

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Preparação e caracterização de uma mistura  
eutética baseada em um derivado de óleo  
essencial extraído do *Syzygium aromaticum* L.

Amanda Luizetto dos Santos

São Carlos

2010

Preparação e caracterização de uma mistura  
eutética baseada em um derivado de óleo  
essencial extraído do *Syzygium aromaticum* L.

Amanda Luizetto dos Santos

Tese apresentada no Instituto de  
Química de São Carlos, para obtenção  
do título de Doutor em Ciências  
(Química Analítica)

Orientador: Gilberto Orivaldo Chierice

São Carlos

2010

Dedico este trabalho aos meus pais, **ARMANDO** e **RITA**, minha irmã **ADRIANA** e meu esposo, **ROBSON**, que são meus exemplos de amor e as pessoas mais importantes da minha vida.

*"Se um dia você lembrar-se de mim e não conseguir do seu pensamento tirar, lembre-se de que também estarei triste por com você não estar".*

*Anônimo*

*"Pai, sei que você sempre estará orgulhoso ao meu lado, e com aquele sorriso no rosto vibrando a cada nova etapa da minha vida."*

*"De onde você estiver, esteja feliz por esta conquista que é tão sua quanto minha, pois sem você do meu lado não conseguiria chegar até aqui".*

*Saudades de uma filha  
que te ama muito e  
nunca vai te esquecer!*

*Agradeço à minha mãe Rita que está sempre feliz com minha felicidade! E que é  
insubstituível na minha vida;*

*Ao meu esposo Robson, maravilhoso companheiro, porque sem seu amor e seu sorriso  
não teria conseguido finalizar esta etapa dentre tantas atribuições da vida;*

*À minha irmã Adriana pelo amor, apoio e pelos abraços sofridos, e pelo presente divino,  
Cassiano;*

*Aos meus avos não mais neste plano espiritual pela força que de algum lugar emana;*

*À Valéria que sempre dividiu comigo alegrias e lágrimas!*

**Muito Obrigada!**

## Agradecimentos

- ✓ Ao Prof. Dr. Gilberto O. Chierice pelo respeito, confiança, incentivo e amizade.
- ✓ Ao Prof. Dr. Alan Riga que me recebeu de braços abertos e confiou no meu trabalho.
- ✓ Ao Prof. Dr. Kenneth Alexander pelos elogios, espaço em seu laboratório e por toda ajuda até hoje conferida.
- ✓ Ao Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro pelo apoio e discussões.
- ✓ Às amigas que sempre estiveram do meu lado em todos os momentos, Roberta, Gra, Barbie, Rita e Milena.
- ✓ Aos amigos de laboratório, Toninho, Salvador, Puff, Toni, Luizinho, Felipe, Royal, André, Marcio, Gabriel, Erik, Paulo, Rafa, Marcelo, Luis, Lu, Bel, Junia, Carol, Pri, Cididulce, Ivana, Ana Paula, Adriana, Mariá, Marlizinha, Thalita, Edgar.
- ✓ Aos meus colegas de laboratório de Toledo e Cleveland.
- ✓ À minha vizinha de São Carlos, Soraia, sempre tão risonha e companheira; a minha vizinha americana, Dona Emilia, sempre carinhosa e com seus “petiscos orgânicos”.
- ✓ Ao Marcio, meu amigo baiano pela companhia e amizade verdadeira.
- ✓ À todos que, por ventura, não estão descritos nesta lista, mas que estão presentes no meu coração.
- ✓ Ao IQSC/USP pela infra-estrutura para a realização deste trabalho.
- ✓ À CAPES, pela bolsa concedida.

***Agradeço a Deus por estar a minha frente para me guiar,  
atrás de mim para me proteger, acima de mim para me  
iluminar, e dentro de mim para me abençoar.***

*Os ventos que às vezes tiram algo que amamos,  
são os mesmo que trazem algo que aprendemos a amar...  
Por isso não devemos chorar pelo que nos foi tirado,  
e sim, aprender a amar o que nos foi dado.....  
Por isso tudo aquilo que realmente é nosso...  
nunca se vai para sempre..."*

*Fernando Pessoa*

## Resumo

A planta *Syzygium aromaticum* L. produz os botões secos do cravo da Índia, do qual se extrai o óleo essencial. O componente majoritário deste óleo é o eugenol, cujas algumas de suas propriedades farmacológicas são atividades fungicida, bactericida, anestésico, entre outros.

No entanto, o eugenol (EUG) foi convertido a acetato de eugenila (AE) pela adição do íon acetato, na ligação do grupo hidroxila. Esta modificação foi realizada devido aos problemas relacionados à solubilidade, o que estabelece uma difícil relação com sua biodisponibilidade, e então, limitando sua utilização em preparações farmacêuticas.

Em seguida, uma mistura eutética foi preparada empregando o acetato de eugenila como princípio ativo, e o polietilenoglicol 3350 (PEG) como carreador hidrofílico. O diagrama de fases apontou a mistura eutética com composição de 80% de AE e 20% PEG. As características térmicas no ponto eutético foram de 21,33° C para temperatura de pico e 5,71Jg<sup>-1</sup> a energia envolvida no processo de fusão.

Dessa maneira, a taxa de permeabilidade e a solubilidade do acetato de eugenila serão aprimoradas, contribuindo para o aumento de sua biodisponibilidade e assim, viabilizando sua utilização em formulações farmacêuticas.



## Abstract

The *Syzygium aromaticum* L. plant produces the cloves buds which are dried. From these dried buds the essential oil is extracted. The major compound is eugenol. Some of eugenol's pharmacological properties include fungicidal, bactericidal, anesthetic, and other activities.

However, eugenol (EUG) was modified to eugenyl acetate (EA) by adding the acetate group to the bound hydroxyl. The modification was performed in order to eliminate the solubility problems which cause a difficult relationship with bioavailability. The solubility problem restrains its use in pharmaceutical formulations.

A eutectic mixture was prepared using the eugenyl acetate as the principal active ingredient and a polyethyleneglycol 3350 (PEG) as the hydrophilic carrier. The phase diagram demonstrated that the eutectic mixture occurred with 80% EA and 20% PEG composition. The thermal characteristics at the eutectic point were 21.33°C for the peak temperature and 5.71Jg<sup>-1</sup> for the energy of fusion.

Thus, the rate of permeability and solubility of eugenyl acetate will be enhanced. This will contribute to an increase in its bioavailability, thus promoting its use in pharmaceutical formulations.

## Lista de figuras

Figura 1: Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos <sup>2</sup> .	21
Figura 2: Estrutura química eugenol.	26
Figura 3: Modelo de um diagrama de fases de uma mistura eutética.	31
Figura 4: Ilustração do aparato de extração Clevenger modificado pelo grupo GQATP.	36
Figura 5: Fotografia do porta-amostra confeccionado em vidro	39
Figura 6: Figura representando a lâmina de vidro usada na microscopia óptica	44
Figura 7: Reação de síntese do acetato de eugenila.	52
Figura 8: a) Cromatograma do EUGp; b) EUG extraído do <i>Syzygium aromaticum</i> L.	55
Figura 9: Curva analítica para o padrão de eugenol	56
Figura 10: Cromatograma do acetato de eugenila a) referência e b) sintético	58
Figura 11: Curvas de DSC obtidas a 10 °C min <sup>-1</sup> para o eugenol padrão e o óleo extraído do <i>Syzygium aromaticum</i> L utilizando porta-amostra de vidro.	61
Figura 12: Curva de DSC e temperatura do acetato de eugenila referência obtida no modo resfriamento e aquecimento com razão de aquecimento 10 °C min <sup>-1</sup> e de resfriamento de -10 °C min <sup>-1</sup> .	64

Figura 13: Curva de DSC do acetato de eugenila sintetizado.	65
Figura 14: Curva de DSC do acetato de eugenila com uma etapa isotérmica entre cada ciclo de aquecimento/resfriamento.	69
Figura 15: Espectros na região do infravermelho de eugenol (EUG) e acetato de eugenila (AE).	71
Figura 16: Estrutura molecular do eugenol (EUG) e acetato de eugenila (AEs); e seus respectivos espectros de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ .	73
Figura 17: Projeção ORTEP da molécula mostrando a probabilidade elipsóide de 30%.	75
Figura 18: Difratoograma de Raios X de monocristal de AEr.	77
Figura 19: Difratoograma de Raios X simulado para a amostra AEs pelo método do pó.	81
Figura 20: Difratoograma de Raios X do AEs pelo método pó.	83
Figura 21a-c: Crescimento do cristal de AEr.	85
Figura 22: Curvas de DSC do AE, PEG e das misturas binárias em proporções crescentes de 10 a 90%.	90
Figura 23: Diagrama de fases do AEr/ PEG 3350 para o primeiro pico endotérmico.	95
Figura 24: Relação característica entre a entalpia de fusão de um eutético e sua composição em porcentagem.	96

Figura 25: Variação de entalpia em relação às composições das misturas para o primeiro pico endotérmico.	97
Figura 26: Diagrama de fases do PEG 3350/ AEr para o segundo pico endotérmico.	98
Figura 27: Variação de entalpia em relação às composições para o segundo pico endotérmico.	100
<b>Figura 28:</b> Espectros na região do Infravermelho para as misturas eutéticas de 10% a 90% de AEr.	102
Figura 29: Foto micrografia da mistura 10% de AE e 90% PEG.	105
Figura 30: Foto micrografia da mistura 20% de AE e 80% PEG.	106
Figura 31: Foto micrografia da mistura 30% de AE e 70% PEG.	106
Figura 32: Foto micrografia da mistura 40% de AE e 60% PEG.	106
Figura 33: Foto micrografia da mistura 50% de AE e 50% PEG.	107
Figura 34: Foto micrografia da mistura 60% de AE e 40% PEG.	107
Figura 35: Foto micrografia da mistura 70% de AE e 30% PEG.	107
Figura 36: Foto micrografia da mistura 80% de AE e 20% PEG.	108
Figura 37: Foto micrografia da mistura 90% de AE e 10% PEG.	108
Figura 38: Foto micrografia de 100% de PEG.	108

Figura 39: Foto micrografia do AE 100%.	109
Figura 40: Relação entre a área superficial e a composição das misturas binárias	110
Figura 41: Imagem de MEV da mistura binária contendo 10% AEr e 90% PEG.	111
Figura 42: Imagem de MEV da mistura binária contendo 20% AEr e 80% PEG.	112
Figura 43: Imagem de MEV da mistura binária contendo 30% AEr e 70% PEG.	112
Figura 44: Imagem de MEV da mistura binária contendo 40% AE e 60% PEG.	112
Figura 45: Imagem de MEV da mistura binária contendo 50% AE e 50% PEG.	113
Figura 46: Imagem de MEV da mistura binária contendo 60% AE e 40% PEG.	113
Figura 47: Imagem de MEV da mistura binária contendo 70% AE e 30% PEG.	113
Figura 48: Imagem de MEV da mistura binária contendo 80% AE e 20% PEG.	114
Figura 49: Imagem de MEV da mistura binária contendo 90% AE e 10% PEG.	114
Figura 50: Relação entre o comprimento do cristal e a composição das misturas binárias.	115
Figura 51: Correlação entre os atributos morfológicos da mistura eutética e as misturas binárias.	117
Figura 52: Difratoograma de Raios X do PEG 3350, das misturas com 40% AE/ 60% PEG e 60% AE/ 40% PEG.	118

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Estudo dos parâmetros de extração do óleo essencial .....	50
Tabela 2: Média das medidas do estudo térmico para amostras de acetato de eugenila .....	66
Tabela 3: Deslocamentos de RMN- <sup>13</sup> C para a estrutura do EUG .....	74
Tabela 4: Detalhes experimentais do DRX .....	78
Tabela 5: Distâncias de ligações e ângulos selecionados no experimento de DRX .....	79
Tabela 6: Valores de $T_p$ , $T_o$ , e $\Delta H$ para o primeiro evento endotérmico encontrado nas misturas eutéticas .....	92
Tabela 7: Valores de $T_p$ , $T_o$ , e $\Delta H$ para o segundo evento endotérmico encontrado nas misturas.....	93
Tabela 8: Tabela de correlação de atributos relacionados à mistura eutética.....	116
Tabela 9: Tabela de atributos não encontrados na mistura eutética contendo 80% AE e 20% PEG 3350.....	116

## Lista de símbolos e abreviaturas

EUGp: Eugenol padrão

EUG: óleo essencial extraído do cravo da Índia

AER: Acetato de eugenila referência

AEs: Acetato de eugenila sintetizado

$T_o$ : Temperatura onset

$T_p$ : Temperatura de pico

$\Delta H$ : Variação de entalpia

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	20
1.1 Considerações Gerais.....	20
1.2 Óleos Essenciais.....	23
1.3 Eugenol.....	25
1.4 Aplicações.....	27
1.5 Eutéticos .....	28
2. OBJETIVOS GERAIS.....	32
2.1 Objetivos específicos .....	32
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	35
3.1 Cravo da Índia.....	35
3.2 Padrão de Eugenol .....	35
3.3 Extração do óleo essencial .....	35
3.4 Caracterização físico-química do óleo essencial e acetato de eugenila .....	37
3.4.1 Cromatografia Gasosa (GC) .....	37
3.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	38
3.4.3 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) .....	40



3.4.4 Ressonância Magnética Nuclear ( $^{13}\text{C}$ NMR).....	41
3.4.5 Difractometria de Raios X de Monocristal.....	41
3.4.6 Difração de Raios X pelo método do Pó .....	42
3.4.7 Microscopia Óptica .....	43
3.5 Preparação dos Eutéticos .....	44
3.6.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	45
3.6.2 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR) .....	46
3.6.3 Microscopia Óptica .....	47
3.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	47
3.6.5 Difractometria de Raios X pelo método do pó .....	48
4. Resultados de caracterização para o eugenol e acetato de eugenila .....	50
4.1 Extração do Óleo Essencial .....	50
4.2 Derivado do Óleo: Acetato de Eugenila .....	51
4.3 Cromatografia Gasosa .....	53
4.3.1 Eugenol.....	54
4.3.2 Acetato de eugenila .....	57
4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	59

4.4.1 Eugenol.....	59
4.4.2 Acetato de eugenila .....	63
4.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho .....	70
4.6 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono .....	72
4.7 Difratomia de Raios X de monocristal .....	74
4.7.1 Acetato de Eugenila.....	74
4.8 Difratomia de Raios X pelo método do pó .....	82
4.9 Microscopia Ótica.....	84
5. Resultados encontrados para os eutéticos.....	86
5.1 Estudo de Eutéticos .....	86
5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	89
5.3 Diagrama de Fases.....	94
5.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho .....	100
5.5 Microscopia Ótica.....	104
5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	110
5.7 Difratomia de Raios X pelo método do pó .....	118
6. CONCLUSÃO.....	121

6.1 Obtenção do acetato de eugenila .....	121
6.2 Eutéticos .....	123
6.3 Conclusões gerais.....	124
7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS .....	125
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	127

# **CAPÍTULO 1**

## *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

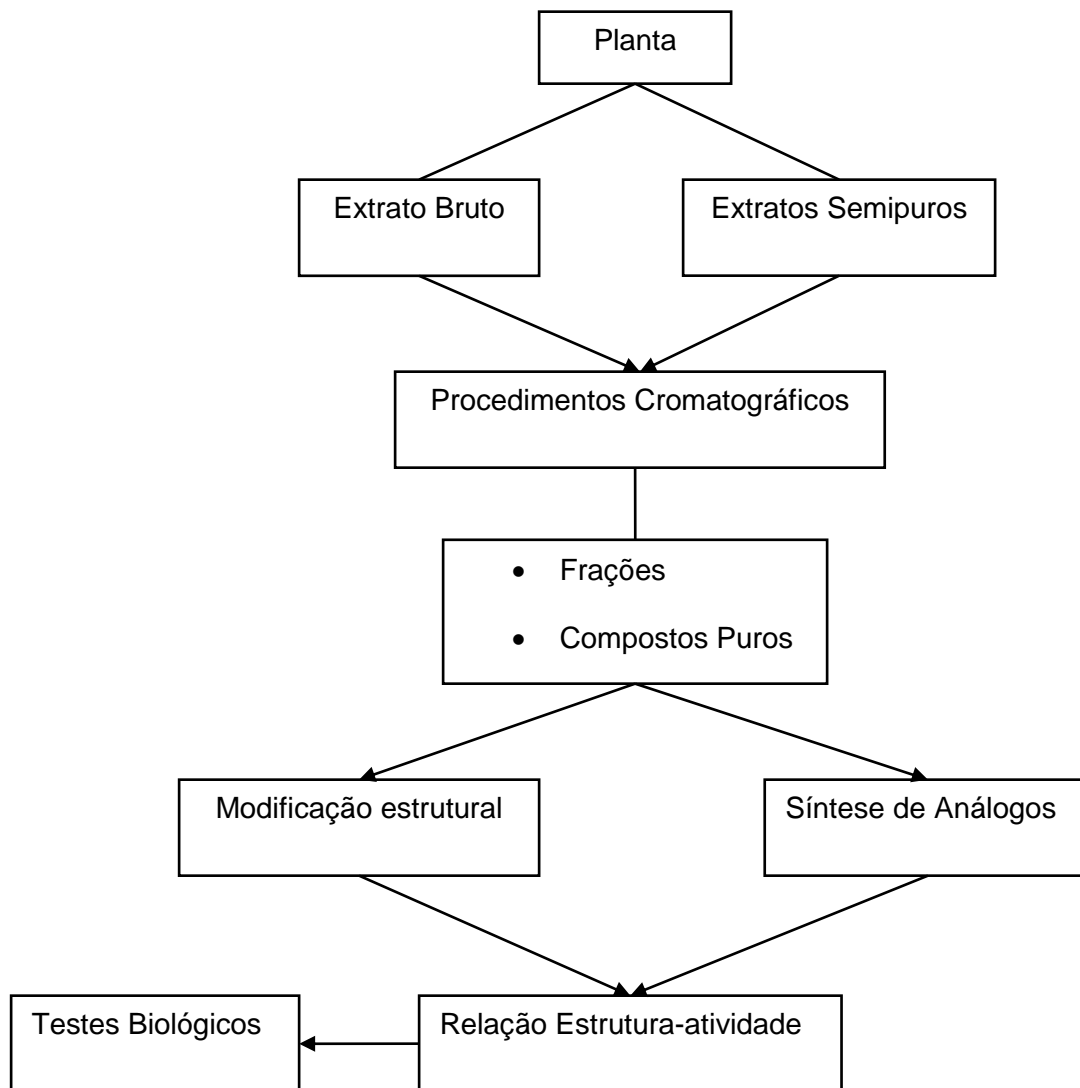
### *1.1 Considerações Gerais*

A busca por moléculas originais pela indústria farmacêutica e pesquisadores, com diferentes estruturas químicas e mecanismos de ação, tem crescido exponencialmente nos últimos tempos.

Os principais aspectos observados na determinação e escolha de substâncias ativas de origem natural estão fundamentados na observação e informações do emprego na medicina popular, ponto de partida para os estudos relacionados a produtos naturais<sup>1</sup>. Aproximadamente 75% dos compostos puros naturais utilizados na indústria farmacêutica foram isolados a partir da observação da medicina popular<sup>2</sup>.

Recentemente, os materiais provenientes de plantas desempenham um papel fundamental em tratamentos terapêuticos, principalmente em países em desenvolvimento.

Embora uma planta possa conter centenas de compostos, apenas os presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados na fotoquímica clássica. A **Figura 1** ilustra algumas etapas básicas seguidas na obtenção de princípios ativos em plantas. O fundamento básico deste procedimento consiste no fato de que toda substância, independente de sua proporção e de seu conhecimento, pode ser um possível princípio ativo.



**Figura 1:** Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos<sup>2</sup>.

O interesse pela utilização de substâncias de origem natural tem aumentado consideravelmente, fato observado inclusive para os óleos essenciais.

Os óleos voláteis são produtos valiosos de origem natural que representam uma importante vertente econômica, cuja utilização é muito grande nas indústrias de perfumes, cosméticos, fitoterapia, condimentos e nutrição<sup>3</sup>.

De acordo com a base de dados americana COMTRADE (United Nations Commodity Trade Statistics Database) o mercado mundial de óleos essenciais gira em torno de US\$15 milhões ao ano, apresentando crescimento aproximado de 11% ao ano. O Brasil é um dos grandes produtores e exportadores mundiais de óleos voláteis, devido ao mercado de óleos cítricos que corresponde a 93% do comércio dos óleos, como os de laranja, lima, limão, entre outros<sup>4</sup>.

No entanto, a grande biodiversidade brasileira ainda pouco explorada, posiciona o Brasil em uma situação promissora, quando relacionada ao aumento de sua participação no mercado de óleos, em outras palavras, a diversidade de plantas disponível no Brasil é o fator que garante o ambiente disponível para o crescimento desta vertente de pesquisa<sup>5</sup>.

A química de aromas está naturalmente presente em grande número de folhas e flores, e têm sido usadas por muitos séculos, sugerindo que estas fragrâncias possuem alguns benefícios a saúde, em adição ao odor agradável<sup>6</sup>.

## **1.2 Óleos Essenciais**

Segundo a International Standard Organization (ISO), óleos essenciais são misturas lipofílicas complexas de substâncias voláteis, os quais são obtidas a partir de órgãos de plantas por destilação de arraste de vapor, bem como compressão dos pericarpos de frutos<sup>7</sup>.

Os óleos essenciais estão associados às funções necessárias à sobrevivência do vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microorganismos e predadores, e ainda colaborando para a atração de insetos e agentes fecundadores<sup>8</sup>. Estas substâncias são responsáveis pelo odor característico e flavorizante, e são metabólitos secundários formados pelas plantas aromáticas<sup>9</sup>.

Os óleos essenciais, além de composição complexa, variam amplamente quanto à sua composição, contendo de poucos até muitas centenas de constituintes, com diferentes tipos de compostos orgânicos, especialmente hidrocarbonetos e compostos oxigenados.

Estas substâncias são amplamente empregadas na medicina como constituinte de diferentes produtos médicos e na indústria alimentícia como aditivos de sabor pela utilização do óleo total e/ou seus componentes.

Algumas composições químicas têm sido estudadas devido às características flavorizantes e à capacidade de conferir odor. Atualmente, há relatos de grande interesse nos óleos voláteis, pois alguns deles apresentam ações farmacológicas que podem estar relacionados a um ou mais constituintes dos óleos essenciais<sup>10</sup>.



Além de seus efeitos antimicrobianos na indústria de alimentos, os óleos voláteis podem ser considerados um determinante intrínseco adicional no aumento da segurança e tempo de validade de alimentos e cosméticos<sup>11</sup>.

A caracterização dos óleos essenciais abrange diferentes parâmetros físicos, como temperaturas de fusão e ebulição, entre outros. A determinação destes parâmetros nem sempre é simples, muitas vezes dependente de algumas técnicas<sup>12</sup>.

Uma variedade de técnicas pode ser usada para a extração de materiais vegetais, com custo e níveis de complexidade variados. O produto de extração pode variar em qualidade, quantidade e composição de acordo com o clima, composição de solo, órgão da planta, idade e estágio do ciclo vegetativo. Portanto, de maneira a se obter uma composição constante, os parâmetros experimentais devem ser estabelecidos e seguidos, além de utilizar o mesmo órgão da planta para a extração<sup>11</sup>.

Diferentes métodos para a extração de óleos essenciais podem ser usados de acordo principalmente com o valor comercial do produto e o órgão da planta no qual este se concentra. Alguns métodos utilizados são a hidrodestilação, arraste a vapor, “enflourage”, extração por solventes e fluido supercrítico.

A hidrodestilação é o método de extração mais comum usado na obtenção de frações voláteis de plantas aromáticas. No entanto, este procedimento demanda muito tempo de extração e exige grande quantidade de amostra<sup>13</sup>.

O uso de produtos naturais como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos oferece algumas vantagens como, por exemplo, biodiversidade de estruturas químicas e classes de estrutura homóloga, estruturas químicas di e

tridimensionais, fonte de novas moléculas como alvos moleculares complexos, entre outros<sup>9</sup>.

A despeito de sua multiplicidade de aplicações, os óleos essenciais são quimicamente instáveis na presença de luz, ar, umidade, e altas temperaturas, o que pode causar rápida evaporação e degradação de alguns componentes ativos<sup>14</sup>.

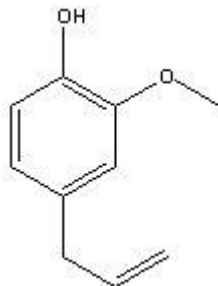
### **1.3 Eugenol**

A árvore *Syzygium aromaticum* L pertence à família das Mirtáceas, nativa da Indonésia e produz pequenos botões de flores, popularmente conhecido como cravo da Índia. O cravo da Índia tem sido usado por décadas como condimento, perfume, na medicina e odontologia, cuja explicação está na presença de um constituinte majoritário biologicamente ativo chamado eugenol<sup>15</sup>.

O eugenol é o principal componente fenólico do óleo extraído do cravo da Índia, perfazendo aproximadamente 90% do volume total<sup>6</sup>. Seus componentes presentes em menor volume são o acetato de eugenila e  $\beta$ -cariofileno, cujo volume corresponde a aproximadamente 10% do óleo extraído<sup>16</sup>.

O óleo obtido é um líquido amarelado extraído por destilação à vapor dos botões florais secos. Apresenta odor fenólico característico e sabor picante acentuado<sup>17,18</sup>. Geralmente, os componentes em maior concentração determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais, como é o caso do eugenol extraído do cravo da Índia<sup>10,19,20</sup>.

A estrutura química do eugenol está representada na **Figura 2**.



**Figura 2:** Estrutura química eugenol.

Este óleo vem sendo utilizado por mais de 2.000 anos em seres humanos em aplicações odontológicas para aliviar as dores de dentes, desinfecção de canal em preenchimentos temporários e como anestésico oral<sup>21</sup>. Além disso, é amplamente usado nas indústrias de aromas, farmacêutica e flavorizante<sup>19,22</sup>.

Mais recentemente, demonstraram-se propriedades farmacológicas adicionais, como potente fungicida, bactericida para microorganismos gram-positiva e gram-negativa, anestésico, antioxidante, antiinflamatório, antialérgico, anticarcinogênica, antimutagênica, e inseticida<sup>20,23,24</sup>.

No entanto, o eugenol apresenta problemas quanto à solubilidade em meio aquoso em virtude de sua natureza lipofílica. Esta característica estabelece uma difícil relação entre solubilidade e biodisponibilidade, limitando sua utilização em formulações farmacêuticas para tratamento terapêutico. Outra desvantagem do emprego do eugenol são as elevadas concentrações necessárias do óleo para atingir o efeito terapêutico desejado<sup>25</sup>.

Portanto, de maneira a reduzir os problemas associados com a molécula de eugenol, dentre várias alternativas, há a possibilidade de adicionar grupos funcionais à sua estrutura.

Portanto, uma modificação molecular foi realizada na estrutura química do eugenol pela reação de esterificação. O grupo acetato foi obtido a partir da esterificação no sítio do grupo hidroxila da molécula original, resultando na formação da molécula do acetato de eugenila.

Esta reação possivelmente minimizará alguns problemas encontrados no eugenol, melhorando suas características físicas e químicas. Outras vantagens da modificação realizada são a diminuição da instabilidade e mudança do estado físico<sup>3,6,26</sup>.

#### **1.4 Aplicações**

Os óleos essenciais e seus derivados possuem grande variedade de aplicações terapêuticas e/ou como veículo em formulações farmacêuticas. No entanto, estes compostos muitas vezes apresentam problemas quando usados em formulações farmacêuticas.

Um princípio ativo com baixa solubilidade em água tipicamente exibe uma taxa de dissolução e absorção limitadas, já o princípio ativo com baixa permeabilidade pela membrana exibe uma taxa de permeação limitada<sup>27</sup>.

A permeabilidade e a solubilidade do fármaco são fatores importantes para sua biodisponibilidade. Certos princípios ativos apresentam problemas quanto à pequena solubilidade em água, como por exemplo, a digoxina e a lidocaína. Atualmente, a indústria farmacêutica enfrenta problemas em formulações farmacêuticas devido ao grande número de fármacos empregando princípios ativos com diminuída solubilidade em água e pouca biodisponibilidade oral<sup>12,28</sup>.

Quando a solubilidade de um princípio ativo é relativamente baixa, uma elevada razão princípio ativo-carreador é necessária para a liberação deste componente<sup>29</sup>.

Algumas possibilidades para aprimoramento destes problemas são, por exemplo, a redução do tamanho da partícula e conseqüentemente o aumento da área de superfície, a redução da espessura, entre outras modificações, cujo objetivo é melhorar a solubilidade do fármaco em meio aquoso. No entanto, estas possibilidades não demonstram resultados eficientes.

Todavia, a opção mais atrativa para melhorar a solubilidade de princípios ativos é através de modificações físicas e químicas, as quais modificam a taxa de liberação de fármacos ou aumentam a área superficial disponível para a dissolução. Dois exemplos destas modificações são as misturas eutéticas e os pró-fármacos, respectivamente<sup>12</sup>.

### **1.5 Eutéticos**

O crescimento eutético é freqüentemente considerado semelhante aos metais puros, visto que ocorre a uma temperatura fixa abaixo da temperatura de equilíbrio<sup>30</sup>.

A química dos eutéticos é um campo de investigação ativo devido às suas propriedades físicas não usuais, as quais não são normalmente demonstradas pelos componentes individuais e originais<sup>31</sup>.

Eutéticos são misturas homogêneas formadas por dois ou mais constituintes em proporções específicas. Um componente é o carreador altamente solúvel em água, e o outro constituinte um fármaco pouco hidrossolúvel. A principal característica desta mistura é o aumento da solubilidade em água quando utilizados juntos em uma mesma formulação a serem usados separados.

Estas combinações são formadas por uma razão de pequenos compostos suspensos em um carreador, os quais se comportam como um único e simples composto. Esta mistura apresenta o ponto de fusão menor que de seus constituintes individuais<sup>12,28,32</sup>.

Este ponto é chamado de ponto eutético, no qual a temperatura mantém-se constante até a precipitação completa do material como cristais, e então, a temperatura pode ser reduzida novamente<sup>33</sup>.

Misturas eutéticas não são normalmente uma simples mistura física composta por duas fases cristalinas. Porém, dependendo das propriedades de fusão dos componentes puros, eles podem ter uma microestrutura bem definida<sup>34</sup>.

Entretanto, todo princípio ativo disperso no carreador não está necessariamente presente no estado microcristalino, uma determinada fração do princípio ativo pode estar molecularmente dispersa na matriz<sup>29</sup>.

O comportamento diferenciado de dissolução na obtenção de eutéticos é determinado pela composição eutética, pela porcentagem requerida e metodologia de obtenção<sup>35</sup>.

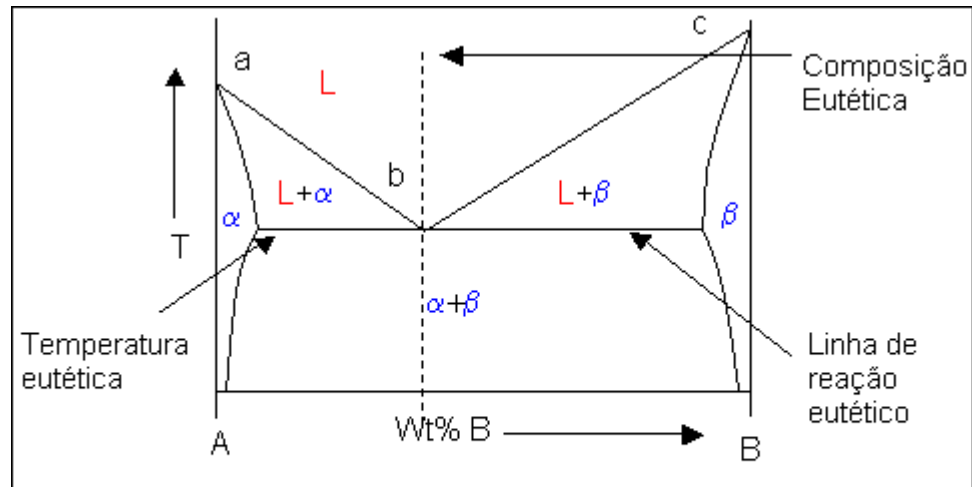
Os eutéticos oferecem várias vantagens, como por exemplo, a redução do tamanho da partícula dos componentes a frações pequenas, alta solubilidade do princípio ativo no carreador e temperaturas de processamento mais baixas. Estes benefícios resultam na melhoria da taxa de dissolução, um dos motivos para o estudo deste sistema<sup>35</sup>.

Modelos teóricos foram desenvolvidos para a determinação da composição eutética, no entanto, devido à robustez das técnicas não foram estabelecidos em literatura<sup>35</sup>.

O conhecimento do diagrama de fases é de importância primordial no entendimento dos sistemas binários. Comumente, o diagrama de fases deve ser a primeira etapa estabelecida antes da investigação do sistema em maiores detalhes, pois sem este detalhamento, a discussão sobre o sistema binário é pouco vantajoso<sup>36</sup>.

O diagrama de fases é construído para se estudar a relação entre a fusão dos componentes sólidos e a composição do sistema<sup>37</sup>.

Um padrão comum de diagrama de fases binário pode ser observado na **Figura 3**.



**Figura 3:** Modelo de um diagrama de fases de uma mistura eutética.

De acordo com a **Figura 3**, as linhas ab e bc são consideradas curvas de solubilidade. A redução da temperatura abaixo do ponto eutético causará a supersaturação de ambos os compostos. Portanto, a mistura eutética de ambas as substâncias envolvidas se precipitará em pequenas e finas partículas<sup>38</sup>.

Abaixo da linha que determina a temperatura eutética, apenas haverá a mistura na fase sólida, e acima dela apenas líquido. Antes do ponto eutético haverá uma mistura entre o sólido  $\alpha$  e componente fundido; e após este mesmo ponto,  $\beta$  e líquido coexistirão<sup>38</sup>.



## 2. OBJETIVOS GERAIS

O principal objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar uma mistura eutética com aplicação terapêutica a partir de um material de origem natural.

O material escolhido para este trabalho foi o eugenol (EUG), óleo essencial extraído por hidrodestilação dos botões secos do cravo da Índia. Este óleo sofreu uma modificação em sua estrutura devido a problemas com relação à solubilidade em meio aquoso e foi convertido a acetato de eugenila (AE).

Após a modificação, o acetato de eugenila foi empregado como princípio ativo no desenvolvimento de uma mistura eutética, cuja principal finalidade é melhorar a estreita relação entre a sua solubilidade e biodisponibilidade.

### 2.1 *Objetivos específicos*

- ✓ Extrair o óleo essencial, eugenol.
- ✓ Sintetizar o acetato de eugenila utilizando o eugenol como reagente de partida.
- ✓ Estudar misturas binárias formadas pelo acetato de eugenila e o polietilenoglicol.
- ✓ Construir um diagrama de fases e encontrar a mistura eutética.

✓ Caracterizar todas as amostras estudadas por Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear, Cromatografia Gasosa, Calorimetria Exploratória Diferencial, Difratometria de Raios X e Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura.

## **CAPÍTULO 2**

*Parte Experimental*

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Cravo da Índia**

Os botões secos do cravo da Índia foram adquiridos a granel em um supermercado da cidade de São Carlos, o qual foi escolhido aleatoriamente. Nenhuma marca específica foi escolhida.

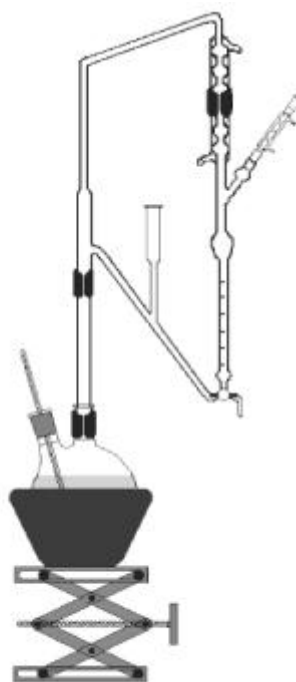
#### **3.2 Padrão de Eugenol**

O padrão de eugenol utilizado neste estudo foi comprado da Fluka, com pureza de 99% (CG). As propriedades físicas fornecidas em laudo são a temperatura de ebulição em 253° C e densidade de 1,066 g mL<sup>-1</sup>.

#### **3.3 Extração do óleo essencial**

Os parâmetros de extração foram otimizados. A parte da planta escolhida para a extração foi os botões secos de cravo-da-Índia do *Syzygium aromaticum* L.

Este material foi hidrodestilado por 5 horas à temperatura de 100° C, utilizando o aparato do modelo Clevenger modificado, desenvolvido na Universidade de São Paulo, pelo Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros (GQATP) no Instituto de Química de São Carlos (IQSC). O aparato Clevenger modificado pode ser visualizado na **Figura 4**.



**Figura 4:** Ilustração do aparato de extração Clevenger modificado pelo grupo GQATP.

O melhor parâmetro de extração do óleo essencial encontrado foi 20 g de botões de cravo-da-índia em 200 mL de água, a qual foi usada como solvente sempre em proporção de 1:2 (w/w). O óleo obtido foi seco em sulfato de sódio anidro e armazenado em temperatura sub-ambiente (-5° C).

A densidade calculada do óleo obtido é 1,0331 g/mL, a uma temperatura de 26,4 °C e 43% de umidade.

### **3.4 Caracterização físico-química do óleo essencial e acetato de eugenila**

#### **3.4.1 Cromatografia Gasosa (GC)**

Os parâmetros usados neste método foram baseados no ponto de ebulição das amostras. A identificação dos componentes do óleo extraído foi estabelecida pela comparação dos índices de tempo de retenção com suas amostras referência.

O equipamento usado para analisar todas as amostras foi um cromatógrafo Shimadzu modelo GC-2010 equipado com detector de ionização de chama (FID) e o auto-injetor AOC-20I (Shimadzu).

A separação foi feita em coluna capilar de polaridade média RTX-5MS, com comprimento de 30 m, diâmetro de 0,25 mm e espessura de filme de 0,25 µm.

As condições de temperaturas do injetor e detector foram 280 e 300 °C, respectivamente. A programação do forno foi composta de duas etapas, a primeira iniciou-se a 100 °C até 280 °C, com razão de aquecimento de 8 °C min<sup>-1</sup>, e então de 230 °C até 280 °C à 15 °C min<sup>-1</sup>. Em seguida, o experimento foi mantido a temperatura constante de 300 °C por 2 minutos.

O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste com vazão de 30 mL min<sup>-1</sup>.

Uma solução padrão com concentração  $2,6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada usando a amostra do padrão de eugenol. Algumas soluções foram estabelecidas com uma proporcionalidade linear entre concentrações de  $5,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Outra solução foi preparada empregando o óleo extraído do *Syzygium aromaticum* L, com objetivo de determinar sua concentração pela relação entre a área de pico e a curva analítica do padrão de eugenol.

### 3.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os estudos térmicos por Calorimetria Exploratória Diferencial foram realizados em amostras de eugenol (EUG) e acetato de eugenila (AE), utilizando diferentes condições experimentais.

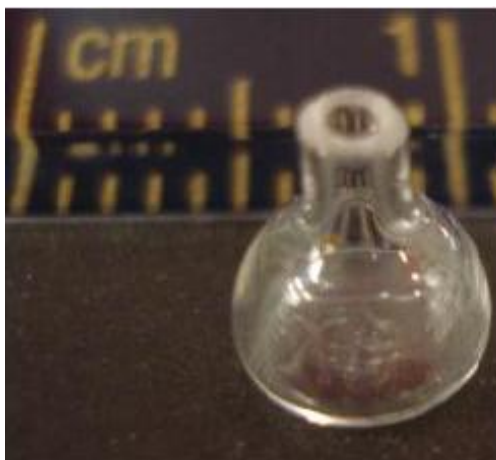
Os experimentos realizados para as amostras contendo eugenol utilizaram o módulo Calorimétrico DSC-910 conectado ao sistema de resfriamento com nitrogênio líquido (LNCA) (TA Instruments).

As temperaturas inicial e final estabelecidas para este estudo foram 100 e 350 °C, respectivamente, com razão de aquecimento ideal de  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . A massa da amostra de eugenol foi 17 mg. Atmosfera de nitrogênio foi empregada para todos os experimentos, com vazão de  $50 \text{ mL min}^{-1}$ .

Portas-amostra confeccionados em vidro com capacidade de 20  $\mu\text{L}$  foram utilizados nos experimentos com amostras de óleos, os quais podem ser visualizados na **Figura 5**<sup>3,39</sup>. Cada suporte de vidro é composto por uma base de forma arredondada

onde a amostra é colocada, e um capilar onde se insere a amostra líquida com auxílio de uma agulha e uma seringa de 1.0 mL. Os suportes foram organizados e agrupados em pares pela similaridade de massas, sendo que um foi preenchido com a amostra, e outro foi usado como suporte referência.

Estes portas-amostra foram desenvolvidos na Universidade de São Paulo, pelo Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros (GQATP) do Instituto de Química de São Carlos<sup>39</sup>.



**Figura 5:** Fotografia do porta-amostra confeccionado em vidro

Os experimentos realizados para as amostras de acetato de eugenila referência (AEr) e a amostra sintética (AEs) foram realizados em DSC 822 Mettler, acoplado ao robô TS0801RO e ao controlador de gás TS0800GC1. O sistema de refrigeração empregado foi o EK 90/MT (HAAKE). As massas das amostras, com aproximadamente 7,5 mg foram pesadas e seladas em porta-amostra de alumínio de 40  $\mu$ L.



Estas amostras foram submetidas a uma programação de aquecimento e resfriamento, com razão de aquecimento de  $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . O programa foi iniciado com o resfriamento da amostra até  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e então aquecimento até  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Este procedimento representa um ciclo da programação, o qual foi repetido por mais duas vezes. Todas as medidas foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio com vazão de  $50\text{ mL min}^{-1}$ .

Outra programação foi realizada para uma melhor definição do comportamento térmico da amostra do AEr. As condições experimentais foram as mesmas, exceto pela adição de uma etapa isotérmica a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos entre cada segmento do experimento total. Esta nova etapa garante a eliminação de todos os cristais contidos na amostra.

### **3.4.3 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)**

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos no equipamento do modelo Nicolet-5SXC, e foram registrados na região de  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ . Todas as pastilhas usadas no experimento de FTIR foram preparadas usando brometo de potássio (KBr) anidro. As amostras líquidas foram diluídas em KBr e, então, preparadas seguindo o mesmo procedimento.

#### 3.4.4 Ressonância Magnética Nuclear ( $^{13}\text{C}$ NMR)

Os espectros de RMN foram realizados em espectrômetro Bruker AC 200 à temperatura de 298K, trabalhando no modo da transformada de Fourier a 50.32 MHz para o  $^{13}\text{C}$ . As amostras foram dissolvidas em clorofórmio usando tubos de 5 mm. O deslocamento químico foi gravado utilizando o pico de solvente residual de clorofórmio a 77 ppm como referência.

Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  convencionais foram adquiridos usando a profundidade de espectro digitalizado de 12.500 MHz, com pontos de dados de 32K e pulso de 4  $\mu\text{s}$  (ca. ângulo de rotação de  $45^\circ$ ), com tempo de aquisição de 1,04 s e número de *scan* com intervalo entre 8000 e 10000. Os FIDs foram condicionados usando multiplicação exponencial com fator de ampliação de linha prévia de 3 Hz para a transformada de Fourier.

#### 3.4.5 Difratomia de Raios X de Monocristal

O experimento difração de Raios X foi realizado apenas para amostras de AEr, em virtude de estar no estado sólido a temperatura ambiente, condição necessária para a realização do experimento.

Os cristais do AEr foram formados durante o armazenamento da amostra em refrigerador, cuja temperatura é sub-ambiente em aproximadamente  $-5^\circ\text{C}$ , devido à sua instabilidade à temperatura ambiente e à luz. Nenhum procedimento foi realizado para o

crescimento de cristais. A redução da temperatura durante o armazenamento favoreceu a nucleação e crescimento dos cristais. Após o período de crescimento, as amostras de cristais unitários foram selecionadas baseadas no contorno e tamanho do monocristal.

Uma vez com os monocristais, a coleta de dados foi realizada um difratômetro do tipo kappa CCD da Enraf-Nonius, no qual a radiação Mo K $\alpha$  ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ) foi monocromatizada pelo uso de um cristal de grafite.

Os parâmetros finais da unidade de cela foram baseados em todas as reflexões. A coleta de dados foi feita usando o programa COLLECT<sup>40</sup>; integração e dimensionamento de reflexões foram realizados com o sistema de programação Denzo-Scalepack HKL<sup>41</sup>. As correções de absorção não foram feitas. A estrutura foi esclarecida pelos métodos diretos com SHELXS-97<sup>42</sup>. Todos os átomos de hidrogênio foram posicionados e refinados pelo modelo de amontoamento. A **Figura 17** foi preparada usando ORTEP-3 pelo Windows<sup>43</sup>.

### 3.4.6 Difração de Raios X pelo método do Pó

Este experimento foi empregado para a avaliação do difratograma do AE obtido pela síntese do óleo extraído EUG, logo não foi possível realizar a difração de Raios X de monocristal para esta amostra.

A amostra de AE foi colocada em um suporte específico para obtenção do difratograma de amostras em pó. Entretanto, a amostra de AE estava na forma líquida, e esta foi gotejada no espaço determinado para amostra. Em seguida, o suporte foi

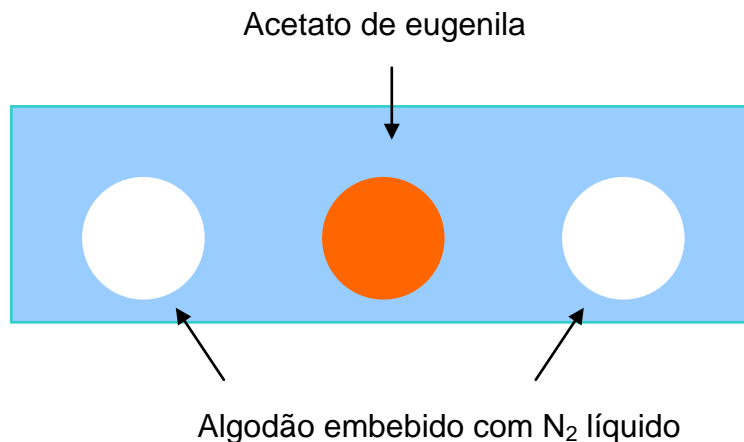
imerso em nitrogênio líquido, e a amostra foi bruscamente cristalizada. Os cristais formados permaneceram inalterados após a temperatura ambiente restabelecida, em condições normais de temperatura e pressão. Logo, estes cristais foram empregados na realização deste ensaio.

Os difratogramas de Raios X foram obtidas em PANalytical X'Pert Pro MPD, operando em radiação de  $\text{CuK}\alpha$ , 45 kV, 40 mA, e sem monocromatizador. A coleta de dados foi gravada no intervalo de  $2\theta = 10 - 70^\circ$  com etapa de  $0.02^\circ$ , e 5 segundos/etapa.

### 3.4.7 Microscopia Óptica

As imagens das amostras foram obtidas utilizando uma câmera Sony de alta resolução CCD-Iris, e o microscópio Olympus BHA para o aumento das imagens.

Uma pequena porção de AEr fundido foi colocada no centro de uma lâmina de vidro, e esta lâmina resfriada com duas bolas de algodão, as quais foram imersas em nitrogênio líquido, como pode ser visualizado na **Figura 6**. Cada bola de algodão foi disposta em uma lateral da lâmina de vidro e substituída após retornar a temperatura ambiente. As imagens foram feitas durante o crescimento do cristal de acetato de eugenila em temperatura sub-ambiente.



**Figura 6:** Figura representando a lâmina de vidro usada na microscopia óptica

### **3.5 Preparação dos Eutéticos**

Os eutéticos foram preparados empregando o acetato de eugenila como princípio ativo da mistura e polietilenoglicol 3350 e uréia como carreadores hidrossolúveis.

A técnica utilizada na preparação dos eutéticos foi o método de solvente. A mistura física do acetato de eugenila e o carreador foram pesados em diferentes proporções, variando-se a proporção entre 0% a 100% de cada constituinte.

O solvente usado nesta reação foi o etanol PA. Após a adição do solvente, a mistura foi agitada até completa dissolução dos componentes. As misturas foram aquecidas em chapa de aquecimento a temperaturas moderadas de aproximadamente 65-70 °C, até completa evaporação do solvente.

As amostras obtidas foram armazenadas em dessecador por 24 horas, e então levadas à temperatura sub-ambiente de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 4 dias. Após este procedimento, as misturas foram homogeneizadas e trituradas, e então armazenadas em frascos plásticos.

### **3.6 Caracterização das misturas**

#### **3.6.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

Todas as misturas binárias foram caracterizados por DSC. O equipamento utilizado foi DSC 822 Mettler, acoplado ao robô TS0801RO e ao controlador de gás TS0800GC1. O sistema de refrigeração empregado foi o EK 90/MT (HAAKE). Amostras de aproximadamente 10 mg foram pesadas e seladas em porta-amostra de alumínio de volume de 100  $\mu\text{L}$ .

Os ensaios foram feitos usando uma rampa de aquecimento, com temperaturas inicial e final de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

Os experimentos foram realizados em diferentes razões de aquecimento, como  $2,5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ,  $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  e  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; e sob atmosfera de nitrogênio, com vazão de  $50\text{ mL min}^{-1}$ .

As calibrações de temperatura e o fluxo de calor para o instrumento foram executados usando índio e dodecano.

As temperaturas inicial e final para o dodecano foram de -40 a 40 °C, com uma razão de aquecimento de 5 °Cmin<sup>-1</sup>. As temperaturas de pico e onset obtidas foram -6,8 °C e -8,8 °C, respectivamente; já a variação de entalpia do evento de fusão foi 194, 2 J g<sup>-1</sup>.

No entanto, as temperaturas inicial e final do índio foram 100 a 200 °C, e a razão de aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup>. As temperaturas de pico e onset para o índio foram respectivamente 158,1 e 157,8 °C, e a variação de entalpia de 24,5 J g<sup>-1</sup>.

### **3.6.2 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)**

Os espectros de FTIR das misturas foram obtidos utilizando o espectrofotômetro Perkin-Elmer Instruments Spectrum GX. As misturas eutéticas foram previamente trituradas e homogeneizadas junto ao brometo de potássio anidro (KBr), a uma baixa razão de peso.

Os pós das misturas e o KBr foram comprimidos a pastilhas usando uma prensa hidráulica a uma pressão de 5 toneladas. Os espectros foram registrados no intervalo de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>.

### **3.6.3 Microscopia Óptica**

As diferentes concentrações das misturas binárias de acetato de eugenila e PEG foram observadas através de um microscópio óptico conectado a uma câmera fotográfica. As imagens foram ampliadas e comparadas entre elas mesmas, as quais foram analisadas e fundamentadas em sua forma e no tamanho de seus cristais. As amostras foram colocadas em lâmina de vidro para observação, em seguida observadas e fotografadas em três diferentes magnificações, que são 100x, 200x e 400x.

### **3.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica que permite a visualização da superfície de amostras volumosas, através da sua varredura com um feixe de elétrons.

As foto micrografias de MEV foram obtidas em um equipamento LEO (modelo 440) com detector OXFORD, operando com feixe de elétrons de 20kV. As amostras foram recobertas com 10 nm de ouro em um metalizador chamado Coating System BAL-TEC MED 020 e mantidas em dessecador até o momento de análise.

Todas as misturas binárias obtidas pela síntese dos eutéticos foram analisadas e comparadas.



### 3.6.5 Difractometria de Raios X pelo método do pó

Algumas misturas foram selecionadas e utilizadas neste experimento com objetivo de demonstrar as interações entre o princípio ativo e o carreador.

Os difratogramas de Raios X foram obtidas em PANalytical X'Pert Pro MPD, operando em radiação de  $\text{CuK}\alpha$ , 45 kV, 40 mA, e sem monocromatizador. Os dados foram obtidos no intervalo de  $2\theta = 10 - 70^\circ$  com etapa de  $0.02^\circ$ , e 5 segundos/etapa.

## **CAPÍTULO 3**

### *Resultados e Discussão*

## 4. Resultados de caracterização para o eugenol e acetato de eugenila

### 4.1 Extração do Óleo Essencial

A determinação das condições de extração de óleos voláteis é uma etapa muito importante no desenvolvimento deste estudo, pois o procedimento é um fator determinante na relação entre a composição química e a qualidade do óleo extraído.

Os parâmetros de extração de eugenol foram estudados pela variação de algumas condições experimentais, como por exemplo, o tempo de extração, massa da amostra, temperatura e volume de solvente. Estes resultados podem ser vistos na

#### **Tabela 1.**

**Tabela 1:** Estudo dos parâmetros de extração do óleo essencial

Massa de cravo	Tempo de extração	Volume obtido
20 g	2 horas	0.47 mL
20 g	3 horas	1.54 mL
20 g	4 horas	0.75 mL
20 g	5 horas	2.39 mL
20 g	6 horas	2.03 mL

A água foi o solvente indicado devido à sua universalidade, evitando contaminação do produto extraído por solvente, e eliminando a etapa de purificação durante sua utilização.

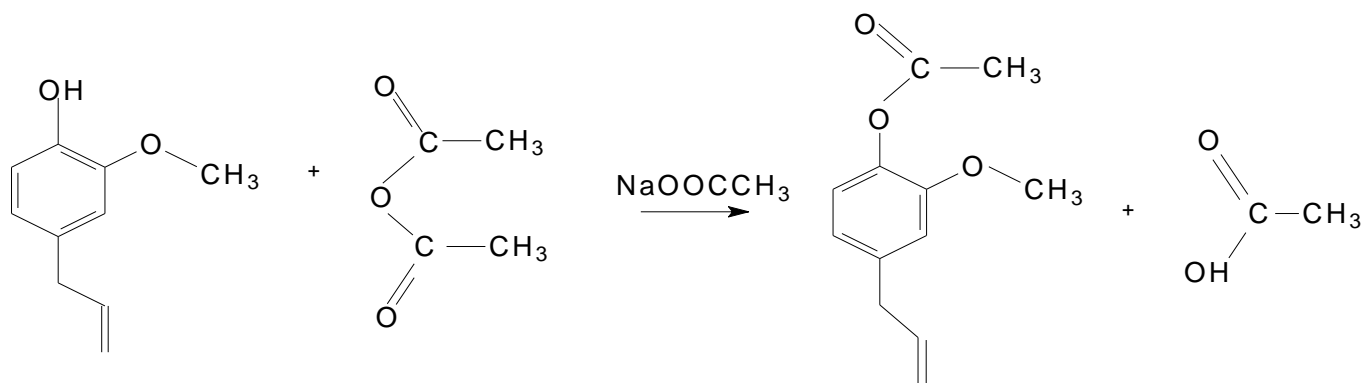
O melhor parâmetro de extração utilizou 20 g de massa de cravo da Índia, 200 mL de água, por 5 horas em um sistema de extração chamado Clevenger modificado responsável pela hidrodestilação do óleo a 100 °C.

Posteriormente, o produto obtido foi coletado e seco em sulfato de sódio anidro. O óleo foi armazenado em frasco de vidro, protegido de luz e em temperatura sub-ambiente.

#### ***4.2 Derivado do Óleo: Acetato de Eugenila***

A composição química tem uma importante influência na qualidade do composto sintético e em sua subsequente aplicação. O composto sintético, acetato de eugenila foi obtido pela substituição do grupo hidroxila pelo acetato, o qual resultará possivelmente no melhoramento das características do eugenol, portanto favorecendo suas futuras aplicações.

As amostras de acetato de eugenila foram sintetizadas como descrita por Moucherek, e armazenadas em frasco selado, em refrigerador com finalidade de conservação a baixas temperaturas<sup>18</sup>. A reação desenvolvida pode ser visualizada na **Figura 7**.



**Figura 7: Reação de síntese do acetato de eugenila.**

O acetato de eugenila referência (AEr) foi sintetizado a partir do eugenol padrão (EUGp), seguindo procedimento já descrito. O AEr cristalizou-se espontaneamente dentro do frasco de vidro, quando armazenado à temperatura sub ambiente.

O acetato de eugenila sintético (AEs) foi sintetizado a partir do óleo extraído do *Syzygium aromaticum* L, seguindo a mesma metodologia da amostra de referência.

No entanto, o acetato de eugenila sintético não se cristalizou por completo quando armazenado em refrigerador a aproximadamente  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , devido à sua temperatura de solidificação ser inferior à temperatura alcançada neste local. Em outras palavras, o evento da cristalização não é completo, uma vez que a temperatura necessária para a cristalização do composto sintético não é a mesma temperatura de cristalização de sua referência, e esta não é atingida pelo refrigerador.

Entretanto, é possível notar uma pequena fase cristalina dentro da porção líquida do AEs.

Esta diferença de temperatura de cristalização está correlacionada com o grau de pureza encontrada na amostra de AEr, que é aproximadamente 99,9%. Contudo, a pureza encontrada no AEs a partir do óleo bruto (EUG) é aproximadamente de 98%.

Portanto, os componentes em menor quantidade do AEs são responsáveis pelas mudanças nos parâmetros físico-químicos entre ambos os AEr e AEs, mesmo que esta porcentagem seja muito pequena, aproximadamente 2% do volume total<sup>6</sup>.

Este comportamento é alterado em virtude destes outros constituintes agirem como um único e diferente componente do óleo, cuja presença modifica todas as características da amostra. Isto confere particularidade à amostra obtida, pois seu comportamento é determinado pelo conjunto de componentes, do AEs e dos constituintes em pequenas proporções.

Alguma das mudanças encontradas entre as amostras de acetato de eugenila referência e sintético são as temperaturas de fusão e cristalização, que estão diretamente relacionadas ao estado em que se encontram quando a temperatura ambiente. Estas mudanças são características de cada amostra serão discutidas nos próximos tópicos.

### **4.3 Cromatografia Gasosa**

A maioria dos óleos essenciais comercializados é qualificada e quantificada pela Cromatografia Gasosa, pois esta técnica está diretamente relacionada à volatilidade dos compostos, característica esta marcante nos óleos essenciais.

Este método cromatográfico é muito eficiente e apresenta sensibilidade aprimorada quando comparado a outros métodos relatados<sup>44</sup>.

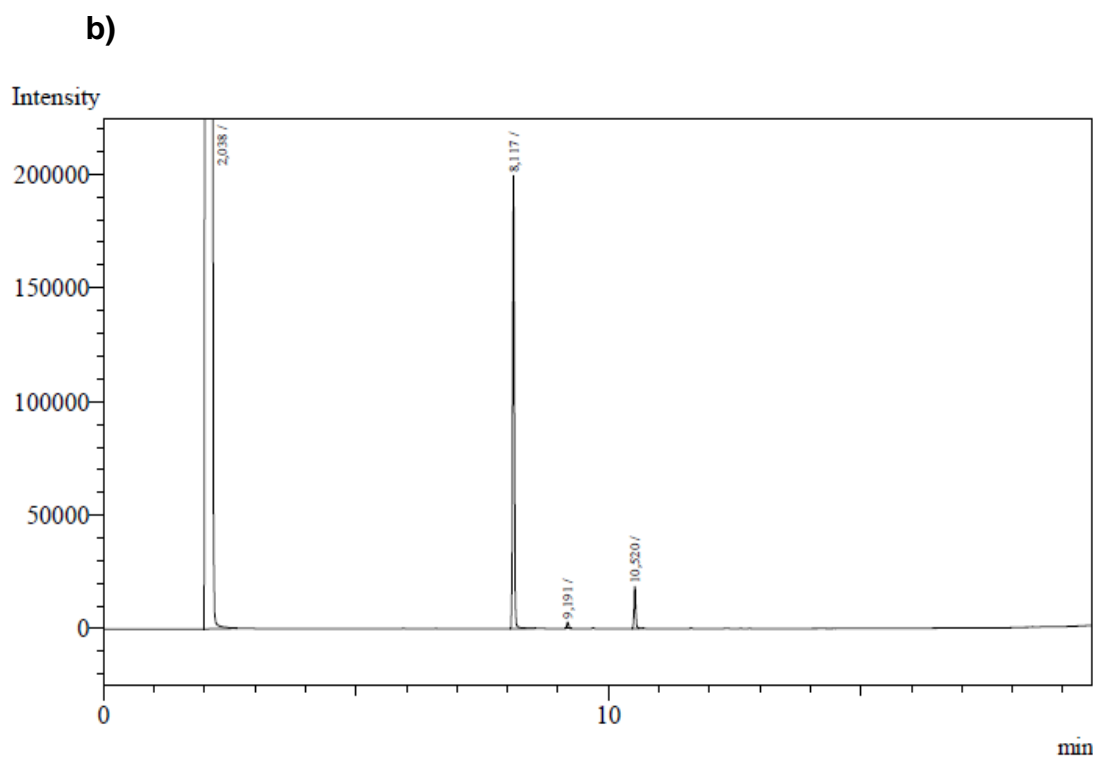
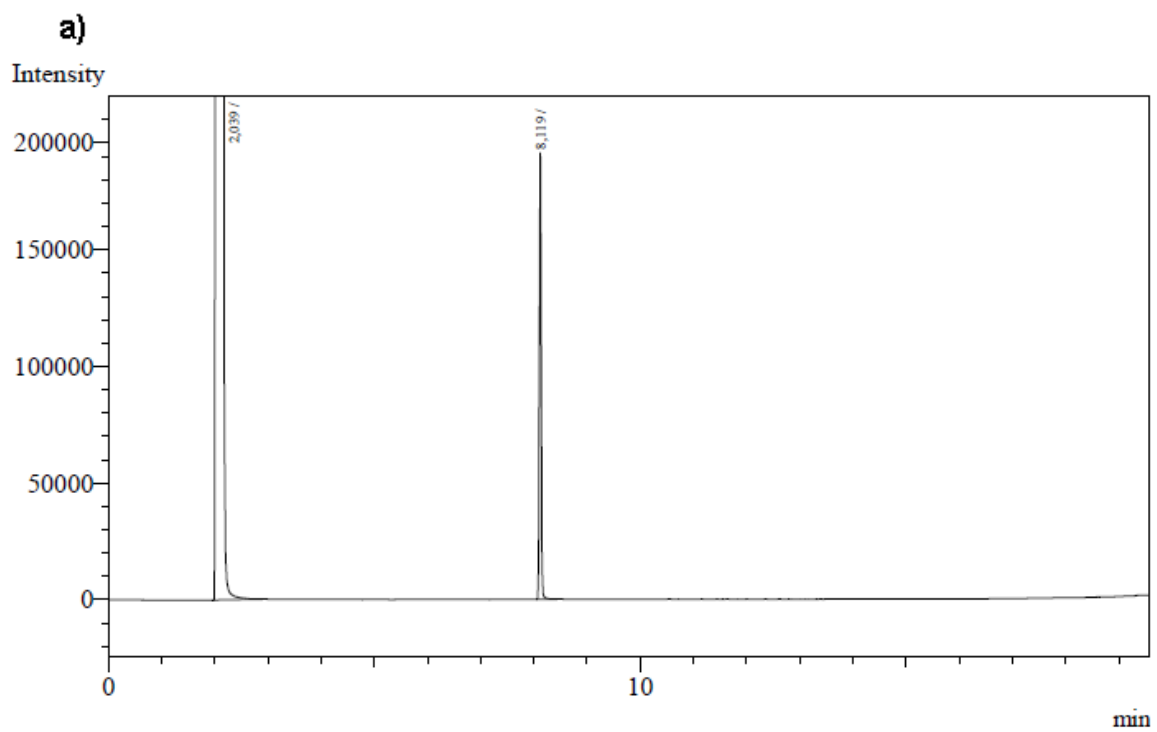
Devido à ampla utilização da técnica cromatográfica na rotina de análises do óleo essencial, é importante e necessário que os estes métodos sejam bem desenvolvidos e cuidadosamente validados<sup>44</sup>.

#### 4.3.1 Eugenol

Os resultados obtidos por cromatografia gasosa para o eugenol padrão (EUGp) e óleo extraído do *Syzygium aromaticum* L (EUG) foram comparados e podem ser vistos na **Figura 8a** e **8b**.

O cromatograma do EUGp apresentou um pico agudo com tempo de retenção em aproximadamente 8,119 minutos correspondente ao eugenol.

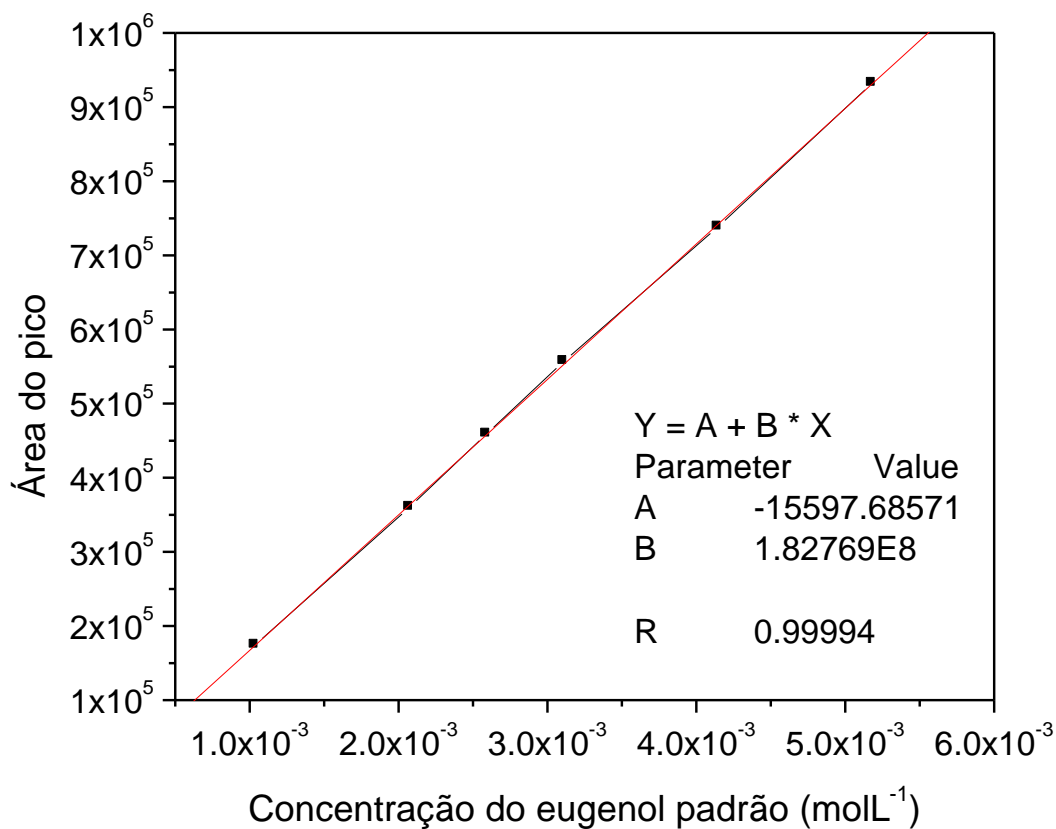
Contudo, o cromatograma do EUG exibiu três picos bem definidos. O pico majoritário e com menor tempo de retenção em 8,117 min está associado à presença de eugenol pela correlação entre seu tempo de retenção e da amostra padrão. Os outros dois picos apareceram com tempos de retenção em 9,191 e 10,520 min, os quais correspondem a diferentes componentes obtidos juntamente com o eugenol durante o processo de extração.



**Figura 8:** a) Cromatograma do EUGp; b) EUG extraído do *Syzygium aromaticum* L.



A curva analítica a partir do EUGp e os parâmetros estatísticos encontrados em sua quantificação por CG podem ser vistos na **Figura 9**.



**Figura 9:** Curva analítica para o padrão de eugenol

Avaliando os resultados obtidos pela técnica cromatográfica e a curva analítica, a concentração de eugenol no óleo essencial extraído foi de  $2,66 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Este resultado está adequadamente ajustado ao intervalo de concentração, uma vez que os elementos não desviam da curva analítica.

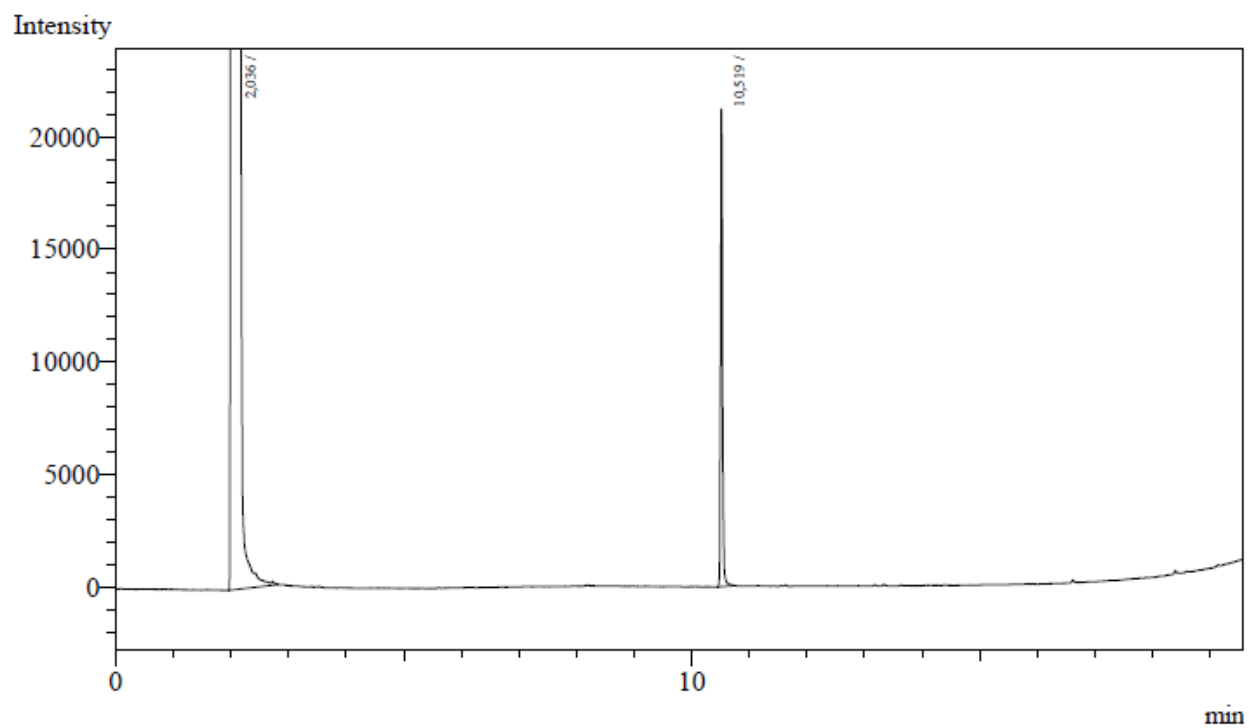
Os resultados de repetibilidade e precisão encontrada neste experimento são oportunos, desde que estes estejam dentro de uma faixa satisfatória de 5% para os métodos de cromatografia.

#### 4.3.2 Acetato de eugenila

O cromatograma do AEr está representado na **Figura 10a**, o qual apresenta apenas um pico com tempo de retenção em 10,519 relacionado à presença de acetato de eugenila.

Todavia na Figura seguinte, **Figura 10b**, nota-se a presença de um composto majoritário com tempo de retenção em 10,526 min, que corresponde ao AEs. Esta correlação é feita com base na semelhança com o tempo de retenção da amostra AEr. Outros picos de menor intensidade estão presentes neste produto sintético em virtude da ausência de processos de purificação no óleo extraído.

a)



b)

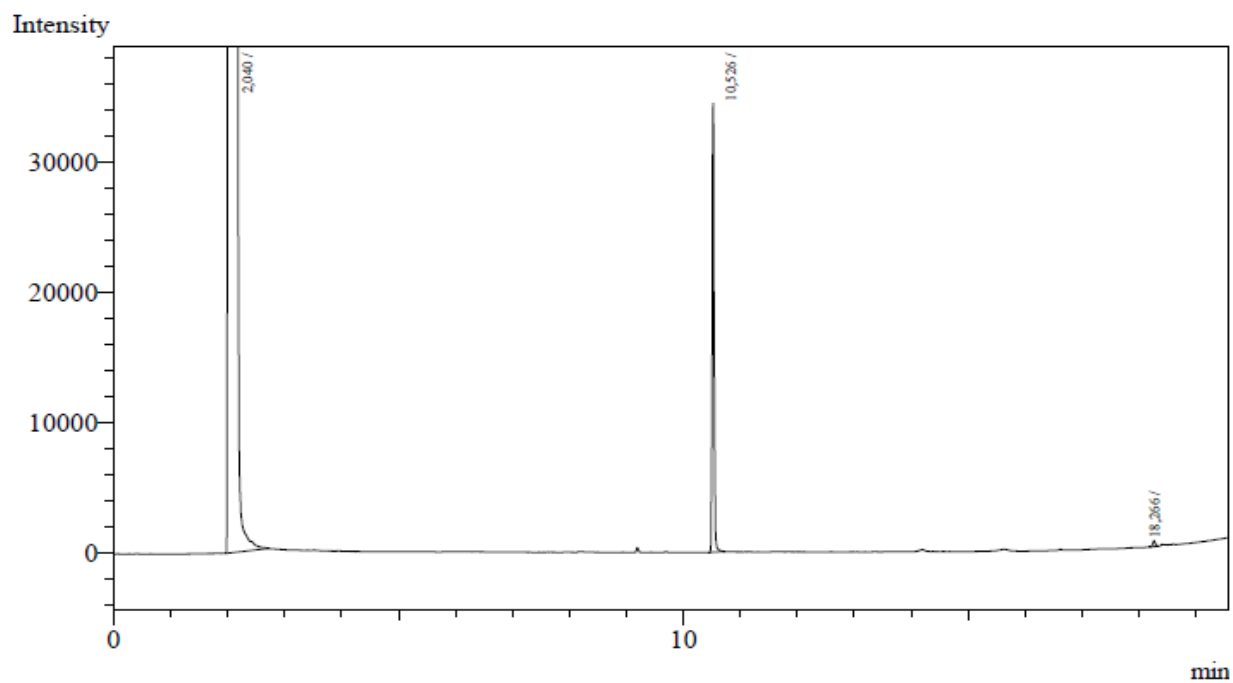


Figura 10: Cromatograma do acetato de eugenila a) referência e b) sintético

Observando a **Figura 8b** nota-se que o segundo pico com maior intensidade possui tempo de retenção semelhante ao AE, isto significa que o óleo extraído contém uma pequena porcentagem de acetato de eugenila, e após a síntese, o AE existente no óleo extraído é somado ao acetato de eugenila resultante da síntese.

Esta técnica esclarece a composição das amostras envolvidas e ainda determina quantitativamente sua composição. Ainda, fundamentado nos resultados encontrados percebe-se a eficiência do procedimento realizado devido à transformação completa do eugenol presente no óleo extraído a acetato de eugenila.

#### ***4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial***

##### **4.4.1 Eugenol**

A Calorimetria Exploratória Diferencial é uma técnica apropriada e útil na realização de medidas e caracterização das propriedades térmicas de materiais<sup>45</sup>. O emprego da análise térmica em óleos e gorduras tem sido estudado, sugerindo uma valiosa ferramenta para a caracterização de óleos proveniente de recursos vegetais<sup>46</sup>.

Óleos não têm temperatura de fusão, preferivelmente, eles fundem em uma faixa de temperatura, tão logo um método dinâmico é importante para estimar o processo de fusão. Esta mudança pode não ser visível a olho nu, mas pode ser estudada por meios físicos como por DSC<sup>47</sup>.

Durante o estudo do comportamento térmico de óleos, mostrou-se de grande importância a geometria do porta-amostra empregado nestas análises. O suporte tem papel fundamental no perfil da curva de DSC, pois é considerado um dos parâmetros que influenciam o aspecto destas curvas.

As amostras de EUGp e EUG foram estudadas utilizando o porta-amostra de vidro visto que favorece a definição e os perfis das curvas de DSC<sup>39</sup>.

Esta técnica foi usada por Chaar et al. (2004), no GQATP, em estudos de outros produtos naturais, como por exemplo, o linalol. Neste estudo, a temperatura de pico e a entalpia de ebulição foram  $(195 \pm 1) ^\circ\text{C}$  e  $(172 \pm 1) \text{ Jg}^{-1}$ , respectivamente para cinco corridas sucessivas.

Mesmo com trabalhos abordando este assunto, realizaram-se estudos empregando diferentes portas-amostra, como de alumínio e vidro. Contudo, as condições experimentais e amostras foram mantidas iguais. Os resultados para cada suporte foram comparados.

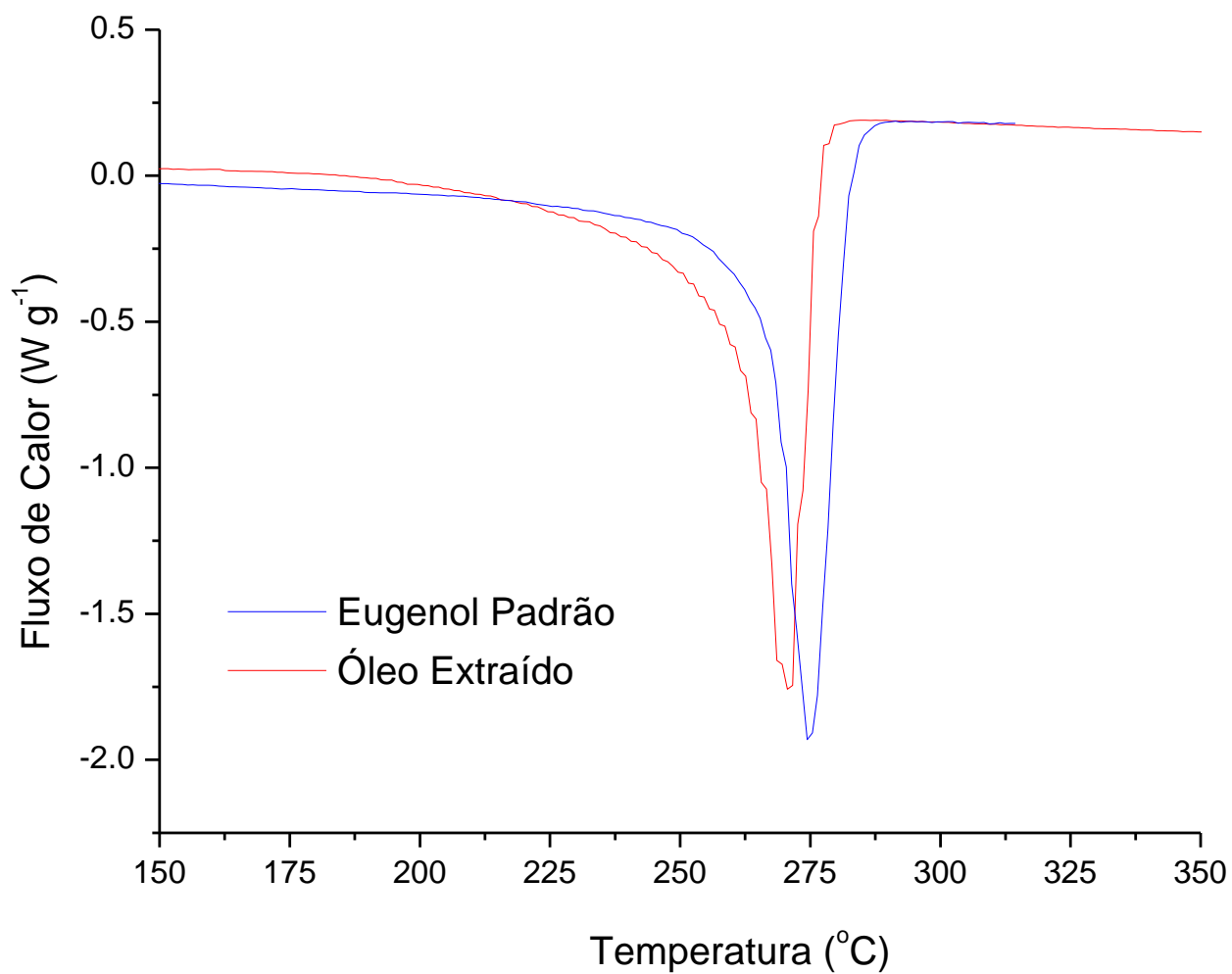
Observando a curva obtida utilizando o porta-amostra de vidro é evidente a presença de um pico agudo e bem definido, e uma temperatura mais precisa para amostras com características lipofílicas, como por exemplo, os óleos voláteis.

Este resultado não foi obtido nas análises empregando porta-amostra de alumínio, cujos picos apresentaram-se mais largos e menos definidos.

As mudanças na linha de base foram observadas para ambos os experimentos com suportes diferentes realizados com amostras voláteis.

As curvas de DSC estudados em suporte de vidro do EUGp e do EUG podem ser vistos na **Figura 11**. Ambas as curvas exibiram um evento endotérmico agudo e

bem definido, os quais se localizam no mesmo intervalo de temperatura. Este evento é atribuído ao processo de ebulição do eugenol.



**Figura 11:** Curvas de DSC obtidas a 10 °C min<sup>-1</sup> para o eugenol padrão e o óleo extraído do *Syzygium aromaticum* L utilizando porta-amostra de vidro.

Baseado nesta figura nota-se que o EUGp apresentou uma curva mais intensa do que o observado para o EUG. Além disso, o processo completo de ebulição do EUGp compreende uma região mais estreita de temperatura.

Deste modo, o suporte confeccionado em vidro originou bons resultados com a presença de picos agudos e bem definidos, permitindo a determinação da temperatura de ebulição mais precisa.

A área de pico, a temperatura e a entalpia de ebulição foram obtidos utilizando a opção integrar pico linear do programa Universal Analysis (2000) V4.5<sup>a</sup> (TA Instruments).

Os dados para o processo de ebulição do EUGp foram 274,5 °C para a temperatura de pico ( $T_p$ ), 241,5 °C temperatura onset ( $T_o$ ) e entalpia de ebulição ( $\Delta H_f$ ) de 284,0 Jg<sup>-1</sup>. Os dados resultantes para o EUG foram similares aos do padrão. Isto indica o mesmo evento, mas com algumas mudanças importantes nas propriedades térmicas, como o intervalo de temperatura de ebulição e a energia requerida neste evento. Os dados de ebulição foram  $T_p$  270,2 °C,  $T_o$  de 234, 2 °C e  $\Delta H_f$  de 244,1 Jg<sup>-1</sup>.

A diferença das temperaturas entre o EUGp e EUG é devido à utilização do óleo essencial extraído sem purificação prévia, portanto a presença de outros componentes causam variações físicas e químicas, como ocorrido com as variações de temperaturas e energia.

Assim sendo, mesmo os constituintes em menores concentrações dos óleos essenciais têm importante influência nas características físico e químicas do óleo total, mesmo quando representa apenas 2% do volume total. Eles podem ser considerados impurezas, pois não apresentam interesse neste estudo e ainda se comportam como

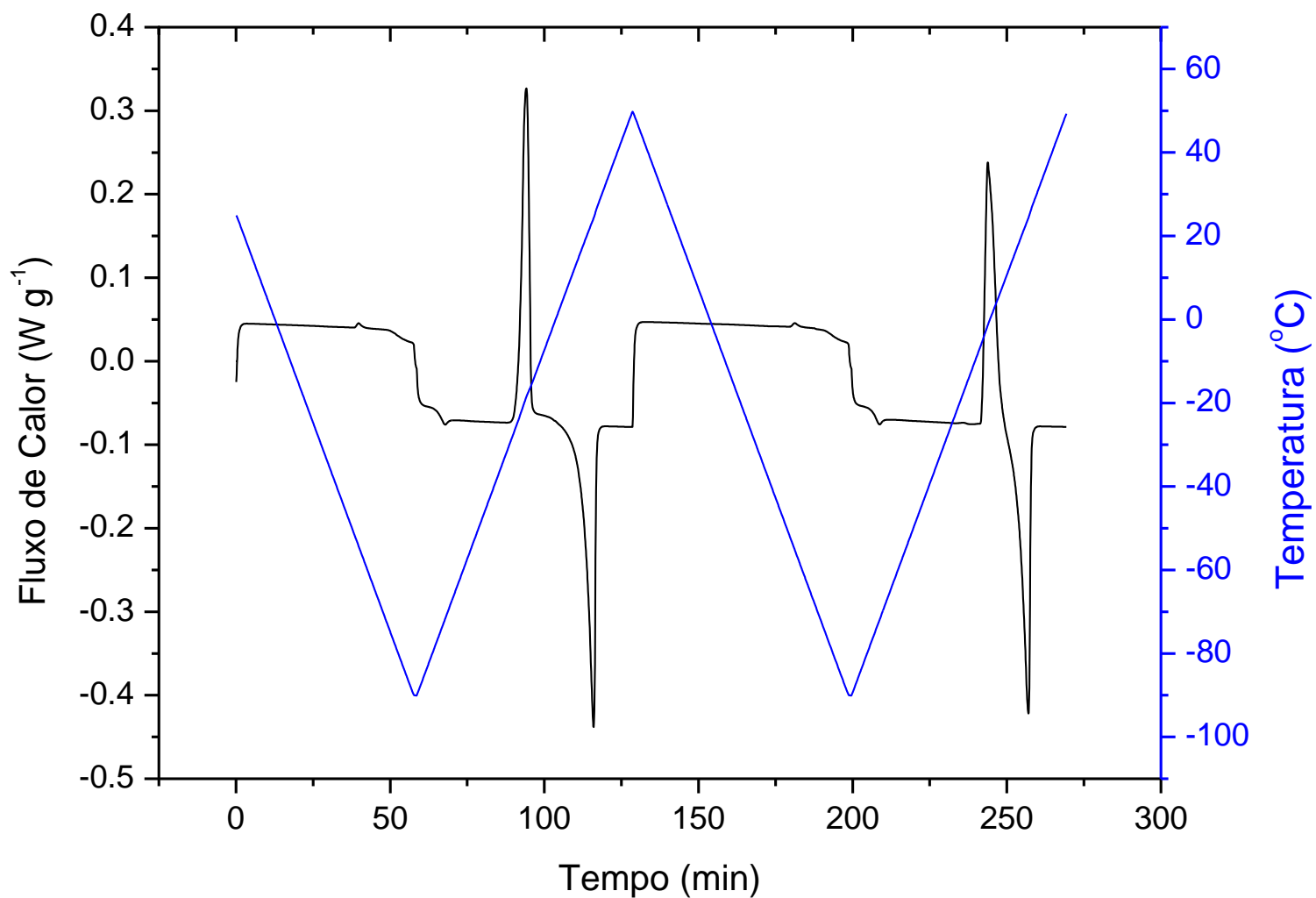
um segundo componente, alterando as propriedades originais do óleo puro, e assim conferindo particularidade aos óleos essenciais.

#### **4.4.2 Acetato de eugenila**

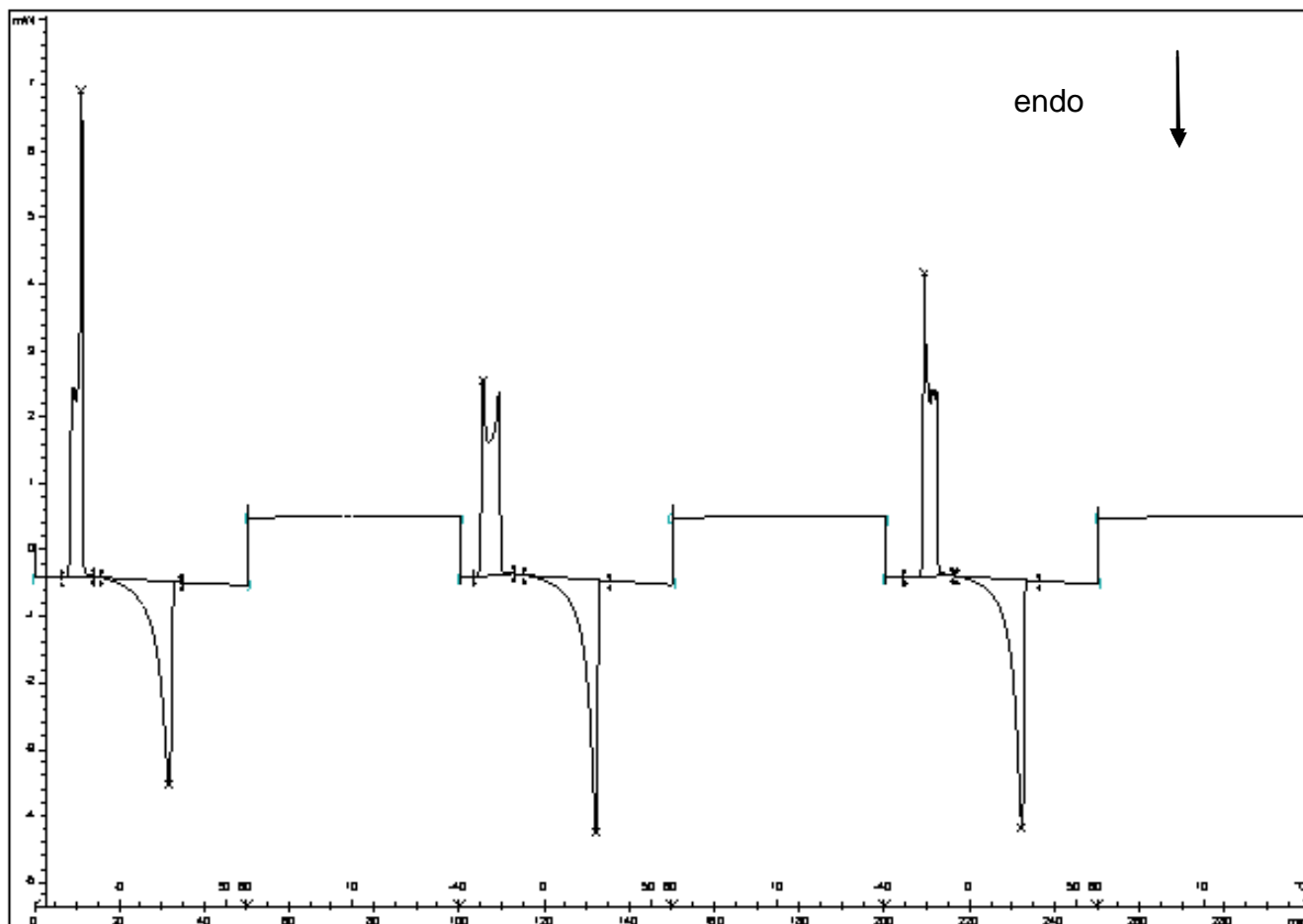
Os ensaios de análise térmica desenvolvida para o acetato de eugenila utilizaram metodologia e porta-amostra diferente do aplicado para as amostras de óleo essencial, pois esta amostra não se comporta inteiramente como óleo essencial.

As curvas de DSC do acetato de eugenila referência e sintético podem ser visualizados na **Figura 12 e 13**, respectivamente.





**Figura 12:** Curva de DSC e temperatura do acetato de eugenila referência obtida no modo resfriamento e aquecimento com razão de aquecimento  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  e de resfriamento de  $-10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .



**Figura 13:** Curva de DSC do acetato de eugenila sintetizado.

O perfil de ambas as curvas é muito similar, com algumas diferenças, e suas temperaturas características dos eventos térmicos, os quais podem ser visualizados devido à baixa razão de aquecimento de  $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

Os dois experimentos exibiram eventos repetitivos e bem definidos, um pico menor e um maior, respectivamente. O menor pico é exotérmico e menos definido,

associado ao evento de cristalização; enquanto o maior pico é endotérmico, agudo, com forma bem delineada, o qual é atribuído ao processo de fusão.

As medidas experimentais para os eventos térmicos mostrados na Figura acima podem ser vistas na **Tabela 2**, cuja elaboração utilizou a média de três diferentes experimentos para ambos os compostos. As amostras foram substituídas a cada experimento, e cada experimento continha três ciclos do programa de aquecimento e resfriamento.

**Tabela 2:** Média das medidas do estudo térmico para amostras de acetato de eugenila

Amostra	Programa aquecimento/resfriamento	Cristalização			Fusão		
		T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	ΔH (Jg <sup>-1</sup> )	T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	ΔH (Jg <sup>-1</sup> )
AEr	Ciclo 1	-13.9	-9.6	83.7	25.9	28.1	-97.8
	Ciclo 2	-13.7	-8.7	84.3	26.6	28.2	-100.7
	Ciclo 3	-11.7	-9.7	83.8	26.1	28.1	-97.8
	SD	2.0	1.6	0.5	0.3	0.1	1.7
AEs	Ciclo 1	-27.4	-25.9	69.6	12.5	20.7	-71.8
	Ciclo 2	-33.2	-31.5	68.1	13.8	21.3	-73.2
	Ciclo 3	-29.5	-27.9	69.3	13.6	21.1	-71.5
	SD	2.9	2.8	0.8	1.8	1.0	1.7

A cristalização e a fusão são os principais eventos térmicos, no entanto, estes exibem algumas diferenças importantes quando seus resultados são comparados.

A cristalização do AEr inicia-se em temperaturas mais elevadas do que a amostra sintética, como mostrado pela temperatura onset ( $T_{oc}$ ). A temperatura de pico da cristalização do AEr ( $T_{pc}$ ) é superior a AEs, significando que o processo inteiro se completa tardiamente. Além do processo de cristalização precisar de temperaturas mais elevadas, a energia requerida para o processo se completar também é maior, qualificado pelo maior valor do calor de cristalização ( $\Delta H_c$ ).

Os processos de fusão seguem o mesmo perfil dos resultados encontrados para a cristalização. As temperaturas *onset* e de pico, e o calor de fusão são mais elevados para a amostra referência. Isto significa que o processo demora mais tempo para se iniciar e completar quando comparados ao produto sintético; e, além disso, a energia requerida durante o evento também é mais elevada.

As temperaturas de pico são diferentes para a amostra sintética e referência, e os intervalos são mais amplos do que o observado para o composto puro. A entalpia de cristalização e fusão para o AEs foi significativamente atenuado pelo sistema multicomponente. As impurezas são responsáveis por este comportamento térmico, e resultam na diminuição da solubilidade do AEs, portanto estes outros componentes são responsáveis por iniciar o processo de cristalização. Em outras palavras, esta mistura complexa precisa de menor quantidade de energia para alcançar as transições térmicas, quando comparada a sua referência.

Observando a energia de fusão e cristalização do AEs nota-se que seus valores são mais próximas, isto significa que porcentagem similar da amostra é fundida, é em

seguida cristalizada. No entanto, este comportamento é esperado em amostras com maior porcentagem de pureza.

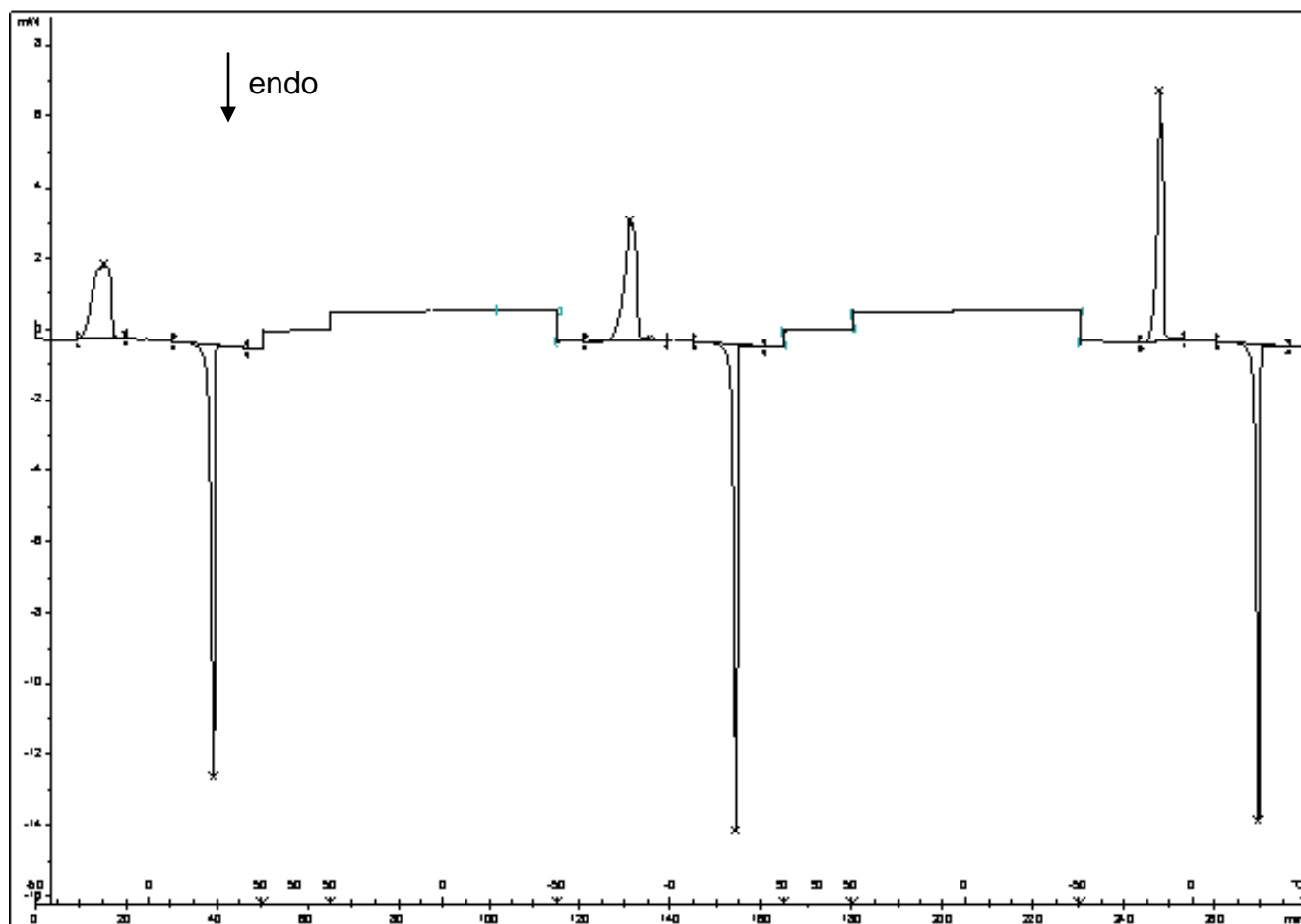
Contudo, os resultados das energias de fusão e cristalização para AEr apresentam uma diferença maior que para AEs, isto é, as porcentagens de amostra fundida e cristalizada não são semelhantes, cuja demonstração é a variação entre as entalpias de fusão e de cristalização.

Esse comportamento sugere que a amostra AEr tem maior quantidade de impurezas do que AEs. Este acontecimento é explicado pelas etapas de cristalização, as quais são responsáveis pela purificação da amostra de AEs.

Os resultados térmicos do AEs demonstram e definem os valores obtidos na cristalização. Portanto, mesmo que não seja possível obter a amostra cristalizada quando armazenado a temperaturas baixas, fica evidente pelas análises de DSC que o evento de cristalização ocorre para o AEs, como verificado na **Figura 13**. Porém, a temperatura de cristalização do AEs é inferior a temperatura encontrada para o AEr, e portanto é difícil atingi-la sem o auxílio de equipamentos específicos e observá-la a olho nu.

Um procedimento experimental diferente utilizando o DSC foi realizado para a amostra de AEr. Este experimento é composto pela adição de uma etapa isotérmica ao final de cada ciclo de aquecimento/resfriamento, permanecendo o restante do experimento inalterado, como pode ser visto na **Figura 14**.

Este último experimento foi realizado para qualificar o crescimento dos cristais, e eliminar qualquer partícula presente na solução que seja capaz de iniciar o processo de crescimento de cristais.



**Figura 14:** Curva de DSC do acetato de eugenila com uma etapa isotérmica entre cada ciclo de aquecimento/resfriamento.

Conseqüentemente, o DSC isotérmico determina a presença de um processo de cristalização espontâneo durante a etapa de aquecimento, na porção onde as temperaturas são ainda negativas.

Então, não há a presença de partículas desconhecidas capazes de iniciar o evento de cristalização. Deste modo, o acetato de eugenila atinge a estrutura mais

estável nas condições experimentais descritas, pela sua própria organização no arranjo de cristais após atingir sua temperatura ideal de cristalização.

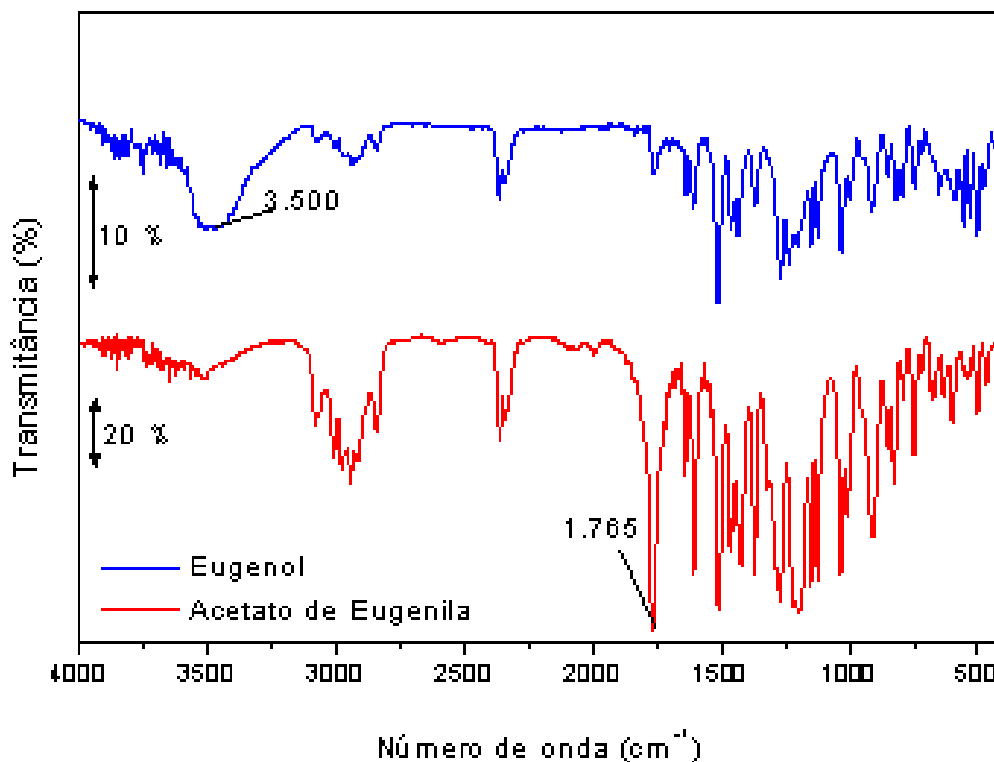
A inclusão da etapa isotérmica não compromete o processo de cristalização. Assim sendo, os outros eventos térmicos tiveram o mesmo comportamento, com as mesmas características e propriedades térmicas, como no primeiro experimento de DSC realizado.

#### ***4.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho***

A espectrometria na região do infravermelho é uma importante técnica de caracterização de compostos orgânicos, pois é capaz de reconhecer as mudanças estruturais em diferentes compostos.

Esta técnica se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula.

Os espectros de EUG e AE foram estudados e podem ser visualizados na **Figura 15**.



**Figura 15:** Espectros na região do infravermelho de eugenol (EUG) e acetato de eugenila (AE).

Como observado na **Figura 15**, o espectro de eugenol apresentou uma banda de absorvência em  $3500 \text{ cm}^{-1}$ , devido à vibração de estiramento da ligação de carbono a hidroxila (OH). Esta banda de absorvência é utilizada como referência para o eugenol em virtude de sua presença apenas nas amostras de eugenol, região em que ocorrerá a modificação molecular.

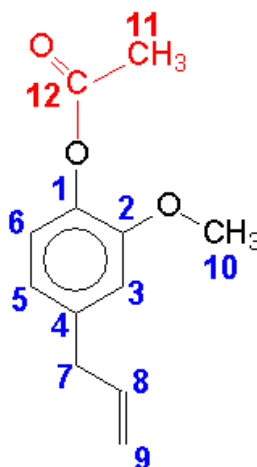
O sinal analítico usado para identificar o acetato de eugenila está estabelecido em  $1765 \text{ cm}^{-1}$ , que está relacionado à vibração de estiramento da carbonila (C=O),

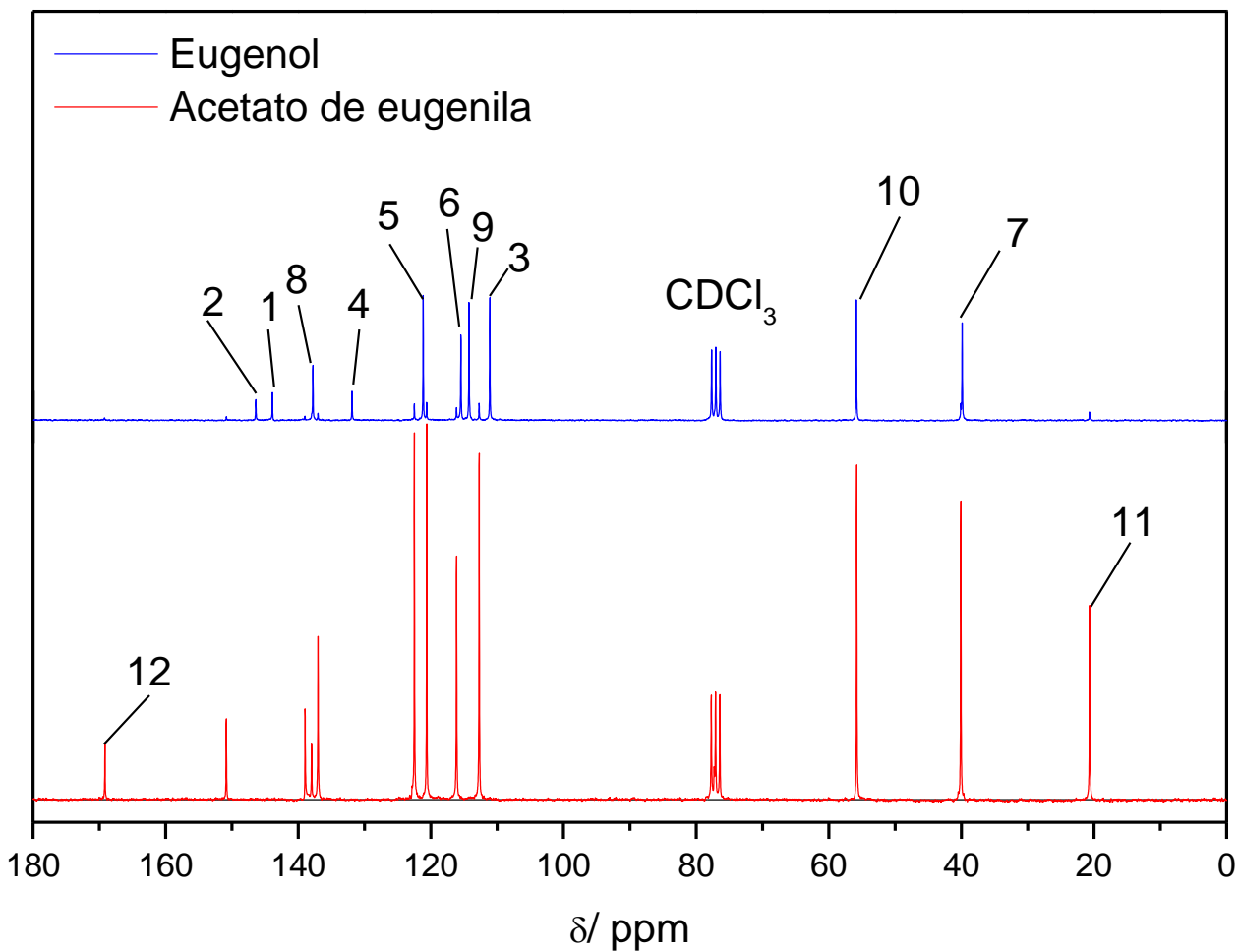


unido ao anel aromático. Esta banda de absorvência é atributo do acetato de eugenila e confirma a modificação ocorrida, devido ao desaparecimento da banda hidroxila e o aparecimento da banda da carbonila.

#### 4.6 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

A estrutura do AE foi diretamente inferida pelo espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ , o qual se baseou em seu precursor, o EUG. A substituição pelo grupo acetato foi confirmada pela presença de dois sinais complementares quando comparados espectros de EUG e AE, os quais são característicos da modificação molecular. As estruturas moleculares do eugenol e acetato de eugenila; e seus espectros com os respectivos deslocamentos químicos estão ilustrados na **Figura 16**.





**Figura 16:** Estrutura molecular do eugenol (EUG) e acetato de eugenila (AEs); e seus respectivos espectros de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ .

Os deslocamentos químicos dos picos adicionados ao AEs estão presentes em 21.0 ppm, para o átomo carbonila ( $\text{C}_{11}$ ), e em 169.0 ppm para o grupamento metila, o qual está ligado a carbonila ( $\text{C}_{12}$ ). Os outros C possuem os mesmos deslocamentos encontrados na molécula de eugenol (EUG) e estão organizados na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Deslocamentos de RMN-<sup>13</sup>C para a estrutura do EUG

Posição	Grupo	Deslocamento Químico ( $\delta$ )
1	C-Acetato	144 ppm
2	C-OCH <sub>3</sub>	146.5 ppm
3	C-Anel Aromático	111.0 ppm
4	Cadeia C-CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub>	132.0 ppm
5	C-Anel Aromático	121.0 ppm
6	C- Anel Aromático	116.0 ppm
7	CH <sub>2</sub> –CHCH <sub>2</sub>	40.0 ppm
8	CH-CH <sub>2</sub>	138.0 ppm
9	CH <sub>2</sub>	114.0 ppm
10	CH <sub>3</sub> –O	56.0 ppm

#### **4.7 Difractometria de Raios X de monocristal**

##### **4.7.1 Acetato de Eugenila**

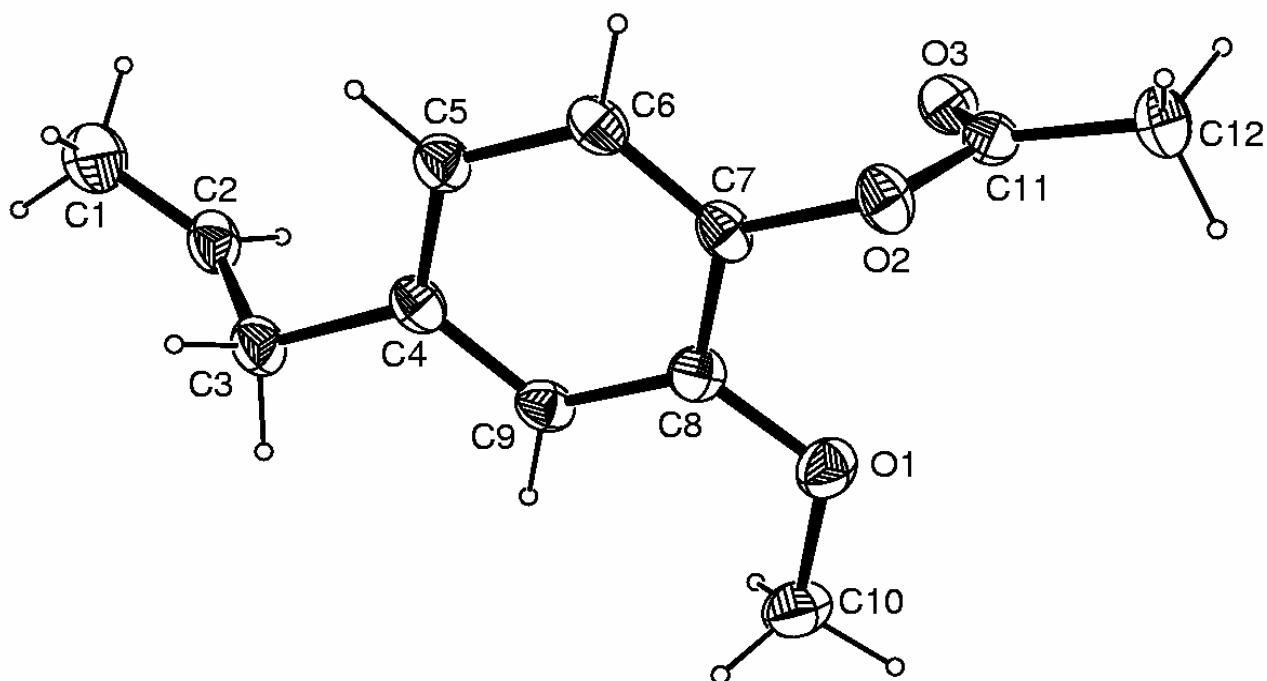
A difratometria de Raios X de monocristal é indubitavelmente a técnica mais importante e eficaz para elucidação de estruturas moleculares e cristais.

Além disso, esta técnica possui algumas vantagens como sua realização a temperatura ambiente, sob condições normais de pressão e temperatura, e ainda é não-destrutiva.

Este experimento foi realizado para o acetato de eugenila referência, pois este composto se encontra no estado sólido durante as condições experimentais necessárias, que ocorrem à temperatura ambiente.

O estudo da cristalografia de Raios X permitiu determinar a estereoquímica e conformação do AEr, como mostrado na **Figura 17**.

O perfil de Raios X encontrado para a molécula de AEr pode ser visualizado na **Figura 18**.

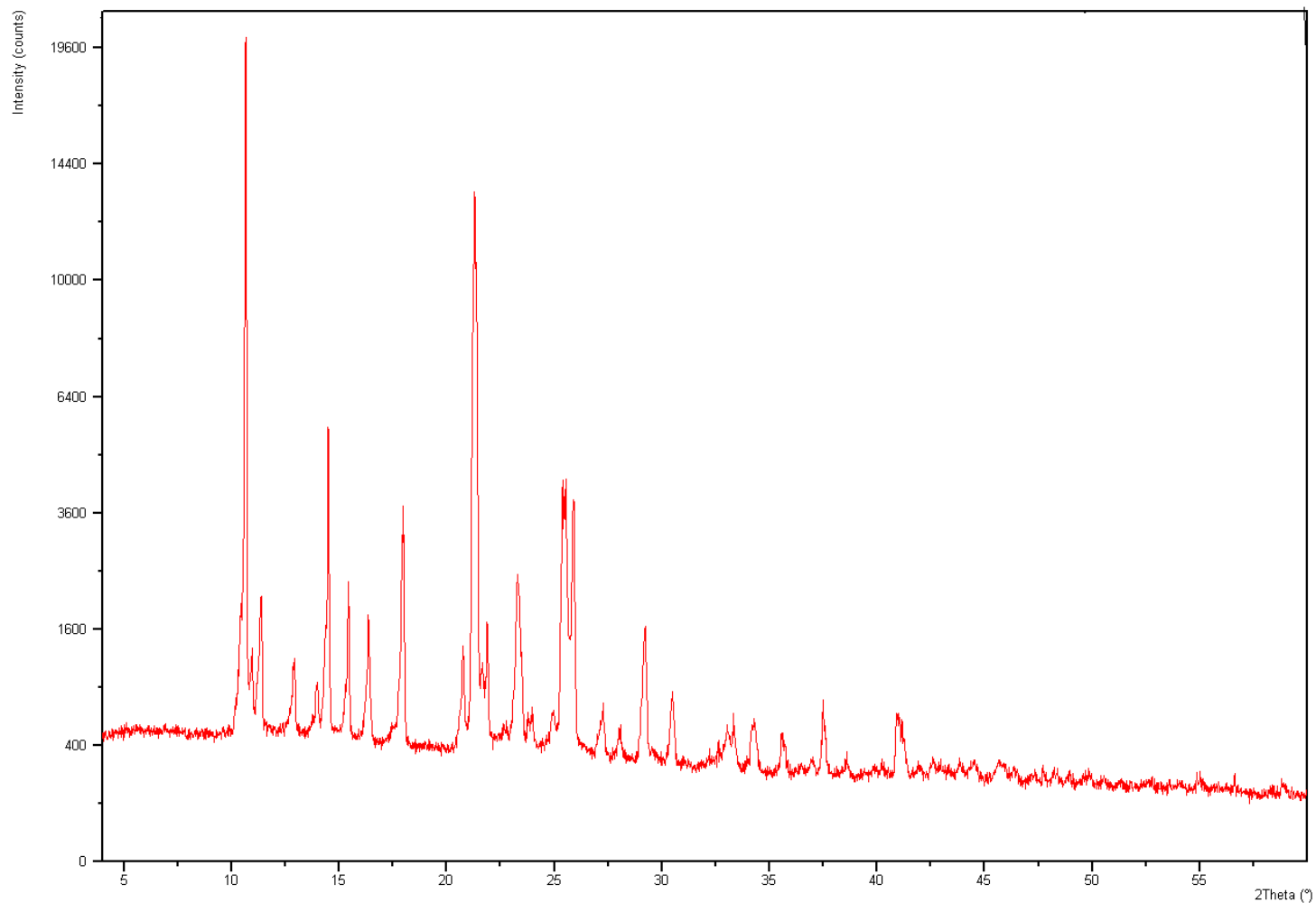


**Figura 17:** Projeção ORTEP da molécula mostrando a probabilidade elipsóide de 30%.

Observando a **Figura 17**, a molécula de AEr é composta por um anel de seis membros, o benzeno, que está ligado a três cadeias pelos carbonos C4, C7 e C8. As cadeias ligadas ao C4 e C8 são as mesmas encontradas na estrutura do EUG.

A cadeia ligada ao carbono C7 é o grupo adicionado à estrutura do EUG, a cadeia acetato. Analisando a posição desta molécula no espaço nota-se que a estrutura cristalina está levemente inclinada para baixo, o que segundo alguns autores sugerem possíveis vantagens com respeito a sua ação biológica.

Além disso, observou-se a modificação de posição da dupla ligação localizada na cadeia homogênea ( $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), fato que demonstra a ocorrência de ressonância no carbono C2, então esta ligação altera sua posição entre os carbonos C1 e C3 ( $\text{CH}_2$ ), alternadamente.



**Figura 18:** Difratoograma de Raios X de monocristal de AEr.

A aquisição de dados e os detalhes experimentais estão resumidos na **Tabela 4**. As distâncias de ligações e ângulos selecionados obtidos neste experimento estão descritos na **Tabela 5**.

**Tabela 4:** Detalhes experimentais do DRX

Fórmula Empírica	$C_{12} H_{15} O_3$
Massa Molecular	207.24
Temperatura	150(2) K
Sistema de cristal	Monoclínico
Grupo espacial	C2/c
Dimensões da unidade celular	a = 11.0430(10) Å b = 12.0950(10) Å $\beta = 103.055(4)^\circ$ c = 17.0050(10) Å
Volume	2212.6(3) Å <sup>3</sup>
Z	8
Densidade (calculado)	1.244 Mg/m <sup>3</sup>
Coeficiente de absorção	0.089 mm <sup>-1</sup>
F(000)	888
Tamanho do cristal	0.28 x 0.24 x 0.22 mm <sup>3</sup>
Faixa $\Theta$ para a coleta de dados	2.62 to 26.00°.
Intervalo de indexação	-13 ≤ h ≤ 13, -14 ≤ k ≤ 14, -20 ≤ l ≤ 19
Número de reflexões coletadas	5229
Número de reflexões independentes	2069 [R(int) = 0.0765]
Integralidade do $\Theta = 26.00^\circ$	94.9 %
Transmissão Max. e min.	0.9808 e 0.9756
Dados / retenção / parâmetros	2069 / 0 / 146
Índice R final [ $ I  > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0.0584, wR2 = 0.1699
Índices R (todos os dados)	R1 = 0.0670, wR2 = 0.1813
Coeficiente de Extinção	0.014(5)
Densidade residual Máxima e mínima	0.310 e -0.296 e.Å <sup>-3</sup>

**Tabela 5:** Distâncias de ligações e ângulos selecionados no experimento de DRX

C(1)-C(2)	1.281(4)
C(2')-C(2)	1.060(8)
C(2)-C(3)	1.480(4)
C(2)-H(2)	1.020(3)
C(3)-C(4)	1.518(2)
C(4)-C(9)	1.391(3)
C(4)-C(5)	1.395(3)
C(5)-C(6)	1.394(3)
C(6)-C(7)	1.368(3)
C(7)-C(8)	1.395(3)
C(7)-O(2)	1.410(2)
C(8)-O(1)	1.363(2)
C(8)-C(9)	1.388(3)
C(10)-O(1)	1.430(3)
C(11)-O(3)	1.200(2)
C(11)-O(2)	1.358(2)
C(11)-C(12)	1.489(3)
C(2')-C(2)-C(1)	55.1(5)
C(2')-C(2)-C(3)	74.3(5)
C(1)-C(2)-C(3)	127.5(3)
C(2')-C(2)-H(2)	161.4(6)
C(1)-C(2)-H(2)	113.9(3)
C(3)-C(2)-H(2)	118.6(3)
C(2)-C(3)-C(4)	113.31(18)
C(9)-C(4)-C(5)	118.96(17)
C(9)-C(4)-C(3)	119.66(17)
C(5)-C(4)-C(3)	121.38(19)
C(6)-C(5)-C(4)	120.09(19)



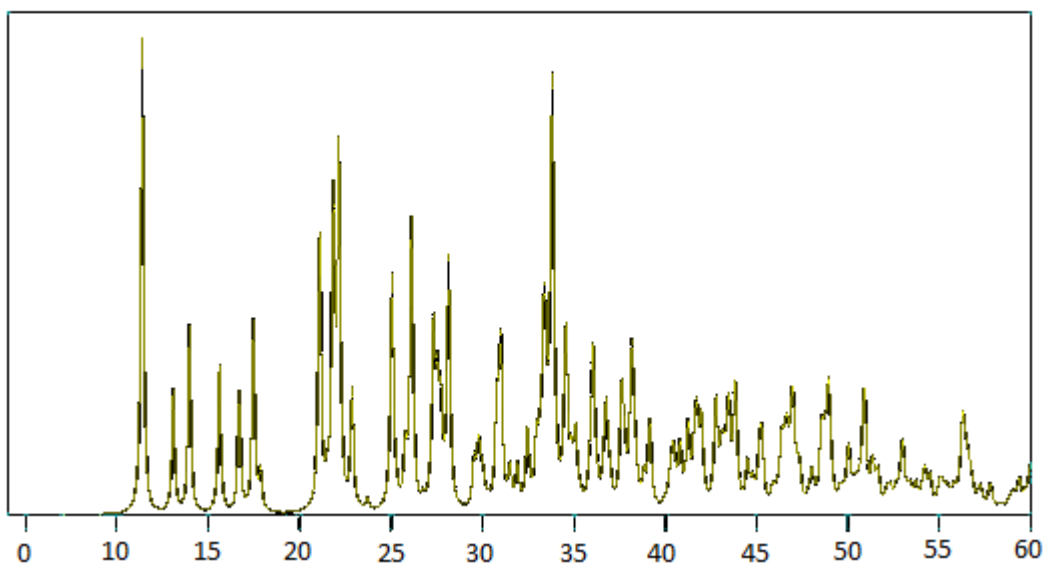
C(7)-C(6)-C(5)	120.01(18)
C(6)-C(7)-C(8)	121.09(18)
C(6)-C(7)-O(2)	120.02(17)
C(8)-C(7)-O(2)	118.73(18)
O(1)-C(8)-C(9)	125.16(17)
O(1)-C(8)-C(7)	116.22(17)
C(9)-C(8)-C(7)	118.62(18)
C(8)-C(9)-C(4)	121.21(17)
O(3)-C(11)-O(2)	122.85(17)
O(3)-C(11)-C(12)	125.92(19)
O(2)-C(11)-C(12)	111.23(17)
C(8)-O(1)-C(10)	116.60(16)
C(11)-O(2)-C(7)	116.99(14)

Visto que a amostra de AEs se encontra no estado líquido à temperatura ambiente, não foi possível sua análise por esta técnica, uma vez que a condição requerida para o procedimento de Raios X em monocristal é permanecer no estado sólido nas condições ambientes, para o recolhimento do cristal.

Entretanto, os dados obtidos na análise por difração de Raios-x de monocristal do AEr foram correlacionados com os dados da amostra sintetizada a partir do óleo (AEs). Logo, com estes elementos combinados desenvolveu-se um experimento teórico de simulação da técnica de difratometria de Raios X para a amostra de AEs.

Utilizou-se um programa específico de simulação S93, para o padrão da amostra em pó empregando a radiação de cobre. Este difratograma pode ser visto na **Figura 19**.

Diagrama simulado de difração de raios X pelo método do pó

**Figura 19:** Difratoograma de Raios X simulado para a amostra AEs pelo método do pó.

Assim sendo, o resultado do programa de simulação foi comparado ao resultado do perfil encontrado em experimento real para a amostra referência.

O perfil simulado de Raios X apresentou os mesmos picos do experimento real, com os mesmos deslocamentos e intensidades muito semelhantes.

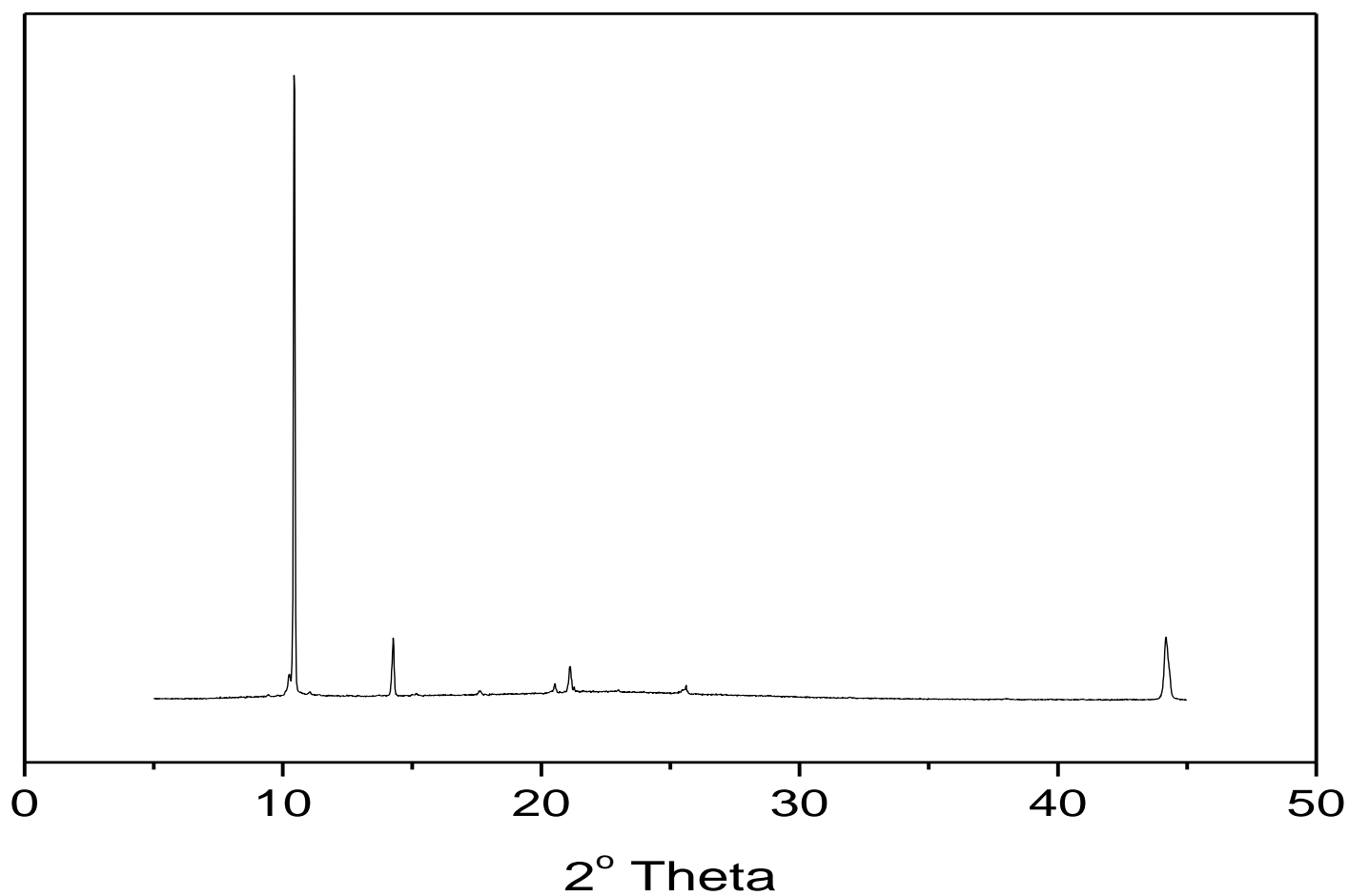
Isto significa que quando aplicado os dados do experimento real na simulação, o resultado gerado é o mesmo encontrado no experimento real do monocristal, confirmando a autenticidade da amostra sintética (AEs) em relação à amostra referência (AEr).

#### **4.8 Difractometria de Raios X pelo método do pó**

A Difração de Raios X pelo método do pó foi realizada para amostra de acetato de eugenila sintética, logo que não é necessário apenas um cristal para a realização do procedimento.

Algumas estratégias foram feitas para se preparar a amostra. O AEs foi colocado sob o suporte de metal especial para o equipamento. Em seguida, mergulhou-se rapidamente este suporte contendo a amostras em nitrogênio líquido. Posteriormente, o nitrogênio se fundiu e a amostra de AEs permaneceu completamente cristalizada a temperatura ambiente, no estado sólido.

Esta amostra foi empregada na realização da Difração de Raios X em Pó, e seu difratograma está ilustrado na **Figura 20**.



**Figura 20:** Difratoograma de Raios X do AEs pelo método pó.

Considerando este resultado, e fundamentado no difratograma do AEr, nota-se que a maioria dos picos obtidos e seus deslocamentos são semelhantes.

No entanto, percebe-se uma breve diferença entre as intensidades de alguns picos da amostra sintética e da referência. Deste modo, obteve-se uma amostra com

pureza mais elevada para o AEs, conforme mostrado pelas intensidades de seus picos devido ao maior grau de cristalinidade desta amostra.

Esta técnica reforça as conclusões encontradas nos estudos térmicos (DSC), o qual demonstra a cristalização do AEs, além de fornecer a “impressão digital” da molécula obtida em laboratório.

#### **4.9 Microscopia Ótica**

As fotos dos cristais foram feitas usando um microscópio com objetivo de ampliar a imagem. Este experimento foi realizado somente para amostras de acetato de eugenila referência (AEr) devido à temperatura de cristalização ser mais elevada que para as amostras sintetizadas a partir do óleo bruto, em outras palavras, foi possível atingir a temperatura de cristalização nas lâminas utilizando as bolas de algodão com nitrogênio líquido.

No entanto, este procedimento não foi possível para o acetato de eugenila sintético em virtude de sua temperatura de cristalização ser inferior a referência.

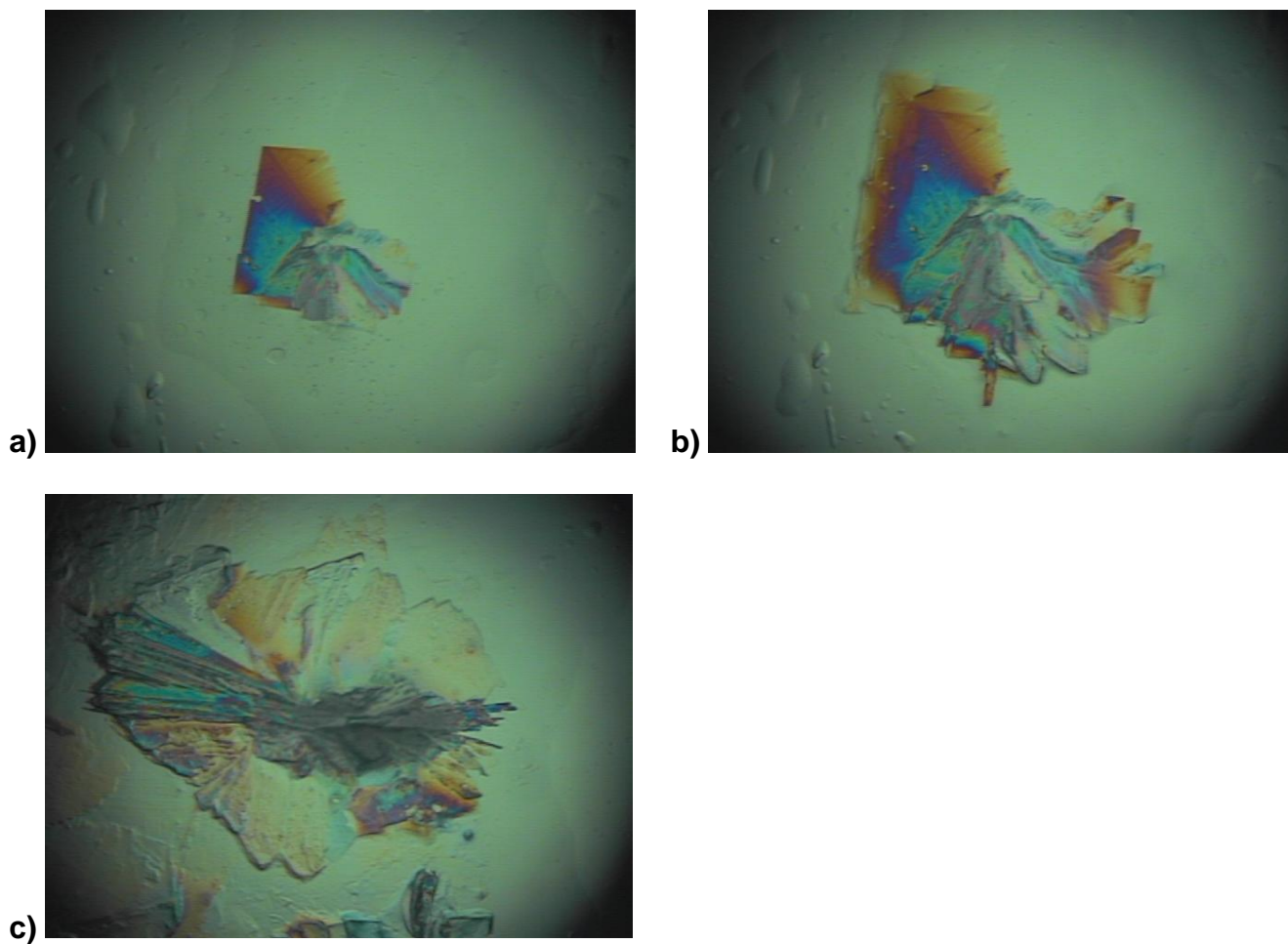
As **Figuras 21a-c** mostram o crescimento do cristal. A nucleação iniciou-se sem influência de partículas externas, e tornou-se estável sob as condições do procedimento realizado.

Após o subsequente crescimento dos núcleos, estes conseguiram alcançar o tamanho crítico do aglomerado “cluster”. A nucleação e o crescimento do cristal

persistiram simultaneamente enquanto havia acetato de eugenila no estado líquido na lâmina de vidro, único delimitador do crescimento.

Observou-se também que a velocidade de crescimento do cristal é diferente quando comparadas diferentes faces. Entretanto, a nucleação ocorre de maneira organizada e bem estruturada, mantendo sempre o mesmo perfil de crescimento desde o início do processo.

Quando o sistema sólido-líquido atingiu o equilíbrio, a cristalização foi finalizada.



**Figura 21a-c:** Crescimento do cristal de AEr.

## 5. Resultados encontrados para os eutéticos

### 5.1 Estudo de Eutéticos

Os eutéticos foram preparados pelo método dos solventes. Nove misturas foram obtidas após o processo físico do AEr com PEG 3350, e nove misturas utilizando a uréia como carreador.

O polietilenoglicol 3350 usado como carreador hidrofílico em misturas binárias originou uma mistura eutética em uma porcentagem específica. Entretanto, as misturas empregando a uréia não originaram eutéticos em nenhuma porcentagem estudada e não serão abordadas neste trabalho.

É evidente que os PEG são altamente solúveis em água, e possuem baixos pontos de fusão comparado a maioria dos fármacos. A incompatibilidade entre o PEG e pequenas moléculas orgânicas torna a formação da solução sólida PEG- fármaco difícil e a miscibilidade induz a um sistema eutético simples<sup>34</sup>.

Na química orgânica e inorgânica é comum classificar sistemas binários eutéticos baseados na entropia de fusão dos componentes individuais<sup>48,34</sup>.

Esta classificação diz que se um componente da mistura eutética tem entropia de fusão menor que 2, a partir da **Equação 1 e 2**, a cristalização eutética exibirá um crescimento simultâneo para ambos componentes da mistura. Esta formação resulta em uma mistura com microestrutura bem definida<sup>34,48</sup>.

$$\Delta S^f = \Delta H^f / T^f$$

$\Delta H^f$ : Variação de entalpia de fusão

$T^f$ : Temperatura no ponto de fusão

**Equação 1:** Equação para a determinação da entropia de fusão dos componentes da mistura eutética.

Sendo que, no ponto de fusão o  $\Delta S$ :

$$\Delta S^f / R < \text{ou} > 2$$

$\Delta S^f$  Entropia de fusão

R: Constante universal dos gases

**Equação 2:** Equação para determinar o valor da razão da entropia de fusão dos componentes pela constante dos gases.

Esta equação pode ser usada para o ponto de fusão da mistura eutética, pois a entropia de um material perfeitamente cristalino é igual a zero, em temperatura de zero absoluto<sup>49</sup>.



No entanto, a entropia deste sistema apenas será alterada quando houver uma transição de fase, desde que ocorra uma mudança na ordem do sistema, ou seja, uma mudança para uma estrutura mais caótica<sup>49</sup>.

Contudo, se ambos constituintes possuem elevada entropia de fusão os crescimentos são independentes um do outro, e a mistura eutética resultante é uma mistura simples de dois tipos de cristais anisotrópico e facetado. Logo, o material com baixa entropia de fusão se cristaliza em forma de lamelas.

O resultado de entropia de fusão encontrado para o AEr apresentou um valor abaixo de 2 utilizando-se a Equação 1; já o valor da entropia de fusão para o PEG 3350 se encontrou acima deste valor.

Pela correlação entre as unidades e utilizando a constante universal de gases de 8,31 J/ mol K, o resultado do AEr para a Equação 2 foi  $8,2 \times 10^{-1}$ . Logo, o valor encontrado para o PEG 3350 foi 31,6.

Por conseguinte, de acordo com a classificação acima, os cristais dos dois constituintes crescem simultaneamente, e apresentam uma estrutura cristalina bem determinada.

Alguns autores relataram que quando os dois componentes de uma mistura eutética se cristalizam simultaneamente como ocorreu neste caso, há uma significativa redução do tamanho da partícula do menor componente<sup>50</sup>.

Contudo, percebe-se que quando a mistura eutética já fundida é resfriada, as duas fases iniciam a cristalização espontaneamente. O desdobramento da formação ocorre com o crescimento da menor fase entre os espaços intersticiais da fase primária,

ou seja, há o crescimento do PEG nos espaços do AE. Este processo conduz a uma acentuada redução no tamanho das partículas do componente menor<sup>51</sup>.

De acordo com a Regra de Tamman, o componente da composição eutética com menor temperatura de fusão define a maior fase. Este comportamento foi observado nesta mistura, cuja menor temperatura de fusão advém do AEr, e este componente se encontra em maior quantidade na mistura eutética.

De acordo com a literatura, o princípio ativo com menor temperatura de fusão deve ter a maior composição e a menor temperatura eutética, fato observado na mistura eutética contendo 80 % / 20 % (m/m) do AEr e PEG<sup>51</sup>.

## ***5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial***

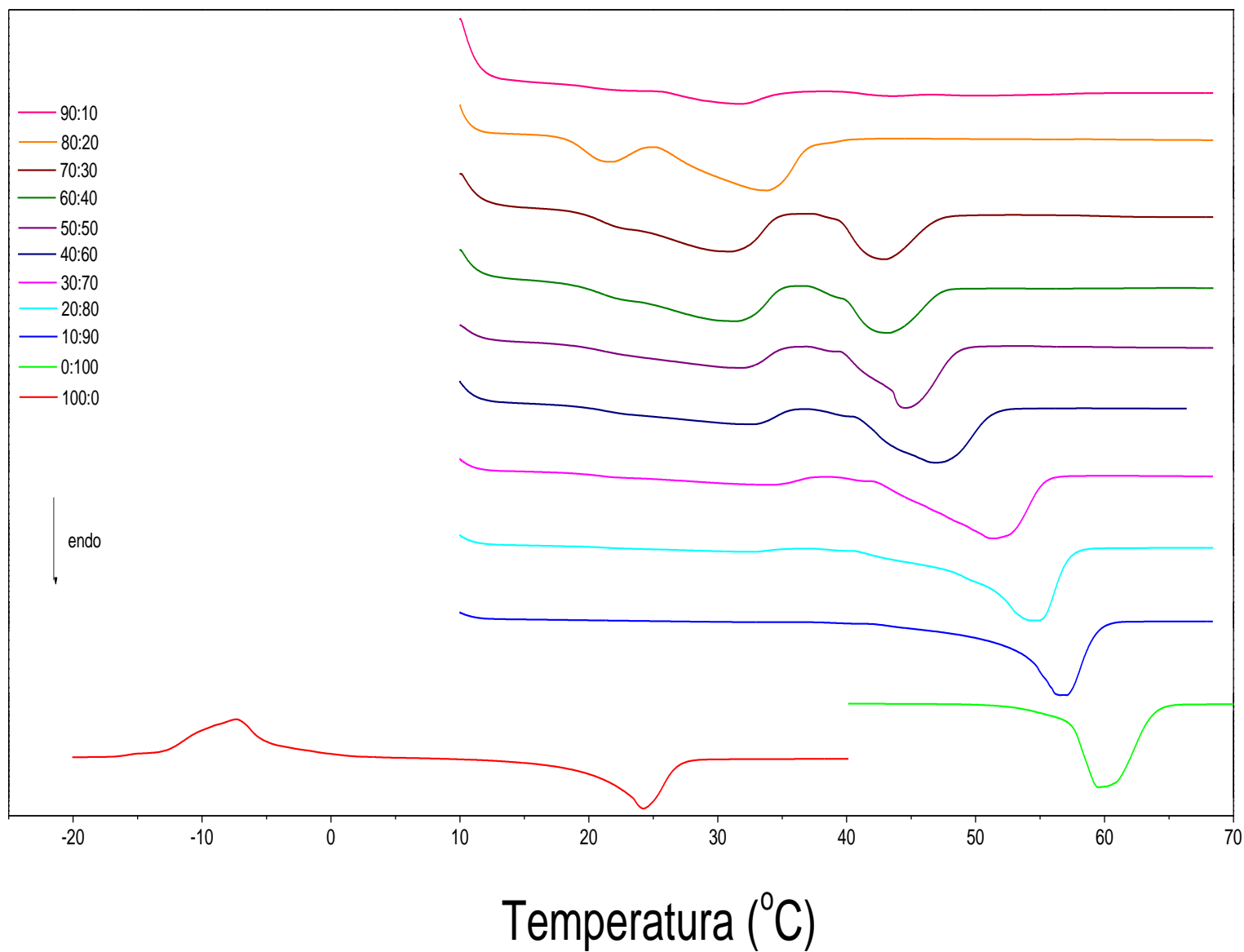
Uma elevada composição eutética pode ser obtida se o princípio ativo tiver pequeno calor de fusão. A combinação da temperatura de fusão e a variação de entalpia representam a energia da substância ativa cristalina<sup>35</sup>.

Portanto, a redução na energia do cristal resulta na formação do eutético. Cristais ligados por forças fracas têm baixo calor de fusão e baixo ponto de fusão, e o mesmo ocorre na situação oposta<sup>35</sup>.

As investigações de DSC foram realizadas em 9 misturas com diferentes composições e para cada componente individual, acetato de eugenila e no PEG 3350.

As curvas de DSC para cada evento implicaram em variações de temperatura e entalpia ocorridas durante a etapa de aquecimento das corridas de DSC.

As curvas de DSC das misturas binárias exibiram diferentes perfis relacionados com as porcentagens de seus componentes (m/m), como ilustrado na **Figura 22**.



**Figura 22:** Curvas de DSC do AE, PEG e das misturas binárias em proporções crescentes de 10 a 90%.

A curva DSC para o PEG 3350 exibe um pico bem definido e agudo com temperatura de pico ( $T_p$ ) em 59,58 °C, temperatura onset ( $T_o$ ) de 57,07 e variação de entalpia ( $\Delta H$ ) 174,8 Jg<sup>-1</sup>.

No entanto, a curva de DSC do AEr apresentou dois picos como citado anteriormente, um pico exotérmico, o qual refere-se à cristalização e um pico endotérmico correspondente a fusão. Os valores na fusão encontrados no DSC do AEr foram 24,21 °C para a  $T_p$ , 21,36 °C  $T_o$ , e 63,02 Jg<sup>-1</sup> o  $\Delta H$ .

A maioria das misturas binárias deste estudo se comportou da mesma maneira. Observando as respectivas curvas de DSC fica evidente a presença de dois eventos endotérmicos.

O primeiro evento é brando e assimétrico, quando comparado ao segundo evento. Este evento térmico tem sua intensidade aumentada conforme a mudança na concentração da mistura, em outras palavras, quando há o aumento da concentração de acetato de eugenila ocorre à intensificação do primeiro evento endotérmico.

Além disso, também é claro o deslocamento de temperatura do primeiro pico para temperaturas mais baixas, logo que as concentrações das misturas se modificam. Os valores térmicos característicos para as misturas de 10% AEr/ 90% PEG a 90 % AEr/ 10 % PEG podem ser encontrados na **Tabela 6**.

**Tabela 6:** Valores de  $T_p$ ,  $T_o$ , e  $\Delta H$  para o primeiro evento endotérmico encontrado nas misturas eutéticas

Composição das Misturas AEr/ PEG (%)	$T_p$ ( °C)	$T_o$ ( °C)	$\Delta H_f$ (Jg <sup>-1</sup> )
10/90	41,96	35,31	4,73
20/80	40,61	33,64	10,68
30/70	33,18	18,74	16,10
40/60	32,23	18,58	24,56
50/50	31,62	18,02	29,87
60/40	30,91	18,34	28,03
70/30	30,19	18,74	29,12
80/20	21,33	18,45	5,71
90/10	31,39	23,64	5,37

Observando os dados encontrados na Tabela 6, concluiu-se que o primeiro evento térmico representa a composição eutética da mistura binária.

Quando analisado o segundo evento térmico, nota-se um evento com melhor definição e mais agudo que o anterior. A definição e a forma do pico estão relacionadas à concentração da mistura binária, ou seja, quanto maior a concentração de AEr na mistura, menor a definição e mais largo é o pico.

Além disso, outro atributo importante das misturas binárias é a tendência na diminuição da temperatura de pico e da energia envolvida, conforme se aumenta a concentração de AEr, e como consequência, diminui-se a concentração de PEG 3350.

As temperaturas de pico ( $T_p$ ) e onset ( $T_o$ ), e a entalpia de fusão ( $\Delta H$ ) para o segundo evento térmico estão descritos na **Tabela 7**.

**Tabela 7:** Valores de  $T_p$ ,  $T_o$ , e  $\Delta H$  para o segundo evento endotérmico encontrado nas misturas

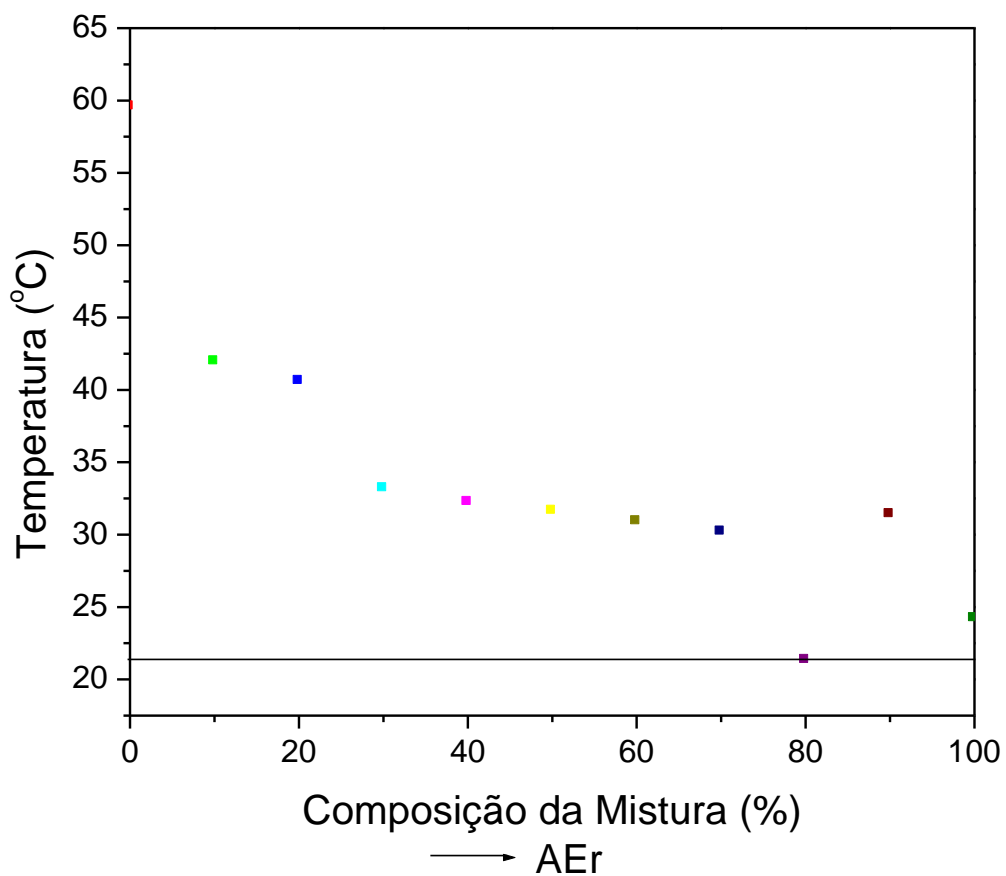
Composição das Misturas AEr/PEG (%)	$T_p$ (°C)	$T_o$ (°C)	$\Delta H_f$ (Jg <sup>-1</sup> )
10/90	57,10	53,06	98,66
20/80	55,10	50,17	81,28
30/70	51,54	43,40	76,30
40/60	47,26	40,99	45,37
50/50	44,63	42,55	36,77
60/40	42,89	39,40	18,42
70/30	42,89	39,30	16,88
80/20	33,90	25,50	27,62
90/10	43,18	40,38	0,33

O segundo evento endotérmico pertence possivelmente ao PEG 3350, o qual se funde a temperaturas mais baixas ao contrário de quando este constituinte é analisado individualmente. Entretanto, este pico está diminuído em certas composições, como em 90% AEr na mistura, cuja intensidade e variação de entalpia é muito pequena. Este evento ocorre pelo fato desta mistura possuir uma maior quantidade de amostra no estado amorfo do que em porções cristalinas.

### **5.3 Diagrama de Fases**

Os diagramas de fases foram construídos separadamente a partir de cada pico endotérmico, os quais podem ser vistos nas **Figuras 23 e 26**. O diagrama de fases da mistura de AEr e PEG foi desenvolvido baseado em curvas de composição/temperatura.

Observando o diagrama de fases elaborado a partir do primeiro evento endotérmico da mistura de PEG 3350-AEr é nítida a formação de um eutético, com composição 80% de acetato de eugenila e 20% de PEG 3350, em temperatura eutética de aproximadamente 21,33 °C. Esta mistura é considerada a composição eutética, devido a sua temperatura de fusão ser inferior a de seus constituintes sozinhos, AEr e PEG, as quais são 28,0 e 59 °C, respectivamente.



**Figura 23:** Diagrama de fases do AEr/ PEG 3350 para o primeiro pico endotérmico.

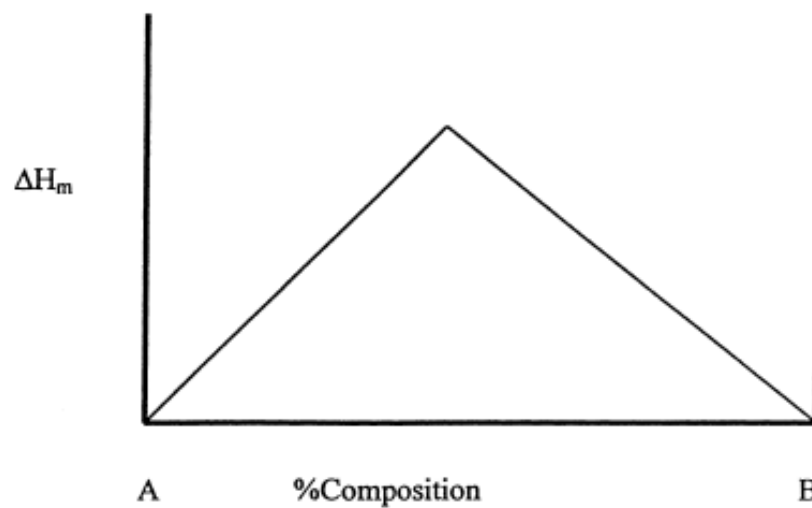
Se esta mistura binária for aquecida, a primeira porção líquida aparente ocorrerá em temperatura eutética. Já, quando esta mistura em fase líquida, homogênea, é resfriada, os primeiros cristais aparecerão no ponto de congelamento. Deste modo, o intervalo de fusão é determinado a partir da temperatura eutética até o ponto de congelamento.



Baseado neste diagrama de fases percebe-se que a composição eutética não é a fração racional entre dois componentes da mistura binária.

Deve-se enfatizar que este produto não é um novo composto, e sim uma mistura de dois componentes finamente subdivididos, em uma determinada razão da composição eutética<sup>52</sup>.

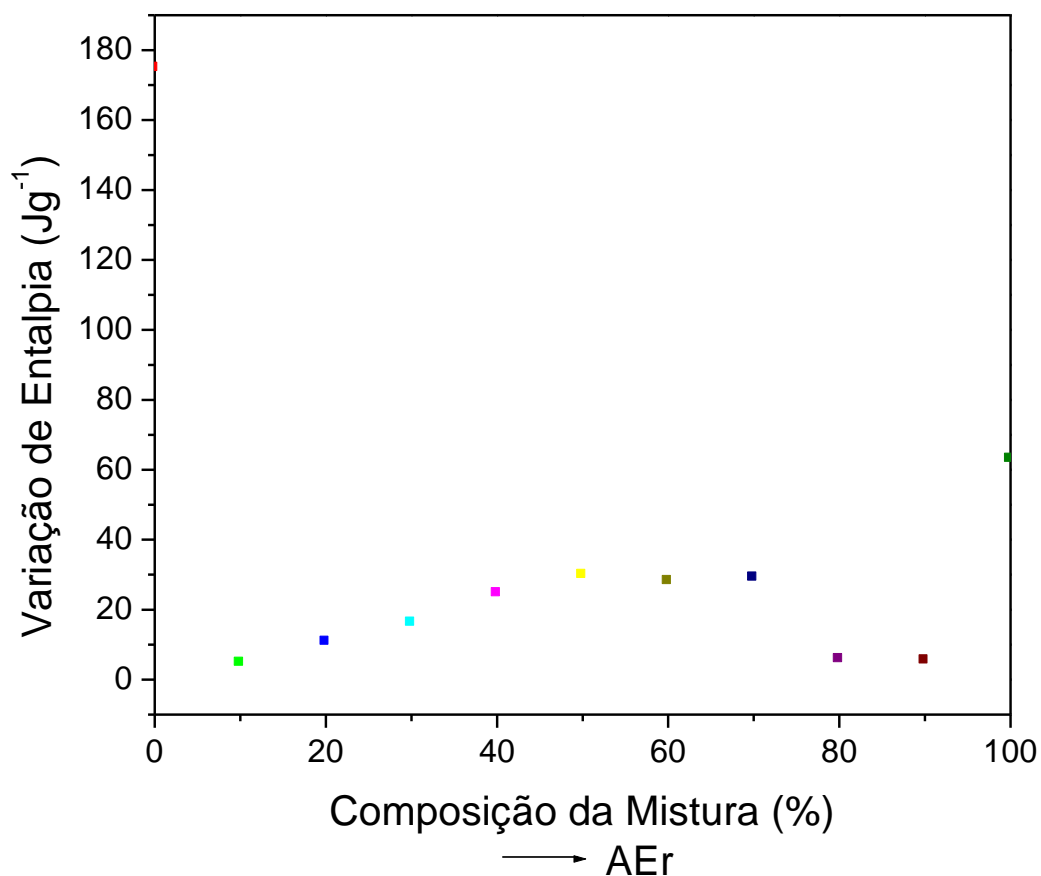
Maiores informações podem ser extraídas da entalpia de fusão das misturas ( $\Delta H_f$ ) e/ou cristalização. A **Figura 24** ilustra a relação comum entre a entalpia de fusão das misturas e suas composições; e ainda o ponto eutético<sup>53</sup>.



**Figura 24:** Relação característica entre a entalpia de fusão de um eutético e sua composição em porcentagem.

Um gráfico semelhante ao modelo exposto anteriormente foi elaborado a partir do primeiro evento endotérmico como pode ser visto na **Figura 25**.

O desvio do perfil triangular observado no gráfico experimental, quando comparado ao hipotético, possivelmente ocorre pelo excesso de um ou mais de seus componentes.



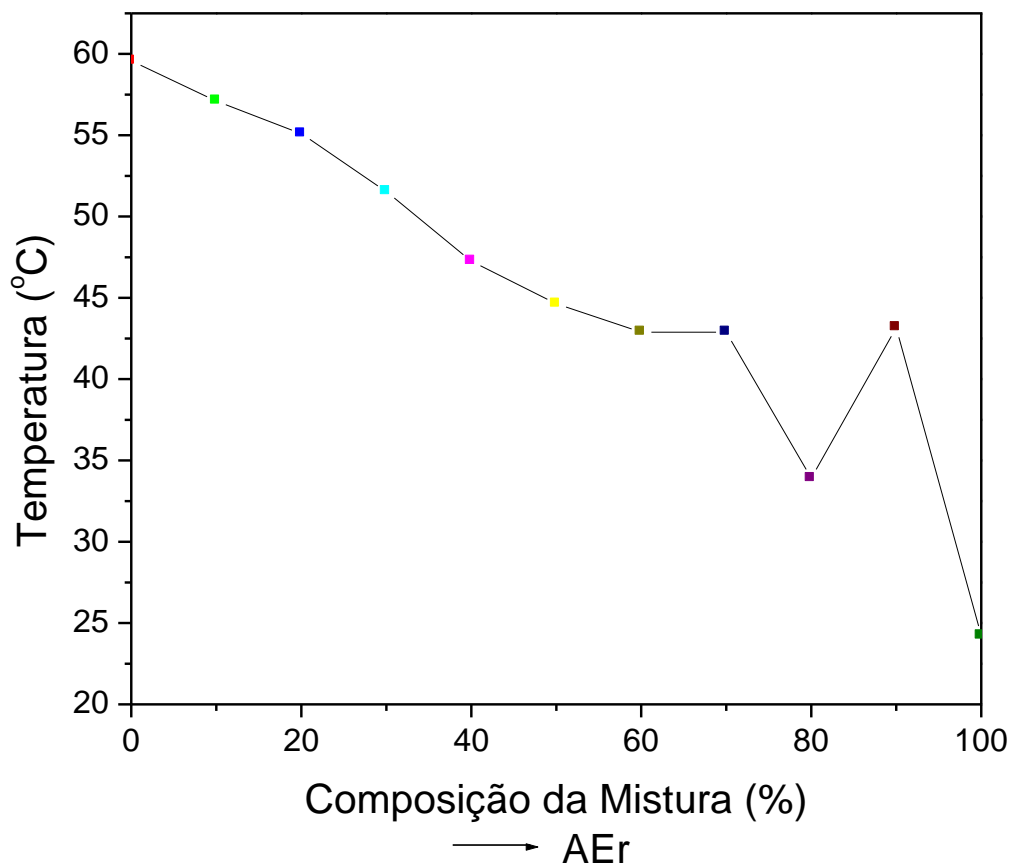
**Figura 25:** Variação de entalpia em relação às composições das misturas para o primeiro pico endotérmico.

Ainda, quando sobrepostos os gráficos de temperatura e variação de entalpia em relação à composição da mistura, observa-se que a temperatura é inversamente

proporcional a percentagem de AEr, e a energia requerida no evento é proporcional ao aumento em percentagem de AEr na mistura binária.

Todavia, este comportamento não é seguido pela mistura eutética, ou seja, a composição eutética altera o comportamento encontrado nas misturas.

A **Figura 26** refere-se ao diagrama de fases construído com os pontos relacionados ao segundo pico endotérmico das curvas de DSC.



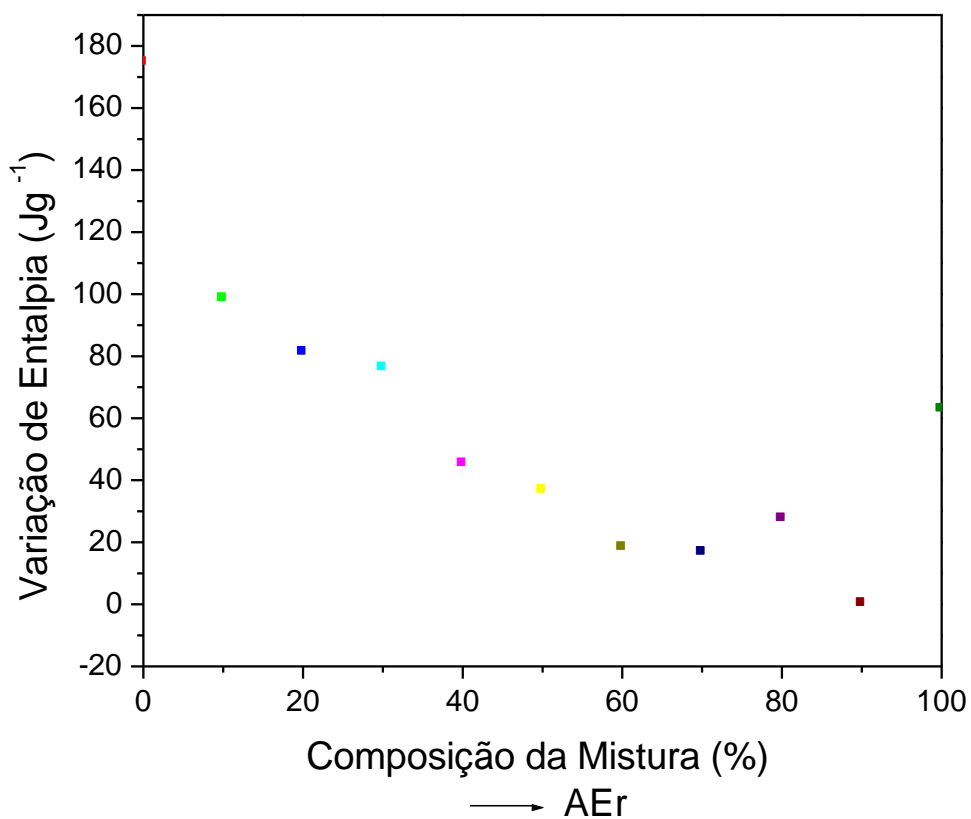
**Figura 26:** Diagrama de fases do PEG 3350/ AEr para o segundo pico endotérmico.

Analisando este gráfico, nota-se a ausência do pico eutético, cuja principal característica é a temperatura de fusão da mistura binária inferior a de seus componentes individuais. A menor temperatura de fusão encontrada nesta figura está associado à fusão do AEr. Portanto, este evento térmico não caracteriza uma mistura eutética.

Provavelmente, este pico endotérmico é resultado de um componente em excesso, cujo ponto de fusão difere do mesmo puro, como o PEG.

Contudo, há uma tendência “linear decrescente” entre as temperaturas e suas composições. A mistura binária com menor temperatura de fusão foi 80% AEr/ 20% PEG, a mesma composição em que obteve-se o ponto eutético no primeiro evento térmico.

Quando observado a **Figura 27**, nota-se o mesmo comportamento do gráfico anterior, entre a variação da entalpia e a composição da mistura, ou seja, conforme se aumenta a porcentagem de AEr, a energia envolvida no processo é menor. A mistura binária 80% AEr/ 20% PEG apresentou uma inclinação diferente, pois se posicionou levemente acima da tendência esperada.



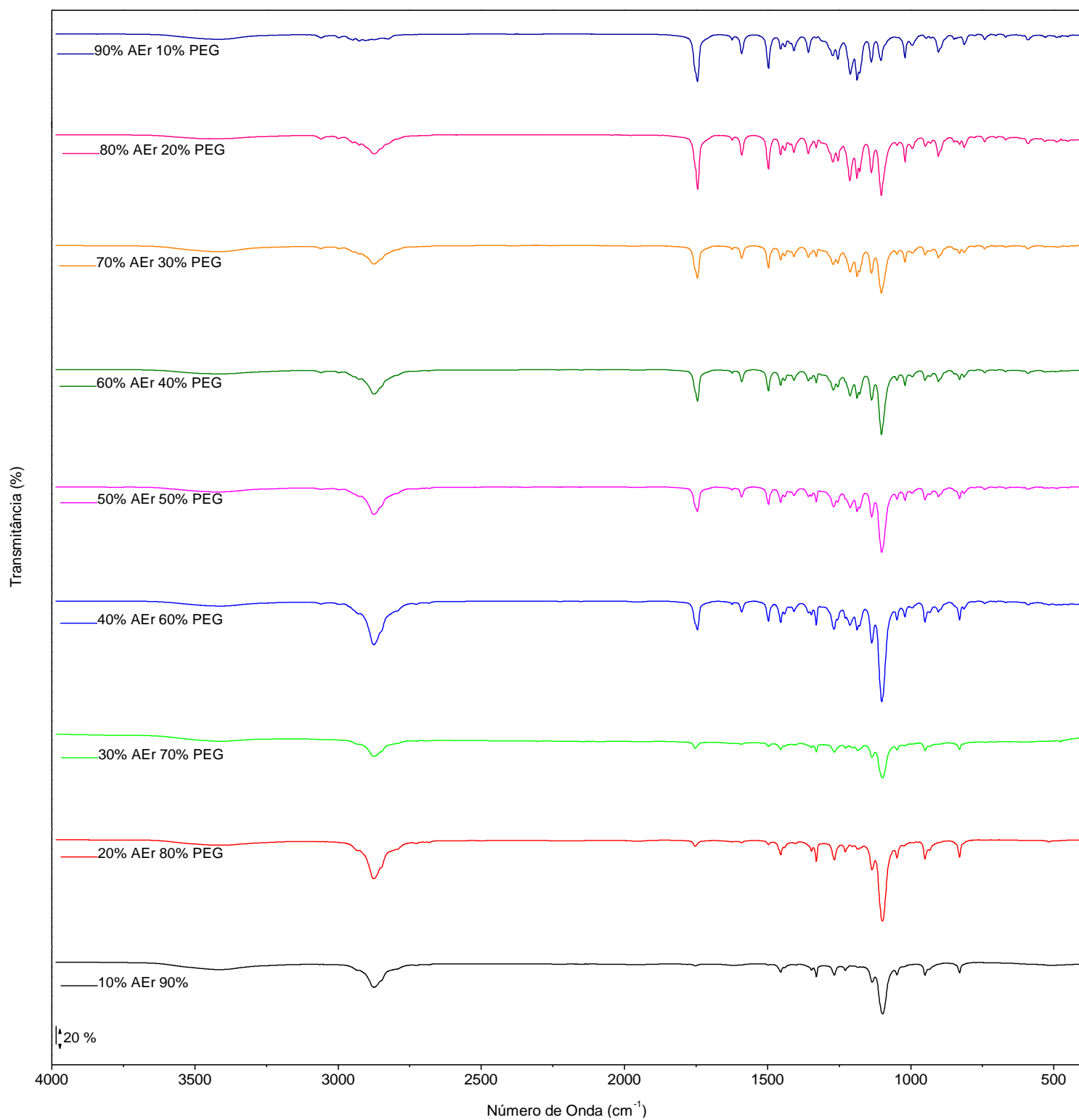
**Figura 27:** Variação de entalpia em relação às composições para o segundo pico endotérmico.

#### **5.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho**

Os espectros de infravermelho foram registradas para ilustrar as mudanças ocorridas em cada mistura, e ainda demonstrar possíveis ligações químicas entre o acetato de eugenila e o PEG 3350.

Os espectros no infravermelho das misturas binárias e seu comportamento em função da composição estão ilustrados na **Figura 28**.

Todas as misturas apresentaram bandas que caracterizam o acetato de eugenila e o PEG, com algumas diferenças em suas intensidades. As intensidades nas bandas estão diretamente relacionadas à porcentagem do componente envolvido.



**Figura 28:** Espectros na região do Infravermelho para as misturas eutéticas de 10% a 90% de AEr.

Observando-se o espectro de 10% AEr/ 90% PEG é evidente a presença das bandas típicas do polietilenoglicol em maior intensidade, nas quais algumas delas são o estiramento da hidroxila (OH) em  $3430\text{ cm}^{-1}$ , estiramento simétrico do  $\text{CH}_2$  em  $2888\text{ cm}^{-1}$ , estiramento do CO compreendido em  $1200\text{ cm}^{-1}$ , estiramento CC em  $1061\text{ cm}^{-1}$ , e a deformação no plano do CO em  $530\text{ cm}^{-1}$ .

Também há bandas características do AE, como por exemplo, o estiramento C=O compreendido em  $1764\text{ cm}^{-1}$ , a deformação da metila ligada ao oxigênio (OMe) em  $1467\text{ cm}^{-1}$ . Estas bandas aparecem com intensidade muito pequena, proporcional a sua composição na mistura. No entanto, algumas bandas pertencentes a este componente estão ausentes nos espectros com menor quantidade deste.

Analisando as outras misturas, de acordo com a quantidade de AE de maneira crescente, nota-se o aumento da intensidade de suas bandas e a diminuição dos picos referentes ao PEG, como já descrito nesta seção.

Além disso, algumas bandas do AEr que estavam ausentes apareceram em concentrações maiores, como por exemplo, o estiramento do benzeno em  $1603\text{ cm}^{-1}$ , a deformação no plano da carbonila (C=O) em  $754\text{ cm}^{-1}$ , entre outras.

Portanto, concluiu-se que não houve ligação química entre o AEr e o PEG, pois não existiu o surgimento de uma nova banda, e sim a “sobreposição” de dois espectros de substâncias diferentes. Este comportamento é típico de substâncias que participaram de uma mistura física, pois são preservados todos os grupos pertencentes aos componentes participantes das misturas.



### **5.5 Microscopia Óptica**

As imagens de microscopia óptica foram obtidas para elucidar as formas adquiridas pelas misturas e a superfície dos cristais.

Estas imagens, no estudo de eutéticos foram selecionadas de acordo a resolução mais apropriada. A magnificação das misturas com melhor resultado foi feita em 200x. Estas figuras foram comparadas e podem ser visualizadas nas **Figuras 29-37**. As Figuras do PEG e do AEr são mostradas nas **Figuras 38 e 39**, respectivamente.

A imagem do PEG exibe uma substância úmida, com formato definido e arredondado. Já o AEr tem formas quadradas e característica cristalina.

De acordo com as imagens das misturas, o contorno dos cristais e área da superfície não são semelhantes, cuja explicação está na diferença entre as concentrações dos componentes. A relação entre a concentração de AEr e a área de superfície são inversamente proporcionais. Isto resulta no aumento do número de faces na partícula cristalina das misturas binárias conforme se aumenta a concentração de AE.

Considerando apenas algumas composições, como 10% de AEr/ 90% PEG, a imagem apresenta uma área grande, com número reduzido de faces, e conseqüentemente, maior opacidade.

Com o aumento da proporção de AEr nas misturas estas características se modificam, o tamanho se reduz, aumenta-se o número de faces e a mistura se torna mais reluzente.

Isto é observado também na mistura eutética, com composição de 80% de AEr e 20% de PEG. Este cristal apresenta tamanho menor que as outras misturas, com um grande aumento de faces, e, portanto, mais brilhante.

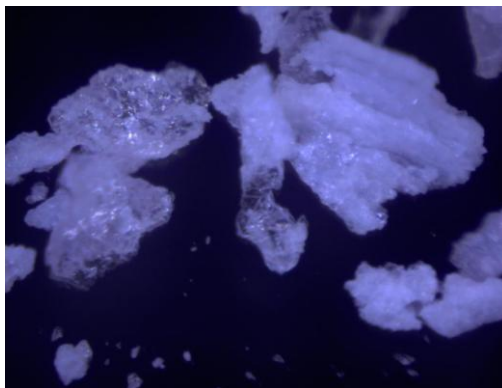
O número de faces e sua propriedade cintilante estão diretamente relacionados à composição da mistura. O aumento na porcentagem do princípio ativo possivelmente determina a cristalinidade das amostras, as quais mostram pequenas partículas cristalinas em dispersão ao invés de permanecer molecularmente dispersa.

Contudo, nas misturas contendo pequena porcentagem de AEr há uma menor cristalinidade, logo, a porcentagem amorfa presente na mistura é possivelmente maior.

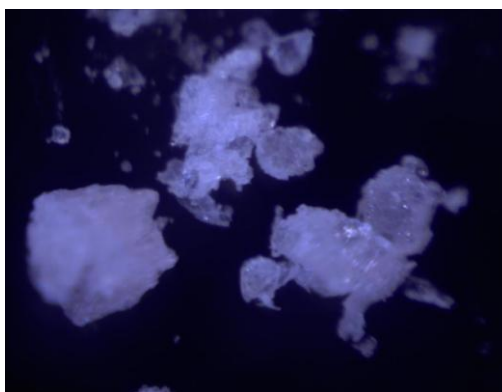
Devido ao arranjo desorganizado e a mobilidade das moléculas nos amorfos, oposto aos cristais, substâncias amorfas são normalmente menos estáveis quimicamente que materiais cristalinos, os quais estão arranjados em malhas e de maneira ordenada<sup>38,54</sup>.



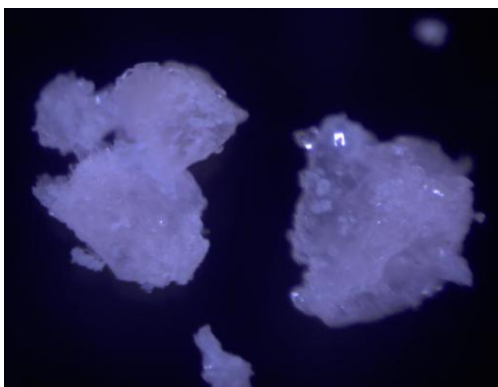
**Figura 29:** Foto micrografia da mistura 10% de AE e 90% PEG.



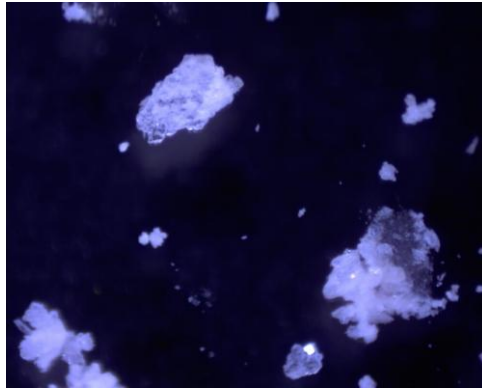
**Figura 30:** Foto micrografia da mistura 20% de AE e 80% PEG.



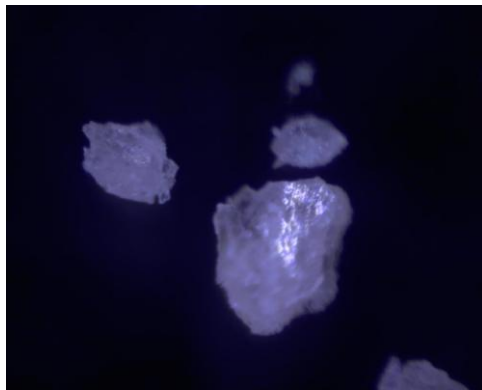
**Figura 31:** Foto micrografia da mistura 30% de AE e 70% PEG.



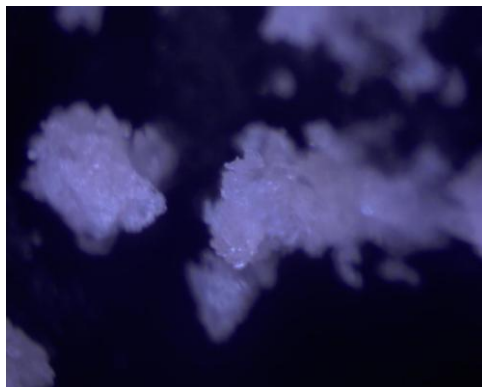
**Figura 32:** Foto micrografia da mistura 40% de AE e 60% PEG.



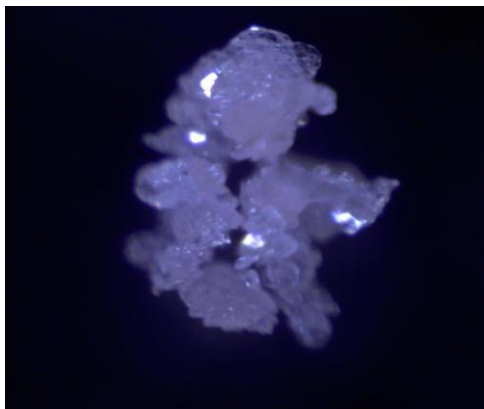
**Figura 33:** Foto micrografia da mistura 50% de AE e 50% PEG.



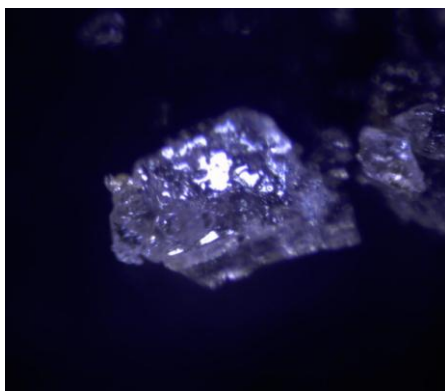
**Figura 34:** Foto micrografia da mistura 60% de AE e 40% PEG.



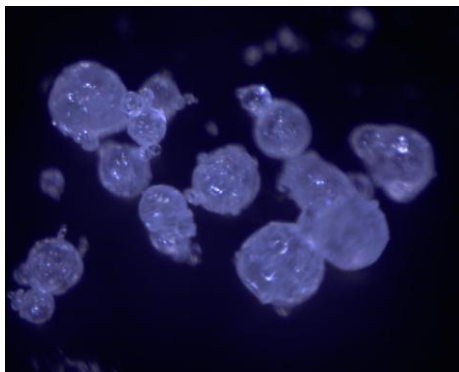
**Figura 35:** Foto micrografia da mistura 70% de AE e 30% PEG.



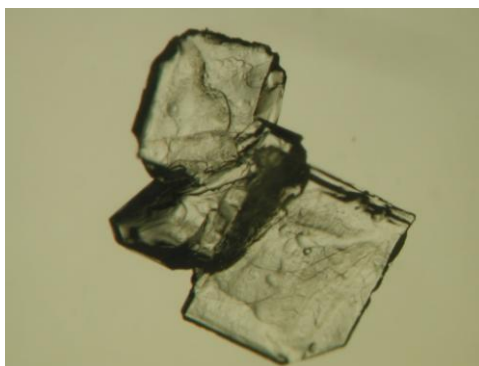
**Figura 36:** Foto micrografia da mistura 80% de AE e 20% PEG.



**Figura 37:** Foto micrografia da mistura 90% de AE e 10% PEG.



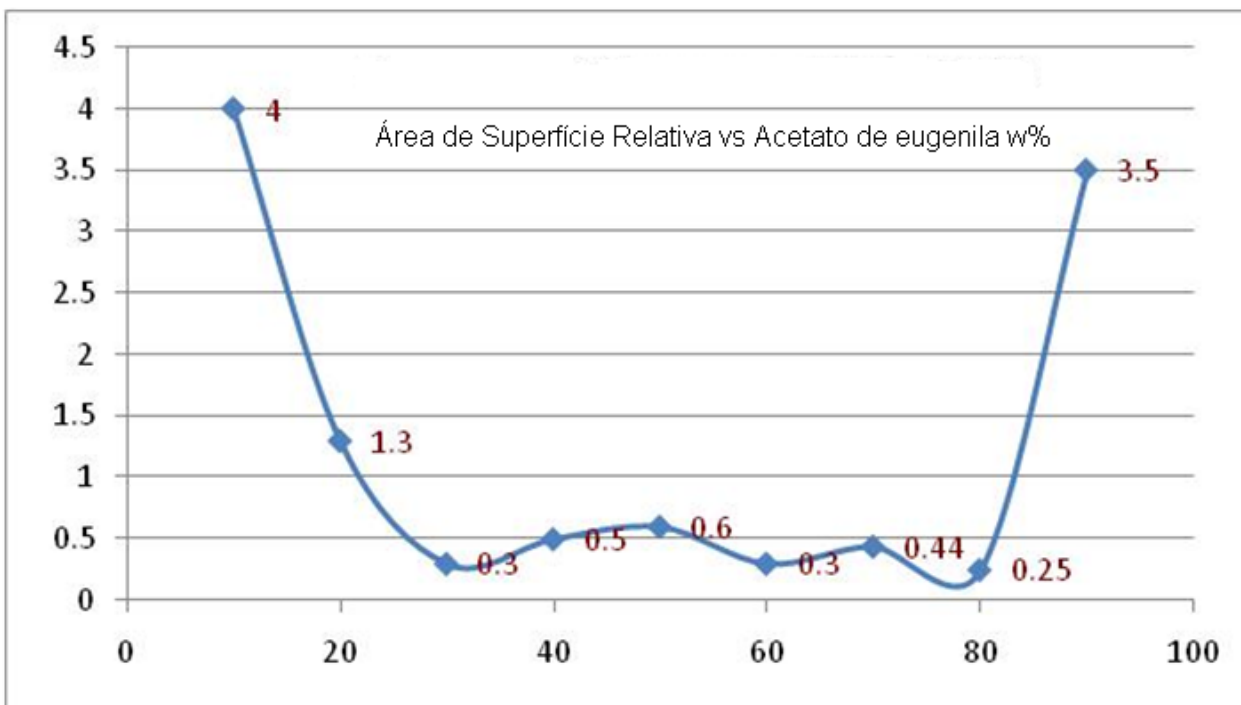
**Figura 38:** Foto micrografia de 100% de PEG.



**Figura 39:** Foto micrografia do AE 100%.

A área superficial das misturas binárias foram medidas e as médias obtidas foram comparadas como mostrado na **Figura 40**, na qual se correlacionou a média da área superficial dos cristais de cada mistura com sua respectiva composição. Analisando os resultados para cada mistura, nota-se uma redução na área superficial para a mistura eutética, contendo 80% de AEr e 20% de PEG 3350, com valor de 0,25.

A menor área encontrada foi da mistura eutética, resultado que condiz com o esperado, pois a formação da mistura eutética determina a redução da área superficial da amostra.



**Figura 40:** Relação entre a área superficial e a composição das misturas binárias

### 5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Esta técnica possibilitou a obtenção das imagens de superfícies das misturas, com ampla profundidade de campo e alta resolução. As imagens geradas neste experimento apresentam aparência tridimensional, o que facilita a sua interpretação, como exibido pelas **Figuras 40-48**.

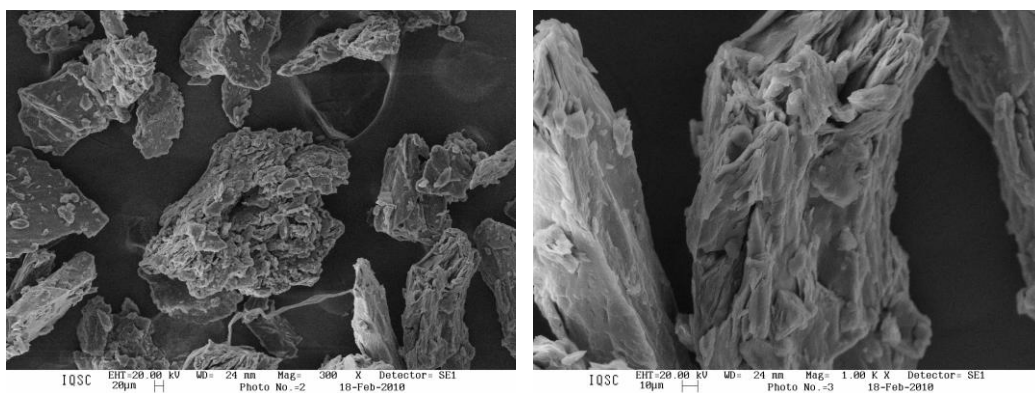
As foto micrografias foram realizadas em duas magnificações diferentes, em 300x e 1000x. Uma pequena porção da figura com magnificação de 300x foi selecionada, e então ampliada até 1000x. Este processo foi realizado para todas as misturas.

As imagens obtidas apresentam apenas uma fase e podem ser classificadas em duas categorias, composições com imagens em “aglomerado” e em “estrias”.

As composições de 10%, 20%, 50% e 90% de AEr apresentam imagens em grandes aglomerados, desorganizadas, e com extremidades irregulares.

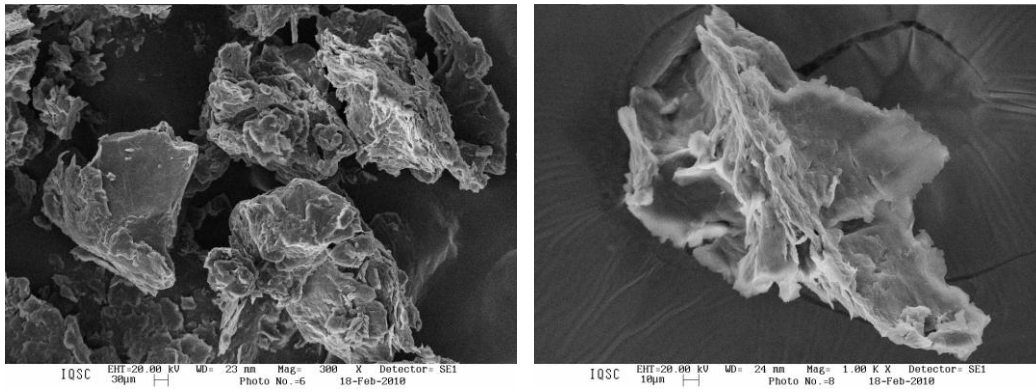
Todavia, as composições com 30%, 40%, 60%, 70% e 80% (mistura eutética) de AEr possuem estrias com tamanho relativamente menor. As extremidades são formadas por camadas, e com repetições regulares.

Nota-se uma redução nas regiões que apresentam estruturas lamelares aglomeradas, mas não se pode concluir que essa redução se deve à variação da velocidade de solidificação das amostras ou pela composição da misturas.

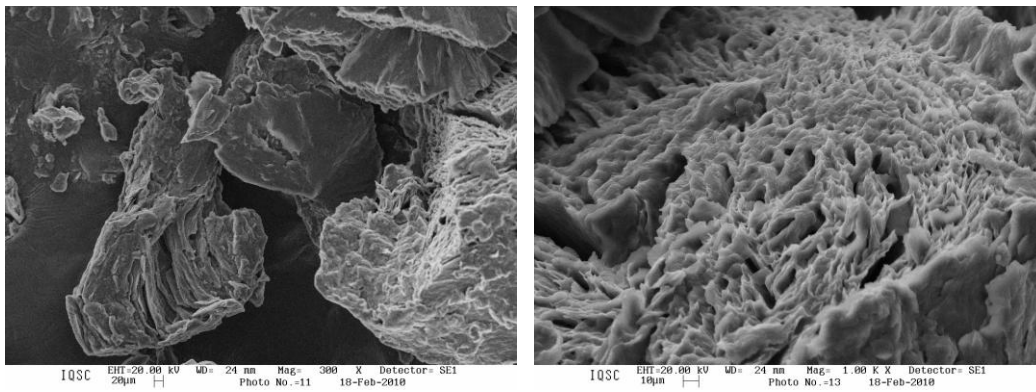


**Figura 41:** Imagem de MEV da mistura binária contendo 10% AEr e 90% PEG.

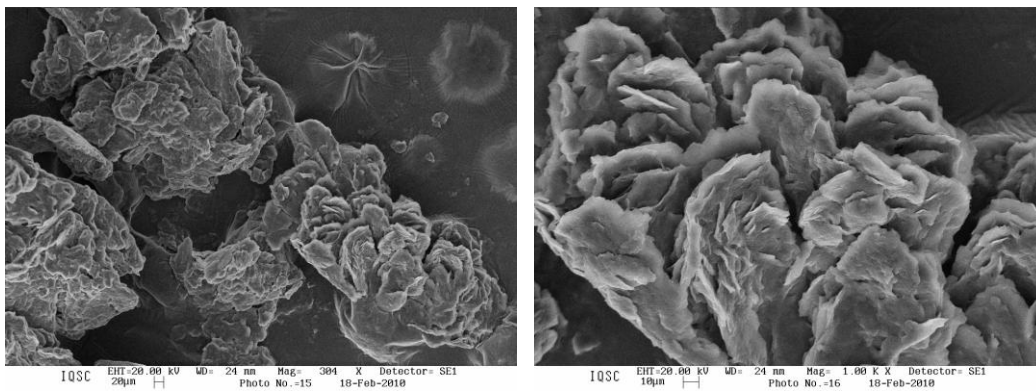




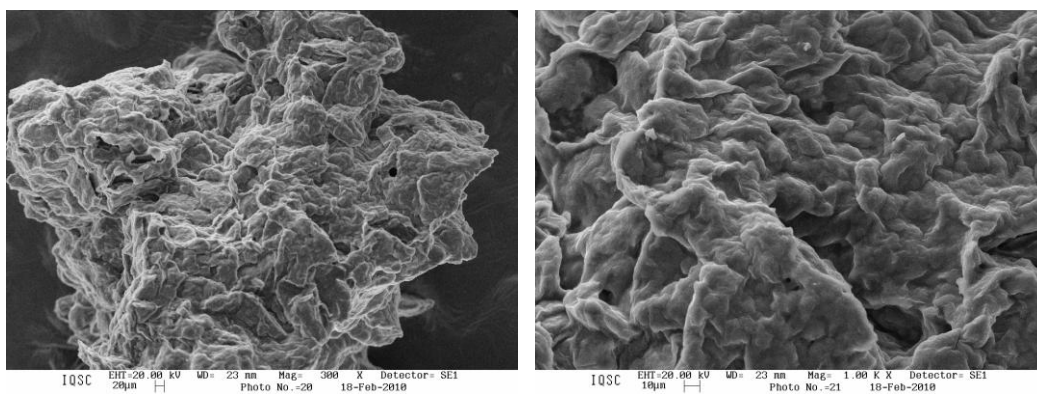
**Figura 42:** Imagem de MEV da mistura binária contendo 20% AEr e 80% PEG.



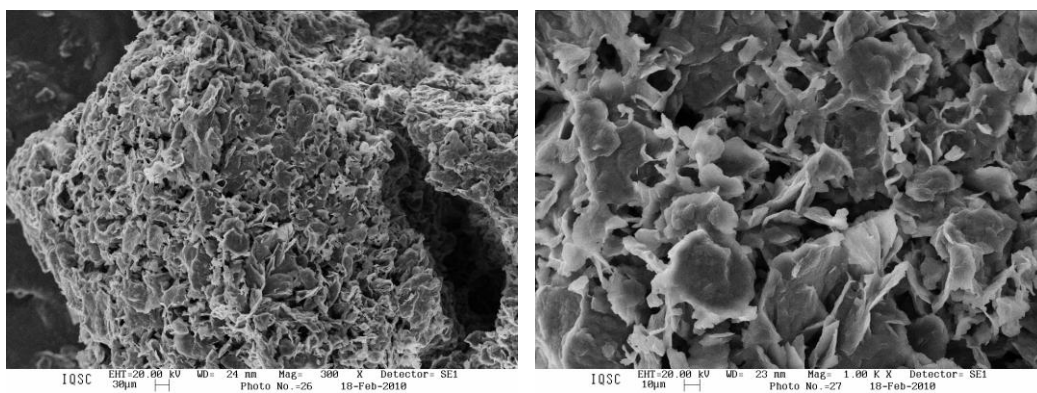
**Figura 43:** Imagem de MEV da mistura binária contendo 30% AEr e 70% PEG.



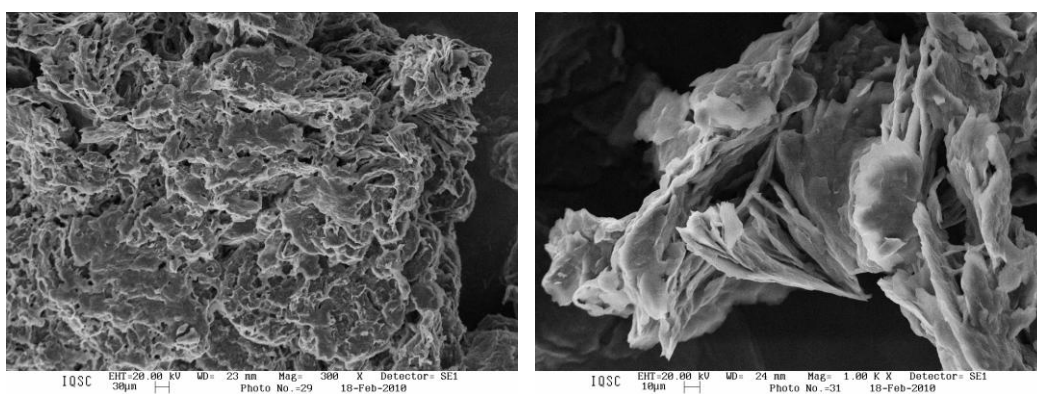
**Figura 44:** Imagem de MEV da mistura binária contendo 40% AE e 60% PEG.



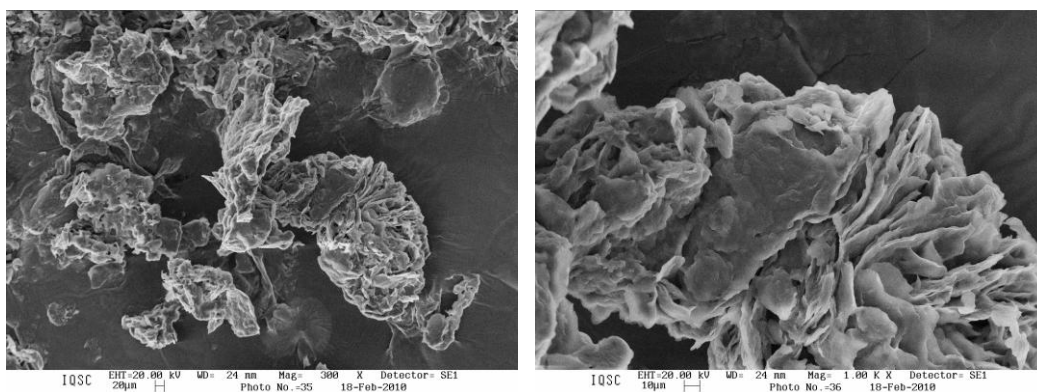
**Figura 45:** Imagem de MEV da mistura binária contendo 50% AE e 50% PEG.



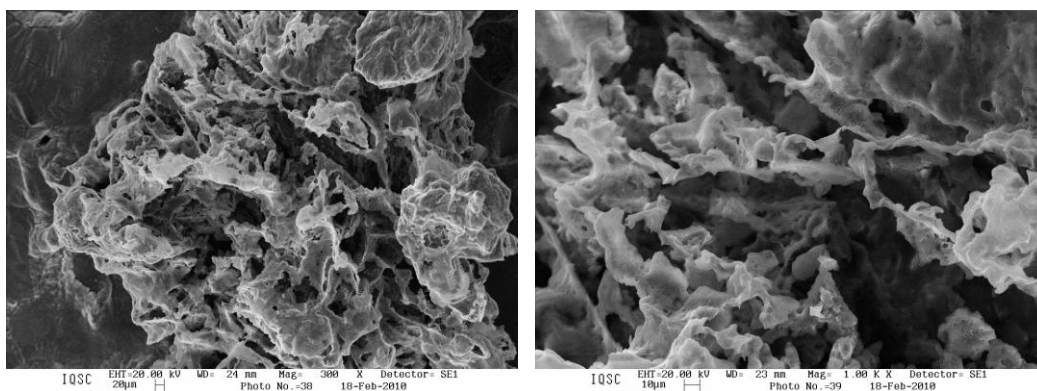
**Figura 46:** Imagem de MEV da mistura binária contendo 60% AE e 40% PEG.



**Figura 47:** Imagem de MEV da mistura binária contendo 70% AE e 30% PEG.



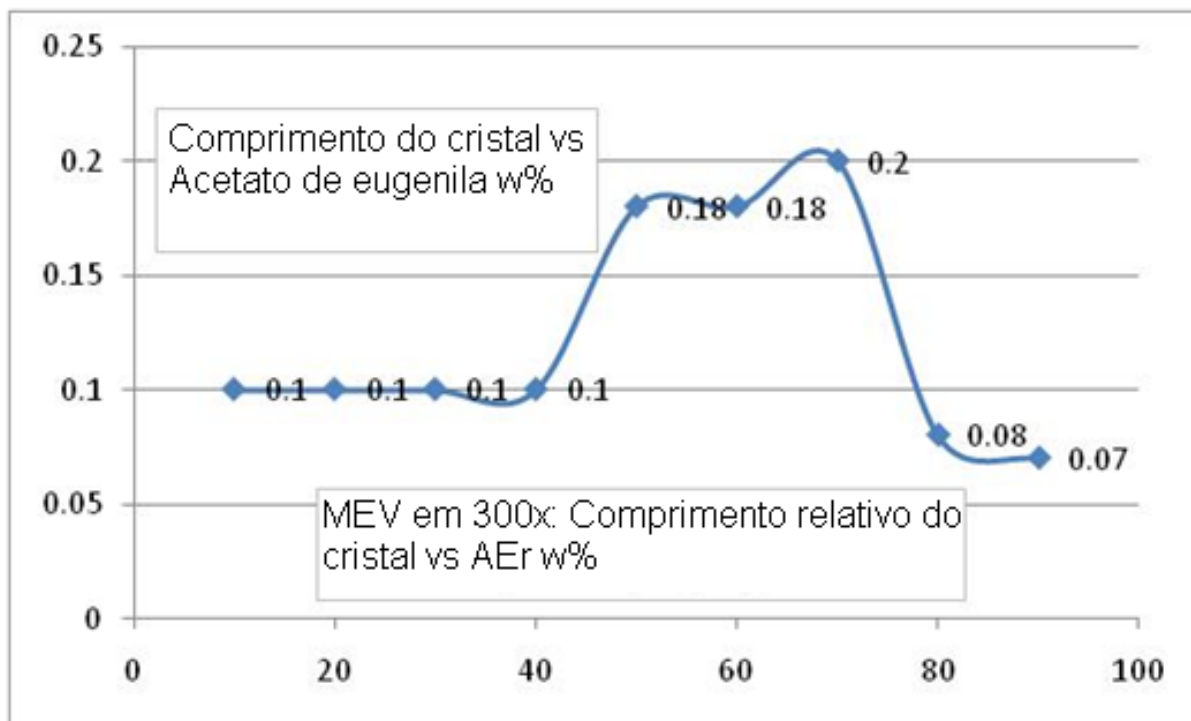
**Figura 48:** Imagem de MEV da mistura binária contendo 80% AE e 20% PEG.



**Figura 49:** Imagem de MEV da mistura binária contendo 90% AE e 10% PEG.

As imagens com magnificação de 300x foram analisadas de duas maneiras. No primeiro estudo foram medidos os comprimentos relativos dos cristais de cada mistura, e a média dos comprimentos foram relacionados à composição das misturas binárias, conforme ilustrado na **Figura 50**.

O maior comprimento de cristal encontrado foi de 0,2 para a mistura eutética, com composição de 80% de AE e 20% PEG 3350, comportamento esperado para um composto eutético.



**Figura 50:** Relação entre o comprimento do cristal e a composição das misturas binárias.

Outro estudo foi realizado para as mesmas misturas binárias como mostrado pela **Figura 51**. A mistura eutética foi usada como referência, na qual todas suas características morfológicas foram listadas. Em seguida, atribuiu-se um ponto positivo para cada característica morfológica, perfazendo um valor total de +6 pontos para o eutético.

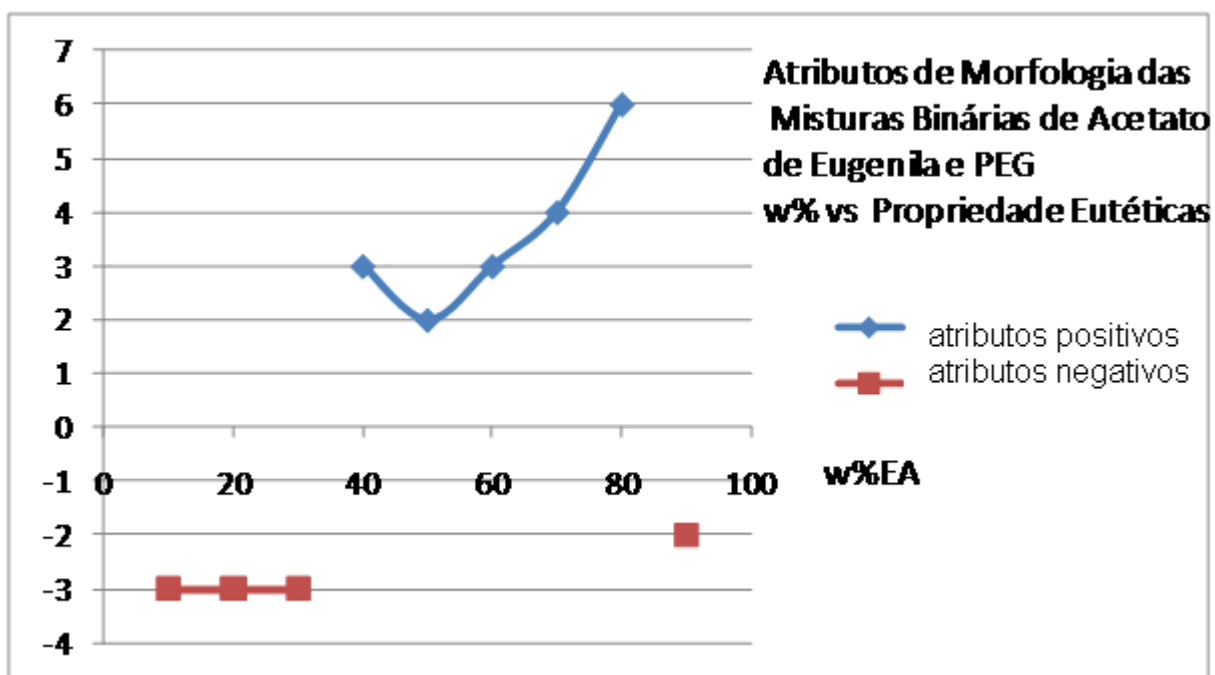
As outras misturas binárias foram visualmente comparadas à mistura eutética, e a cada característica semelhante um ponto positivo foi atribuído, como verificado na **Tabela 8**. As características visuais observadas que não estavam presentes na mistura eutética foram chamadas de atributos negativos, e cada um deles recebeu uma pontuação negativa com valor de -1, como visto na **Tabela 9**.

**Tabela 8:** Tabela de correlação de atributos relacionados à mistura eutética

<i>Pontuação</i>	<i>Atributos morfológicos</i>
+1	Formato de folhas
+1	Superfície em retalhos
+1	Cristais pequenos
+1	Camadas
+1	Empilhado
+1	Agrupados

**Tabela 9:** Tabela de atributos não encontrados na mistura eutética contendo 80% AE e 20% PEG 3350

<i>Pontuação</i>	<i>Propriedades não associadas ao eutético</i>
-1	Formato irregular
-1	Cristais achatados
-1	Superfície estriada e ondulada
-1	Estrutura rígida
-1	Coluna flexível ou filamentosa



**Figura 51:** Correlação entre os atributos morfológicos da mistura eutética e as misturas binárias.

Analisando a **Figura 51** observaram-se duas fases, uma fase semelhante à mistura eutética e outra com diferenças morfológicas.

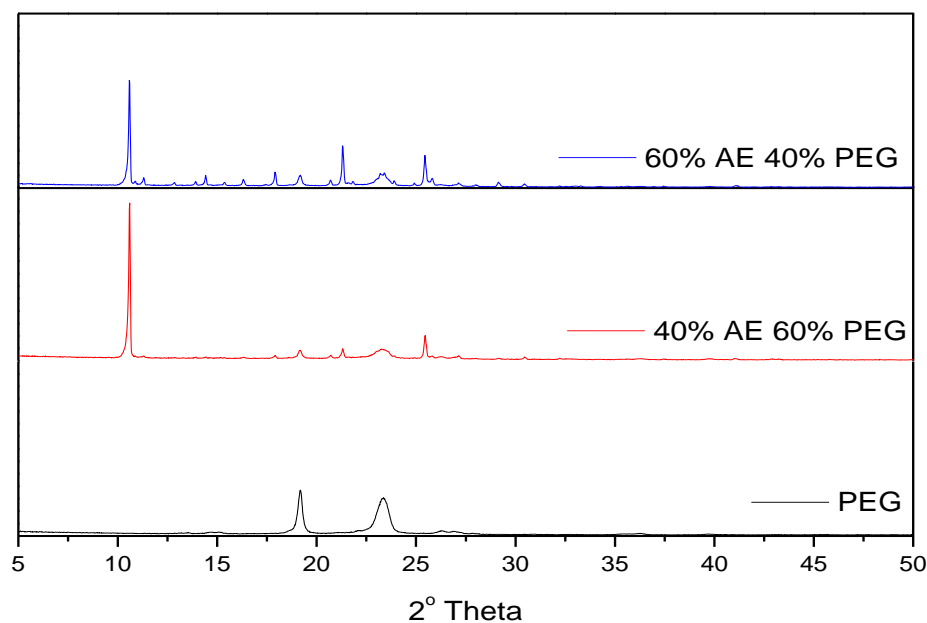
Os pontos em azul e positivo apresentam semelhanças morfológicas com a mistura eutética. Portanto, estas misturas podem ser considerados amostras com composição diferente e inferior de AEr, mas com algumas semelhanças visuais.

Já os pontos em vermelho e com valores negativos mostram diferenças morfológicas com relação à mistura eutética. Estas amostras não apresentam vantagem e similaridade a mistura eutética, portanto seriam descartadas em um estudo de formulação eutética com baixa dosagem de princípio ativo.

Este estudo é um direcionamento para a preparação e emprego de formulações de baixa dosagem.

### 5.7 Difratomia de Raios X pelo método do pó

A técnica de difratometria de Raios X foi usada para avaliar as possíveis ligações químicas entre as misturas. As misturas de 40% de AE e 60% PEG e 60% AE e 40% PEG foram escolhidas para ilustrar este experimento, e então, comparados aos difratogramas individuais, como mostrado na **Figura 47**.



**Figura 52:** Difrátograma de Raios X do PEG 3350, das misturas com 40% AE/ 60% PEG e 60% AE/ 40% PEG.

Os resultados encontrados para as misturas são iguais à soma dos difratogramas dos componentes individuais, AE e PEG, com diferenças nas intensidades dos picos quando relacionados à concentração da amostra. Isto significa que nenhuma combinação química ocorreu entre os componentes individuais, logo, como mostrado em por outras técnicas não houve nenhuma ligação química entre os constituintes, mas sim uma mistura física.



## **CAPÍTULO 4**

*Considerações finais e sugestões*

*futuras*

## 6. CONCLUSÃO

### 6.1 Obtenção do acetato de eugenila

- ✓ O composto derivado do eugenol foi sintetizado empregando o óleo essencial bruto extraído do *Syzygium aromaticum* L, sem prévia purificação. A qualidade do óleo e o alto rendimento do produto, acetato de eugenila sintético, garantem viabilidade econômica e ainda emprega cuidadosamente os recursos naturais, evitando desperdício de tempo e investimento.
- ✓ Os constituintes minoritários presentes no óleo essencial bruto não influenciaram no processo e no rendimento da síntese. Logo, o acetato de eugenila é somado a mesma substância já presente no óleo bruto.
- ✓ Baseado nos resultados de caracterização do acetato de eugenila pôde-se concluir que a cristalização do acetato de eugenila é dependente do grau de pureza e da qualidade do óleo.
- ✓ O estudo realizado utilizando as técnicas de CG apontou o eugenol como o maior constituinte e princípio ativo do *Syzygium aromaticum* L. Também demonstrou uma elevada porcentagem do acetato de eugenila obtido pela síntese desenvolvida.

- ✓ Os resultados de DSC sugeriram que o acetato de eugenila se cristaliza à temperatura ambiente com alto grau de pureza, proporcionando uma relação entre seu comportamento térmico e o grau de pureza.
  
- ✓ As técnicas FTIR e RMN-<sup>13</sup>C foram utilizadas na verificação da modificação molecular ocorrida na estrutura de eugenol a acetato de eugenila, baseados na elucidação da estrutura química.
  
- ✓ As análises de DRX confirmaram a formação de uma estrutura mais estável para o padrão de acetato de eugenila nas condições normais de pressão e temperatura, determinando sua estereoquímica e a estrutura cristalina.
  
- ✓ Após o resfriamento brusco do acetato de eugenila sintético em nitrogênio líquido houve a cristalização da amostra com subsequente solidificação devido à pureza adquirida após o procedimento de cristalização.
  
- ✓ Algumas mudanças nas propriedades físicas e químicas ficaram evidentes, como por exemplo, a alteração do odor intenso e picante, modificação do estado físico, estabilidade, e ainda redução da volatilidade foram alguns dos benefícios obtidos com a modificação.

## 6.2 Eutéticos

- ✓ As misturas binárias foram preparadas utilizando o PEG 3350 como carreador hidrofílico, e o AE como princípio ativo lipofílico.
  
- ✓ O diagrama de fases apontou a mistura eutética com composição de 80% de AE e 20% PEG. As características térmicas do ponto eutético foram de 21,33 °C para temperatura de pico e 5,71 Jg<sup>-1</sup> a energia envolvida no processo de fusão.
  
- ✓ Os dados de FITR e PXRD indicaram que não houve ligação química entre os dois constituintes da mistura, mas sim uma mistura física de componentes.
  
- ✓ A estrutura dos cristais dos eutéticos é fortemente afetada pela mistura com PEG. O número de faces e o brilho estão diretamente ligados a porcentagem de AE, quanto maior a quantidade de AE maior o número de faces e mais brilhante o cristal.
  
- ✓ Pela análise tridimensional do MEV, a mistura eutética apresenta uma superfície constituída de várias estrias, em muitas camadas. Este comportamento é observado possivelmente devido à diferença na velocidade de solidificação de cada composição.
  
- ✓ Algumas características significantes destas misturas foram à redução do tamanho da partícula dos componentes, o aumento da solubilidade do princípio ativo, e temperaturas de fusão mais baixas. Todos estes progressos resultaram em uma melhor taxa de dissolução.

### **6.3 Conclusões gerais**

- ✓ A modificação estrutural na molécula do eugenol foi importante, pois algumas propriedades físico-químicas que comprometem sua utilização foram aperfeiçoadas, como por exemplo, a solubilidade em meio aquoso.
  
- ✓ A mistura eutética foi obtida com finalidade de utilizar o acetato de eugenila com ação anestésica em futuras formulações farmacêuticas, através da melhora de suas propriedades químicas.

## 7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a ação anestésica do acetato de eugenila.
- Estudar outros prováveis fins terapêuticos do eutético formado por acetato de eugenila e polietilenoglicol.
- Avaliar algumas propriedades farmacêuticas, como por exemplo, tempo de absorção, dissolução, liberação, toxicidade, entre outros.
- Estudar outras possíveis formulações farmacêuticas utilizando o acetato de eugenila, com diferentes finalidades, como por exemplo, uso tópico e intravenoso.
- Estudar outros derivados do eugenol, como o metileugenol, e empregá-lo em formulações farmacêuticas.

## **CAPÍTULO 5**

### *Referências Bibliográficas*

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 
- <sup>1</sup> OZTURK, S.; ERCISLI S. The chemical composition of essential oil and in vitro antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Ziziphora persica* Bunge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 372-376, 2006.
- <sup>2</sup> YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001. 500p.
- <sup>3</sup> SANTOS, A.L.; CHIERICE, G.O.; ALEXANDER, K.; RIGA, A.; MATTHEWS, E. Characterization of the raw essential oil eugenol extracted from *Syzygium aromaticum* L. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 96, p. 821-825, 2009.
- <sup>4</sup> BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- <sup>5</sup> BIASSI, I.A. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Ed Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009. 160p.
- <sup>6</sup> SANTOS, A.L.; CHIERICE, G.O.; ALEXANDER, K.; RIGA, A. Crystal structure determination for eugenyl acetate. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 39, p. 655-661, 2009.
- <sup>7</sup> SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC, 2002. 833p.
- <sup>8</sup> SIANI, A.C.; SAMPAIO A.L.F.; SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais. **Biociência**, v. 16, p. 38-43, 2000.



- 
- <sup>9</sup> EBRAHIMI, S.N.; HADIAN, J.; MIRJALILI, M.H.; SONBOLI, A.; YOUSEFZADI, M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymes caramanicus* at different phonological stages. **Food Chemistry**, v. 110, p. 927-31, 2008.
- <sup>10</sup> LEE K.G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. **Food Chemistry**, v.74, p. 443-448, 2001.
- <sup>11</sup> BAKKALI, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils- a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-75, 2008.
- <sup>12</sup> LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, p.47-60, 2000.
- <sup>13</sup> PAOLINI, J.; NASICA, E.; DESJOBERT, J.; MUSELLI, A.; BERNARDINI, A.; COSTA, J. Analysis of volatile constituents isolated by hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction from *Adenostyles briquetii* Gamisans. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 266-76, 2008.
- <sup>14</sup> LAI, F.; WISSING, S.A.; MULLER, R.H.; FADDA, A.M. Artemisia arborescens L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, p. 1-9, 2006.
- <sup>15</sup> CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A.B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a short review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 501-506, 2007.
- <sup>16</sup> ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1996. 337p.

- 
- <sup>17</sup> OZTURK, A.; OZBEK, H. The anti-inflammatory activity of *Eugenia caryophyllata* essential oils: an animal model of anti-inflammatory activity. **European Journal of General Medicine**, v.2, p. 159-63, 2005.
- <sup>18</sup> MOUCHREK, V. **Estudos analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie Pimenta dioica Lindl.** 2000. 124 p. Tese (Doutorado em Química Analítica)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.
- <sup>19</sup> CRUZ, G.L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil.** Belo Horizonte: Velloso, 1965. p. 400-401.
- <sup>20</sup> HE, M.; DU, M.; FAN, M.; BIAN, Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycophatologia**, v. 163, p. 137-43, 2007.
- <sup>21</sup> PAOLI, S.; GIANI, T.S.; PRESTA, G.A.; Pereira M.P.; FONSECA, A.S.; BRANDÃO NETO, J.; MEDEIROS, A.C.; SANTOS-FILHO, S.D.; BERNARDO-FILHO, M. Effects of clove (*Caryophyllus aromaticus* L.) on the labeling of blood constituents with technetium-99m and on the morphology of red blood cells. **Brazilian archives of biology and Technology**, v. 50, p. 175-182, 2007.
- <sup>22</sup> GUENTHER, E. **The essential oils.** New York: D. Van Nostrand, 1950. v.4
- <sup>23</sup> GUENETTE, S.A.; RODD, A.; MARIER, J.F.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 562, p. 60-7, 2007.
- <sup>24</sup> GUENETTE S.A.; HELIE P.; BEAUDRY F.; VACHON P. Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 34, p. 164–170, 2007.
- <sup>25</sup> MATELIC`, J.; JERKOVIC, I.; BLAZEVIC`, I.; POLJAK-BLAZI, M.; BOROVIĆ, A. A comparative study on the anti-oxidant and biological activities of carvacrol, thymol and

---

eugenol derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3989-3996, 2008.

<sup>26</sup> SANTOS, A.L.; CHIERICE, G.O.; RIGA, A.; ALEXANDER, K. Thermal behavior and structural properties of plant derived eugenyl acetate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, p. 329–332, 2009.

<sup>27</sup> DHIRENDRA, K.; LEWIS, S.; UDUPA, N.; ATIN, K. Solid dispersions: a review. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v. 22, p. 234-246, 2009.

<sup>28</sup> KOUTNOUYAN, H.A.; RASGON, B. M.; CRUZ, R.M. Efficacy of a eutectic mixture of local anesthetics as a topical anesthetic in minor otologic procedures. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, n.121, p.38-42, 1999.

<sup>29</sup> SERAJUDDIN, A.T.M. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p. 1058-1066, 1999.

<sup>30</sup> ZHIQIANG, C.; JUNZE, J.; DONG, L.; XIANSHU, Z.; CHO, Y.; OH, Y.; SHIM, J. Thermodynamic criterion of separated eutectic phenomena. **Journal of Materials Science**, v. 33, p. 2313-2317, 1998.

<sup>31</sup> GUPTA, R.K.; SINGH, S.K.; SINGH, R.A. Some physicochemical studies on organic eutectics. **Journal of Crystal Growth**, v.300, p.415- 420, 2007.

<sup>32</sup> STOTT, P.W.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Transdermal delivery from eutectic systems: enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. **Journal of Controlled Release**, v. 50, p. 297-308, 1998.

<sup>33</sup> CARSTENSEN, J.T. **Solid pharmaceuticals: mechanical properties and rate phenomena**. New York: Academic Press, 1980. p. 259.

- 
- <sup>34</sup> LAW, D.; WANG, W.; SCHMITT, E.A.; QIU, Y.; KRILL, S.L.; FORT, J.J. Properties of rapidly dissolving eutectic mixtures of poly(ethylene glycol) and fenofibrate: the eutectic microstructure. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p. 505-515, 2003.
- <sup>35</sup> VIPPAGUNTA, S.R.; WANG, Z.; HORNUNG, S.; KRILL, S.L. Factors affecting the formation of eutectic solid dispersions and their dissolution behavior. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 294-304, 2007.
- <sup>36</sup> GUENET, J-M. Contributions of phase diagrams to the understanding of organized polymer-solvent systems. **Thermochemica Acta**, v. 298, p. 67-83, 1996
- <sup>37</sup> KANG, L.; JUN, H.W. Formulation and efficacy studies of new topical anesthetic creams. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, p. 505-512, 2003.
- <sup>38</sup> CARSTENSEN, J.T. **Advanced pharmaceutical solids**. New York: Marcel Dekker, 2001. v. 110.
- <sup>39</sup> CHAAR, J.S.; MOUCHRECK-FILHO, V.E.; BREVIGLIERI S.T.; CAVALHEIRO, E.T.G.; CHIERICE, G.O. Boiling temperatures and enthalpy changes of essential oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.75, p. 437-43, 2004.
- <sup>40</sup> ENRAF-NOMIUS. **COLLECT**. Delft: Nonius BV, 1997. Programa de computador.
- <sup>41</sup> OTWINOWSKI Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Methods Enzymology**, v. 276, p. 307-326, 1997.
- <sup>42</sup> SHELDRIK, G.M. **Program for crystal structure resolution**. SHEL8XS-97, Gottingen, 1997.
- <sup>43</sup> FARRUGIA, L.J. ORTEP-3 for windows- a version of ORTEP-III with a graphical user interface. **Journal of Applied Crystallography** v. 30, p. 565, 1997.

- 
- <sup>44</sup> SHABIR, G.A. Method development and validation for the GC-FID assay of p-cymene in tea tree oil formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 681-4, 2005.
- <sup>45</sup> CHE MAN, Y.B.; SWE, P.Z. Thermal analysis of failed-batch palm oil by differential scanning calorimetry. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 72, p. 1529-1532, 1995.
- <sup>46</sup> CHIAVARO, E.; VITTADINI, E.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T.; CERRETANI, L.; BENDINI, A. Differential scanning calorimeter application to the detection of refined hazelnut oil in extra virgin olive oil. **Food Chemistry**, v. 110, p. 248-256, 2008.
- <sup>47</sup> TAN, C.P.; CHE MAN, Y.B. Comparative differential scanning calorimetric analysis of vegetable oils: I. Effect of heating rate variation. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 129-141, 2002.
- <sup>48</sup> JACKSON, K.A.; HUNT, J.D. Binary eutectic solidification. **Transaction Metal Society AIME**, v. 236, p. 843-852, 1966.
- <sup>49</sup> FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Edusp, 2003. 732 p.
- <sup>50</sup> PODOLINSKY, V.V.; TARAN, Y.N. Influence of absorption on structure formation in eutectic systems. **Journal of Crystal Growth**, v. 52, p. 82-87, 1981.
- <sup>51</sup> NEWA, M.; BHANDARI, K.H.; LI, D.X.; KWON, T.H.; KIM, J.A.; YOO, B.K.; WOO, J.S.; LYOO, W.S.; YOG, C.S.; CHOI, H.G. Preparation, characterization and in vivo evaluation of ibuprofen binary solid dispersions with poloxamer 188. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, p. 228-237, 2007.
- <sup>52</sup> CARSTENSEN, J.T. **Pharmaceutics of solids and solid dosage forms**. New York: Wiley-Interscience, 1977. p.256.

---

<sup>53</sup> LERDKANCHANAPORN, S.; DOLLIMORE, D.; EVANS S.J. Phase diagram for the mixtures of ibuprofen and stearic acid. **Thermochimica Acta**, v. 367, n. 368, p. 1-8, 2001.

<sup>54</sup> CARSTENSEN, J.T.; TOMMY, M. Chemical stability of indomethacin in solid amorphous and molten states. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 6, p. 657-659, 1993.