofílicos em produtos agrícolas (LAI *et al.*, 2006), farmacêuticos (GARG; SING, 2011; CORTÉS-ROJAS, SOUZA; OLIVEIRA, 2014) e, recentemente, vêm despertando interesse também na indústria alimentícia, isto por que mantêm a atividade biológica de compostos ativos e minimizam o impacto sobre as propriedades organolépticas dos alimentos. Os óleos essenciais, uma vez envolvidos por uma nanocamada lipídica protetora, conseguem chegar às fases ricas em água do alimento e atingir diretamente a parede celular dos microrganismos, causando distúrbios na membrana celular com consequente inviabilização; além da possibilidade de obter nanopartículas com flexibilidade de liberação, uma vez que a nanoemulsão tem liberação mais rápida comparada às lipídicas sólidas que podem ser trabalhadas com perfil de liberação controlada. Alguns estudos já comprovam a eficiência do emprego de nanopartículas lipídicas, principalmente quando se trata de nanoemulsão de óleos essenciais, frente a microrganismos de relevância na indústria alimentícia em ensaios *in vitro* (GHOSH, MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013) e também em alimentos (DONSI *et al.*, 2014; GHOSH, MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2014).

As nanopartículas poliméricas formadas com diversos materiais poliméricos também são amplamente empregadas no transporte de drogas, principalmente na indústria farmacêutica, onde são desenvolvidas para liberação controlada de fármacos (GÓMEZ-GAETE *et al.*, 2007; MAINARDES *et al.*, 2009; BELLETTI *et al.*, 2012; MO *et al.*, 2012; TOMODA *et al.*, 2012), e ainda para incorporação de óleos essenciais (GOMES, MOREIRA E CASTELL-PEREZ, 2011;

ESFANDYARI-MANESH *et al.*, 2013; EL ASBAHANI *et al.*, 2015). No entanto, é constante a busca por polímeros de fontes renováveis, biocompatíveis para emprego na preparação das partículas.

A polimerização via tiol-eno, que consiste em uma polimerização radicalar mediada por reações de transferência de cadeia, é uma alternativa interessante para produção de polímeros oriundos de fontes renováveis (TÜRÜNÇ; MEIER, 2013; CRAMER *et al.*, 2003). As nanopartículas carregadas com o composto bioativo podem ser produzidas tanto por polímeros pré-formados quanto por polimerização *in situ*, sendo esta última muito pouco explorada tanto para a polimerização via tiol-eno em miniemulsão, quanto para a incorporação de óleos essenciais e seus compostos em carreadores poliméricos.

Com base nos fatos e considerações expostas, os óleos essenciais podem ser incorporados em diferentes nanocarreadores, para diferentes fins de aplicação e avaliação da eficiência da técnica quanto à preservação da bioatividade e eficácia frente microrganismos e radicais livres. No entanto, pesquisas referentes à aplicação de nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com óleos essenciais na área de alimentos ainda são escassas, principalmente quando se trata de métodos livres de solventes, e também quando se refere à polimerização em miniemulsão via tiol-eno, tanto por ser uma área nova a ser explorada, quanto por avaliar possíveis aplicações das nanopartículas produzidas pela técnica, e o comportamento da incorporação do óleo essencial *in situ*, tendo como principais desafios as interferências que podem ser causadas devido à complexidade das estruturas químicas que compõem um óleo essencial.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o processo de encapsulação do óleo de cravo em diferentes tipos de nanopartículas lipídicas e poliméricas em sistema livre de solvente.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Encapsular o óleo de cravo em nanopartículas lipídicas utilizando método livre de solvente.
- Encapsular o óleo de cravo em nanopartículas poliméricas via polimerização em miniemulsão *in situ*.

- Caracterizar as nanopartículas carregadas com óleo de cravo quanto ao diâmetro de partículas e índice de polidispersão; eficiência de encapsulação; estabilidade sob armazenagem; propriedades térmicas e cristalinidade.
- Caracterizar o polímero obtido via polimerização em miniemulsão em relação às massas moleculares e conversão com diferentes concentrações de óleo de cravo.
- Avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas lipídicas carregadas com óleo de cravo.
- Avaliar a atividade antioxidante das nanopartículas lipídicas e poliméricas carregadas com óleo de cravo.

CAPÍTULO II

Neste Capítulo será apresentada uma revisão da literatura disponível acerca dos assuntos pertinentes neste trabalho. Primeiramente, é introduzida uma abordagem geral sobre o óleo essencial do cravo da Índia, seus principais compostos, sua atividade antimicrobiana e antioxidante. Em seguida, são apresentadas informações sobre métodos de encapsulação de compostos através das técnicas de nanoemulsão, nanopartículas lipídicas sólidas e polimerização em miniemulsão, incluindo possíveis aplicações.

2 ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Como a maioria dos compostos bioativos, aromas, antioxidantes, antimicrobianos, os óleos essenciais são quimicamente diversos, podendo acarretar alguns problemas quanto à introdução destes compostos em sistemas complexos. Isto por que, a adição destes compostos bioativos pode afetar negativamente a estabilidade e aceitabilidade do produto e também alterar a sua atividade biológica, devido à interação com outros ingredientes da composição, principalmente quando se trata de alimentos (WEISS *et al.*, 2009). Entretanto, a principal desvantagem dos componentes ativos dos óleos essenciais é a baixa solubilidade em água, por consequência, a concentração destes agentes hidrofóbicos é baixa em fase aquosa, onde habitam os microrganismos (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2014). Desta forma, o desenvolvimento de formulações contendo compostos instáveis, voláteis e fracamente solúveis em água, como os óleos essenciais, é uma tarefa desafiadora e que vem sendo estudada recentemente.

Uma alternativa para facilitar a incorporação dos óleos essenciais e seus componentes em matrizes complexas ou soluções aquosas é a encapsulação, conhecida por ser o processo de empacotamento de uma substância ativa em cápsulas de um material inerte protetor. Alternativa que proporciona melhorias quanto à solubilidade, dispersibilidade em meio aquoso e redução das perdas devido à ligação com componentes dispersos no meio, promovendo o contato com os componentes como células bacterianas presentes em meios aquosos e radicais livres (SHAH; DAVIDSON; ZHONG, 2013; SPIGNO *et al.*, 2013).

Um ramo promissor e que vem sendo amplamente estudado é a nanotecnologia, definida como a criação, utilização e manipulação de materiais, dispositivos ou sistemas em escala nanométrica. A

nanoencapsulação é um importante campo da nanotecnologia, que envolve o aprisionamento de agentes bioativos dentro de materiais de suporte, com uma dimensão em nanoescala (FATHI; MARTÍN; McCLEMENTS, 2014).

Neste sentido a nanotecnologia vem contribuindo significativamente para o desenvolvimento de carreadores nanométricos capazes de carregar antioxidantes e antimicrobianos, os bons resultados são justificados pela proteção fornecida pela matriz impedindo reações indesejadas, minimizando os impactos organolépticos e ainda melhorando a atividade (SPIGNO *et al.*, 2013). Neste contexto, Mohammadi, Hashemi e Hosseini (2015) produziram nanopartículas de quitosana carregadas com óleo essencial de *Zataria multiflora* e testaram sua eficiência na vida de prateleira de pepinos *in natura*. Os autores verificaram que com a aplicação das nanopartículas carregas com óleo o pepino foi preservado até 98% mais do que o controle após 15 dias de armazenagem, prevenindo estresse oxidativo e proliferação de fungos. Ainda, testes antioxidantes mostraram que a aplicação das nanopartículas com óleo essencial também ajudaram a preservar a atividade antioxidante do pepino durante a estocagem.

A nanoencapsulação de óleos essenciais representa uma abordagem viável e eficaz para as substâncias ativas, quando preparados como carreadores lipídicos, as propriedades superficiais da gotícula, tais como hidrofobicidade e carga de superfície não são apenas importantes para a estabilidade física, mas também para a eficácia antimicrobiana (SHAH; DAVIDSON; ZHONG, 2013), isto por que, o tamanho nanométrico em sistemas de entrega de fármaco, devido ao tamanho subcelular, pode aumentar o mecanismo de absorção celular passiva, reduzindo a resistência à transferência de massa e aumentando a atividade antimicrobiana (DONSI *et al.*, 2012). Partículas poliméricas em nanoescala também têm sido utilizadas para fabricação de novos carreadores de compostos bioativos em diversas áreas, com o propósito de preservar e proteger sua funcionalidade, com vantagens quanto à variação do perfil de liberação, obtendo liberações de médios a prolongados intervalos de tempo, dependendo do material polimérico de matriz utilizado.

São várias as áreas nas quais podem ser aplicadas as nanopartículas carregadas com óleos essenciais tanto poliméricas quanto lipídicas, devido à diversidade de compostos que os compõe, e ainda pelo aumento da área de contato ser capaz de aumentar o seu espectro de ação, garantindo a eficiência contra os mais diversos fungos, bactérias, vírus. A escolha do material adequado de matriz e processo vai depender

da aplicação e afinidade entre matérias primas e composto a ser encapsulado. Nas próximas seções serão abordados desenvolvimento e aplicações das técnicas citadas e descrições e atividades do óleo essencial escolhido.

2.1 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO

O cravo, *Syzygium aromaticum*, é uma importante especiaria aromática que vem sendo cultivada desde os tempos antigos na Índia, Madagascar, Sri Lanka, sul da China e Indonésia, este último apresenta a maior produção mundial, e o cravo é cultivado em quase todas as províncias do país. No entanto, atualmente o cravo é produzido e comercialmente exportado por todo o mundo e utilizado para diversos fins na medicina popular, aromas alimentares, conservação de alimentos, fragrâncias, produtos farmacêuticos e produção do óleo essencial (PETTER, 2012; HOSSAIN *et al.*, 2012).

O óleo do cravo é composto por várias classes ou grupos de compostos químicos, tais como: monoterpenos, sesquiterpenos, hidrocarbonetos e compostos fenólicos (HOSSAIN *et al.*, 2012). Fayemiwo *et al.* (2014) avaliaram a composição química do óleo essencial do cravo. Os resultados determinados através de GC-MS mostraram que o óleo de *S. aromaticum* tem eugenol a 80,5% como seu principal constituinte, seguido por Acetato de Eugenila com 5% e β -cariofileno com 3,14%, ainda estiveram presentes Mirceno, α -Terpineno em concentrações inferiores a 2% dentre outros compostos com valores inferiores a 1%.

O óleo essencial de cravo é obtido tradicionalmente por destilação a vapor, hidrodestilação ou extração por solvente das flores, caules e folhas da árvore de cravo (GUAN *et al.*, 2007; GÜLÇİN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN, 2012). Esta planta possui de 15 a 20% de óleo volátil que, além de ser utilizado como aromatizante (YANG; WEI; HONG, 2014), ainda pode substituir antioxidantes sintéticos como o hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT) utilizados na indústria alimentícia, alguns trabalhos abordam atividade antioxidante eficaz de *S. aromaticum* em óleo de avelã e papoula (ÖZCAN; ARSLAN, 2011) e carne de frango crua (RADHA KRISHNAN *et al.*, 2014).

Estudos comprovam o potencial de óleo de cravo contra infecções fúngicas na pele, boca, trato urinário e vaginal ocasionadas através de cepas de *Candida albicans*, responsável pela candidíase (KHAN; AHMAD, 2012), atividade antiinflamatória no tratamento da otite

externa aguda, que se refere à inflamação do canal auditivo externo (PANAHI *et al.*, 2014), ação clareadora na pele, sobre a formação de melanina em células de melanoma B16 (ARUNG *et al.*, 2011), atividade bactericida frente a bactérias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* responsáveis por doenças orais como cárie dentária e periodontite (MOON; KIM; CHA, 2011), atividade ansiolítica contra ansiedade (TIWARI *et al.*, 2014), atividade anti *Giardia lamblia*, protozoário que causa mundialmente doenças no trato intestinal em humanos e animais (MACHADO *et al.*, 2011), atividade tripanocida contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, responsável pela doença de chagas (SANTORO *et al.*, 2007), atividade antioxidante (GÜLÇİN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN, 2012). Abbaszadeh *et al.* (2014) avaliaram a atividade fungicida *in vitro* do eugenol em concentrações de 350 a 500 µg.mL⁻¹ frente a diferentes cepas de fungos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Botrytis* e *Rhizopus* e verificaram a redução significativa no crescimento de todos os fungos.

O potencial larvicida do óleo de *Syzygium aromaticum* e *Pinus sylvestris* contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* foi estudado por Fayemiwo *et al.* (2014). Ambos os óleos alcançaram mais de 85% de mortalidade larval no prazo de 24 horas de contato. As larvas de *A. aegypti* foram mais suscetíveis aos óleos do que a *C. quinquefasciatus*, e o óleo de *S. aromaticum* do que o *P. sylvestris*. No entanto, a diferença foi insignificante ($p > 0,05$), indicando que os óleos podem ser incorporados como medida de controle dos mosquitos junto aos serviços de saúde.

A elevada concentração de eugenol presente no óleo além de ser a principal responsável pelo odor característico de cravo, também é discriminada pelas suas atividades biológicas, o que despertou interesse crescente nos pesquisadores que vem estudando a eficiência do óleo frente a microrganismos deteriorantes e patogênicos de relevância para a indústria alimentar. Segundo a United States Food and Drug Administration quando administrado em níveis não superiores a 1500 ppm, o óleo de cravo foi listado como uma substância geralmente considerada segura para todas as classes de alimentos. Além disso, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu que a ingestão humana diária aceitável de óleo de cravo em 2,5 mg.kg⁻¹ de peso corporal para humanos (GÜLÇİN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN, 2012).

A atividade do óleo de cravo foi avaliada na inibição da *Listeria monocytogenes*. Mytle *et al.* (2006) avaliaram este potencial devido ao microrganismo ser capaz de sobreviver e crescer em temperaturas de

refrigeração em alguns produtos industrializados de aves, como a salsicha. Elevados números celulares (10^4 a 10^6 UFC.g⁻¹) foram aplicados à superfície do alimento e armazenados a 5°C por duas semanas e 15°C por uma semana, as amostras que foram submetidas a tratamento com 1 e 2% de óleo de cravo da Índia apresentaram inibição total do microrganismo, enquanto nas amostras controle todas as cepas sobreviveram e cresceram em ambas as condições de refrigeração.

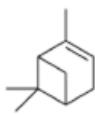
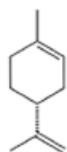
Matan *et al.* (2006) avaliaram o potencial antimicrobiano do óleo de canela e de cravo combinados em atmosfera modificada frente à *Aspergillus flavus*, *Penicillium roqueforti*, *Mucor plumbeus*, *Eurotium* sp., *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens*, *Zygosaccharomyces rouxi*, *Candida lipolytica*, *Staphylococcus aureus* e *Pedococcus halophilus*. Os autores verificaram que os óleos testados são eficazes inibidores dos microrganismos testados, salvo que o *A. flavus* apresentou maior resistência e elevadas concentrações dos óleos foram necessárias para a efetiva inibição do microrganismo.

2.1.1 Atividade Antimicrobiana do Eugenol

As plantas são capazes de sintetizar dois tipos de óleos, óleos fixos e óleos essenciais. Os óleos fixos são compostos por ésteres de glicerol e ácidos graxos (triglicerídeos), enquanto os óleos essenciais são misturas voláteis de terpenos, terpenoides, fenilpropanoides entre outros, como ilustrado na Figura 1, que contribuem para o sabor e aroma da planta (TISSERAND; YOUNG, 2014).

Os terpenos são hidrocarbonetos produzidos por uma combinação de várias unidades de isoprenos (C₅H₈), em sua maioria são monoterprenos (C₁₀H₁₆) e sesquiterpenos (C₂₀H₃₂), também existem em longas cadeias, como diterpenos (C₂₀H₃₂) e triterpenos (C₃₀H₄₀). A Figura 1 mostra exemplos de terpenos que inclui *p*-cimeno, limoneno, terpineno, sabineno e o pineno. Os terpenoides são terpenos que sofreram modificações via enzimas com adição de moléculas de oxigênio e com mudança ou remoção de grupos metil. Podem ser divididos em álcoois, ésteres, fenóis e epóxidos. O timol, carvacol, acetato de linalilo, citronela, piperitona, mentol e geraniol são exemplos de terpenóides (Figura 1). Os fenilpropanoides são sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina em plantas e são constituídos por um grupo fenol aromático de seis carbonos e um grupo lateral de três carbonos. Os fenilpropanoides constituem uma pequena parte dos óleos essenciais, os mais estudados são o eugenol, isoeugenol, vanilina, safrol e cinamaldeído (Figura 1) (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

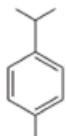
Figura 1. Estrutura química de constituintes de óleos essenciais.

Terpenos**Monoterpenos** α -Pinoeno

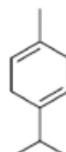
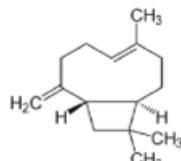
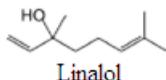
Limoneno



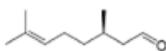
Sabineno



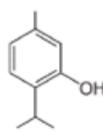
P-cimeno

 γ -Terpineno**Sesquiterpenos** β -Cariofileno**Terpenoides****Monoterpenoides**

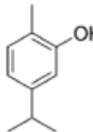
Linalol



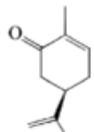
Citronela



Timol



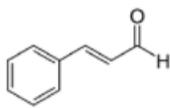
Carvacol



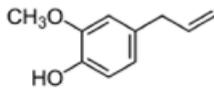
Carvona



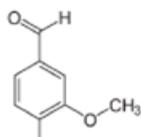
Borneol

Fenilpropanoides

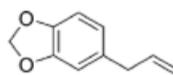
Cinamaldeo



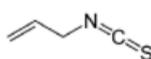
Eugenol



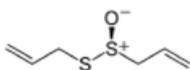
Vanilina



Safrol

Outros

Alil-isotiocianato



Alicina

Fonte: Adaptado de Hyldgaard, Mygind e Meyer (2012).

O fenilpropanoide eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$; 4-alilo-2-methoxyphenol) encontrado em elevadas concentrações na composição do óleo de cravo, pode ser responsável pelas suas fortes funções antimicrobianas, pois os compostos fenólicos dos óleos essenciais são eficazes antimicrobianos, capazes de desnaturar proteínas e interagir com os lipídios da membrana

celular dos microrganismos, alterando sua permeabilidade (HOSSAIN *et al.*, 2012).

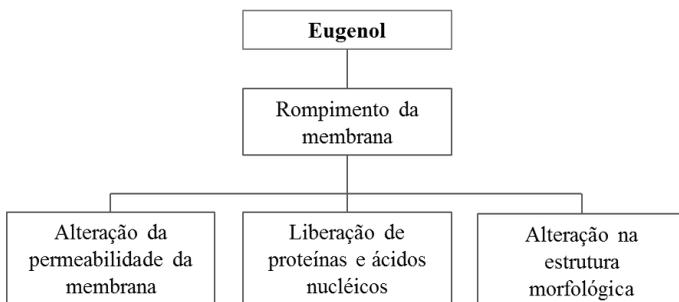
As principais estruturas celulares microbianas conhecidas são as gram-positivas que possuem uma espessa camada de peptidoglicano que protege a membrana citoplasmática, e as gram-negativas compostas por uma fina camada de peptidoglicano que rodeia a membrana citoplasmática, e ainda uma camada externa composta por lipopolissacarídeos e proteínas. Os compostos fenólicos dos óleos essenciais, como o eugenol, são capazes de interagir com os lipídios e proteínas presentes nas membranas celulares das gram-positivas e gram-negativas resultando na destruição da célula devido à alteração na sua permeabilidade, fluidez, inibição da respiração e alteração no transporte de íons (SADAKA *et al.*, 2014).

Com a finalidade de avaliar a capacidade antimicrobiana do Eugenol contra a *Salmonella typhi* e avaliar o seu mecanismo de ação, Devi *et al.* (2010), verificaram por de testes *in vitro* que o eugenol exibiu um forte efeito bactericida sobre a *S. typhi* (Figura 2). Dentro de 60 minutos a população bacteriana foi completamente inativada. A partir do ensaio de violeta cristal, foi possível observar que tratamentos em com 1 e 5% (v/v) de eugenol houve um aumento de 95% e 99% de absorção de violeta cristal para dentro das células, acarretada provavelmente por uma alteração da permeabilidade da membrana por ação do eugenol, facilitando a entrada do corante. Por de leituras UV-visível, foi possível verificar que os tratamentos com 1 e 5% de eugenol tiveram um aumento na densidade óptica (OD) de 0,01 até 0,4, ocasionado pela lise celular com consequente liberação dos constituintes intracelulares para o meio aquoso. Por intermédio da análise por eletroforese, foi possível visualizar a composição dos constituintes celulares que foram liberados para o meio extracelular, que incluem água, ácidos graxos, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos, composição atribuída à ocorrência de lesão celular. Os resultados sugerem que o eugenol altera as estruturas macromoleculares na membrana, o que resulta em perda completa de sua integridade. Além disso, a morfologia da superfície também foi estudada, confirmando a hipótese de deformação da superfície celular, que ficou visivelmente danificada após o tratamento com eugenol.

Em concordância aos resultados citados, um estudo anterior de Gill e Holley (2006), avaliou a perturbação das membranas celulares de *Escherichia coli*, *Lactobacillus sakei* e *Listeria monocytogenes* após contato com o eugenol, os resultados confirmam a ação antimicrobiana do composto que atua sobre as membranas celulares dos

microrganismos devido ao aumento da permeabilidade e confirmando a ruptura da membrana devido ao aumento do ATP extracelular e diminuição do ATP intracelular das células tratadas com eugenol.

Figura 2. Atividade antibacteriana e mecanismo de ação do eugenol.



Fonte: Adaptado de Devi *et al.* (2010).

2.1.2 Atividade Antioxidante do Eugenol

Os compostos fenólicos são uma classe importante de antioxidantes, capazes de inibir a oxidação de materiais comerciais e biológicos. A função dos antioxidantes é interceptar e reagir com os radicais livres a uma taxa mais rápida do que a do substrato, tais como lipídios, gorduras e proteínas (WRIGHT; JOHNSON; DILABIO, 2001).

A ação dos compostos fenólicos é devido à presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado ao anel benzênico, o qual é capaz de doar átomos de hidrogênio ou elétrons aos radicais livres impedindo o processo de oxidação (WRIGHT; JOHNSON; DILABIO, 2001).

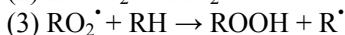
O processo de oxidação de lipídios ocorre pelas reações de iniciação onde o radical livre é gerado (1), adição de O₂ (2) e troca de hidrogênio (3), formando uma reação em cadeia onde o ciclo se repete entre as reações 2 e 3. Várias moléculas de lipídio são convertidas em hidroperóxidos (ROOH), resultando na oxidação e rancidez de lipídios e gorduras.



Iniciação

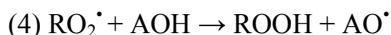


Adição de O₂



Troca de H

Quando um antioxidante que é capaz de doar hidrogênio (AOH) está presente no meio, ocorre a quebra da reação em cadeia e a reação 3 é impedida, uma vez que o antioxidante é responsável pela doação de H na reação 2, sequestrando o oxigênio e formando 4, impedindo a formação do radical livre (R[•]), conseqüentemente prevenindo a lipoperoxidação (WRIGHT; JOHNSON; DILABIO, 2001; *BERSON et al.*, 1985).



Da mesma forma, o antioxidante pode ser capaz de doar elétrons, devido à transferência destes entre RO_2^- e AOH^+ , decorrente da desprotonação do H^+ e formação de ROOH e AO^{\bullet} , portanto a mesma reação 4 é produto, também impedindo a formação do radical livre (WRIGHT; JOHNSON; DILABIO, 2001; BURTON *et al.*, 1985).

A indústria de alimentos utiliza largamente antioxidantes fenólicos sintéticos, como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ), por terem alta efetividade e baixo custo (ROBY *et al.*, 2013). No entanto, alguns óleos essenciais também estão inclusos como antioxidantes, como os terpenoides e fenóis, nos quais os fenóis se destacam e são empregados em alguns alimentos (BAKKALI *et al.*, 2008), como é o caso do eugenol, presente no óleo de cravo, que vem sendo reportado como um poderoso antioxidante, com atividade similar a alguns antioxidantes sintéticos, Teixeira *et al.* (2013) testaram a atividade antioxidante de vários óleos essenciais comerciais, incluindo o óleo de cravo, e compararam com a atividade do BHT, através do ensaio eliminador de radicais livres DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Como resultados encontraram um EC₅₀, quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração de DPPH[•] no meio, de 20 µg.mL⁻¹ para o BHT enquanto que para o óleo de cravo foi de 40 µg.mL⁻¹.

Gülçin e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antioxidante do óleo de cravo por de vários métodos *in vitro*, comparando a atividades de antioxidantes padrões como BHA, BHT, α-tocoferol e trolox. Como resultado os autores encontraram uma inibição de 97,3% da lipoperoxidação lipídica no ensaio do ácido linoleico em emulsão com óleo de cravo a uma concentração de 15 µg.mL⁻¹. Sob as mesmas condições e com concentrações de 45 µg.mL⁻¹ foram encontrados valores de 95,4, 99,7, 84,6 e 95,6% de redução da lipoperoxidação para os antioxidantes BHA, BHT, α-tocoferol e trolox, respectivamente. Os autores também realizaram o ensaio eliminador de radicais livres

DPPH^{*}, com este método é possível avaliar a ação eliminadora de radicais do antioxidante através da habilidade de doar hidrogênio, e consequente redução da absorção a 517 nm, devido à alteração da cor púrpura (DPPH^{*}) para amarela (DPPHH). Como resultado foi verificado que a uma concentração de 45 µg.mL⁻¹ para todos os antioxidantes testados, o efeito eliminador de radicais da solução de 0,1 mM de DPPH foi de 83,6, 67,8, 64,9 62,5 e 29,4% para óleo de cravo, BHT, α -tocoferol, BHA e trolox, respectivamente. O EC₅₀ para o óleo de cravo foi determinado em 21,50 µg.mL⁻¹. Os resultados encontrados no trabalho mostram que o óleo de cravo pode ser considerado um efetivo antioxidante quando comparado a antioxidantes padrões comerciais, podendo atuar na minimização e prevenção da oxidação lipídica tanto em produtos alimentícios quanto farmacêuticos, mantendo a qualidade nutricional e prolongando vida de prateleira.

Esta elevada atividade antioxidante do eugenol foi estudada por BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET (1995) utilizando o método DPPH^{*}, o primeiro hidrogênio doado para formar DPPHH não radical é provindo do radical hidroxila, depois disto os autores sugerem três hipóteses para explicar a eficiência antirradical. A primeira hipótese envolve a doação de um segundo átomo de hidrogênio derivado do deslocamento do elétron desemparelhado para a posição “para” do anel benzênico, que possui dois ou três hidrogênios no carbono nesta posição, liberando um H para agir com DPPH^{*}. A segunda hipótese envolve a dimerização entre dois radicais fenoxil gerando dois grupos hidroxila, através da transferência intramolecular de H^{*}, podendo então, interagir novamente com o DPPH^{*}. Na última hipótese eles sugerem que uma molécula de DPPH^{*} pode ser ainda complexada com um radical arilo presente no anel benzênico, estabilizando mais um radical DPPH. Os autores sugeriram neste mecanismo, que não somente da hidroxila ocorre doação de hidrogênio, mas também de outras partes da estrutura do eugenol, por isso sua elevada atividade.

2.2 NANOEMULSÕES

As nanoemulsões (NE) são definidas como a mistura de dois líquidos imiscíveis, com ou sem emulsionante, que contêm nanogotas com diâmetro de partículas entre 10 e 100 nm (McCLEMENTS, 2011). NE são consideravelmente diferentes das emulsões convencionais em seu desempenho devido à redução do tamanho das gotas, melhorando o desempenho da atividade devido ao aumento da superfície de contato. Outras vantagens da nanoemulsão sobre a emulsão convencional

incluem alta estabilidade física, alta biodisponibilidade e baixa turbidez, o que as torna atraentes para os sistemas de aplicações em alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013; SUGUMAR *et al.*, 2014).

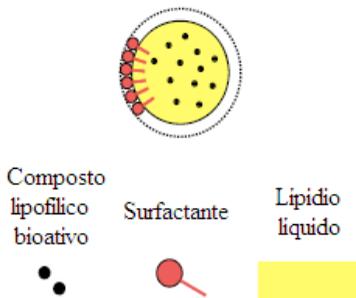
A principal particularidade das NE é a sua elevada estabilidade de suspensão das gotículas, a estabilidade cinética adquirida pode permanecer por meses, diferente das microemulsões (2-50 nm) que são termodinamicamente estáveis e das macroemulsões (100 nm- 100 μ m) que são termodinamicamente instáveis. A aparência e estabilidade da emulsão líquida são fortemente dependentes do tamanho da partícula. As emulsões se tornam transparentes e mais estáveis quando seu diâmetro é inferior a 40 nm. As nanoemulsões ainda têm uma vantagem sobre as emulsões macro, a frequência de colisão com microrganismos é maior devido ao tamanho menor ocasionando um aumento na funcionalidade (WEISS *et al.*, 2009; McCLEMENTS, 2011).

A desestabilização física das emulsões está relacionada com a tendência espontânea para um espaço mínimo interfacial entre as duas fases imiscíveis. Portanto, a minimização da área interfacial é alcançada através de dois mecanismos: A coalescência e a degradação difusional (degradação de Ostwald). Em nanoemulsões, a coalescência é naturalmente impedida devido à estabilização estérica ou iônica provida pelos agentes tensoativos. Levando isto em consideração, a forma de desestabilização das nanoemulsões é devida ao fenômeno de degradação de Ostwald, no qual ocorre transferência de massa das gotículas menores para as maiores devido à diferença de pressão de Laplace, isto é, as moléculas pequenas difundem através do meio contínuo para encontrar gotas maiores, onde a pressão de Laplace é menor, favorecendo a transferência de massa, com consequente desaparecimento das gotas pequenas e aumento do tamanho das gotículas maiores, ocasionando a desestabilização física do sistema da nanoemulsão (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008). Para melhorar a estabilidade das emulsões diminuindo a tensão interfacial entre as fases contínua e dispersa e minimizando a coalescência das gotículas, são adicionados agentes emulsionantes. O agente emulsionante é composto por moléculas tensoativas, que se dispõem nas superfícies das gotículas durante a dispersão das distintas fases, conforme ilustrado na Figura 3, formando uma camada superficial que minimiza a agregação das gotas por coalescência devido à repulsão eletrostática e/ou estérica (PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2013).

As nanoemulsões podem ser formuladas usando métodos de emulsificação de baixa e alta energia. Os métodos de baixa energia

incluem emulsificação espontânea, no qual a emulsão é formada espontaneamente através da mistura de todos os elementos da emulsão (óleo, água, surfactante) juntos. Usando este método, o tamanho das gotículas pode ser reduzido através da variação da composição da emulsão e alterando os fatores do meio, como a temperatura. Os métodos de elevada energia incluem homogeneização a alta pressão, microfluidização e sonicação. Nestes métodos, primeiramente é preparada uma emulsão grosseira que é submetida a forças de ruptura intensa que reduzem o tamanho da gotícula (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2014).

Figura 3. Estrutura da gota formada em uma nanoemulsão contendo composto bioativo com emulsificante.



Fonte: Adaptado de Weiss *et al.* (2009).

Para formar uma emulsão estável e fina usando homogeneização de alta pressão, a dispersão grosseira de óleo/água/emulsionante é transposta por um pequeno orifício de entrada a pressões na faixa 500-5000 psi. A microfluidização utiliza pressões superiores a 20000 psi para forçar o líquido através da câmara que consiste em microcanais de configuração específica. A emulsão é alimentada através dos microcanais para uma câmara de colisão, que leva à formação de gotículas na escala nano. A pressão de operação e o número de ciclos de passagem da pré-emulsão grosseira, em ambas as técnicas, tem forte efeito sobre o tamanho das nanopartículas formadas (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012).

A cavitação por ultrassom é um método que utiliza alta frequência de ondas sonoras para reduzir o tamanho das gotas na emulsão, a irradiação do ultrassom explora ondas sonoras de mais de 20

kHz para o desenvolvimento de cavitação acústica, o fechar dessas cavidades produz aquecimento, alta pressão e quebra das gotículas de emulsão em menor tamanho. É uma técnica eficiente para a preparação de nanoemulsões com diâmetro de gotas pequenas, maior estabilidade e baixa polidispersão (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2014). Este sistema é normalmente utilizado em escala laboratorial enquanto o homogeneizador de alta pressão pode ser utilizado pela indústria para grandes quantidades.

Nanopartículas lipídicas (sólidas ou líquidas) antimicrobianas são do tipo óleo em água com gotas nanométricas e amplo espectro de atividade contra vírus, fungos e bactérias. Utilizando o método de homogeneização por ultrassom para obtenção de nanoemulsões de óleo de eucalipto, Sugumar *et al.* (2014) utilizaram uma mistura de componentes contendo óleo de eucalipto, água e Tween 80 como surfactante. O potencial antibacteriano foi testado contra *Staphylococcus aureus* e a atividade de cicatrização de feridas em ratos. Os autores observaram que um aumento no tempo de sonicação melhorou a transparência e a estabilidade da emulsão. A nanoemulsão mais estável obtida com 30 minutos de sonicação teve um diâmetro médio da gotícula de 3,8 nm. A avaliação da atividade antibacteriana mostrou que o óleo de eucalipto foi eficaz para inviabilização total das células de *S. aureus* em 15 minutos de interação, e por de microscopia eletrônica de varredura foi confirmado o rompimento da membrana da célula com consequente morte do microrganismo. Em relação à atividade de cicatrização de feridas com as nanopartículas de óleo de eucalipto não foram visualizadas irritações na pele e foi observada cicatrização mais rápida em relação ao controle e com tratamento com neomicina.

Donsi *et al.* (2014) testaram emulsões de carvacrol em diferentes concentrações e escala nanométrica formadas a partir de homogeneização a alta pressão em abobrinhas com avaliação da inativação de *E. coli* previamente inoculadas no vegetal. Para aplicação, as amostras foram imersas nas emulsões diluídas com água destilada por 1, 3 e 5 minutos. O efeito da formulação da emulsão não obteve resultados significativamente diferentes para os diferentes agentes emulsionantes utilizados (lecitina, Tween 20 e monooleína), provavelmente porque o efeito dominante foi o tamanho das gotículas que se manteve entre 166 e 238 nm, o que é significativamente menor do que o tamanho da célula vegetal (10 μm), acarretando um aumento nos mecanismos passivos de transferência de massa através membranas celulares com base nos gradientes de concentração. As nanoemulsões também obtiveram melhores valores de inativação do microrganismo do

que as emulsões em escala micrométrica em um período de 30 minutos de contato. Os resultados apresentados demonstraram que os sistemas de distribuição baseados em nanoemulsão para óleos essenciais promovem uma ação antimicrobiana mais eficiente e também pode contribuir para a sua incorporação dos compostos hidrofóbicos em sistemas alimentares complexos.

Da mesma forma, Ghosh, Mukherjee e Chandrasekaran (2013) formularam uma nanoemulsão com óleo de manjerição, Tween 80 e água, a fim de avaliar sua atividade bactericida frente à *Escherichia coli*. O processo de emulsificação foi otimizado de modo a ser alcançado o diâmetro mínimo de gotículas com uma elevada estabilidade física, após foram fixados a concentração de surfactante, a proporção da mistura do óleo e surfactante e o tempo de emulsificação, em 1:3 v/v de óleo e surfactante e 15 minutos de sonicação respectivamente, obtendo gotículas com diâmetro de 29,3 nm que se mantiveram estáveis por um mês. Sob estas condições pré-determinadas, foi avaliada a atividade antibacteriana contra *E. coli*. Como resultado após 1 minuto de interação com a nanoemulsão não diluída, todas as células foram inviabilizadas, isto por que as gotículas de óleo de manjerição em escala nanométrica são capazes de reduzir até 6 log de células bacterianas viáveis em 1 minuto. Outras amostras contendo *E. coli* foram tratadas com diferentes diluições de nanoemulsão e mais de 60% de células viáveis foram mortas dentro de 15 minutos de exposição à nanoemulsão com diluição a 1:10, a atividade antibacteriana na nanoemulsão é esperada devido a presença de estragol, que é o principal componente do óleo essencial de manjerição.

Donsi *et al.* (2012) investigaram o efeito de sistemas de nanoemulsão sobre a atividade antimicrobiana de diferentes componentes de óleos essenciais. Carvacrol, limoneno e cinamaldeído foram nanoencapsulados em gotículas de óleo de girassol (fase lipídica) através de homogeneização a alta pressão e estabilizados por meio de diferentes emulsificantes (lecitina, proteína de ervilha, éster de açúcar e uma combinação de Tween 20 e monooleato de glicerol). A atividade antimicrobiana foi medida contra *E. coli*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae* e mostrou ser dependente da formulação dos sistemas de entrega das nanopartículas. As NE formadas com ésteres de açúcar ou combinação de Tween 20 e monooleato de glicerol melhoraram a solubilidade da nanopartícula que esteve presente no meio aquoso, consequentemente a atividade bactericida foi maior em períodos mais curtos de tempo (2 horas). Em contraste, as emulsões baseadas em lecitina e proteína de ervilha não exibiram atividade antimicrobiana

contra *L. delbrueckii*, e para *E. coli* apresentaram uma atividade limitada ao longo de 24 horas, provavelmente por que os componentes da nanoestrutura serviram como nutriente para os microrganismos. Estas considerações sugerem que uma escolha correta dos emulsificantes utilizados para formulação das nanoestruturas carreadoras é de extrema importância, uma vez que este deve servir de suporte e proteção para manter a estabilidade física e atividade do composto bioativo durante a difusão pelo meio.

Em estudo recente, Ghosh, Mukherjee e Chandrasekaran (2014) aplicaram uma nanoemulsão carregada com eugenol em suco de fruta e avaliaram os seus efeitos contra a contaminação microbiológica. Após a otimização dos parâmetros do processo, tais como tipo e concentração de surfactante e o tempo de emulsificação para se obter gotículas de diâmetro inferior e com elevada estabilidade, a nanoemulsão óleo/água foi formulada utilizando proporção 1:3 v/v de óleo de gergelim-eugenol e Tween 80 como surfactante e água, após aplicação de sonicação por 30 minutos, foram obtidas nanopartículas com um diâmetro 13 nm que se mantiveram estáveis por mais de um mês. A nanoemulsão apresentou atividade bactericida frente a *Staphylococcus aureus*, por testes utilizando microscopia de fluorescência foi confirmado que a membrana celular da bactéria foi rompida, com consequente morte celular, além de ter apresentado uma redução significativa na população de bactérias heterotróficas nativas no suco de laranja.

2.3 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

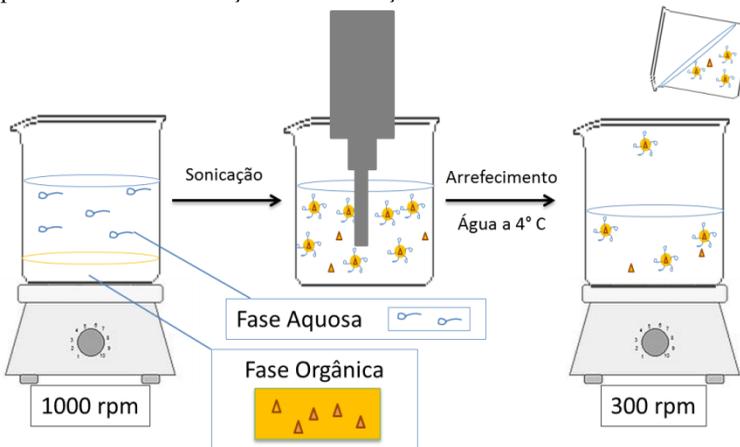
Os primeiros estudos referentes às NLS foram desenvolvidos por Schwarz e colaboradores (1994) que buscavam partículas intermediárias às nanoemulsões e nanopartículas poliméricas, com uma liberação mais lenta que as nanoemulsões, que possuem liberação quase instantânea do princípio ativo para o meio, mas que ainda fossem inferiores as nanopartículas poliméricas, que possuem uma liberação muito lenta do princípio tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

A primeira geração das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) eram constituídas pela dispersão do composto ativo em um lipídio sólido fundido ou de uma mistura de lipídios sólidos, seguida de resfriamento para que ocorra a incorporação das moléculas ativas entre as cadeias lipídicas (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA; 2014). A segunda geração de nanopartículas sólidas consiste em uma mistura de um lipídio sólido mais um lipídio líquido, capazes de formar uma matriz sólida a temperatura ambiente, formando uma rede menos cristalina com mais

espaço e facilidade para acomodar a droga, consequentemente conseguindo níveis de encapsulação elevados, quando comparados ao uso de apenas lipídio sólido (WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014). As NLS têm algumas vantagens em relação às nanoemulsões, como alta eficiência de encapsulação, possibilidade de produção e esterilização em larga escala, elevada flexibilidade no controle do perfil de liberação devido à lenta degradação da matriz sólida e a proteção dos compostos incorporados contra a degradação química (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012).

Para a produção de NLS, pode ser utilizada a técnica de homogeneização a quente. Primeiramente o lipídio (matriz sólida) é fundido a aproximadamente 5 °C acima do seu ponto de fusão, em seguida é adicionado o composto bioativo, surfactante e água e realizada a homogeneização com temperatura constante. A emulsão é submetida a um homogeneizador de elevada energia a uma temperatura controlada para formação da nanoemulsão lipídica óleo-água, em seguida é submetida a resfriamento e mistura, no qual ocorre a recristalização e a formação de nanopartículas lipídicas sólidas (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012; WEISS *et al.*, 2009).

Figura 4. Esquema de formação de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando o processo de emulsificação-ultrasonicação.



Fonte: Autor.

Quando a ultrasonicação é empregada para formação de NLS podem ser utilizadas duas técnicas, uma com o uso de solvente e outra

livre de solventes. Na técnica emulsificação-evaporação, uma emulsão grosseira é formada pela mistura da fase lipídica, solvente orgânico, emulsionante e componente bioativo. A pré-emulsão é em seguida sonicada a uma temperatura acima do ponto de fusão do lipídio por um período de tempo adequado. Finalmente, as partículas sólidas lipídicas são produzidas quando a nanoemulsão formada é submetida à água arrefecida contendo surfactante e agitação para evaporação do solvente (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012). Na técnica emulsificação-ultrasonicação (Figura 4) é dispensado o uso de solvente orgânico, e a fase orgânica é composta pelo lipídio ou mistura de lipídios mais composto bioativo que são aquecidos a uma temperatura superior ao ponto de fusão do lipídio, enquanto a fase aquosa é composta por água e surfactante e mantida na mesma temperatura. As fases orgânica e aquosa são emulsionadas sob alta agitação, a emulsão obtida é sonicada em um ultrassom por tempo e amplitude determinados, formando então uma nanoemulsão que é dispersa em água arrefecida para a solidificação das nanopartículas (DAS *et al.*, 2011).

A aplicação de óleos essenciais em NLS é estudada principalmente na área médica e farmacêutica, dentre um dos estudos Garg e Singh (2011) aplicaram eugenol em NLS utilizando matriz com um (ácido esteárico) ou dois lipídios (ácido esteárico e triglicerídeo caprílico), com o uso de acetona como solvente na fase orgânica. Para redução do tamanho das partículas os autores utilizaram ultraturrax e ultrassom, alcançando um tamanho médio de entre 527 e 87 nm com a variação das formulações. Os níveis de encapsulação de eugenol nas nanopartículas contendo dois lipídios chegaram a quase 99%. Após otimização e caracterização, as NLS carregadas com eugenol foram aplicadas em ratos laboratoriais imunossuprimidos com candidíase oral. Os resultados indicaram melhora na atividade antifúngica do eugenol, quando administrada na forma de NLS em comparação ao eugenol de forma livre.

Lai e colaboradores (2006) projetaram um sistema de entrega baseado em NLS para aplicação de óleo essencial de *Artemisia arborescens* como pesticida ecológico. Foi utilizada a técnica de homogeneização a alta pressão para formação das nanopartículas, Compritol como matriz lipídica e poloxamer 188 ou Miranol Ultra C32 como surfactantes. Como resultados os autores conseguiram partículas com alta estabilidade física, com diâmetro médio entre 199 e 294 nm, e eficiência de encapsulação de até 92%. Além disso, uma vez envoltos pela matriz lipídica foi verificada a prevenção da evaporação dos compostos.

O grupo de Cortés-Rojas, Souza e Oliveira (2014) avaliou a nanoencapsulação de óleo de cravo em carreadores lipídicos, os autores testaram cinco diferentes formulações variando material de matriz entre behenato de glicerila, ácido esteárico, e óleo de buriti, surfactante entre Polisorbato 80 e Poloxamer 188, e ainda maltodextrina, goma arábica e lactose como agentes de secagem. Também foram realizados testes quanto à influência do método de dispersão (alta homogeneização em ultraturrax, sonicação em ultrassom e homogeneização a alta pressão) e técnica de secagem (spray e freeze drying). Dentre os testes, a formulação contendo behenato de glicerila, Poloxamer 188 e maltodextrina apresentou a melhor retenção dos compostos eugenol e acetato de eugenila presentes no óleo de cravo, com bons resultados de atividade antioxidante, e o método de *freeze drying* obteve melhores resultados de retenção dos compostos.

2.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

A encapsulação favorece a entrega dos compostos ativos de interesse, uma vez que pode estar alocada em um carreador adequado proporcionando uma entrega dirigida, e ainda possui uma liberação controlada por diferentes intervalos de tempo independente da massa molecular, ou natureza do bioativo. Melhorando a segurança e eficácia uma vez que beneficia a proteção do composto bioativo (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008).

Nanopartículas poliméricas (NPs) são definidas como carreadores sólidos, em tamanho sub-micrométrico, geralmente entre 1 a 1000 nm (REIS *et al.*, 2006), que sejam de preferência biodegradáveis e biocompatíveis quando se trata de carreadores de princípios ativos (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). As nanopartículas podem ser divididas em nanoesferas e nanocápsulas. Nas nanoesferas as drogas podem ser adsorvidas na superfície ou encapsuladas dentro da partícula, sendo composta por uma matriz sólida, enquanto nas nanocápsulas a droga é confinada em uma cavidade, formando um núcleo líquido no interior rodeado por uma membrana polimérica (REIS *et al.*, 2006), também conhecida por casca-núcleo. O núcleo pode ser hidrofóbico ou hidrofílico, de acordo com o método de preparação e a matéria prima utilizada (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Numerosos materiais poliméricos estão sendo utilizados para preparar nanopartículas para entrega de compostos bioativos, incluindo poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) que é um dos polímeros biodegradáveis

mais utilizados, policaprolactona (PCL), polissacarídeos (principalmente quitosana), poli (ácido acrílico) (PAA) e derivados, proteínas ou polipeptídeos (como a gelatina) entre outros. Existem várias técnicas que podem ser empregadas para encapsulação de compostos bioativos em matrizes poliméricas utilizando polímeros pré-formados, como é o caso da emulsificação-evaporação do solvente e nanoprecipitação, ambas com emprego de solvente, e também a partir de polimerização direta dos monômeros usando uma técnica de polimerização clássica, sem necessidade do uso de solventes, como é o caso da polimerização em miniemulsão que será abordada no próximo capítulo.

2.4.1 Polimerização em miniemulsão

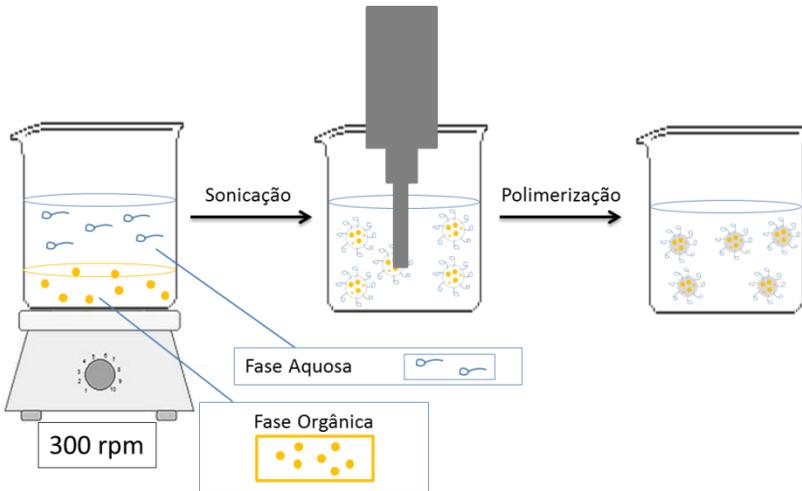
A polimerização em miniemulsão é uma técnica utilizada para encapsulação de compostos tanto sólidos quanto líquidos através da polimerização direta. Consiste basicamente na aplicação de alta tensão de cisalhamento em macrogotas providas usualmente de uma macroemulsão, na qual a fase orgânica é composta por monômero e coestabilizador, e a fase aquosa composta por água e emulsificante, para formação de gotas pequenas e estáveis em uma fase contínua (Figura 5). Estas pequenas gotas agem como nanorreatores, nos quais ocorrem as reações de polimerização tanto dentro da gota quanto na superfície, formando na maioria dos casos nanopartículas sólidas (LANDFESTER, 2009; LANFESTER; MUSYANOVYCH; MAILÄNDER, 2010).

O tamanho das nanogotas depende do tipo e concentração de surfactante, que pode variar entre 50 a 500 nm. O coestabilizador deve ter boa solubilidade na fase dispersa, e baixa solubilidade na fase contínua, sendo ele responsável pela pressão osmótica encontrada dentro das gotas (LANFESTER; MUSYANOVYCH; MAILÄNDER, 2010). Ambos, surfactante e coestabilizador usados corretamente, são responsáveis pela prevenção tanto da degradação difusional, também conhecida por “*Ostwald Rippening*” na qual a diferença de pressão de La Place entre as gotas menores e maiores, que é inversamente proporcional ao tamanho, é responsável pela difusão das gotas menores para as maiores, quanto da coalescência causada pela colisão com consequente agregação das gotas devido ao efeito Browniano e forças de van der Waals (ASUA, 2002).

As NPs formadas a partir de miniemulsões são versáteis, podendo ocorrer com diferentes combinações de coestabilizadores e iniciadores. Esta combinação tem grande influência na formação e na natureza das nanopartículas (RAO; GECKELER, 2011). Além disso, como a reação

ocorre dentro das nanogotas, nenhuma difusão é necessária, vários monômeros podem ser utilizados, como estireno, metacrilato, acrilamidas, acrilatos entre outros, ou até mesmo copolimerização entre monômeros hidrofóbico e hidrofílico. Dentre vantagens, ainda é possível citar que inúmeras polimerizações podem ser realizadas, como radicalar ou não-radicalar, aniônica, catiônica, catalítica, polimerização via metátase por abertura de anel e dienos acíclicos, poliadição, policondensação, polimerização enzimática entre outras (LANFESTER; MUSYANOVYCH; MAILÄNDER, 2010).

Figura 5. Esquema de formação de nanopartículas poliméricas utilizando o processo de polimerização em miniemulsão.



Fonte: Adaptado de Landfester, 2009.

Dentro das NPs formadas via miniemulsão é possível encapsular inúmeros compostos líquidos ou sólidos. Na área médica, a encapsulação de líquidos hidrofóbicos contribuiu para a incorporação de fármacos, desta forma Moreira *et al.* (2014) com auxílio do hexadecano como coestabilizador e facilitador de incorporação da droga, produziram nanopartículas carregadas com tamoxifeno por polimerização via radicais livres e transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação (RAFT) via miniemulsão, utilizando metil metacrilato (MMA) como monômero e 2,2-azobisisobutironitrila (AIBN) como iniciador, conseguindo altos níveis de encapsulação. Neste contexto,

Fonseca e colaboradores (2013), também utilizando MMA como monômero e óleo mineral como coestabilizador, produziram nanopartículas carregadas com praziquantel através de polimerização via miniemulsão *in situ*. Como resultado conseguiram 100% de encapsulação através de homogeneização a alta pressão como método de produção.

Os coestabilizadores hidrofóbicos mais utilizados são hexadecano e o álcool cetílico (ASUA, 2002), além do Crodamol GTCC (VALÉRIO *et al.*, 2015; STEINMACHER *et al.*, 2010) que são frequentemente testados para produção de NPs via miniemulsão. No entanto é constante a busca por coestabilizantes alternativos, como óleo mineral (FONSECA *et al.*, 2013), óleo de semente de girassol (GUO; SCHORK, 2008), ácido linoleico (GUO; SCHORK, 2008), óleo de mamona (STEINMACHER *et al.*, 2010), óleo de jojoba e andiroba (CARDOSO; ARAÚJO; SAYER, 2013). Os coestabilizantes podem interferir na taxa de reação, distribuição da massa molar e morfologia uma vez que se houver presença de insaturações na cadeia aumenta a probabilidade de reação entre o polímero e as duplas ligações do coestabilizante retardando a polimerização (GUO; SCHORK, 2008).

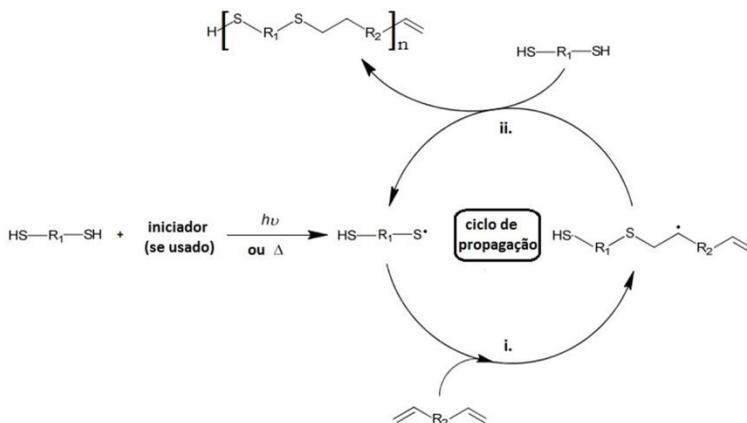
A encapsulação de fragrâncias utilizando a técnica também reporta comportamento similar, Theisinger *et al.* (2009) produziram NPs carregadas com 1,2-dimetil-1-fenil-butiramida (DMPBA) utilizando estireno e MMA como monômeros e também testaram MMA e metacrilato de metila (BMA) como co-monômeros. Como resultados, visualizaram que com o aumento da concentração de DMPBA houve uma grande redução da massa molar das NPs, além de uma desaceleração nas taxas de conversão do monômero, com uma redução significativa da taxa de polimerização. Os autores sugerem que a fragrância agiu como um agente de transferência de radical, devido a sua estrutura química interferir nas taxas de polimerização.

2.4.2 Polimerização via Tiol-eno

Recentemente reações via tiol-eno têm sido estudadas devido à simplicidade e versatilidade do processo e várias características as tornam particularmente atrativas: as reações podem proceder em diferentes condições como via radical, processo catalítico ou catalise supramolecular; uma gama de “enos” como espécies ativas ou não ativas e ligações olefinicas multissubstituídas podem ser usadas como substratos; as reações são normalmente muito rápidas (LOWE, 2010) e

as conversões são comumente inferiores a 100% quando a transferência de massa é fator limitante (HOYLE; BOWMAN, 2010).

Figura 6. Polimerização em cadeia do grupo tiol e a dupla ligação do grupo eno.



Fonte: Machado, 2015.

As reações via tiol-eno, como é possível visualizar na Figura 5, ocorrem basicamente em três passos: iniciação, propagação com transferência de cadeia e terminação. Na iniciação ocorre a formação dos grupos tiol pela da abstração do hidrogênio devido ou não à presença de iniciadores. No segundo passo, a propagação envolve a adição direta do grupo tiol ao grupo “eno”, na qual o tiol ataca as duplas ligações e se adiciona à olefina, gerando ainda um elétron desemparelhado no carbono central da cadeia. A transferência de cadeia ocorre devido ao carbono central resultante ser responsável pela doação do elétron para o grupo tiol, produzindo outro grupo tiol e desta forma reiniciando o ciclo. Como etapa final a terminação se dá provavelmente devido ao processo de acoplamento radical-radical (HOYLE; BOWMAN, 2010; LOWE, 2010). A reação é basicamente a combinação dos grupos tiol e eno, na ausência ou presença de foto ou termoiniciadores, resultando em uma estrutura com massa molecular e estrutura semelhante a outras polimerizações com transferência de cadeia (HOYLE; BOWMAN, 2010).

As polimerizações via tiol-eno tem ganhado considerável importância no âmbito tecnológico e científico em virtude às várias vantagens intrínsecas e têm sido utilizadas no preparo de biomateriais

com potenciais aplicações em várias áreas devido às suas características não tóxicas, biodegradabilidade e propriedades adesivas (ORTIZ *et al.*, 2009).

Neste contexto, Acosta Ortiz *et al.* (2010) empregaram a técnica de fotopolimerização via tiol-eno para preparar um biopolímero reticulado de sacarose, baseado em materiais de fontes renováveis, pela da reação entre tiol difuncional com dialil sacarose como agente reticulante. Os resultados de conversão e taxa de polimerização aumentaram consideravelmente quando diferentes fotoiniciadores a 1 mol% foram empregados e quando a intensidade da luz ultravioleta foi aumentada, mas também ocorreu na ausência de fotoiniciadores. A cinética de fotopolimerização procedeu muito rapidamente e com conversões em torno de 62%. Ambos os monômeros testados, dialil sacarose e ditiotretitol, resultaram em materiais flexíveis com temperatura de transição vítrea (T_g) de 30 °C, alto módulo de elasticidade, estabilidade térmica até 230 °C, degradação completa após 2 horas em meio ácido e moderada habilidade de absorção de água devido à presença dos grupos hidroxila na cadeia polimérica. Por fim, os autores sugerem que com estas características, o polímero produzido tem potencial aplicação em sistemas de entrega de droga.

Elastase Neutrófila Humana (ENH) é a protease secretada pelos neutrófilos, as quais são as primeiras células recrutadas para agir em sítios inflamatórios. Usando tiol-eno fotopolimerização, Aimetti, Tibbitt e Anseth (2009) produziram e caracterizaram uma plataforma para por hidrogéis de polietilenoglicol (PEG) com ENH imobilizada e avaliaram a potencial liberação para tratar inflamações locais. Como resultados, os autores observaram que a plataforma a base de hidrogel estudada mostrou alto controle cinético de liberação com taxas de liberação de aproximadamente 80%, mostrando potencial aplicação em entrega de droga para resposta celular.

Wang e colaboradores (2013) sintetizaram um novo monômero acetal cíclico com grupo dialilo reagente, 5-etil-5-(hidroximetil)-b,b-dimetil-1,3-dioxano-etanol dialil (EHDA), o qual foi reticulado com tiols por de fotopolimerização via tiol-eno, produzindo géis biodegradáveis na presença de uma pequena quantidade de fotoiniciador como agente catalítico. A taxa de polimerização aumentou com o aumento da concentração do fotoiniciador e da intensidade da luz. A cinética de polimerização foi muito rápida e com conversão em torno de 90%. O polímero resultante apresentou uma boa estabilidade térmica com perda de massa de 97,2% em 378 °C. Os autores também investigaram a degradação do biopolímero em meio PBS para simular as

condições fisiológicas e como resultado após 25 dias foi verificada uma perda de massa de 16%. Testes de citotoxicidade *in vitro* também foram conduzidos e os resultados mostraram que os géis acetal cíclico não são tóxicos aos fibroblastos e tem boa compatibilidade.

2.4.3 Polimerização via Tiol-eno em miniemulsão

Existem muitas possibilidades para emprego da polimerização via tiol-eno com potencial para sintetizar polímeros biocompatíveis e biodegradáveis para aplicações biomédicas e esta ainda é uma área pouco explorada, principalmente quando se trata de polimerização em miniemulsão. Como trabalho pioneiro Jasinski *et al.* (2014) sintetizaram nanopartículas de poli(tioeter-éster) (PTEE) usando etileno glicol ditiol e adipato dialil como co-mônômeros por de fotopolimerização via tiol-eno em miniemulsão. O látex resultante teve um tamanho médio de partículas de 130 nm. As análises calorimétricas revelaram uma T_g de -63 °C e comportamento semicristalino com grau de cristalinidade em 55%.

Amato, Flynt e Patton (2014) sintetizaram nanopartículas de poli(tioeter) reticuladas através da técnica de fotopolimerização via tiol-eno em miniemulsão usando homogeneização de alta energia. Como resultado foram obtidas partículas com tamanho médio de 46 nm. Outros estudos vêm sendo desenvolvidos no grupo de pesquisa de Durham, em trabalho recente avaliaram como o impacto da adição de hidrocoloides na síntese de partículas poliméricas preparadas utilizando polimerização via tiol-eno em miniemulsão (DURHAM; SHIPP, 2015); Em outra pesquisa os autores sintetizaram partículas poliméricas usando vários monômeros, como alceno, alcino e tiol, em suspensões tiol-eno e tiol-ino usando iniciação térmica. As partículas foram analisadas quanto a tamanho, temperatura de transição vítrea e capacidade de desenvolver funcionalização química (DURHAM; NORTON; SHIPP, 2015).

Neste contexto, é possível verificar que a polimerização via tiol-eno em miniemulsão é um novo campo com muitos processos, características, aplicação e degradação que ainda precisam ser estudados. Com isto, o grupo de pesquisa da proponente dissertação começou recentemente a trabalhar com polimerizações via tiol-eno em miniemulsão, no qual Machado *et al.* (2016) sintetizaram nanopartículas de poli(tioéter-éster) derivadas de fontes renováveis. Como etapa inicial, foi sintetizado o monômero renovável α,ω -dieno diéster, dianidro-D-glucitilo diundec-10-enoato (DGU) por da esterificação do óleo de castor e isosorbídeo em solvente orgânico. O DGU foi então

copolimerizado com 1,4-butanoditiol em polimerização via tiol-eno em massa e em miniemulsão. Como resultado, foi observado um poli(tioéter-éster) linear semicristalino. Todos os parâmetros como tempo e temperatura de reação, concentração de iniciador, tipo e concentração de surfactante foram otimizados pelo autor e as nanopartículas foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, morfologia, massa molecular e comportamento térmico. Desta forma, parte desta dissertação vem como continuação do trabalho citado anteriormente, procurando por possíveis aplicações para as nanopartículas de poli(tioéter-éster).

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS REFERENTES AO ESTADO DA ARTE

Na área de alimentos, a maioria dos estudos quanto à encapsulação via nanoemulsão de óleos essenciais são referentes à sua eficiência frente a microrganismos, faltando estudos em relação à sua atividade antioxidante após o processo de encapsulação. E ainda, faltam pesquisas na área alimentícia para encapsulação de óleos essenciais em nanopartículas lipídicas sólidas, principalmente quando se trata de métodos livres de solventes, tendo como principal vantagem a liberação controlada das NLS, que podem auxiliar tanto para aplicações diretas sobre superfície de alimentos, como frutas e verduras, além de também poder ser aplicado em embalagens funcionais.

Quando se fala em encapsulação de óleos essenciais via polimerização em miniemulsão há uma lacuna na literatura. Não são reportados até o presente momento trabalhos que avaliem a encapsulação de óleos essenciais utilizando o presente método com a incorporação do óleo *in situ*. Os principais desafios são quanto às interferências que podem ser causadas pela estrutura química do óleo essencial, formados por diversos compostos, e como isto afetará as taxas de polimerização e as propriedades das NPs.

Baseado nestas considerações, as seguintes seções da presente dissertação apresentam os resultados obtidos referente à encapsulação do óleo essencial de cravo em nanopartículas lipídicas com aplicação frente a microrganismos de relevância na indústria de alimentos e avaliação da atividade antioxidante. Em seguida é apresentado o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas carregadas com óleo de cravo pela da técnica de polimerização em miniemulsão via tiol-eno e avaliação da atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S.; SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A.R. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 24, n. 2, p. e51–6, 2014.
- ACOSTA ORTIZ, R.; MARTINEZ, A. Y. R.; GARCÍA VALDEZ, A. E.; BERLANGA DUARTE, M. L. Preparation of a crosslinked sucrose polymer by thiol-ene photopolymerization using dithiothreitol as comonomer. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 822–828, 2010.
- AIMETTI, A. a.; TIBBITT, M. W.; ANSETH, K. S. Human neutrophil elastase responsive delivery from poly(ethylene glycol) hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 6, p. 1484–1489, 2009.
- AMATO, D. N. V. N. D. V. D.; FLYNT, A. S.; PATTON, D. L. D. Functional, sub-100 nm polymer nanoparticles via thiol-ene miniemulsion photopolymerization. **Polym. Chem.**, p. 5625–5632, 2014.
- ANTON, N.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 128, n. 3, p. 185–99, 2008.
- ARUNG, E. T.; MATSUBARA, E.; KUSUMA, I. W.; SUKATON, E.; SHIMIZU, K.; KONDO, R. Inhibitory components from the buds of clove (*Syzygium aromaticum*) on melanin formation in B16 melanoma cells. *Fitoterapia*, v. 82, n. 2, p. 198–202, 2011.
- ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 7, p. 1283–1346, 2002.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BELLETTI, D.; TOSI, G.; FORNI, F.; GAMBERINI, M. C.; BARALDI, C.; VANDELLI, M. A.; RUOZI, B. Chemico-physical investigation of tenofovir loaded polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 753–763, 2012.
- BERSON, A.; DUNN, D. D. A.; BRISIMITZAKIS, A. C.; BURTON, G. W.; DOBA, T.; GABE, E. J.; HUGHES, L.; LEE, F. L.; PRASAD,

- L.; INGOLD, K. U. Autoxidation of Biological Molecules- 4. Maximizing the Antioxidant Activity of Phenols. **Journal of the Americam Chemical Society**, v. 107, n. 24, p. 7053-7065, 1985.
- BEYKI, M.; ZHAVEH, S.; KHALILI, S.T.; RAHMANI-CHERATI, T.; ABOLLAHI, A.; BAYAT, M.; TABATABAEI, M.; MOHSENI FAR, A. Encapsulation of Mentha piperita essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against Aspergillus flavus. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 310–319, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CARDOSO, P. B.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Encapsulation of jojoba and andiroba oils by miniemulsion polymerization. Effect on molar mass distribution. **Macromolecular Symposia**, v. 324, n. 1, p. 114–123, 2013.
- CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers. **Journal of Food Engineering**, v. 127, p. 34–42, 2014.
- DAS, S.; KIONG, W.; KANAUIA, P.; KIM, S.; TAN, R. B. H. DAS, S. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Formulation design , preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug : Effects of process variables. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 483–489, 2011.
- DE OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M. de. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 146–151, 2014.
- DEVI, K. P.; NISHA, S.A.; SAKHINEL, R.; PANDIAN, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107–15, 2010.
- DONSI, F.; ANNUNZIATA, M.; VINCENSI, M.; FERRARI, G. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342–50, 2012.

- DONSÌ, F.; CUOMO, A.; MARCHESE, E.; FERRARI, G. Infusion of essential oils for food stabilization: Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, p. 212–220, 2014.
- DURHAM, O. Z.; NORTON, H. R.; SHIPP, D. A. Functional polymer particles via thiol–ene and thiol–yne suspension “click” polymerization. **RSC Adv.**, v. 5, n. 82, p. 66757–66766, 2015.
- DURHAM, O. Z.; SHIPP, D. A. Suspension “click” polymerizations: thiol-ene polymer particles prepared with natural gum stabilizers. **Colloid and Polymer Science**, v. 293, n. 8, p. 2385–2394, 2015.
- EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AÏT ADDI, E. H.; CASABIANCA, H.; EL MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220–243, 2015.
- EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AÏT ADDI, E. H.; CASABIANCA, H.; EL MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220–243, 2015.
- ESFANDYARI-MANESH, M.; GHAEDI, Z.; ASEMI, M.; KHANAVI, M.; MANAYI, A.; JAMALIFAR, H.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 4, p. 290–295, 2013.
- FATHI, M.; MARTÍN, Á.; McCLEMENTS, D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, 2014.
- FATHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 1, p. 13–27, 2012.
- FAYEMIWO, K. A.; ADELEKE, M. A.; OKORO, O. P.; AWOJIDE, S. H.; AWONIYI, I.O. Larvicidal efficacies and chemical composition of essential oils of *Pinus sylvestris* and *Syzygium aromaticum* against mosquitoes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 1, p. 30–4, 2014.

FONSECA, L. B.; NELE, M.; VOLPATO, N. M.; SEICEIRA, R. C.; PINTO, J. C. Production of PMMA Nanoparticles Loaded with Praziquantel Through “In Situ” Miniemulsion Polymerization. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 7, n. 1, p. 54–63, 2013.

GARG, A; SINGH, S. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 280–8, 2011.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against microbial spoilage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 392–7, 2014.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 338–44, 2013.

GILL, A O.; HOLLEY, R. A. Disruption of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Lactobacillus sakei cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 1–9, 2006.

GOMES, C.; MOREIRA, R. G.; CASTELL-PEREZ, E. Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped trans-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. N16–N24, 2011.

GÓMEZ-GAETE, C.; TSAPIS, N.; BESNARD, M.; BOCHOT, A.; FATTAL, E. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, n. 2, p. 153–159, 2007.

GUAN, W.; LI, W.; YAN, R.; TANG, S.; QUAN, C. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1558–1564, 2007.

GÜLÇİN, İ.; ELMASTAŞ, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 489–499, 2012.

GUO, J.; SCHORK, F. J. Hybrid miniemulsion polymerization of acrylate/oil and acrylate/fatty acid systems. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 2, p. 265–276, 2008.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RA, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Deliverv Reviews**, v. 60, p. 1638–1649, 2008.

HIN, G. H.; KIM, J. T.; PARK, H. J. Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 144–157, 2015.

HOSSAIN, M. A.; AL-HASHMI, R. A.; WELI, A. M.; AL-RIYAMI, Q.; AL-SABAHIB, J.N. Constituents of the essential oil from different brands of *Syzygium caryophyllatum* L by gas chromatography–mass spectrometry. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1446–S1449, 2012.

HOYLE, C. E.; BOWMAN, C. N. Thiol-Ene Click Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 9, p. 1540–1573, 2010.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-24, 2012.

JASINSKI, F.; LOBRY, E.; TARABLSI, B.; CHEMTOB, A.; NOUEN, D. Le; CRIQUI, A. Light-Mediated Thiol – Ene Polymerization in Miniemulsion: A Fast Route to Semicrystalline Polysulfide Nanoparticles. **ACS Macro Letters**, v. 3, p. 958–962, 2014.

JOYE, I. J.; DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. J. Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability. Trends in Food Science & Technology, v. 40, n. 2, p. 168–182, 2014.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 416–23, 2012.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

LAI, F.; WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H.; FADDA, A. M. *Artemisia arborescens* L essential oil Loaded in Solid Lipid Nanoparticles for

potential agricultural application: Preparation and characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, p.E1- E9, 2006.

LANDFESTER, K. Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 25, p. 4488–4508, 2009.

LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A.; MAILÄNDER, V., From polymeric particles to multifunctional nanocápsulas for biomedical applications using the miniemulsion process. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 48, p. 493–515, 2010.

LOWE, A. B. Thiol-ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. **Polymer Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 17–36, 2010.

MACHADO, M.; DINIS, A. M.; SALGUEIRO, L.; CUSTÓDIO, J. B. A.; CAVALEIRO, C.; SOUSA, M. C. Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 4, p. 732–9, 2011.

MACHADO, T. O. **Synthesis of Poly (thioether-ester) nanoparticles derived from renewable resources via thiol-ene polymerization in miniemulsion**. 2015. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

MACHADO, T. O.; CARDOSO, P. B.; MEIER, M. A. R.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. **Thiol-ene polymerization of a renewable monomer in miniemulsion**. Submitted, 2016.

MAINARDES, R.M.; GREMIÃO, M.P.D.; BRUNETTI, I.L.; FONSECA, L.M.; KHALIL, N.M. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: Influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 1, p. 257-267, 2009.

MATAN, N.; RIMKEEREE, H.; MAWSON, A. J.; CHOMPREEDEA, P.; HARUTHAITHANASAN, V.; PARKER, M. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 180–5, 15, 2006.

- McCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297, 2011.
- MO, L.; HOU, L.; GUO, D.; XIAO, X.; MAO, P.; YANG, X. Preparation and characterization of teniposide PLGA nanoparticles and their uptake in human glioblastoma U87MG cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 815–824, 2012.
- MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M.; HOSSEINI, S. M. Postharvest treatment of nanochitosan-based coating loaded with Zataria multiflora essential oil improves antioxidant activity and extends shelf-life of cucumber. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2015.
- MOON, S.-E.; KIM, H.-Y.; CHA, J.-D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 9, p. 907–916, 2011.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113–142, 2010.
- MOREIRA, T. S.; DE OLIVEIRA, M. A. M.; DA ROCHA E LIMA, L. M. T.; DE SOUZA, M. N.; DA SILVA PINTO, J. C. C. Synthesis of Nanoparticles Loaded with Tamoxifen by in Situ Miniemulsion RAFT Polymerization. **Macromolecular Symposia**, v. 344, p. 101–107, 2014.
- MYTLE, N; ANDERSON, G. .L.; DOYLE, M. P.; SMITH, M. A. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**, v. 17, n. 2, p. 102–107, 2006.
- ORTIZ, R. A.; GARCIA VALDÉZ, A. E.; MARTINEZ AGUILAR, M. G.; BERLANGA DUARTE, M. L. An effective method to prepare sucrose polymers by Thiol-Ene photopolymerization. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 2, p. 282–286, 2009.
- ÖZCAN, M. M.; ARSLAN, D. Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 171–174, 2011.
- PANAHI, Y.; AKHAVAN, A.; SAHEBKAR, A.; HOSSEINI, A. M.; TAGHIZADEH, M.; AKBARI, H.; SHARIF, M. R.; IMANI, S. Investigation of the effectiveness of *Syzygium aromaticum*, *Lavandula angustifolia* and *Geranium robertianum* essential oils in the treatment of

acute external otitis: a comparative trial with ciprofloxacin. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 3, p. 211–6, 2014.

PETTER, K. V. **Handbook of herbs and spices**. 2nd edition. Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2012.

PIORKOWSKI, D. T.; McCLEMENTS, D. J. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. **Food Hydrocolloids**, p. 1-37, 2013.

RADHA KRISHNAN, K.; BABUSKIN, S.; BABU, P. A. S.; SASIKALA, M.; SANINA, K.; ARCHANA, G.; SIVARAJAN, M.; SUKUMAR, M. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 32–40, 2014.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

REIS, C.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.

ROBY, M. H. H.; SARHAN, M. A.; SELIM, K. A.-H.; KHALEL, K. I. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 827–831, 2013.

SADAKA, F.; NGUIMJEU, C.; BRACHAIS, C.-H.; VROMAN, I.; TIGHZERT, L.; COUVERCELLE, J.-P. Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, p. 1-23, 2014.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; MENDONÇA, L. Z.; SOARES, M. J. Trypanosoma cruzi: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 283–90, 2007.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production,

characterization and sterilization. **Journal of Controlled Release**, v. 30, n. 1, p. 83–96, 1994.

SCOPEL, R.; FALCÃO, M. a.; LUCAS, A. M.; ALMEIDA, R. N.; GANDOLFI, P. H. K.; CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. Supercritical fluid extraction from *Syzygium aromaticum* buds: Phase equilibrium, mathematical modeling and antimicrobial activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 223–230, 2014.

SHAH, B.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in bovine milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 53–59, 2013.

SPIGNO, G.; DONSI, F.; AMENDOLA, D.; SESSA, M.; FERRARI, G.; DE FAVERI, D. M. Nanoencapsulation systems to improve solubility and antioxidant efficiency of a grape marc extract into hazelnut paste. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 2, p. 207–214, 2013.

STEINMACHER, F. R.; BERNARDY, N.; MORETTO, J. B.; BARCELOS, E. I.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Kinetics of MMA and VAc miniemulsion polymerizations using miglyol and castor oil as hydrophobe and liquid core. **Chemical Engineering and Technology**, v. 33, n. 11, p. 1877–1887, 2010.

SUGUMAR, S.; GHOSH, V.; NIRMALA, M. J.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAM, N. Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 1044–1049, 2014.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M. F.; ALEXANDRE, J.; LEONOR, M. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops & Products**, v. 43, p. 587–595, 2013.

THEISINGER, S.; SCHOELLER, K.; OSBORN, B.; SARKAR, M.; LANDFESTER, K. Encapsulation of a fragrance via miniemulsion polymerization for temperature-controlled release. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 210, n. 6, p. 411–420, 2009.

TISSERAND, R.; YOUNG, R. **Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals**. 2^a edition. Churchill Livingstone Elsevier, 2014.

TIWARI, P.; VERMA, R.; AHIRWAR, D.; CHANDY, A.; DWIVEDI, S. Evaluation of anxiolytic effect of *Syzygium aromaticum*: a traditional herb of India. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. Suppl 1, p. S77–S80, 2014.

TOMODA, K.; TERASHIMA, H.; SUZUKI, K.; INAGI, T.; TERADA, H.; MAKINO, K. Enhanced transdermal delivery of indomethacin using combination of PLGA nanoparticles and iontophoresis in vivo. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 50–54, 2012.

VALÉRIO, A.; CONTI, D. S.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; DA ROCHA, S. R. P. Synthesis of PEG-PCL-based polyurethane nanoparticles by miniemulsion polymerization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 35–41, 2015.

WANG, K.; LU, J.; YIN, R.; CHEN, L.; DU, S.; JIANG, Y.; YU, Q. Preparation and properties of cyclic acetal based biodegradable gel by thiol-ene photopolymerization. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1261–1266, 2013.

WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 1, p. 7–22, 2014.

WEISS, J.; GAYSINSKY, S.; DAVIDSON, M.; MCCLEMENTS, J. **Global issues in food science and technology**. [s.l.] Elsevier, 2009

WRIGHT, J. S.; JOHNSON, E. R.; DILABIO, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 6, p. 1173–1183, 2001.

YANG, Y.-C.; WEI, M.-C.; HONG, S.-J. Ultrasound-assisted extraction and quantitation of oils from *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) with supercritical carbon dioxide. **Journal of Chromatography A**, v. 1323, p. 18–27, 2014.

CAPÍTULO III

3 ENCAPSULATION OF CLOVE OIL INTO SOLID LIPID NANOPARTICLES AND NANOEMULSION BY A SOLVENT FREE METHOD

ABSTRACT

In this work, the clove essential oil was loaded into solid lipid nanoparticles (SLN) and nanoemulsions (NE) using a free-solvent method. SLN and NE loading different amounts of clove oil were prepared by a high emulsification method using single (stearic acid) or binary (stearic acid and Crodamol GTCC) lipids for SLN, and Crodamol and/or clove oil for NE, both employing a non-ionic surfactant (Pluronic F-127) to prevent coalescence. The intensity mean particle size of the SLN was between 250 and 310 nm, and whereas those of the nanoemulsions were between 100 and 135 nm. The presence of small amounts of Crodamol increased particle stability of both SLN and NE, and also led to a decrease of crystallinity of SLN as results showed by FT-IR and DSC analyses. Encapsulation Efficiency of SLN 3 (binary lipid) was found to be almost 12% more than of SLN 1 (single lipid); moreover stability studies showed that the single lipid formulation had more facility to drug expulsion, droplets agglomeration and reduction of physical stability than binary lipid. Formulation SLN 3 showed the lowest Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against Gram positive and negative bacteria, probably due the high surface area. Results of DPPH scavenging showed that both free and encapsulated eugenol retained the antioxidant activity around 90%.

Keywords: Clove oil; Solid lipid nanoparticles; Nanoemulsion; Antioxidant activity; Antimicrobial activity.

3.1 INTRODUCTION

Essential oils (EOs) are very complex being composed by volatile mixtures of terpenes, terpenoids, phenylpropanoid, among others, which contribute to the characteristic flavor and aroma. The antimicrobial and antioxidant activity of EOs are directly correlated to the presence of their bioactive volatile compounds (CALO *et al.*, 2010). There are between 20 and 60 components at quite different concentrations which compose an essential oil (BAKKALI *et al.*, 2008), usually one or two major components in fairly high concentrations are responsible for bioactivity.

The phenylpropanoid eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$, 4-allyl-2-methoxyphenol) found in high concentration, about 90-95%, in clove oil composition can be credited for its strong antimicrobial activity, due to the phenyl group that is capable of denaturing proteins and interact with the lipids of the cell membrane of microorganisms, altering their permeability and causing subsequent cell death (HOSSAIN *et al.*, 2012; SADAKA *et al.*, 2014). Additionally, eugenol also presents strong antioxidant activity for lipids or other molecules by inhibition of oxidizing chain reactions which provides protection against oxidative degradation in foods (GÜLÇİN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN, 2012).

However, some technological limitations are involved when it comes to essential oils application in foods, due to the hydrophobic and volatile nature of the bioactive molecules that affect their dispersion in the food matrix and the odor and taste of the food (DONSI *et al.*, 2012). The use of particles with reduced size, as nanoparticles, can provide a better physical stability and chemical properties that are significantly different from those same substances in macroscale (DUNCAN, 2011) Nanoemulsions (NE) and solid lipid nanoparticles (SLN), made up of natural lipids that are solid at body temperature (ALMEIDA; SOUTO, 2007), are gaining space as carrier systems for lipophilic compounds in medical (GARG; SINGH, 2011), pharmaceutical (SUGUMAR *et al.*, 2014; BECKER PERES *et al.*, 2016) and more recently in the food industry (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2014) by improving the availability and keeping the biological activity of active compounds while minimizing the impact on the food's organoleptic properties. Essential oils, once surrounded by a protective lipid nanolayer and forming stable aqueous dispersions, can more easily reach the water rich phases of foods, where microorganisms remain, acting in its cell membrane causing disturbances with consequent unfeasibility (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013; SUGUMAR

et al., 2014). The very high surface area of NE and SLN increases the contact and maximize the antimicrobial activity, making it possible to use concentrations which are low enough to change the perceived quality of the product, but on the other hand, are high enough to inhibit microbial growth within the limits imposed by food regulations (DONSI *et al.*, 2012).

The aim of this work is to obtain Solid Lipid Nanoparticles and Nanoemulsions loaded with clove oil using a free solvent method and compare their antimicrobial and antioxidant activity. Stearic acid (solid lipid) and Crodamol GTCC that is composed by a mixture of capric/caprylic triglycerides (liquid lipid) are considered non-toxic and safe by Food and Drug Administration (FDA) (SEVERINO *et al.*, 2012). Several clove oil / stearic acid / Crodamol GTCC combinations were tested in respect of their suitability for preparing stable SLN and NE. The responses were being the intensity average particle size and distribution, zeta potential and encapsulation efficiency. Finally, both formulations (SLN and NE) were tested as antimicrobial and antioxidant agents.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Chemical reagents

Essential oil of clove leaves was obtained from Ferquima Industry and trade essential oils, Brazil. Stearic acid (Vetec) and Pluronic® F-127 were purchased from Sigma Aldrich, Brazil. CrodamolTM GTCC was obtained from Alpha Química, Brazil. Distilled water was employed in all experiments.

3.2.2 Clove Oil composition

Composition of clove oil was analyzed on an Agilent 7890A gas chromatograph interfaced to an 5975C mass spectrophotometer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), CTC-Combi-Pal autosampler (GTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) and capillary column HP-5MS (30 m length x 0.32 mm internal diameter x 0.25 μm film thickness). The samples were injected at a concentration of 1 wt.% diluted in chloroform, the oven temperature was programmed at 70 °C for 1 min, raised to 240 at a rate of 3 °C.min⁻¹ and maintained at 240 °C for 5 min and injector temperature was kept at 240 °C. The identification of the

components of the clove oil was done by matching the obtained mass spectra data with NIST MS search version on Wiley library.

3.2.3 Solid Lipid Nanoparticles preparation

SLN were obtained at different clove oil, stearic acid and Crodamol GTCC combination. A non-ionic surfactant, Pluronic F-127, at 0.2 wt% related to water was used in all experiments. Preliminary tests were carried out to optimize lipid and surfactant concentrations, then different concentrations of clove oil ranging from 250 to 750 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were tested as well as the effect of single lipid and/or binary lipid in the SLN production using solvent-free method, as exposed in Table 1. SLN was prepared in four steps, first, the organic phase composed by lipids and clove oil was heated up to 80 °C, due the stearic acid melting point of ~72 °C, and kept at this temperature for 10 min under stirring for complete melting of stearic acid. Then, water and surfactant, at same temperature, were added to the organic phase and stirred for 30 min under constant heating resulting in a coarse emulsion. Third, the coarse emulsion was sonicated during 1 min (sonication 30 s and pause 10 s) at 50% amplitude using a sonicator (Fischer Scientific, Ultrasonic Dismembrator Model 500, 400 W), which produces intense disruptive forces and minimizes droplet diameter. Finally, nanodispersions were suspended in cooled water to promote lipid solidification.

Table 1. Formulations of Solid Lipid Nanoparticles.

Sample	Stearic Acid (mg) ^a	Crodamol GTCC (mg) ^a	Clove oil ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ^b
SLN 1	600	-	250
SLN 2	400	200	-
SLN 3	400	200	250
SLN 4	400	200	450
SLN 5	400	200	750

PS: ^a quantities to 100 mL of water; ^b clove oil concentration in relation to water.

3.2.4 Nanoemulsion preparation

Nanoemulsions were prepared using Crodamol GTCC with different amounts of clove oil as the organic phase, and an aqueous phase composed by 0.33 wt.% of Pluronic F-127 solution, as exposed in Table 2. At room temperature a coarse emulsion was prepared stirring

the aqueous and organic phase for 30 min at 600 rpm, followed by sonication during 1 min (sonication 30 s and pause 10 s) at 50% amplitude. Finally, the nanoemulsion was cooled in an ice bath to dissipate the heat generated during the sonication.

Table 2. Formulations of Nanoemulsions.

Sample	Crodamol GTCC (mg) ^a	Clove oil (mg.mL ⁻¹) ^b
NE 1	-	7
NE 2	20	7
NE 3	20	13

PS: ^aquantities to 6 mL of water; ^b clove oil concentration in relation to water.

3.2.5 Droplet size measurement

Nanoparticles and nanodroplets intensity average size (Dp) and polydispersity index (PdI) were determined by Dynamic Light Scattering technique (DLS) using the Zetasizer Nano S equipment from Malvern instruments. Samples were scattered at 633 nm at an angle of 173° with previous dilution in distilled water at 25 °C.

3.2.6 Zeta potential (ZP)

Zeta potential provides particles electric surface potential and information about stability of the nanoemulsions and solid lipid nanoparticles formulations. It was determined by Laser Doppler Anemometry technique associated with microelectrophoresis using the Zetasizer Nano ZS 3600 equipment, Malvern Instruments. Analysis were conducted with previous dilution in distilled water (1:10) at 25 °C.

3.2.7 Encapsulation Efficiency

The essential oil loading in the solid lipid nanoparticles formulation was determined by centrifugation using 100 kDa Nominal Molecular Weight Limit filter (Amicon® Ultra, Millipore). The analysis was performed by adding 500 µL of SLN dispersion into the Amicon® Ultra and centrifuging it at 10000 rpm for 20 min. SLN with loaded oil were retained by the filter and water and free oil were permeated. A permeated aliquot was properly diluted with ethanol and then free clove oil was quantified by UV/Vis spectroscopy at 280 nm using a Hitachi (U-1900) spectrophotometer. The concentration of free oil was

calculated using a calibration curve following Equation 1 and the oil encapsulation efficiency (EE) was determined using Equation 2.

$$Abs = (0.0165 \times C_{co}) + 0.0621 \quad (1)$$

where, *Abs* is the absorbance and C_{co} is the clove oil concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Following a correlation coefficient of $R^2 = 0.99$.

$$EE\% = (C_{initial} - C_{free})/C_{initial} \times 100 \quad (2)$$

where, C_{free} is the amount (μg) of free oil not encapsulated dispersed in water determined from Equation 1 and $C_{initial}$ is the total amount (μg) of clove oil added to the initial emulsion.

3.2.8 Stability studies

Nanoemulsions and SLN aqueous dispersions with different amounts of clove oil were stored for 30 and 60 days under refrigeration ($\sim 4^\circ\text{C}$). Thereafter, the intensity average particle size, polydispersity index, zeta potential and encapsulation efficiency upon storage were evaluated.

3.2.9 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

The absorption spectra of lyophilized SLN samples were determined using a Shimadzu spectrophotometer (IRPrestige-21) by conventional KBr pellet method. Samples were grinded and compressed with anhydrous KBr to form pellets. The scanning range was $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ and resolution was 4 cm^{-1} .

3.2.10 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Lyophilized SLN samples were analyzed using a DSC 4000 Perkin Elmer, under inert atmosphere (N_2 , $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), from -10 to 85°C at heating rate of $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. The thermal history was removed prior to the analyses at a heating rate of $20^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ and cooling rate of $-20^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. The melting temperatures were thus obtained from the second heating run to investigate the influence of the clove oil and Crodamol GTCC on the thermal behavior of the SLN.

3.2.11 Transmission Electron Microscopy (TEM)

Particle morphology characterization was performed by Transmission Electron Microscopy using a JEM-1011 TEM (100 kV). Samples of SLN and Nanoemulsion were diluted in distilled water up to 0.1% of solids; in sequence one drop of each sample was placed on a carbon-coated grid and dried under room conditions overnight.

3.2.12 Surface Area and Number of Particles

The number of particles (Np) and the total surface area (SA_t) of nanoemulsion and SLN dispersions were calculated using Equations 3 and 4, respectively.

$$Np = \left(\frac{m_t}{\rho_m} \right) / \left(\frac{4}{3} \pi \left(\frac{Dp}{2} \right)^3 \right) \quad (3)$$

$$SA_t = Np \ 4 \ \pi \left(\frac{Dp}{2} \right)^2 \quad (4)$$

where, m_t is the total mass (g) of organic phase, ρ_m is the specific mass of organic phase (g/cm^3) and Dp is the intensity average diameter determined by DLS.

3.2.13 Antioxidant Activity

The DPPH free radical scavenging measurements were used to determine if scavenging capacity of clove oil was maintained after encapsulation procedure. With minor modification, the method previously described (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) was employed. Briefly, 500 μL of free clove oil solution, SLN or NE loaded with clove oil was mixed with 1000 μL of ethanolic DPPH solution (0.125 mM) and incubated in dark room for 1 h at room temperature. Then, the tubes were centrifuged at 10000 rpm for 30 min and supernatant was taken for measurement at 517 nm using a Hitachi (U-1900) UV-vis spectrophotometer. Blank samples were prepared by mixing 500 μL of distilled water and blank SLN (SLN 2) with 1000 μL of DPPH ethanolic solution. The percentage of DPPH scavenging activity ($SA\%$) of clove oil was calculated following Equation 5.

$$SA\% = \left(1 - \frac{A_s}{A_0}\right) \times 100 \quad (5)$$

where, A_s and A_0 are the absorbance of sample and absorbance of blank, respectively.

3.2.14 Antimicrobial Activity

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined using the indirect method of bacterial growth and optical density reading in liquid culture medium. Gram positives *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *Streptococcus mutans* and Gram negatives *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Salmonella choleraesuis* were tested. After the growth period, 10 μ L of pre-inoculum (10^8 UFC.mL⁻¹) were inoculated in microtubes with 1 mL of LB broth in different concentrations, obtained with dilutions of samples (SLN and NE) and control. Then, the microtubes were incubated in electromagnetic mixer (60 Hz) for 24 h at 35 °C. Before and after incubation period, 0 and 24 h respectively, bacterial broth aliquots of 100 μ L were transferred to flat bottom microplates and absorbance was measured in 490 nm in an automatic microplates reader (Bio-Tec Instruments Inc., EL800). The inhibition of growth was determined by the difference between 24 and 0 h measurements. All experiments were carried out in triplicate. The MIC was considered as the minor concentration of the agent capable to inhibit the bacterial growth after 24 h of incubation.

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 Clove Oil Composition

Composition of the essential oils of any plant can be dependent on which part of the plant is used: flowers, leaves, stems, bark, wood, whole fruits, pericarp, seed or roots (CALO *et al.*, 2015). In this work, a commercial oil extracted from clove leaves was used. The chemical composition of this oil is shown in Table 3 as component and area (%) obtained by CG/MS, as well as the retention indexes listed in order of their elution from capillary column HP-5MS. Eugenol (91.0%) was the most abundant compound in clove oil followed by caryophyllene (8.1%) and humulene (0.9%). As expected, the eugenol was the major component, which confers most of bioactivity of the clove oil, plus its characteristic odor. It is noteworthy that usually the aromatic

compounds and terpenes have biosynthetic pathways separated in plants but may coexist, as happens in this case (BAKKALI *et al.*, 2008).

Table 3. Main components of essential oil of clove leaf as determined by GC-MS.

Component	Retention Time (R _t)	Area %
Eugenol	15.584	91.0
Caryophyllene	17.838	8.1
Humulene	19.131	0.9

3.3.2 Particle Size and Polydispersity Index

Intensity average particle diameter and polydispersity index are presented in Table 4. SLN formulations resulted in average particles diameter between 250 and 310 nm with a broad particle size distribution inferred by the PDI between 0.13 and 0.25 for the most formulations. It is possible to notice that single lipid (SLN 1) had larger droplet size, 312 nm, and particle size dispersity, PDI of 0.332, than binary lipid SLNs. This behavior is probably due the addition of liquid lipid (Crodamol GTCC) and essential oil (clove oil) that reduced the viscosity of the organic phase, decreasing the particle resistance to breakup during stirring and sonication. The liquid lipid is also able to reduce stearic acid crystallinity forming a disordered matrix that can be more easily broken down into small and homogeneous particles (GARG; SINGH, 2011).

Nanoemulsions presented a much smaller average diameter than those found in SLN formulations, as shown in Table 4. The intensity average droplet size for the three nanoemulsions formulations ranged from 98 to 134 nm, with PDI between 0.196 and 0.286.

3.3.3 Zeta Potential

The lipid nanodispersions stability analysis, based on electrokinetic potential values, revealed that all the SLN samples showed a low value for ZP between -18 and -19 mV (Table 4). Pluronic F-127 is a non-ionic surfactant, therefore the negative ZP should be caused by the presence of carboxylic groups from the stearic acid at the particle surface. Without stearic acid on the formulation of nanoemulsions the zeta potential values were around -12 mV.

Table 4. Solid Lipid Nanoparticles and Nanoemulsion characterization of average size ($D_p \pm S.D.$), polydispersity index ($PdI \pm S.D.$), encapsulation efficiency* ($E.E. \pm S.D.$) and zeta potential ($ZP \pm S.D.$) * Encapsulation Efficiency was determined just for SLN.

Sample	Day 1			Day 30		Day 60	
	$D_p \pm S.D.$ (nm)	$PdI \pm S.D.$	$ZP \pm S.D.$ (mW)	$E.E. \pm S.D.$ (%)	$E.E. \pm S.D.$ (%)	$E.E. \pm S.D.$ (%)	$E.E. \pm S.D.$ (%)
SLN 1	312.9±20.7	0.332±0.033	-18.1±0.3	82.3±1.1	74.2±2.2	70.5±1.9	-
SLN 2	271.2±11.2	0.221±0.028	-18.4±0.8	-	-	-	-
SLN 3	248.2±22.8	0.124±0.011	-18.9±0.9	93.9±1.6	93.1±1.1	91.2±1.0	-
SLN 4	250.8±18.0	0.142±0.014	-19.3±0.3	84.4±0.8	84.2±0.9	82.2±0.8	-
SLN 5	293.8±36.6	0.256±0.051	-18.7±0.5	78.2±1.1	74.3±1.8	73.8±1.6	-

Sample	Day 1		
	$D_p \pm S.D.$ (nm)	$PdI \pm S.D.$	$ZP \pm S.D.$ (mW)
NE 1	98.9±28.7	0.285±0.027	-13.2±0.9
NE 2	134.3±10.6	0.196±0.014	-12.3±1.3
NE 3	132.5±15.3	0.225±0.037	-12.9±0.9

Nanoemulsions

3.3.4 Encapsulation Efficiency

Encapsulation efficiency of clove oil in SLN dispersions was evaluated through the measurements of clove oil that was not encapsulated, remaining in the aqueous phase after the encapsulation procedure. Table 4 shows values of E.E. for all SLN formulations. It can be observed that adding Crodamol GTCC to the formulation increased the entrapment capacity of SLN 3 (binary lipid) in comparison to SLN 1 (single lipid). This result can be related with crodamol ability to increase imperfections on lipid crystal lattice, where the EO is loaded, as well as improving the eugenol's solubility (HU et al., 2006; SOUTO et al., 2004). Efficiency was also evaluated regarding the clove oil concentration and, it is possible affirm that E.E. had become lower when clove oil concentration was increased in the formulations, probably due to the saturation of the lipid phase with EO.

3.3.5 Stability studies

Stability studies were performed after 30 and 60 days of storage under refrigeration and results are presented in Table 4. Comparing formulations with the same concentration of clove oil (SLN 1 and SLN 3), it is worth noting that the formulations with Crodamol (SLN 2-5) increased the encapsulation efficiency and decreased the release rate. The observed effect can be explained due to the Crodamol being able to promote a better entrapment of drug during storage, once it helps in lattice formation and loading the EO within nanoparticles lipid matrix imperfections, reducing the chances of drug expulsion of the lipid phase. As previously reported (SOUTO et al., 2004), a single lipid with a high crystallinity degree, as stearic acid, had its crystallinity transformed due to high energy modifications in encapsulation procedure and during storage has the tendency to become a perfect crystal with consequent expulsion of the drug. For SLN 4 and 5, with binary lipid, a similar behavior of EO entrapment was observed.

Figure 7. Solid Lipid Nanoparticles stability of particle average size (Dp) and polydispersity index (PDI) under refrigeration during 30 and 60 days of storage.

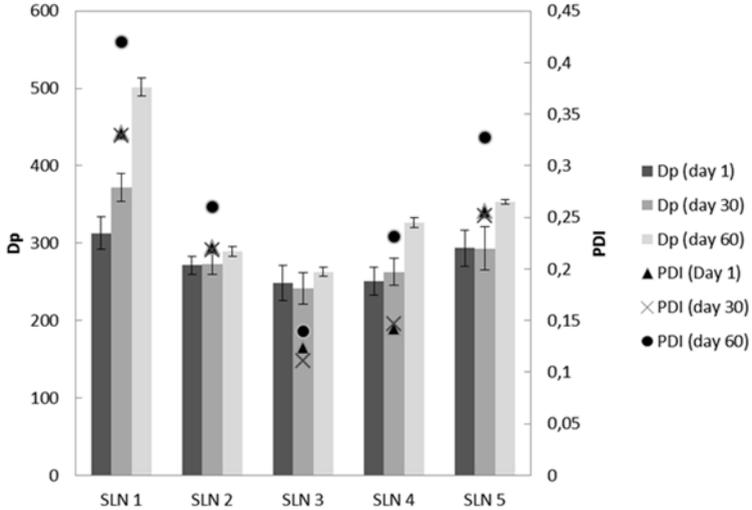
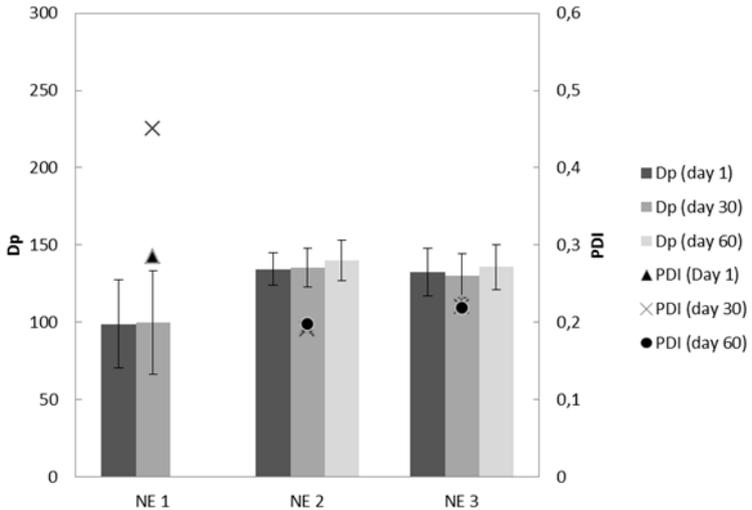


Figure 8. Nanoemulsion stability of particle average size (Dp) and polydispersity index (PDI) under refrigeration during 30 and 60 days of storage.



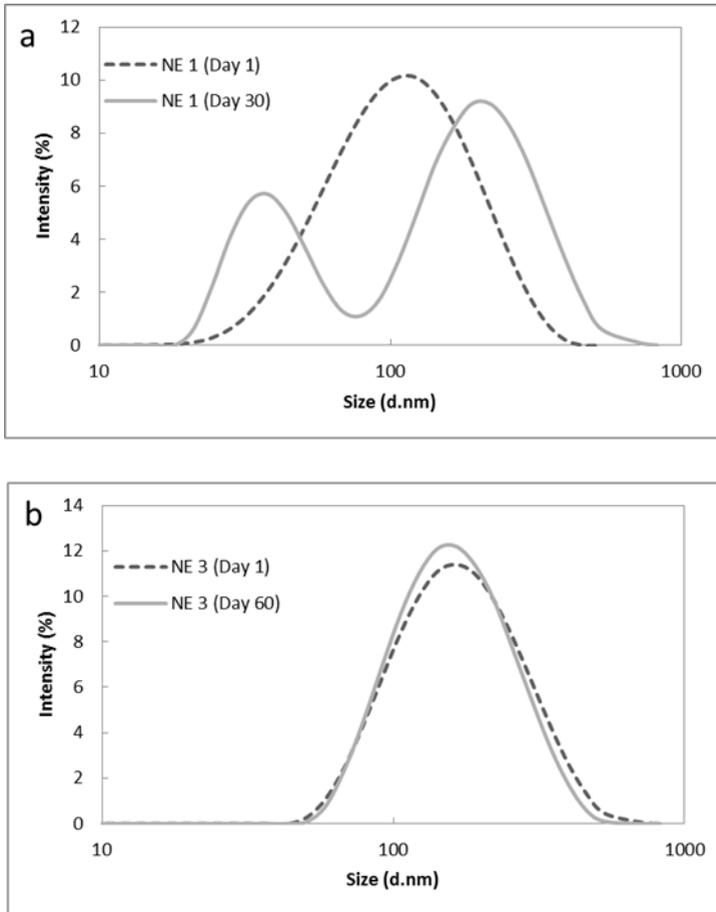
Average particle size was also evaluated during 30 and 60 days at refrigeration, as shown in Figure 7. SLN 1 composed of a single lipid presented lower stability, as could be observed in the results where PdI increased from 0.332 (at first day) to 0.420 after 60 days of storage. On the other hand, all formulations containing Crodamol showed a good colloidal stability over 30 days and with a slight increase of Dp and PdI after 60 days of storage, particularly for SLN 4 and 5 containing a higher concentration of EO. It is also worth mentioning that none of the samples presented any visual phase separation.

Nanoemulsion stability was also evaluated during 30 and 60 days of storage under refrigeration. Results presented in Figure 8 show that formulations with Crodamol (NE 2 and NE 3) were stable with the size and PdI around 130 nm and 0.200, respectively, remaining constant during the 60 days of storage. On the other hand, the nanoemulsion without Crodamol (NE 1) presented a high increase of PdI during storage, from 0.285 to 0.450 after 30 days and a visual phase separation after 60 days indicating a complete loss of colloidal stability.

This result shows that nanoemulsion of clove oil undergo diffusional degradation (Ostwald ripening), probably due the water soluble part of main component (eugenol) providing the access to Ostwald ripening in oil-in-water nanoemulsions, as previously reported (NAZARZADEH; ANTHONYPILLAI; SAJJADI, 2013). However, as seen in the Figure 9, the presence of a very hydrophobic compound as the triglyceride composed of capric/caprylic acids (NE 3) prevents the degradation increasing colloidal stability. In Ostwald ripening, the smaller droplets present a higher Laplace pressure resulting in an increased water-solubility of compounds that present water solubility at some extent, like eugenol. Laplace pressure decreases with increasing particle size. Therefore, a higher concentration of solubilized eugenol molecules can be observed in the aqueous phase surrounding small droplets than surrounding larger ones. Consequently, solubilized eugenol molecules tended to move from the smaller droplets to the larger droplets due the concentration gradient (McCLEMENTS, 2011), being followed by the growth of the larger droplets and the destabilization of the dispersion. This behavior can be avoided, with the addition of an ultrahydrophobe, like crodamol. The ultrahydrophobe remains in the droplets due to the very low water solubility and its concentration increases in the smaller particles due to the diffusion of more water soluble compounds. When the Laplace pressure becomes equivalent to the osmotic pressure created by the ultrahydrophobe

concentration gradient between the larger and smaller particles, the nanoemulsion becomes colloidal stable.

Figure 9. Particle size distribution for (a) NE 1 at first day and 30 day and (b) NE 3 at first and 60 day of storage.



3.3.6 Thermal and crystallinity study

Crystallinity of solid nanoparticles was evaluated with the infrared spectra through FT-IR analysis. In Figure 10, for all samples, it is possible to notice a peak in region $1700\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$ indicating the presence of C=O group of fatty acids molecules (BERKHEISER, 1982). In spectra *a* and *b* of pure stearic acid and SLN 1, that was composed only by stearic acid, a peak at 1464 cm^{-1} indicating C-O stretch of acid and another peak at 1410 cm^{-1} representing C-C bend from carboxylate, both peaks can be observed. For all the other samples with Crodamol (*c*, *d*, *e* and *f*) and clove oil (*d*, *e* and *f*) the intensity of these peaks was reduced probably due to the presence of Crodamol GTCC. In addition, the peaks between 1200 and 1350 cm^{-1} provided conformational information about CH₂ groups present in crystalline environment of lipid matrices (LIN et al., 2007). In Figure 11, it can be observed that pure stearic acid and SLN 1 present similar spectra in the range between $1200\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$, while SLN 2, 3, 4 and 5 exhibited a pronounced reduction of all peaks intensity. These results indicated a decrease of crystallinity when liquid lipid was added to the organic phase, indicating that a less ordered structure was formed. Furthermore, it is important to notice that clove oil addition did not changed the crystallinity structure of the particles. As shown in Figures 10 and 11, there is no difference between FT-IR spectra of SLN 2, without clove oil load and SLN 3, 4 and 5 (with increased clove oil concentration), suggesting that the concentration of Crodamol was high enough to change the crystallinity of the particles. A similar behavior was informed in the study of a lipid carrier loaded with eugenol for therapeutic use in the treatment of *Candida albicans* (GARG; SINGH, 2011). It was reported that the use caprylic triglyceride in SLN formulation decreased the imperfections in crystalline structure of stearic acid, with a consequent reduction in crystallinity.

Figure 10. FT-IR spectra of samples (a) pure stearic acid, (b) SLN 1, (c) SLN 2, (d) SLN 3, (e) SLN 4 and (f) SLN 5.

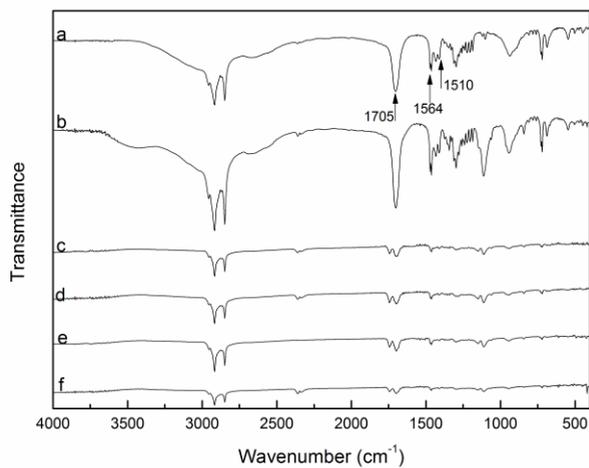
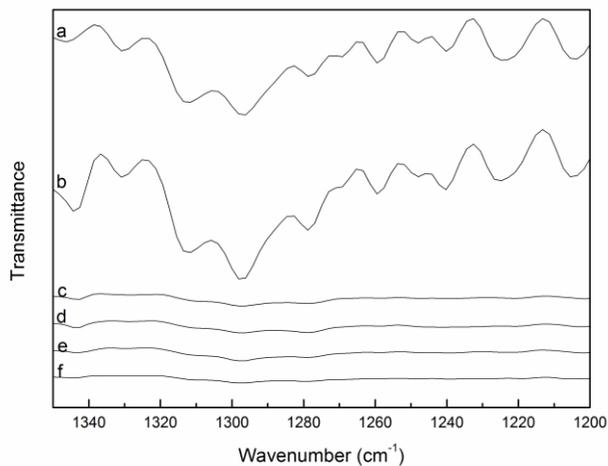


Figure 11. FT-IR spectra magnified in the range 1200-1350 cm^{-1} for (a) pure stearic acid, (b) SLN 1, (c) SLN 2, (d) SLN 3, (e) SLN 4 and (f) SLN 5.

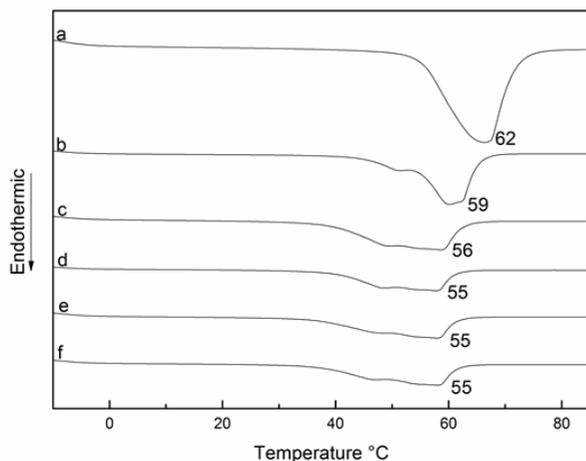


The corresponding peak melting temperatures (T_m) and enthalpies (ΔH_m) of pure stearic acid and different SLN samples are reported in Table 5 and the thermograms are presented in Figure 12. Comparing the thermograms of pure stearic acid and SLN 1, that contains stearic acid and clove oil (4 wt% related the organic phase), it is possible to observe a shoulder in the melting peak in SLN 1, indicating a pre melting of a less crystalline phase followed by a melting of high crystalline phase which displaces the melting point to from 62 to 59 °C. It is known that lipid dispersions typically melt at temperatures 3-5 °C lower than their respective bulk samples due the decrease of particle size as expected according to the Gibbs-Thomson equation (BUNJES; KOCH; WESTESEN, 2000) due to the application of high disruptive forces. When a liquid lipid and clove oil was added to the organic phase (SLN 2, 3, 4 and 5), a strong reduction in the melting enthalpies was observed for SLN 2, 3, 4 and 5, from 167 J.g⁻¹ to 106, 100, 94 and 98 J.g⁻¹, respectively, indicating an increased number of lattice defects which melt in a higher temperature range, requiring less energy for melting due the liquid lipid addition, followed by a non-homogeneous melting behavior due the application of high disruptive forces. Additionally, a subsequent variation on melting temperature from 59 to ~55 °C, comparing SLN 1, single lipid, and others SLN formulations with binary lipid, indicate that their melting peak was shifted to lower temperatures due to the formation of a less ordered lipid matrix. Similar results were observed in FT-IR analyses, confirming that presence of Crodamol in the formulation increased the number of lattice defects producing nanoparticles with lots of room available for loading bioactive compounds.

Table 5. Differential scanning calorimetric results of melting peaks temperature (T_m) and enthalpies (ΔH_m) of clove oil loaded in Solid Lipid Nanoparticles.

Samples	T_m (°C)	ΔH_m (J.g ⁻¹)
Stearic acid	62	167
SLN 1	59	168
SLN 2	56	106
SLN 3	55	100
SLN 4	55	94
SLN 5	55	98

Figure 12. Differential Scanning Calorimetry thermographs of (a) pure stearic acid, (b) SLN 1, (c) SLN 2, (d) SLN 3, (e) SLN 4 and (f) SLN 5.



3.3.7 Morphology

The morphology of nanoemulsions NE 2 obtained with clove oil Crodamol, analyzed by TEM images (Figure 13) show a spherical surface with a particle size around 100 nm. TEM images of the SLN 3 presented in Figure 14 indicate that morphology of SLN 3 particles were, in general, spherical with surface crystals producing an irregular surface. The TEM images corroborate the results obtained by DLS.

Figure 13. TEM images of Nanoemulsion NE 2 composed by crodamol and 7 mg.mL⁻¹ of CO.

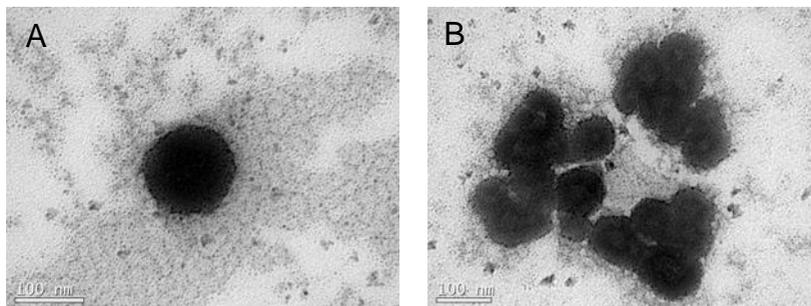
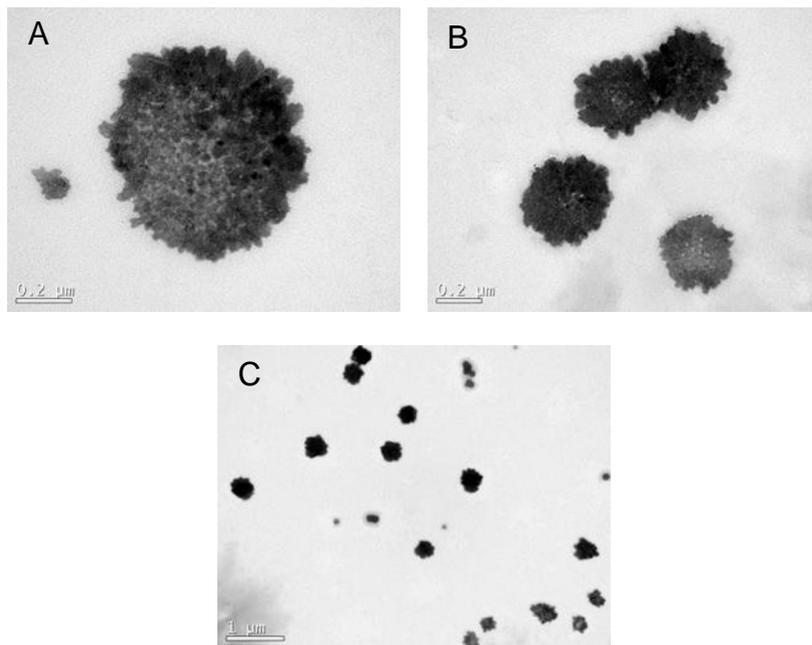


Figure 14. TEM images of SLN 3 composed by stearic acid, crodamol and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of CO.



3.3.8 Antimicrobial activity

The analyses of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for SLN dispersions and Nanoemulsion loaded with clove oil for Gram positive, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus mutants* and *Staphylococcus aureus*, and Gram negative bacteria, *Salmonella choleraesius*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, are given in Table 6. Results showed that SLN 4 and SLN 5 had a lower MIC than NE 2, respectively 264, 418 and 856 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for Gram positive and 288, 418 and 999 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for Gram negative bacteria. It means that increasing clove oil concentration in the dispersions there is an increase in MIC. This effect could be credited to the decrease of the total superficial area of nanoparticles as presented in Table 6. The surface area for SLN 4, SLN 5 and NE 2 were respectively 2.39×10^7 , 2.04×10^7 and 2.68×10^6 cm^2 , thus, SLN 4 had a larger contact area available to release the clove oil and to act on the surface of the bacterial cell

membrane. Therefore, a lower Clove oil concentration was sufficient to prevent bacterial growth promoting a lower MIC for both gram positive and gram negative bacteria. Based on the results it is possible to affirm that clove oil did not lose its antimicrobial effects after encapsulation procedure, plus the contact area of the particle has a direct effect on ability to prevent the bacteria growth. The lower MIC values for SLN comparing to nanoemulsions could also be attributed to the affinity of lipid matrix of SLN with the lipid membrane of bacteria facilitating the transport of eugenol with consequent disruption of the plasmatic membrane.

Table 6. Minimum Inhibitory Concentration for Solid Lipid Nanoparticles and Nanoemulsion loaded with clove oil in different concentration against Gram positive and Gram negative bacteria, Number of particles (N_p) and surface area (SA_t).

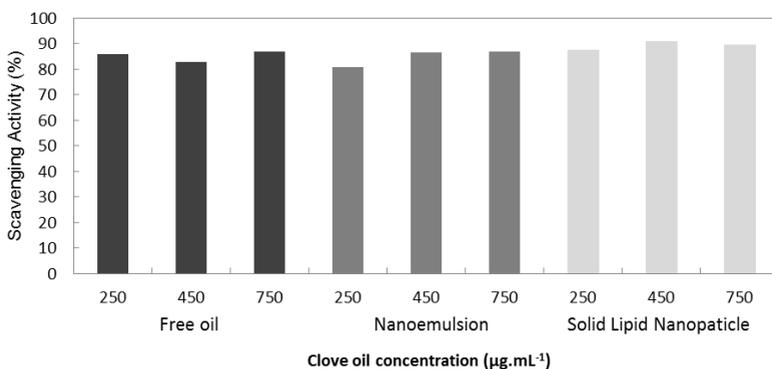
Samples	SLN 4	SLN 5	NE 2
Gram positive	MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
<i>Staphylococcus epidermis</i>	264	418	856
<i>Streptococcus mutans</i>	264	418	856
<i>Staphylococcus aureus</i>	264	418	856
Gram negative	MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
<i>Salmonella choleraesius</i>	288	418	999
<i>Escherichia coli</i>	288	418	999
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	288	418	999
Number of particles (N_p)	1.21×10^{16}	7.53×10^{15}	4.73×10^{15}
Surface Area (SA_t) (cm^2)	2.39×10^7	2.04×10^7	2.68×10^6

3.3.9 Antioxidant Activity

DPPH is a free-radical compound and has been widely used to test the free-radical scavenging ability of various compounds. Eugenol has a strong antioxidant activity as shown for some authors, with an EC_{50} around $21 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ indicating a high DPPH free radical scavenging (GÜLÇİN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN, 2012; SEBAALY *et al.*, 2015) in agreement with the results displayed in Figure 15, which shows the DPPH scavenging for free clove oil, SLN and Nanoemulsion loaded with the same clove oil concentration. For all concentrations studied 260

$\mu\text{g.mL}^{-1}$, $460 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $760 \mu\text{g.mL}^{-1}$ the scavenging activity were around 90%. This high antioxidant activity of clove oil, as previously described (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), is attributed to eugenol, its major compound, which is able to donate hydrogen from hydroxyl and aryl radical and, after a dimerization between two phenoxyl radicals, more two hydroxyl groups are generated with more two hydrogen to donation to DPPH radicals. These results suggest that the bioactivity of eugenol was maintained after encapsulation process. Similar behavior was found with liposomes loaded with clove essential oil (SEBAALY *et al.*, 2015). The authors evaluated the DPPH scavenging activity of free and encapsulated clove oil, as results, it was observed that the antioxidant activity was preserved after encapsulation remaining around 80% for all formulations investigated using saturated and unsaturated soybean phospholipids.

Figure 15. DPPH Scavenging of free clove oil, SLN 4 composed by stearic acid, crodamol and 450 mg.mL^{-1} of CO and NE 2 composed by crodamol and 7 mg.mL^{-1} of CO, diluted at same concentrations.



3.4 CONCLUSIONS

Encapsulation of clove oil in solid lipid nanoparticles and nanoemulsions presented a high encapsulation efficiency using a free-solvent method. In addition Solid Lipid Nanoparticles made with binary lipid (stearic acid and Crodamol) resulted in lower particle size, higher clove oil loading and retention, plus higher stability during 60 days of storage than Solid Lipid Nanoparticles made with a single lipid (stearic acid). Nanoemulsions formulations with the presence of Crodamol also presented high colloidal stability after 60 days. The liquid lipid,

Crodamol, acted as an ultrahydrophobe preventing Ostwald ripening of the nanoemulsions loaded with clove oil. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) analysis showed that Solid Lipid Nanoparticles and Nanoemulsions formulations have potential to prevent bacterial growth for Gram positive and negative bacteria at low concentrations. The very high superficial area of the Solid Lipid Nanoparticles could be responsible for the improved bacteria growth inhibition. The results of DPPH scavenging showed a high antioxidant activity for all samples which indicates that the antioxidant activity of eugenol was not affected by the encapsulation process. Therefore, clove oil loaded into SLN and NE can be a promising alternative to application in foods.

REFERENCES

- ALMEIDA, A. J.; SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 478–490, 2007.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BECKER PERES, L.; BECKER PERES, L.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 317–323, 2016
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BUNJES, H.; KOCH, M. H. J.; WESTESEN, K. Effect of particle size on colloidal solid triglycerides. **Langmuir**, v. 16, n. 12, p. 5234–5241, 2000.
- CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015.
- DONSI, F.; ANNUNZIATA, M.; VINCENSI, M.; FERRARI, G. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342–50, 2012.
- DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, n. 1, p. 1–24, 2011.

GARG, A.; SINGH, S. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 280–8, 2011.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 338–44, 2013.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 114, p. 392–7, 2014.

GÜLÇİN, İ.; ELMASTAŞ, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 489–499, 2012.

HOSSAIN, M. A.; AL-HASHMI, R. A.; WELI, A. M.; AL-RIYAMI, Q.; AL-SABAHIB, J. N. Constituents of the essential oil from different brands of *Syzigium caryophyllatum* L by gas chromatography–mass spectrometry. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1446–S1449, 2012.

HU, F.-Q.; JIANG, S.-P.; DU, Y.-Z.; YUAN, H.; YE, Y.-Q.; ZENG, S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 1, p. 83–89, 2006.

LIN, X.; LI, X.; ZHENG, L.; YU, L.; ZHANG, Q.; LIU, W. Preparation and characterization of monocaprates nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 311, n. 1–3, p. 106–111, 2007.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297, 2011.

NAZARZADEH, E.; ANTHONYPILLAI, T.; SAJJADI, S. On the growth mechanisms of nanoemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 397, p. 154–162, 2013.

SADAKA, F.; NGUIMJEU, C.; BRACHAIS, C.-H.; VROMAN, I.; TIGHZERT, L.; COUVERCELLE, J.-P. WITHDRAWN: Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, mar. 2014.

SEBAALY, C.; JRAIJ, A.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. **Food Chemistry**, v. 178, p. 52–62, 2015.

SEVERINO, P.; PINHO, S. C.; SOUTO, E. B.; SANTANA, M. H. A. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 125–130, 2011.

SOUTO, E. B.; WISSING, S. a.; BARBOSA, C. M.; MÜLLER, R. H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 71–77, 2004.

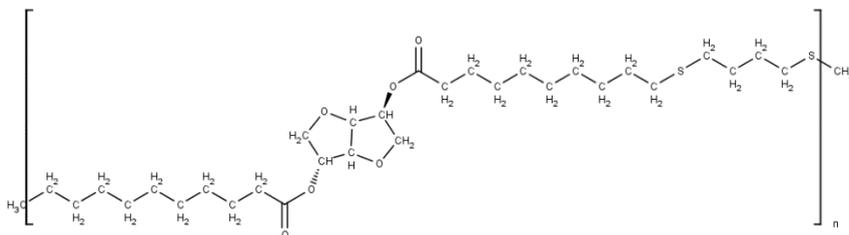
SUGUMAR, S.; GHOSH, V.; NIRMALA, M. J.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 1044–9, 2014.

CAPÍTULO IV

4 ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLY(THIOETHER-ESTER) NANOPARTICLES

Thiol-ene addition reactions are known for more than a century and have been studied throughout the years (TÜRÜNÇ; MEIER, 2010). The reaction is simply the thiol and ene groups combination, with or without photo or thermo-initiators, which proceeds via radical addition mechanism, followed by chain transfer to a thiol end group, thus reinitiating the cycle (HOYLE; BOWMAN, 2010). Thiol-ene polymerization presents some advantages as rapid polymerization rates, high overall functional group conversion, and little sensitivity to oxygen inhibition (CRAMER *et al.*, 2010). Thiol-ene polymers have been successfully synthesized comprising different kinds of multifunctional enes and thiols finding application in the biomedical field as polymeric nanoparticles and hydrogels for drug-delivery systems, biomimetic hydrogels, and dental restorative resins (MACHADO, SAYER, ARAÚJO, 2016).

Figure 16. Chemical structure of poly-co-dianhydro-D-glucytil-diundec-10-enoate-co-1,4-butanedithiol (Machado *et al.*, 2016).



The wide range of enes with activated and non-activated species and multiply-substituted olefinic bonds can be used as suitable substrates (LOWE, 2010). However some attention has been given for renewable feedstock, like plant oils (TÜRÜNÇ; MEIER, 2010), due the minimization of hazards, and the generation of substances with as little toxicity as possible, plus biodegradable nature of products (SALIMON; SALIH; YOUSIF, 2012). In this context, poly(thioether-ester) (PTEE) was synthesized by Machado *et al.* (2016) from a renewable monomer α,ω -diene diester, dianhydro-D-glucityl diundec-10-enoate (DGU) derived from castor oil and isosorbide esterification. Then, DGU was

copolymerized with 1,4-butanedithiol ($\text{Bu}(\text{SH})_2$) via thiol-ene polymerization in bulk and miniemulsion, resulting in poly-co-dianhydro-D-glucytil-diundec-10-enoate-co-1,4-butanedithiol (Figure 16).

Table 7. Formulation of PTEE Nanoparticles using miniemulsion (NP 1) with AIBN as initiator and emulsification/evaporation (NP 2).

Sample	PTEE (mg)	DGU (mg)	Bu (SH) ₂ (mg)	Crodamol (mg)	Surfactant (% w/v)
NP 1	-	1000	0.24	123	3 ^a
NP 2 ^b	100	-	-	-	0.3 ^c

^a quantities for 5.5mL of water

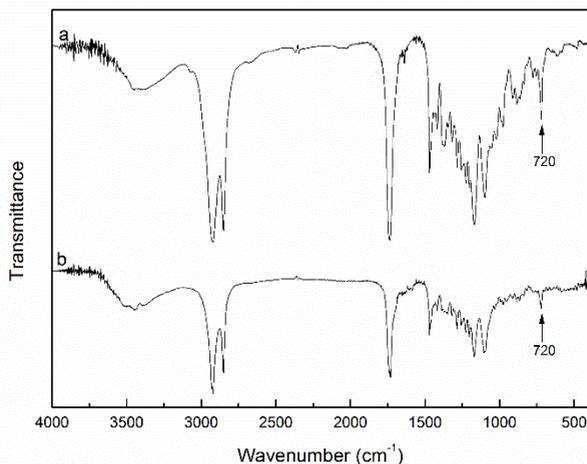
^b Dichloromethane was used as organic phase solvent in quantity of 4 mL.

^c quantities for 20 mL of water

Some conductive polymers, as polypyrrole (PPy), poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) and polyaniline have been reported to have radical scavenging properties and the application of these polymers during the storage of products susceptible to oxidation were studied (HSU *et al.*, 2008; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS *et al.*, 2004). However, the antioxidant activity of poly(thioether-ester)s has never been reported. To investigate this ability, in this work, PTEE nanoparticles were produced and individually assessed for their possible antioxidative capacities by employing DPPH free radical-scavenging and β -carotene/linoleic acid assays. Two techniques were employed to produce PTEE nanoparticles: Miniemulsion polymerization (1) and Emulsification/evaporation (2); the formulations employed in both techniques are given in Table 7. Miniemulsion polymerization was conducted by stirring organic phase, DGU, Crodamol and AIBN as initiator, with aqueous phase, Lutensol AT 80 and water, during 15 min, following the addition of dithiol ($\text{Bu}(\text{SH})_2$) and stirred over again for 5 min. The final emulsion was submitted to ultrasonication using a Fischer Scientific Sonic Dismembrator (Model 500) under ice bath during 2 min (10 s on, 5 s off) at 70% of amplitude. Finally, the ampoule was immersed in a thermal bath at 80 °C for 4 h producing NP 1. For emulsification/evaporation technique, PTEE was synthesized by bulk polymerization immersing an ampoule containing DGU, $\text{Bu}(\text{SH})_2$ and AIBN in a thermal bath at 80 °C for 4 h. The resulting polymer was solubilized in dichloromethane and after complete dissolution of PTEE, the organic phase was dripped into the aqueous phase, composed by water and poly(vinyl alcohol) (PVA) and stirred at room temperature for

15 min, following by application of ultrasonication under ice bath at amplitude of 70% during 2 min (15 s on, 10 s off) to reduce the droplets to submicrometric range. After obtaining the dispersion, the solvent was evaporated under magnetic stirring at room temperature and atmospheric pressure for 12 h producing NP 2.

Figure 17. FT-IR spectra of nanoparticles obtained by: (a) Miniemulsion polymerization (NP 1); and (b) Emulsification/evaporation (NP 2).

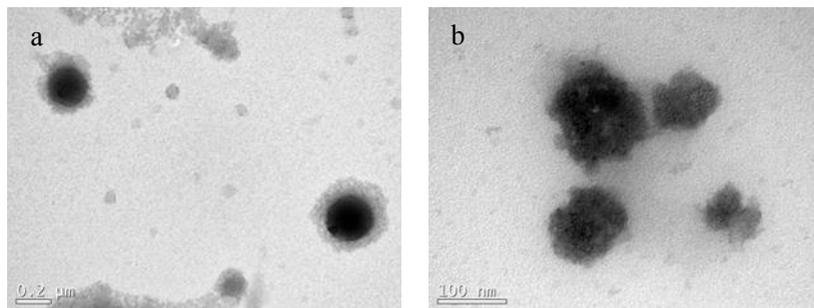


Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) spectra from the dried samples of NP 1 and NP 2 were evaluated. Figure 17 shows for both samples peaks at 910 cm^{-1} due the CH_2 out-of-plane wag from $\text{CH}=\text{CH}_2$ in vinyl compounds and peaks at 720 cm^{-1} due to the presence of sulfide bonds (S-C) resultant from the addition of the thiol radicals with the ene group. The similar results for FT-IR suggest that both polymerization methods, miniemulsion and bulk, were able to produce PTEE with similar characteristics.

Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis was carried out conducted to provide information about nanoparticles morphology and particle size range. TEM images show that particles obtained by miniemulsion polymerization (NP 1) presented spherical shape with particle diameters around 200-300 nm (Figure 18a), whereas particles produced by emulsification/evaporation (NP 2) also presented spherical shape, but with some imperfections on surface and particles diameters

around 80-150 nm (Figure 18b). The imperfections observed at particle surface in NP 2 could be attributed to coalescence of smaller particles during the evaporation step. The results of FTIR and TEM showed that the different techniques affected the particle size but not polymer properties.

Figure 18. TEM images of nanoparticles obtained by: (a) Miniemulsion polymerization (NP 1); and (b) Emulsification/evaporation (NP 2).



The antioxidant activity of PTEE nanoparticles was evaluated about its ability of scavenger hydroxyl radical through the use of 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH), a spectrophotometer assay (BLOIS, 1958; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995). When a hydrogen atom or electron was transferred to the odd electron in DPPH·, the absorbance decreased due the DPPHH non-radical formation, which is possible to be seen at 517 nm. Figure 19 shows the scavenging activity of PTEE nanoparticles, with PTEE concentrations varying from 5 to 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. It is possible to notice that increasing PTEE concentration led to an increase of the antioxidant activity for both samples (NP 1 and NP 2). The EC_{50} was also determined, denoting the amount of polymer required to reduce initial concentration of DPPH· radicals by 50%. As shown in Table 8, EC_{50} for NP 1 and NP 2 was respectively $177.9\pm 3.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $212.2\pm 2.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ after 30 min of exposure. Gizdavic-Nicolaidis and co-workers (2004) found similar results for polyaniline grafted with lignin at 20 wt% in an antioxidant test with methanolic DPPH· assay, as result a concentration of $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was enough to reduce the level of $72 \mu\text{M}$ of DPPH· radicals by close to 50%. These results indicated that PTEE has potential as scavenger of DPPH free radical, its activity is probably due the inevitable polymer oxidation during process, and the oxidation

product may involve the polymer chain by positively charged centers, with consequent donating of one or more protons from the polymer to form DPPHH (GIZDAVIC-NICOLAIDIS *et al.*, 2004).

Figure 19. DPPH scavenging activity after 30 min of exposure at different PTEE concentrations. Results for PTEE nanoparticles obtained by: Miniemulsion polymerization (NP 1); and Emulsification/evaporation (NP 2).

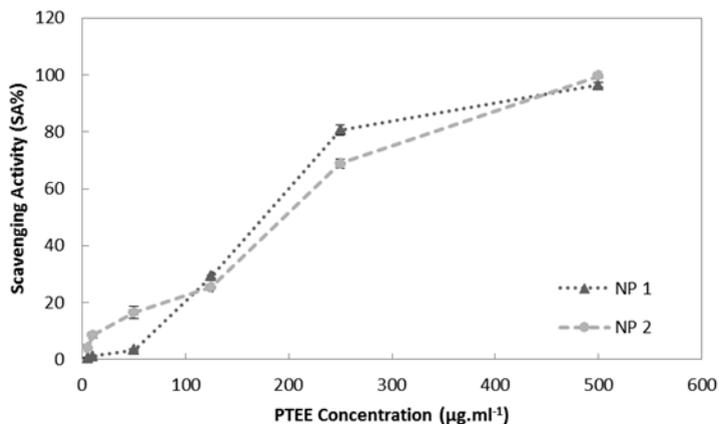


Table 8. Antioxidant Activity of Poly (thioether-ester) nanoparticles by DPPH free radical scavenging activity and β -carotene/linoleic acid assay.

Sample	DPPH EC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	β -carotene-linoleic Acid Antioxidant Activity (%)
NP 1	177.9 \pm 3.2	53.4 \pm 0.6
NP 2	212.3 \pm 2.3	57.4 \pm 2.2

Inhibiting peroxidation effects of nanoparticles was also determined on a linoleic acid system determined by β -carotene bleaching test (MATTHÄUS, 2002; KANG *et al.*, 2006). The free radical is formed by linoleic acid and a hydrogen atom removed from methyl group of the β -carotene molecule following by a discoloration of β -carotene, which is determined for the difference between the initial and final (after 120 min) spectrophotometric measurement at 470 nm. The effect of the presence of PTEE nanoparticles into β -carotene/linoleic acid assay was evaluated and the results are displayed in Table 8. The antioxidant activity in percentage for NP 1 and NP 2 was found to be 53.41 \pm 0.62 and 57.45 \pm 2.25, respectively, these results show that de polymer at the concentration of 1.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ was able to

prevent the β -carotene discoloration in almost 60%. This result showed that the polymer had the capability of inhibiting the free-radical induced; preventing the hydrogen atom exchanges in which lipid molecules cannot be converted into lipid hydroperoxide and, consequently, interrupts the lipid peroxidation. However the present antioxidant activity can be due the electron transfers, where a compound can deactivate a free radical, in which the radical cation is first formed followed by rapid and reversible deprotonation in solution (WRIGHT; JOHNSON; DILABIO, 2001).

These results show that the poly(thioether-ester) nanoparticles obtained by miniemulsion polymerization or emulsification/evaporation presented antioxidant activity. This property of PTEE polymers indicate their potential as a functional barrier material in packing industry to avoid food or lipid degradation by oxidation besides acting as a physical barrier in the composition of the polymer film.

REFERENCES

- BLOIS, M. S. Antioxidant Determination by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199–1200, 1958.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CRAMER, N. B.; COUCH, C. L.; SCHRECK, K. M.; BOULDEN, J. E.; WYDRA, R.; STANSBURY, J. W.; BOWMAN, C. N. Properties of methacrylate-thiol-ene formulations as dental restorative materials. **Dental Materials**, v. 26, n. 8, p. 799–806, 2010.
- GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; TRAVAS-SEJDIC, J.; BOWMAKER, G. a.; COONEY, R. P.; THOMPSON, C.; KILMARTIN, P. a. The antioxidant activity of conducting polymers in biomedical applications. **Current Applied Physics**, v. 4, n. 2-4, p. 347–350, 2004.
- HOYLE, C. E.; BOWMAN, C. N. Thiol-Ene Click Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 9, p. 1540–1573, 2010.
- HSU, C. F.; ZHANG, L.; PENG, H.; TRAVAS-SEJDIC, J.; KILMARTIN, P. A. Free radical scavenging properties of polypyrrole and poly(3,4-ethylenedioxythiophene). **Current Applied Physics**, v. 8, p. 316–319, 2008.

KANG, H.J.; CHAWLA, S. P.; JO, C.; KWON, J. H.; BYUN, M.W. Studies on the development of functional powder from citrus peel. **Bioresource Technology**, v. 97, 614-620, 2006.

LOWE, A. B. Thiol-ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. **Polymer Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 17–36, 2010.

MACHADO, T.O., SAYER, C., ARAUJO, P.H.H., Thiol-ene polymerization: a promising technique to obtain novel biomaterials. **European Polymer Journal**, accepted for publication 2016.

MACHADO, T.O., CARDOSO, P.B., MEIER, M.A.R., SAYER, C., ARAUJO, P.H.H., Thiol-ene polymerization of a renewable monomer in miniemulsion. Submitted, 2016.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, 3444-3452, 2002.

SALIMON, J.; SALIH, N.; YOUSIF, E. Industrial development and applications of plant oils and their biobased oleochemicals. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 135–145, 2012.

TÜRÜNÇ, O.; MEIER, M. A. R. Fatty Acid Derived Monomers and Related Polymers Via Thiol-ene (Click) Additions. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 31, n. 20, p. 1822–1826, 2010

WRIGHT, J. S.; JOHNSON, E. R.; DILABIO, G. a. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 6, p. 1173–1183, 2001

CAPÍTULO V

5 POLY(THIOETHER-ESTER) NANOPARTICLES ENTRAPPED WITH CLOVE OIL FOR ANTIOXIDANT ACTIVITY IMPROVEMENT

ABSTRACT

Poly(thioether-ester) was synthesized from dianhydro-d-glucityl diundec-10-enoate (DGU), a fully renewable diene monomer, and a dithiol, and employed to nanoencapsulate clove oil, a great source of eugenol, aiming to improve its antioxidant activity. Nanoparticles were formed by the miniemulsion polymerization method with clove oil concentration varying from 0 to 25% (w/w of DGU) by using ultrasound. Spherical and stable nanoparticles were obtained with particle size between 192 and 284 nm and high encapsulation efficiency around 98%, part of the clove oil were bounded to polymer chain forming particles with bound/loaded clove oil, with polymer conversions reduced with the increase of clove oil in the formulation. DSC and GPC analysis suggest the incorporation of clove oil in the polymer chain, and a gradual reduction in the melting point from 66 °C with 0% of clove oil to 50 °C was observed when 25% of clove oil was added, consequently a reduction of molar mass was also observed, results probably due to the chain transfer between double bonds of eugenol and thiyl groups. FT-IR results showed the incorporation of clove oil into nanoparticles. The Poly(thioether-ester) nanoparticles loaded with 6% of clove oil exhibited an improvement in antioxidant activity around 26% for β -carotene/ linoleic acid assay and a reduction of 66% on EC₅₀ for DPPH assay.

Keywords: Poly (Thioether-ester) Nanoparticles; Clove oil; Antioxidant Activity.

5.1 INTRODUCTION

Miniemulsion polymerization is a technique in which monomer is dispersed in a continuous phase under high shear, forming a colloidally stable dispersion. The monomer nanodroplets act as the main polymerization locus resulting in polymer nanoparticles dispersed in the continuous phase (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002). As a very versatile technique, miniemulsion allows the formation of polymer nanoparticles by several polymerization mechanisms, including, very recently, thiol-ene polymerization (JASINSKI *et al.*, 2014; AMATO *et al.*, 2014, MACHADO *et al.*, 2016), which is a free radical polymerization between diene and dithiol monomers with the stages of initiation, propagation and termination, plus a chain transfer step (HOYLE; BOWMAN, 2010; LOWE, 2010). The use of plant oils as diene monomers has been some attention in recent years due to a more sustainable process perspective, in addition to the minimization of hazards, with products presenting as little toxicity as possible (SALIMON; SALIH; YOUSIF, 2012; TÜRÜNÇ; MEIER, 2010).

However, thiol-ene polymerization in miniemulsion is still a new and challenging field, as well as the antioxidant activity of nanoparticles formed by thiol-ene polymers (MENESES *et al.*, 2016) needing more investigation to allow a deeper comprehension of the mechanism and the potential use of these polymer nanoparticles. Some conductive polymers had shown radical scavenging activity (GIZDAVIC-NIKOLAIDIS *et al.*, 2004; HSU *et al.*, 2008), since they have the ability to reduce oxidizing agents and scavenge free radicals, acting as antioxidants (GIZDAVIC-NIKOLAIDIS *et al.*, 2004), a property which is widely regarded as beneficial for biomaterials and packaging of substances that could undergo oxidation, as unsaturated lipids.

In this context, the aim of this work is to produce poly(thioether-ester) (PTEE) nanoparticles via miniemulsion polymerization, using dianhydro-D-glucityl diundec-10-enoate (DGU), a fully renewable diene monomer, and a dithiol monomer with different concentrations of clove oil, a widely known source of eugenol, a powerful natural antioxidant, to improve the radical scavenger property and lipoperoxidation inhibition of PTEE nanoparticles. PTEE nanoparticles were characterized regarding particle size and distribution, conversion rate, encapsulation efficiency, thermal and physical characterization by DSC and FT-IR analyses, molar mass study with GPC analyses, particle morphology by TEM analyses, and evaluation of efficiency as

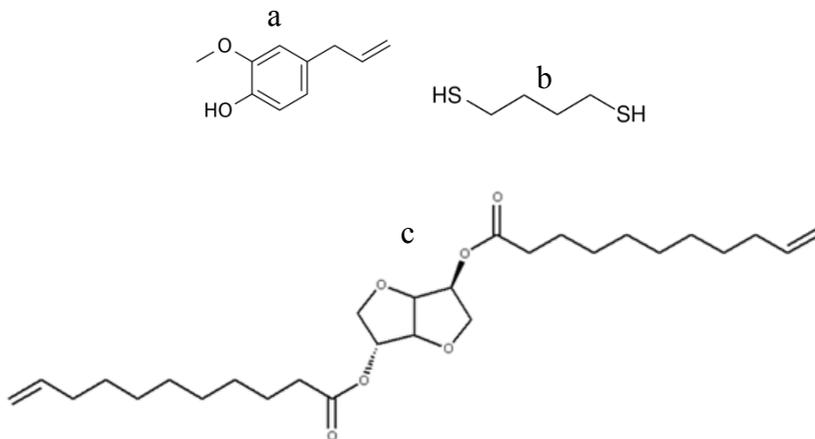
antioxidant potential using scavenger DPPH radicals and β -carotene/acid linoleic assays.

5.2 MATERIALS AND METHODS

5.2.1 Materials

Dianhydro-D-glucityl diundec-10-enoate (DGU) was used as the diene monomer, 1,4, butanedithiol ($\text{Bu}(\text{SH})_2$ as the dithiol monomer, Sigma Aldrich), azobisisobutyronitrile as the initiator (AIBN, Vetec, 98%), Crodamol GTCC (Crodamol, Alpha Química), Lutensol AT 80 (Lutensol AT80, BASF). Clove oil contained ~92% of eugenol (CO, Ferquima) and distilled water was used. The synthesis of the diene monomer DGU followed the procedure presented by Machado *et al.* (2016). The structures of eugenol, DGU and the dithiol are shown in Figure 20.

Figure 20, Chemical structures of eugenol (a), 1,4, butanedithiol (b) and dianhydro-D-glucityl diundec-10-enoate (c).



5.2.2 Preparation of nanoparticles via miniemulsion polymerization

Organic phase was prepared with the diene monomer DGU, initiator AIBN, with or without Crodamol. Clove oil concentration was varied from 0, 6, 12, and 25% (w/w DGU) for ME 01, 02, 03 and 04, respectively, as reported in Table 9. Aqueous phase was prepared with distilled water and Lutensol AT 80. First, both phases were stirred separately until complete initiator and surfactant dissolution. The

aqueous phase was then added to the organic phase and after 15 min of stirring under 300 rpm. Bu(SH)₂ was added to the mixture and stirred for 5 min. The final emulsion was submitted to sonication using a Fischer Scientific Sonic Dismembrator (Model 500) with 1/2" tip under ice bath during 2 min (10 s on, 5 s off) at 70% of amplitude. In sequence, the miniemulsion was heated upto 80 °C using a thermal bath and kept at this temperature for 4 h. Conversion was determined gravimetrically and calculated from the ratio between the polymer weight and the mass of monomer added to the reaction medium.

Table 9. Formulation of PTEE nanoparticles loaded with clove oil following Miniemulsion Method (1:1 of molar fraction between Bu(SH)₂ and DGU).

Reactants	Sample			
	ME 01	ME 02	ME 03	ME 04
DGU (mg)	1000	1000	1000	1000
Bu(SH) ₂ (μL)	240	240	240	240
AIBN (mg)	34	34	34	34
Clove oil (mg)	-	61.5	123	246
Crodamol (mg)	123	61.5	-	-
Lutensol AT80 (% w/v) ^a	3	3	3	3

^a quantities for 5.5 mL of water

5.2.3 Size and polydispersity index measurements

Intensity average particle size (Dp) and polydispersity index (PDI) of nanoparticles were determined by Dynamic Light Scattering (DLS) using Zeta Sizer Nano S equipment from Malvern Instruments. Analyses were performed after dispersion in water to 0.5% of total solids and measured at 25 °C in a glass cuvette.

5.2.4 Encapsulation efficiency

A calibration curve was previously prepared (Equation 1), in which standard solutions with ethanol 90% containing known concentrations of CO were analyzed at 280 nm using a UVvis spectrophotometer Hitachi (U-1900).

$$Abs = (0.0165 \times C_{CO}) + 0.0621 \quad (1)$$

where, *Abs* is the Absorbance and *C_{CO}* is the CO concentration (μg). The calibration curve follow the correlation coefficient R²=0.99.

The encapsulation efficiency (EE) was calculated as the relation between to the amount of oil entrapped and the initial amount added to the emulsion. Therefore, quantification of free oil in the aqueous solution was performed by ultrafiltration of 500 μL of nanoparticle solution in a Eppendorf with a filter coupled Amicon Ultra 0.5 (Millipore®, 100 KDa) during 30 min at 13,400 rpm. An aliquot of permeate was diluted in ethanol, transferred to a cuvette and analyzed at 280 nm in a spectrophotometer. The EE_{loaded} of clove oil loaded into nanoparticles was calculated following Equation 2.

$$EE_{loaded} = \frac{(C_{initial} - C_{free})}{C_{initial}} \times 100 \quad (2)$$

where, $C_{initial}$ is the initial amount (μg) of clove oil added to the miniemulsion; and C_{free} is the amount (μg) of free clove oil present in the filtered aliquot and determined by UVvis.

A free radical can react with eugenol by the phenol group, which gives its property as radical scavenger, or by the doublebond from the allylic group, in both cases resulting in reduced polymerization rate (Fujisawa & Kadoma, 1997). However, when the growing polymeric radical reacts with the double bond from the eugenol, the eugenol molecule can be attached to the polymer chain. Therefore, miniemulsion polymerizations were also evaluated regarding the fraction of eugenol that formed a covalent bond with the polymer chain. Therefore, nanoparticles were swollen with ethanol. In this assay, 100 μL of nanoparticles diluted in ethanol (1:20) were submitted to a bath sonicator (UNIQUE Ultracleaner 750) for 30 min to allow complete liberation of not coupled clove oil. The samples were then centrifuged until complete sedimentation and an aliquot of the supernatant was diluted in ethanol, finally, a new quantification was performed by UVvis. The fraction of clove oil coupled to the polymer (EE_{bound}) was calculated using Equation 3.

$$EE_{linked} = \left(\frac{EE_{loaded} - CO_{not\ linked}}{EE_{loaded}} \right) \times 100 \quad (3)$$

where, $CO_{not\ bound}$ is the concentration of CO solubilized in ethanol and not bound in polymer chain.

5.2.5 Stability study

Nanoparticle suspensions were stored under refrigeration at dark room for 30 days. The average particle size, polydispersity index and encapsulation efficiency were determined in the end of storage period.

5.2.6 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Dried nanoparticle samples were analyzed by DSC 4000 Perkin Elmer under inert atmosphere (N_2 , $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), from -60 to $150 \text{ }^\circ\text{C}$ at a heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. The thermal history was removed under heating rate of $20 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ and cooling rate of $-20 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. The melting temperatures (T_m) and enthalpy (ΔH_m) were obtained from the second heating run.

5.2.7 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

Samples ME 01, 02, 03 and 04 were dried in an oven with forced convection for 48 h at $60 \text{ }^\circ\text{C}$. FT-IR spectra of dried samples and pure CO were obtained using a Shimadzu infrared spectrophotometer (IRPrestige-21) using the KBr pellet method, in which the samples were grinded and compressed with anhydrous KBr to form pellets. The spectra of samples were taken in wavenumber region between 400 and 4000 cm^{-1} .

5.2.8 Gel Permeation Chromatography (GPC)

The molecular weight distribution measurements of the PTEE were carried out by gel permeation chromatography using a high performance liquid chromatography equipment (HPLC, model LC 20-A) and Shim Pack GPC800 Series Columns (GPC 801, GPC 804 and GPC 807) both from Shimadzu. After complete dissolution of 0.02 g of each dried sample in 4 mL of tetrahydrofuran (THF), the solutions were filtered through a nylon syringe filter with $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ of pore size and 33 mm of diameter. THF was used as eluent with volumetric flow rate of $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ at $40 \text{ }^\circ\text{C}$. The GPC system was calibrated using polystyrene standards with molecular weight ranging from 580 to $9.225 \times 10^6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

5.2.9 Transmission Electron Microscopy (TEM)

Particle morphology characterization was performed by Transmission Electron Microscopy using a JEM-1011 TEM (100 kV). Nanoparticles samples were diluted in distilled water up to 0.1% of solids; in sequence one drop of each diluted sample was placed on a carbon-coated grid and dried under room conditions overnight.

5.2.10 Antioxidant activity

DPPH Assay: Antioxidant activity of PTEE nanoparticles loaded with CO were evaluated on its ability of transferring electrons or hydrogen atom to 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH \cdot), forming a non-radical form 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazine (DPPHH) (BLOIS, 1958; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; MENSOR *et al.*, 2001). Determination of EC₅₀ was carried out by varying the concentration of CO and polymer from 5 to 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Briefly, 1.5 mL of sample in different concentrations was mixed with 0.5 mL of ethanol solution of DPPH (0.125 mM) and placed in dark room, at 25 °C for 30 min. Thereafter, the samples were transferred to a glass cuvette and the absorbance was measured at 517 nm using a spectrophotometer against the blank samples, in which the respective nanoparticles samples were mixed with water with adequate dilution. The ability to scavenge the DPPH \cdot radical was calculated using Equation 4.

$$DPPH\ SA\% = 100 - \left[\frac{A_s - A_b}{A_c} \times 100 \right] \quad (4)$$

where, A_c is the absorbance of blank control of DPPH \cdot solution at 0.125 mM, A_s is the absorbance of sample after reacting with DPPH \cdot and A_b is the absorbance of blank. EC₅₀ was then determined, which denotes the amount (μg) of sample required to reduce the initial concentration of DPPH radicals by 50%.

β -carotene/ linoleic acid assay: Inhibiting ability of peroxidation effects of nanoparticles loaded with CO was determined using a linoleic acid system determined by β -carotene bleaching test (MATTHÄUS, 2002; KANG *et al.*, 2006). The free-radical for linoleic acid is induced when the system is submitted to heat and a hydrogen atom removed from methyl group of the β -carotene molecule, following by the discoloration of β -carotene. The difference between the initial and final

(after 120 min) spectrophotometric measurement at 470 nm quantifies the amount of β -carotene discolored. Firstly, an emulsion with 3.4 mg of β -carotene and 44 μL of linoleic acid was prepared using 364 μL of Tween 20 and 1 mL of chloroform for better solubilization. Then, solution was shaken and the chloroform was evaporated in a rotaevaporator at 40 °C. After that, 100 mL of water was added and homogenized the system. A blank emulsion was also done containing just 44 μL of linoleic acid, 364 μL of Tween 20 and 100 mL of distilled water. The samples were prepared in a concentration of 1.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Analyses were performed adding 200 μL of sample and 5 mL of β -carotene emulsion in test tubes, and 200 μL of sample with blank emulsion, the tubes was then placed in a thermal bath at 50 °C and absorbance measured at 470 nm in 0, 15, 30, 60 and 120 min. The control samples were prepared with 200 μL of ethanol and 5 mL of β -carotene emulsion; and 200 μL of ethanol with 5 mL of blank emulsion. The antioxidant activity of samples was determined using the Equation 5.

$$AA\% = \left[1 - \frac{As_{t120} - As_{t0}}{Ac_{t120} - Ac_{t0}} \right] \times 100 \quad (5)$$

where, Ac_{t120} and Ac_{t0} are the absorbance of control after 120 and 0 min, respectively; and As_{t120} and As_{t0} are the absorbance of sample after 120 and 0 min, respectively.

5.3 RESULTS AND DISCUSSION

5.3.1 Droplet size, dispersion measurements and conversion rate

Average droplet size and polydispersity index were evaluated at first day of production for all formulations, as shown in Table 10. It is possible to see that average droplet size remained between 190 and 284 nm for all samples. Moreover, an increase in clove oil concentration increase the polydispersity of droplets in aqueous media just in the higher concentration (ME 04, 25%) and also showed an increase in Dp about 284 nm, while ME 01, 02 and 03 remained near 200 nm. This result is attributed to the higher oil (clove oil and crodamol) concentration in organic phase of the last sample (ME 04), around 23 wt.%, while the other formulations (ME 01, 02 and 03) around 21 wt.%, resulting in a consequent increase in viscosity of dispersed phase, which

can hinder droplet breakage during sonication, forming larger nanoparticles.

Table 10. Characterization of PTEE nanoparticles loaded or not with clove oil at first day of production and 30 days of storage at 4 °C: Particle Size ($D_p \pm S.D.$), Polydispersity index ($PdI \pm S.D.$) and Encapsulation efficiency ($E.E. \pm S.D.$).

Day 1			
Sample	$D_p \pm S.D.$ (nm)	$PdI \pm S.D.$	$E.E. \pm S.D.$ (%)
ME 01	207 ± 1	0.15 ± 0.03	-
ME 02	201 ± 2	0.18 ± 0.01	>98
ME 03	192 ± 1	0.19 ± 0.02	>98
ME 04	284 ± 3	0.27 ± 0.02	>98
Day 30			
Sample	$D_p \pm S.D.$ (nm)	$PdI \pm S.D.$	$E.E. \pm S.D.$ (%)
ME 01	239 ± 1	0.19 ± 0.01	-
ME 02	222 ± 3	0.20 ± 0.02	96.0 ± 1.1
ME 03	205 ± 1	0.20 ± 0.01	96.6 ± 0.9
ME 04	306 ± 1	0.27 ± 0.01	96.4 ± 1.0

Table 11 shows the gravimetric conversion results for all formulations. It is possible to verify that the use of CO resulted in a strong reduction in conversion rate from ~90 to ~67% with the increase of CO from 6 to 25%, respectively, while the conversion for the sample ME 01 with 0% of CO was about 97%. These reductions can be attributed to the reactions of growing chain with double bonds of eugenol, since the increase of eugenol in the reaction medium, also a distribution of thiy groups reacting with both double bonds (DGU and eugenol) for polymer formation, consequently reducing the conversion of DGU.

Table 11. Conversion, melting temperature (T_m), enthalpy (ΔH_m) and molar mass (M_w , M_n) of dried samples of the PTEE nanoparticles containing 0% (ME 01), 6% (ME 02), 12% (ME 03) and 25% (ME 04) of CO.

Sample	Conversion (%)	T_m (°C)	Δ_m (J/g)	M_n (kDa)	M_w (kDa)
ME 01	97 ± 1	66	53.4	3.26	7.48
ME 02	90 ± 10	62	38.1	2.44	4.53
ME 03	93 ± 7	60	38.6	2.19	3.99
ME 04	67 ± 1	50	28.5	1.61	2.59

This high reduction on conversion with the increase of CO concentration can also be attributed to the presence of OH group in

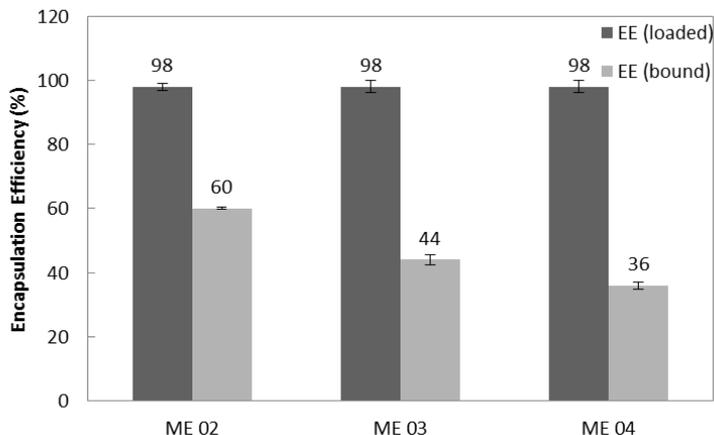
eugenol, which is able to develop retarding effects in polymerizations rate (DONOVAN *et al.*, 2014). Similar behavior was found by Donovan and co-workers (2014) that developed adhesives from CO derivatives via thiol-ene photopolymerization. As a result, with an increase in eugenol and 4-allylpyrocatechol concentrations, both with hydroxyl groups, there was a decrease in polymer conversion, while for methyl eugenol also tested, with no OH group, no change in conversion rates were found. At the same time that the high concentration of clove oil became the most significant retard, present results for low CO concentrations are still effective.

5.3.2 Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency of CO in PTEE nanoparticles with different ratios was evaluated in terms of EE (loaded) and, when the particles were solubilized in ethanol, in terms of EE (bound) to chain polymer; the results are displayed in Figure 21 and Table 10. High EE (loaded) can be observed ~98% for all CO ratios tested, possibly due to the fact that eugenol, found in high concentration in CO, has reactive double bonds that make it able to participate in the polymerization reaction and linking covalently with the polymer chain. The other portion of eugenol that does not react probably is incorporated into the particle wall material. The results for EE (bound) better shows this behavior, after solubilization of particles in ethanol, it is possible to see that the CO bound with the polymer chain decreases with the increase of CO in formulation from 60 to 36% for 6 to 25% of CO. This is probably due to the a limited amount of thiyl radicals available to act on the double bonds of both the DGU and eugenol. The thiyl group acts on double bonds and binds to DGU and eugenol forming the polymer chain, i.e., with the oil concentration increase, only a limited amount of eugenol present in the nanoapartiles is able to bind to the polymeric chain - related to the amount of dithiol added in the formulation - the remaining oil is encapsulated non-covalently in polymeric matrix, forming a nanoparticle bound/ loaded with clove oil.

Thus, based on displayed results, it is possible to observe that ME 02 has about 60% of eugenol bound on polymer chain and about 40% of not bound oil, but retained into polymeric matrix, and ME 04 has about 36% of eugenol bound and 64% not bound.

Figure 21. Encapsulation efficiency for PTEE nanoparticles formulations in relation of clove oil loaded and bound to polymer chain in different ratios 6 (ME 02), 12 (ME 03) and 25% (ME 04).



5.3.3 Stability study

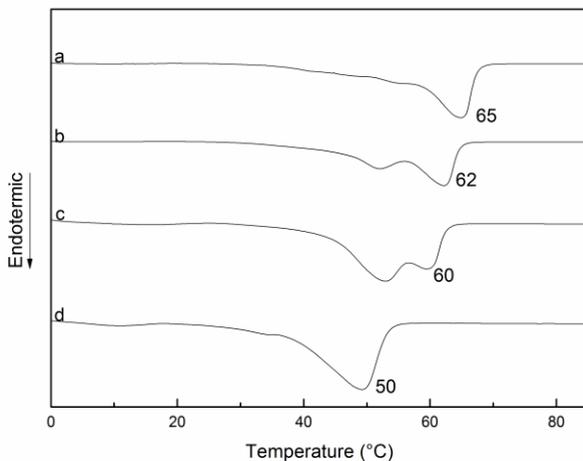
The influence of storage at 4 °C was evaluated after 30 days by analyzing the average droplet size, polydispersity index and the EE (loaded) for all formulations. The stability results after 30 day of storage (Table 10) showed a slight increase on Dp for all formulations, which started in 207 ± 1 , 201 ± 2 , 192 ± 1 and 284 ± 3 nm respectively for ME 01, 02, 03 and 04, and ended in 239 ± 1 , 222 ± 3 , 205 ± 1 and 306 ± 1 nm. For encapsulation efficiency was notice a slight reduction for all samples after the period of storage. However, these values were not enough to destabilize the formulations and no undesirable changes for samples containing CO were observed, indicating that it did not affect nanoparticle stability during the storage period tested.

5.3.4 Thermal analysis

The thermal analyses for dried samples were carried out by DSC and results are displayed in Figure 22. The heating curves a, b and c showed a shoulder on the left of the melting peak, which is a normal behavior for semi-crystalline polymer, in which a partial melting and

recrystallization of imperfect lattice occurs, while the second peak with a higher melting temperature corresponds to the best organized crystal lattice (YU *et al.*, 1983; YASUNIWA *et al.*, 2004). As consequence of increase in CO concentration from 0% (a) to 25% (d), a reduction of the melting temperature (T_m) around 65, 62, 60 and 50 °C was observed, following a decrease in enthalpy (ΔH_m) of 53.4, 38.1, 38.6 and 28.5 J.g⁻¹, respectively for a (0%), b (6%), c (12%) and d (25%), as exposed in Table 11. In addition, an increase of CO concentration led to an increase the left shoulder, until the melting point was completely shifted to the left, forming a single peak in the high CO concentration (d), with high decrease in T_m and ΔH_m . This sharp decline is due to the a low conversion of reaction ME 04 around 67 % (Table 11), suggesting that CO act as plasticizer.

Figure 22. Differential Scanning Calorimetry for PTEE NPs formulations (a) ME 0%, (b) ME 02, (c) ME 03 and (d) ME 04 with 0, 6, 12 and 25% of CO, respectively.



5.3.5 Molecular weight characterization

The molar mass results (Table 11) corroborated thermal analyses. As expected, the molar mass was of 7.48, 4.53, 3.99 and 2.59 kDa with the increase in CO concentration in formulations ME 01, 02, 03 and 04, respectively. This is possibly due to the increase of hydroxyl groups in the medium that acting as retarders of polymerization and also due to

the chain transfer between double bonds of eugenol and thiol groups, i.e. a higher amount of eugenol in the medium increases the formation of low reactivity terminals with more propensity for termination, consequently, a polymer with lower molar mass is obtained. Similar behavior was already reported for miniemulsion polymerizations between methyl methacrylate (MMA) and butyl acrylate (BA) as comonomers, linoleic acids and sunflower seed oil (GUO; SCHORK, 2008); MMA and vinyl acetate (VAc) with Miglyol 182 and castor oil; (STEINMACHER *et al.*, 2010); acrylic and methacrylic acid (AA and MAA) with jojoba and andiroba oil (CARDOSO; ARAÚJO; SAYER, 2013).

These results are in agreement with previously show data for conversion and thermal. The CO at concentration of 25% (ME 04) also led to the biggest reduction also in Mw. However, the low concentrations of CO still showed good results and do not change completely the polymer properties.

5.3.6 Chemical characterization

Pure clove oil, ME 01, ME 02, ME 03 and ME 04 samples were analyzed in an infrared spectrophotometer with Fourier transform. The spectra are presented in Figure 23. The typical eugenol peaks can be noticed, a large band related to O-H stretch in 3350 cm^{-1} , peaks at 2950 and 2980 cm^{-1} related to axial deformation of the groups CH_2 and CH_3 , in 1640 cm^{-1} weak axial deformation of alkene group $\text{C}=\text{C}$, 1600 and 1500 cm^{-1} axial deformation $\text{C}=\text{C}$ of aromatic ring, in 1033 cm^{-1} a peak related to C-H aromatic and in 750 cm^{-1} angular deformation out-of-plane related to C-H of aromatic ring (MARGELOS *et al.*, 1998; GARG *et al.*, 2010).

In the curve b, that represents ME 01 (0% CO), peaks at 3076 cm^{-1} indicating are observed $=\text{C}-\text{H}$ stretching of unsaturated hydrocarbons and in 910 cm^{-1} CH_2 out-of-plane related to $\text{CH}=\text{CH}_2$ of the vinyl compounds, and further, it can be seen the presence of sulfide bonds S-C in 720 cm^{-1} (MACHADO *et al.*, 2016).

A similar behavior to spectrum b was found in spectra c, d and e, with high CO added, all characteristic peaks for the polymer can be seen and a new peak at 1540 cm^{-1} was detected, due to the presence of $\text{C}=\text{C}$ of the eugenol aromatic ring, indicating that the oil was incorporated into particles.

Figure 23. FT-IR spectrums of (a) clove oil and dried PTEE nanoparticles samples (b) ME 01, (c) ME 02, (d) ME 03 and (e) ME 04.

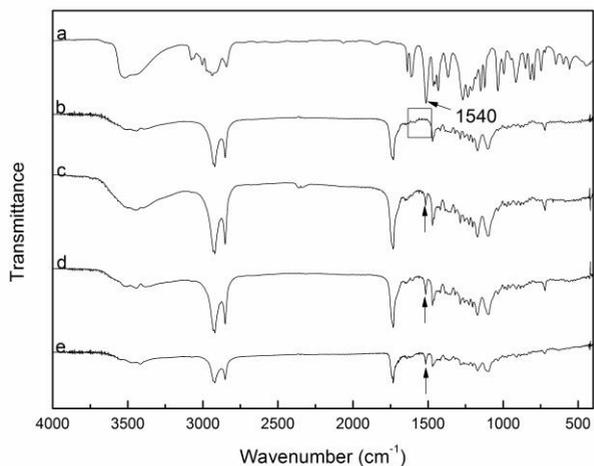
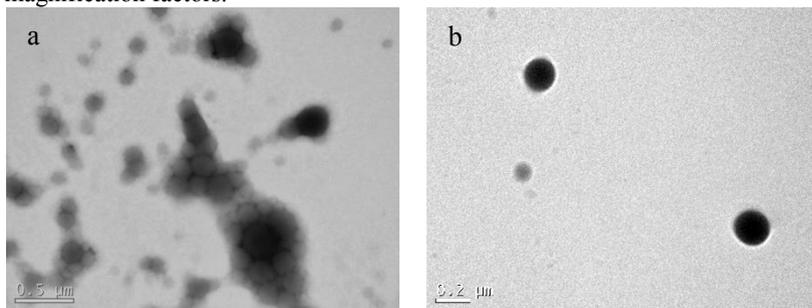


Figure 24. TEM micrographs of PTEE nanoparticles containing CO 6% (ME 02). A and B represent the views from different positions with different magnification factors.



5.3.7 Morphology

TEM micrographs (Figure 24) show the morphology of Poly(thioether-ester) particles produced by thiol-ene copolymerization of DGU/Bu(SH)₂ in miniemulsion loaded with 6% of CO (ME 02). Both images represent the views from different grid positions and different magnifications factors. As PTEE nanoparticles melt under the strong electron beam of TEM (Machado et al., 2016), the analysis should be

performed very fast to avoid a complete blurred image. As shown in Figure 24 (a and b), the PTEE particles had, in general, spherical shape with regular surface. Figure 24a can provide an idea of the particle size distribution and shows a majority of small particles but also some larger particles, with particle diameter ranging from 150 to 400 nm.

5.3.8 Antioxidant activity

In accordance to the previous results of our research group (MENESES *et al.*, 2016) the PTEE nanoparticles had by themselves antioxidant activity in both methods tested. For DPPH assay a EC_{50} of $177.97 \pm 3.29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ was found for ME 01 (0% CO), while with the addition of 6% of CO this value decreased to $60.80 \pm 1.83 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (ME 02), showing a reduction of 66% in polymer concentration required to reduce DPPH radical by 50%. A better result was also shown for β -carotene/linoleic acid assay, since ME 01 (0% CO) had the antioxidant activity of ~53% improved to ~79% with 6% of CO added into the formulation. This increase in the scavenging activity of DPPH radicals and in inhibition of peroxidation shows that the eugenol bioactivity was preserved after the polymerization/encapsulation process, and that its incorporation in the polymer chain did not affect the antioxidant activity, in addition to being a natural alternative to improve the antioxidant activity of the PTEE nanoparticles.

Table 12. Antioxidant Activity of PTEE Nanoparticles by DPPH free radical scavenging activity and β -carotene-linoleic acid assay.

Sample	DPPH $EC_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})$	β -carotene/linoleic acid Antioxidant activity (%)
ME 01	177.97 ± 3.29	53.41 ± 0.62
ME 02	60.80 ± 1.83	79.31 ± 3.91

5.4 CONCLUSIONS

Preparations of PTEE nanoparticles loaded with CO showed high encapsulation efficiency due to the affinity of CO for the organic phase and also due to the ability of CO to be incorporated into the polymer chain. In addition, CO concentration up to 12% did not lead to an increase in size and distribution in PTEE. However, due to the increase of the low reactivity terminals formed with the increase of CO in the formulation, conversion, melting point and molar mass of the polymer had a gradual decreased, since double bonds of eugenol were

available to react with the thiol group, competing with the DGU double bonds, in addition to plasticizer properties detected with the increase of CO in the medium. CO concentrations up to 12% could be effectively incorporated during miniemulsion polymerization via thiol-ene process. Antioxidant activity of PTEE nanoparticles with 6% of CO had an increase proved by β -carotene/linoleic acid and DPPH assays, results which conforming the bioactivity of eugenol after encapsulation/polymerization process.

REFERENCES

- AMATO, D. N. V. N. D. V. D.; FLYNT, A. S.; PATTON, D. L. D. Functional, sub-100 nm polymer nanoparticles via thiol-ene miniemulsion photopolymerization. **Polym. Chem.**, p. 5625–5632, 2014.
- ANTONIETTI, M; LANDFESTER K. Polyreactions in miniemulsions. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 4, p. 689-757, 2002.
- BLOIS, M. S. Antioxidant Determination by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199–1200, 1958.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CARDOSO, P. B.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Encapsulation of jojoba and andiroba oils by miniemulsion polymerization. Effect on molar mass distribution. **Macromolecular Symposia**, v. 324, n. 1, p. 114–123, 2013.
- DONOVAN, B. R.; COBB, J. S.; HOFF, E. F. T.; PATTON, D. L. Thiol-ene adhesives from clove oil derivatives. **RSC Adv.**, v. 4, n. 106, p. 61927–61935, 2014.
- FUJISAWA, S., KADOMA, Y. Action of eugenol as a retarder against polymerization of methyl methacrylate by benzoyl peroxide. **Biomaterials**, v. 18, p. 701-703, 1997.
- GARG, A.; GUPTA, B.; PRAKASH, R.; SINGH, S. Preparation and characterization of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex of eugenol: differential pulse voltammetry and (1)H-NMR. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 58, p. 1313–1319, 2010.
- GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M. et al. The antioxidant activity of

conducting polymers in biomedical applications. **Current Applied Physics**, v. 4, n. 2-4, p. 347–350, 2004.

GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; TRAVAS-SEJDIC, J.; BOWMAKER, G.; COONEY, R. P.; KILMARTIN, P. Conducting polymers as free radical scavengers. **Synthetic Metals**, v. 140, p. 225–232, 2004.

GUO, J.; SCHORK, F. J. Hybrid miniemulsion polymerization of acrylate/oil and acrylate/fatty acid systems. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 2, p. 265–276, 2008.

HSU, C. F.; ZHANG, L.; PENG, H.; TRAVAS-SEJDIC, J.; KILMARTIN, P. A. Free radical scavenging properties of polypyrrole and poly(3,4-ethylenedioxythiophene). **Current Applied Physics**, v. 8, p. 316–319, 2008.

JASINSKI, F.; LOBRY, E.; TARABLSI, B.; CHEMTOB, A.; NOUEN, D. Le; CRIQUI, A. Light-Mediated Thiol – Ene Polymerization in Miniemulsion: A Fast Route to Semicrystalline Polysulfide Nanoparticles. **ACS Macro Letters**, v. 3, p. 958–962, 2014.

KANG, H.J.; CHAWLA, S. P.; JO, C.; KWON, J. H.; BYUN, M.W. Studies on the development of functional powder from citrus peel. **Bioresource Technology**, v. 97, 614-620, 2006.

LOWE, A. B. Thiol-ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. **Polym. Chem.**, v. 1, n. 1, p. 17–36, 2010.

MACHADO, T.O., CARDOSO, P.B., MEIER, M.A.R., SAYER, C., ARAUJO, P.H.H., **Thiol-ene polymerization of a renewable monomer in miniemulsion**. Submitted, 2016.

MARGELOS, J.; ELIADES, G.; VERDELIS, C.; PALAGHIAS, G. Interaction of calcium hydroxide with zinc oxide-eugenol type sealers a potential clinical problem. **Journal of Endodontics**. v. 23, n. 1, p. 44-48, 1998.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, 3444-3452, 2002.

MENESES, A. C.; MACHADO, T. O.; SAYER, P. H. H. A.; OLIVEIRA, D. **Antioxidant activity evaluation of Poly (Thioether-ester) nanoparticles**. Communications to the Editor submitted, 2016.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v.15, 127-130, 2001.

SALIMON, J.; SALIH, N.; YOUSIF, E. Industrial development and applications of plant oils and their biobased oleochemicals. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 135–145, 2012.

STEINMACHER, F. R.; BERNARDY, N.; MORETTO, J. B.; BARCELOS, E. I.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Kinetics of MMA and VAc miniemulsion polymerizations using miglyol and castor oil as hydrophobe and liquid core. **Chemical Engineering and Technology**, v. 33, n. 11, p. 1877–1887, 2010.

YASUNIWA, M.; TSUBAKIHARA, S.; SUGIMOTO, Y.; NAKAFUKU, C. Thermal analysis of the double-melting behavior of poly(L-lactic acid). **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 42, n. 1, p. 25–32, 2004.

YU, T.; BU, H.; HU, J.; ZHANG, W.; GU, Q. The double melting peaks of poly (ethylene terephthalate), **Polymer communications**, p. 83-91, 1983.

CAPÍTULO VI

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram produzidas e caracterizadas nanopartículas lipídicas sólidas, NLS, nanoemulsões, NE, e nanopartículas poliméricas, NPs, carregadas com óleo de cravo via processos livre de solvente. Foram obtidas elevadas eficiências de encapsulação para as NLS, principalmente quando adicionado Crodamol à formulação, devido à uma redução da cristalinidade das nanopartículas formadas majoritariamente por ácido esteárico. As análises microbiológicas frente a microrganismos patogênicos de relevância na indústria de alimentos indicaram que baixas concentrações de óleo encapsulado, tanto para as NLS quanto para as NE, foram suficientes para inibir o crescimento dos microrganismos testados, e ainda que a área superficial das partículas possa estar relacionada à eficiência de inativação. A atividade antioxidante do óleo de cravo foi preservada após a encapsulação e ainda foram conseguidos altos níveis de atividade eliminadora de radicais para as duas técnicas testadas.

As NPs formadas utilizando a técnica de polimerização via tioleno em miniemulsão apresentaram excelentes níveis de encapsulação. No entanto, quando em maior concentração, a presença das duplas ligações do eugenol e do próprio grupo fenol do eugenol no meio de polimerização reduziram a conversão final do polímero, massa molecular e temperatura de fusão. Quando em menor concentração o óleo de cravo apresentou maior viabilidade na produção das nanopartículas poliméricas devido à maior conversão alcançada e os resultados de atividade antioxidante se mostraram promissores, capazes de elevar a atividade antioxidante do polímero, que nos testes de eliminação de radicais e oxidação lipídica também apresentou atividade antioxidante quando testado sem presença de óleo de cravo.

Neste contexto, os resultados se mostraram promissores para a produção de nanocarreadores de diferentes matrizes carregados com óleo de cravo, tendo possibilidade de aplicação em diversas áreas como agentes antimicrobianos e antioxidantes.