



**LUCIMARA NAZARÉ SILVA BOTELHO MARTINS**

**COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE ÓLEO ESSENCIAL DE  
*CALLISTEMON VIMINALIS* E  $\beta$ -CICLODEXTRINA:  
PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E TESTES DE TOXICIDADE**

**LAVRAS-MG  
2018**

**LUCIMARA NAZARÉ SILVA BOTELHO MARTINS**

**COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE ÓLEO ESSENCIAL DE  
*CALLISTEMON VIMINALIS* E  $\beta$ -CICLODEXTRINA:  
PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E TESTES DE TOXICIDADE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica para obtenção do título de Doutor.

Prof. Dra. LUCIANA DE MATOS ALVES PINTO  
ORIENTADORA

**LAVRAS-MG  
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Martins, Lucimara Nazaré Silva Botelho.

Complexo de inclusão entre óleo essencial de *Callistemon  
viminalis* e  $\beta$ -ciclodextrina: preparação, caracterização, atividade  
antibacteriana, antifúngica e testes de toxicidade / Lucimara Nazaré  
Silva Botelho Martins. - 2018.

108 p. : il.

Orientador(a): Luciana de Matos Alves Pinto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.  
Bibliografia.

1. Monoterpenos. 2. Solubilidade. 3. Atividade biológica. I.  
Pinto, Luciana de Matos Alves. . II. Título.

O conteúdo desta obra é de responsabilidade do(a) autor(a) e de seu  
orientador(a).

**LUCIMARA NAZARÉ SILVA BOTELHO MARTINS**

**COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE ÓLEO ESSENCIAL DE *CALLISTEMON*  
*VIMINALIS* E  $\beta$ -CICLODEXTRINA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E TESTES DE TOXICIDADE**

**INCLUSION COMPLEX BETWEEN ESSENTIAL OIL OF *CALLISTEMON*  
*VIMINALIS* AND  $\beta$ -CYCLODEXTRIN: PREPARATION, CHARACTERIZATION,  
ANTIBACTERIAL, ANTIFUNGAL ACTIVITY AND TOXICITY TESTS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 25 de junho de 2018.

Dr. Anderson Assaid Simão	UFLA
Dra. Juliana Mesquita Freire	UFLA
Dra. Priscila Ferreira de Sales	IFMG
Dr. Sérgio Scherrer Thomasi	UFLA

Prof. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto  
ORIENTADORA

**LAVRAS-MG  
2018**

*Aos meu pais, Maria Aparecida e José Antônio Botelho, as minhas irmãs Luciana e Luana, as minhas sobrinhas Laura, Niara e Laís ao meu marido Bruno e minha filha Lorena, pelo incentivo, confiança, e amor sempre.*

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus por estar sempre presente em minha vida, iluminando meus passos e guiando o melhor caminho a seguir.

Aos meus pais, minhas irmãs e minhas sobrinhas pelo carinho, apoio e dedicação.

Ao meu marido Bruno por estar sempre presente, sendo companheiro nas horas mais difíceis.

A minha filha Lorena por todo carinho, compreensão e por tornar meus dias mais alegres.

A Professora Luciana de Matos Alves Pinto pela orientação, apoio, paciência e todos os ensinamentos que a mim foram passados.

À universidade Federal de Lavas (UFLA), ao Departamento de Química (DQI) e ao Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos, pela oportunidade para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento a Pesquisa (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da pesquisa e concessão da bolsa de estudos.

Aos meus colegas de Laboratório de Bioquímica, que estiveram presentes ao longo dessa caminhada.

Aos meus familiares e amigos que sempre torceram por mim e sempre estiveram do meu lado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram e fizeram parte da realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO GERAL

Óleos essenciais (OEs) são constituídos por compostos bioativos de ocorrência natural, provenientes do metabolismo secundário de algumas plantas. O OE *Callistemon viminalis* (OEC) é rico em componentes químicos com diversas propriedades biológicas (antibacteriana, antifúngica, inseticida, antitumoral, entre outras). A utilização de OEs tem crescido muito nos últimos anos, porém sua utilização em altas concentrações podem ser prejudiciais à saúde do homem. A formação de complexos de inclusão (CIs) de OEs com ciclodextrinas (CDs) está sendo cada vez mais estudados, a fim de reduzir algumas características indesejáveis, como a alta volatilidade e baixa solubilidade dos OEs. Com isso, o objetivo deste estudo foi preparar o CI entre o OEC e a  $\beta$ -CD pelos métodos malaxagem (MA) e co-precipitação (CO-P). Caracterizar a formação do CI por técnicas espectroscópicas, calorimétricas, microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raio-x (DRX) e modelagem molecular (MM). Observar as mudanças ocorridas nas propriedades do OEC como (solubilidade, volatilidade, atividade antibacteriana, antifúngica e a toxicidade fosfolipásica e sobre sementes de alface), após a formação dos CIs. A solubilidade em água do OEC foi aumentada 8 vezes. A taxa de liberação do OEC nos CIs foi melhorada com uma média de 72% de liberação após oito dias, contra 83% de liberação do OEC puro em dois dias. Os resultados espectroscópicos e calorimétricos demonstraram que o CI OEC/ $\beta$ -CD possui diferentes características físico-químicas do OEC livre. As mudanças estruturais e morfológicas observadas por MEV e DRX também confirmaram a formação do CI, pela redução no grau de cristalinidade. A atividade antibacteriana e antifúngica do OEC foi melhorada após a complexação, apresentando um redução da concentração mínima inibitória (CMI) de 250 para 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *S. aureus* nos CIs preparados por MA e CO-P. Para a *L.monocytogens* a redução no CMI foi de 250 para 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no CI preparado por MA. Para o fungo *A. flavus* o CMI 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  reduziu para 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o CI preparado por MA e para o fungo *A. ochraceus* o CMI de 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi reduzido para 15,62  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nos CIs preparados por MA e CO-P. A toxicidade do OEC no CIs foi reduzida no teste com sementes de alface, apresentando porcentagem de germinação (%GR) para a MA de 91,3% e de 75,3% para CO-P. Os CIs inibiram a ação das fosfolipases A2 da peçonha de *Bothrops atrox*, de forma mais pronunciada nos CI preparado por MA. Os componentes majoritários encontrados no OEC foram o 1,8-cineol (67,70%),  $\alpha$ -pineno (15,01%) e  $\alpha$ -terpineol (7,72%). A modelagem molecular (MM), revelou que esses componentes formam CIs energeticamente favoráveis, porém o terpineol na posição 'up' a-aa (axial-anti, anti), e o CI mais estável com um  $\Delta E = -69,42 \text{ kJ mol}^{-1}$ , quando comparado com os outros componentes complexados isoladamente. A formação do CI entre o OEC/ $\beta$ -CD é uma boa alternativa para melhorar a solubilidade e volatilidade que este OE apresenta, mantendo suas propriedades biológicas. Reduz sua toxicidade e prolonga sua ação, ampliando assim suas formas de utilização, de maneira mais segura para o homem e ao meio ambiente.

**Palavras-chave:** Monoterpenos. Ciclodextrinas. Complexação. Antibacteriana. Antifúngica.

## GENERAL ABSTRACT

Essential oils (EOs) are composed of naturally occurring bioactive compounds from the secondary metabolism of some plants. EO of *Callistemon viminalis* (EOC) is rich in chemical components with diverse biological properties (antibacterial, antifungal, insecticide, antitumor, among others). The use of EOs has grown greatly in recent years, but their use in high concentrations can be harmful to human health. The formation of inclusion complexes (ICs) of EOs with cyclodextrins (CDs) are being increasingly studied in order to reduce some undesirable characteristics such as high volatility and low solubility of EOs. Therefore, the objective of this study was to prepare the IC between EOC and  $\beta$ -CD by the methods of kneading (KN) and co-precipitation (CO-P). Characterization of IC formation by spectroscopic techniques, calorimetric, scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) and molecular modeling (MM) were performed. To observe the changes in the EOC properties as (solubility, volatility, antibacterial activity, antifungal and phospholipase toxicity, hemolytic and lettuce seeds) after the formation of ICs. The water solubility of the EOC was increased 8-fold. The release rate of EOC in the ICs was improved with an average of 72% release after eight days, versus 83% release of pure EOC in two days. The spectroscopic and calorimetric results demonstrated that the EOC/ $\beta$ -CD IC has different physicochemical characteristics from the free EOC. The structural and morphological changes observed by SEM and XRD also confirmed the formation of IC by reducing the degree of crystallinity. The antibacterial and antifungal activity of EOC was improved after complexation, with a reduction of inhibitory minimum concentration (IMC) from 250 to 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for *S. aureus* in ICs prepared by KN and CO-P respectively. For *L. monocytogenes* the reduction in IMC was from 250 to 62.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in IC prepared by KN. For the fungus *A. flavus* the IMC of 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  reduced to 62.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for the IC prepared by KN and for the *A. ochraceus* fungus the IMC of 62.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was reduced to 15, 62  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in ICs prepared by KN and CO-P. The toxicity of EOC in ICs was reduced in the test with lettuce seeds, presenting germination percentage (% GR) for KN of 91.3% and of 75.3% for CO-P. ICs inhibited the action of both phospholipases A2 from *Bothrops atrox* venom, more pronounced on IC prepared by KN. The major components found in the EOC were 1,8-cineole (67.70%),  $\alpha$ -pinene (15.01%) and  $\alpha$ -terpineol (7.72%). Molecular modeling (MM) revealed that these components formed energetically favorable ICs, but the up-to-aa (axial-anti, anti) position terpineol and the more stable IC with a  $\Delta E = -69.42$   $\text{kJ mol}^{-1}$  when compared to the other complexed components alone. The formation of IC between EOC/ $\beta$ -CD is a good alternative to improve the solubility and volatility that this EO presents, maintaining its biological properties. It reduces its toxicity and prolongs its action, thus increasing its use, in a way that is safer for man and the environment.

**Keywords:** Monoterpenes. Cyclodextrins. Complexation. Antibacterial. Antifungal.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Rota biossintética dos metabólitos secundários.....	21
Figura 2 - Estrutura básica: A) fenilpropanoídes e B) isopreno.....	22
Figura 3 - Via do mevalonato para a formação do isopentenil difosfato.....	23
Figura 4 – Via DXPS para a formação do isopentenil difosfato.....	24
Figura 5 - Biossíntese dos terpenos.....	25
Figura 6 - Planta <i>Callistemon Viminalis</i> (escova de garrafa).....	26
Figura 7 - Principais componentes majoritários encontrados no OEC. A) 1,8-cineol; B) $\alpha$ -pineno; C).....	27
Figura 8 - Representação esquemática das ciclodextrinas: $\alpha$ -ciclodextrina, $\beta$ -ciclodextrina e $\gamma$ -.....	29
Figura 9 - Estrutura da ciclodextrina.....	29
Figura 10 - Representação esquemática da formação do complexo de inclusão.....	31
Figura 11 - Perfis de solubilidade de fases e classificação do complexo de inclusão (Higuchi e Connors, 1965). .....	35

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

Figura 1 – Cromatograma do óleo essencial de <i>C. viminalis</i> analisado por cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (CG-MS) .....	54
Figura 2 - Principais constituintes químicos presentes nas folhas do óleo essencial de <i>Callistemon viminalis</i> (OEC).....	54
Figura 3- Estudo da solubilidade de fase do óleo essencial de <i>Callistemon viminalis</i> (OEC) com a $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) realizado na temperatura ambiente de 25 °C.....	56
Figura 4 - Espectro de absorção na região do UV-visível do óleo essencial de <i>C. viminalis</i> (OEC), $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), malaxagem (MA) e co-precipitação (CO-P) .....	57
Figura 5 - Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) das amostras: (a) óleo essencial de <i>C. viminalis</i> (OEC); (b) $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD); (c) malaxagem (MA), (d) co-precipitação (CO-P) e (e) mistura física (MF) .....	58
Figura 6 - Termogramas obtidos por calorimetria exploratória diferencial (DSC): (a) $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD); (b) óleo essencial de <i>C. viminalis</i> (OEC); (c) malaxagem (MA); (d) co-precipitação (CO-P) e (e) mistura física (MF) .....	60

### TERCEIRA PARTE – ARTIGO 2

Figura 1 - Curvas da análise termogravimétrica do óleo essencial de <i>C. viminalis</i> (OEC), $\beta$ -ciclodextrina $\beta$ -CD, mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-precipitação (CO-P). (a) curva de termogravimetria (TG) e (b) curva da derivada da termogravimetria (DTG) .....	75
---	----

Figura 2 - Difratoograma de raio-x. (a)  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD); (b) mistura física (MF); (c) co-precipitação (CO-P); (d) malaxagem (MA) ..... 76

Figura 3 - Micrografias de varredura (A)  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD); (B) mistura física (MF); (C) co-precipitação (CO-P); (D) malaxagem (MA). Todas as amostras foram apresentadas em três diferentes ampliações, seguindo a ordem de (I) 252X, (II) 688X; (III) 1780X ..... 78

Figura 4 - Porcentagem de liberação (a) óleo essencial de *C. viminalis* (OEC); (b) mistura física (MF); (c) co-precipitação (CO-P) e (d) malaxagem (MA), em função do tempo ..... 79

Figura 5 - Porcentagem de germinação das sementes de *L. sativa* nos tratamentos malaxagem (MA), co-precipitação (CO-P) e água destilada, avaliados a cada 8 horas por um período de 48h ..... 81

Figura 6 - Avaliação da atividade enzimática de fosfolipase A<sub>2</sub> presentes na peçonha de *Bothrops atrox*, para mistura física (MF), malaxagem (MA), co-precipitação (CO-P) e óleo essencial *C. viminalis* + peçonha (OEC+P). \*difere estatisticamente do respectivo controle positivo pelo teste Tukey (p<0,05) .. 82

### QUARTA PARTE – ARTIGO 3

Figura 1 - Esquema representativo da orientação de uma molécula de CD no plano xy e a molécula hóspede no eixo z ..... 92

Figura 2 - Estruturas conformacionais das moléculas rígidas isoladas.  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), cineol e pineno, com seus respectivos valores de energia ..... 95

Figura 3 - Estrutura do terpineol nas suas diferentes conformações na posição axial e equatorial, e seus respectivos valores de energia e porcentagem populacional (%P). As nomenclaturas utilizadas na ordem (1-2 3) foram em 1: a (axial) ou e (equatorial); e em 2 e 3: a (anti), p (gauche +), m (gauche -) ..... 96

Figura 4 - Perfil de energia livre obtida para inclusão das moléculas a) cineol e b) pineno na cavidade da CD ..... 97

Figura 5 - Perfil de energia livre obtida para inclusão da molécula terpineol axial nas posições a) 'up' e 'b) down' na cavidade da  $\beta$ -CD ..... 98

Figura 6 - Perfil de energia livre obtida para inclusão da molécula terpineol equatorial nas posições a) 'up' e b) 'down' na cavidade da  $\beta$ -CD.....99

Figura 7 - Dinâmica molecular da molécula hóspede antes e após a complexação com a  $\beta$ -CD. A) cineol 'up'; B) cineol 'down'; C) pineno 'up'; D) pineno 'down'; E) terpineol 'up' a-aa; F) terpineol 'down' a-am; G) terpineol 'up' e-am e H) terpineol 'down' e-pm ..... 102

Figura 8 - Porcentagem de inibição do óleo essencial de *C. viminalis* (OEC), malaxagem (MA), co-precipitação (CO-P), mistura física (MF) sobre os fungos *A. flavus* *A. carbonarius* e *A. ochraceus* no CMI na qual houve a inibição ..... 105

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de *Callistemon viminalis* (OEC) identificados por .....53

Tabela 2 – Concentração mínima inibitória (CMI- $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) do óleo essencial de *C. viminalis* (OEC) e dos .....61

### TERCEIRA PARTE

Tabela 1 - Porcentagem de perda de massa do óleo essencial de *C. viminalis* (OEC),  $\beta$ -ciclodextrina  $\beta$ -CD, mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-precipitação (CO-P) nas faixas de temperaturas de 30 a 120 °C; 40 a 180 °C e 270 a 430 °C ..... 75

Tabela 2 - Variação do índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (%GR) e taxa de crescimento radicular (CR) de sementes de *L. sativa* em função de diferentes tratamentos ..... 80

### QUARTA PARTE

Tabela 1 - Mínimos de energia e porcentagem de população para o cineol e para o pineno ..... 97

Tabela 2 - Mínimos de energia e porcentagem de população para o terpineol axial ‘up’ e ‘down’ ..... 98

Tabela 3 - Mínimos de energia e porcentagem de população para o terpineol equatorial ‘up’ e ‘down’ .. 99

Tabela 4 - População para o terpineol equatorial e axial..... 100

Tabela 5 - Energias dos complexos de inclusão mediante dinâmica molecular ..... 101

Tabela 6 - Concentração mínima inibitória (CMI)  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e comprimento dos halos de inibição causados pelo óleo essência de *C. viminalis* (OEC) e dos complexos de inclusão (CIs) para os fungos avaliados ..... 104

## LISTA DE SIGLAS

BHI - Caldo de Infusão de Cérebro e Coração  
CDs - Ciclodextrinas  
CI - Complexo de inclusão  
CIs - Complexos de inclusão  
CL - Cloranfenicol  
CMI - Concentração mínima inibitória  
CO-P - Co-precipitação  
CR - Taxa de crescimento radicular  
DM - Dinâmica molecular  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
DRX - Difração de raio-x  
DSC - Calorimetria exploratória diferencial  
FL - Fluodioxonil  
HP $\beta$ -CD - Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina  
IK - Índice de Kovats  
ISO - International Standard Organization  
IV - Espectroscopia de infravermelho  
IVG - Índice de velocidade de germinação  
Ka - Constante de associação  
MA - Malaxagem  
MEA - Ágar Extract Malt  
MEV - Microscopia eletrônica de varredura  
MF - Mistura física  
MH - Ágar Mueller-Hinton  
MM - Modelagem molecular  
OEs - Óleos essenciais  
OEC - Óleo essencial de *Callistemon Viminalis*  
OEC + P - OEC incubado com peçonha  
PBS - Tampão fosfato salino  
PPs - Fenilpropanóides  
TG - Termogravimetria  
TSB - Caldo de soja trípica  
UV-vis - Espectroscopia de absorção Ultravioleta-visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$ -CD - Alfa-ciclodextrina

$\beta$ -CD - Beta-ciclodextrina

$\gamma$ -CD - Gama- ciclodextrina

$S_0$  - Solubilidade intrínseca

%GR - Porcentagem de germinação

%I - Porcentagem de inibição

d(A)\* - Posição em relação ao centro da CD

%P - Porcentagem populacional

a - Axial

a - Anti

E - Equatorial

terp. - Terpeneol

m - Gauche -

p - Gauche +

$\Delta E$  - Variação de energia cinética

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>18</b>
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1 Óleos essenciais</b> .....	<b>20</b>
3.1.1 Óleo essencial de <i>Callistemon Viminalis</i> .....	25
<b>3.2 Ciclodextrinas</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3 Complexos de inclusão</b> .....	<b>30</b>
3.3.1 Preparo dos complexos de inclusão .....	32
<b>3.4 Caracterização dos complexos de inclusão</b> .....	<b>34</b>
3.4.1 Diagrama de solubilidade de fase.....	34
3.4.2 Espectroscopia ultravioleta-visível .....	36
3.4.3 Espectroscopia de infravermelho .....	37
3.4.4 Calorimetria exploratória diferencial .....	37
3.4.5 Termogravimetria.....	38
3.4.6 Difratomia de raios-x .....	39
3.4.7 Microscopia eletrônica de varredura .....	39
3.4.8 Modelagem molecular.....	40
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1</b> .....	<b>46</b>
<b>PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA</b> .....	<b>46</b>
<b>DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE</b> .....	<b>46</b>
<b><i>CALLISTEMON VIMINALIS</i> E <math>\beta</math>-CICLODEXTRINA</b> .....	<b>46</b>
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1 Soluções e reagentes .....	49
2.2 Obtenção e caracterização do óleo essencial de <i>C. viminalis</i> .....	49
2.3 Preparação dos complexos de inclusão.....	50
2.3.1 Malaxagem.....	50
2.3.2 Co-precipitação .....	50
2.4 Isotermas de solubilidade.....	51
2.5 Espectroscopia ultravioleta-visível .....	51
2.6 Infravermelho.....	51
2.7 Calorimetria exploratória diferencial.....	52
2.8 Atividade antibacteriana .....	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
3.1 Caracterização e quantificação do óleo essencial de <i>C.viminalis</i> .....	53

3.2	Isoterma de solubilidade .....	55
3.3	UV-visível.....	57
3.4	Infravermelho.....	58
3.5	Calorimetria exploratória diferencial.....	59
3.6	Atividade antibacteriana .....	60
4.	CONCLUSÃO.....	63
5.	AGRADECIMENTOS .....	63
5.	REFERÊNCIAS .....	63
<b>TERCEIRA PARTE – ARTIGO 2 .....</b>		<b>67</b>
<b>TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>CALLISTEMON</i>.....</b>		<b>67</b>
<b><i>VIMINALIS</i> COMPLEXADO COM CICLODEXTRINAS .....</b>		<b>67</b>
1.	INTRODUÇÃO.....	69
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1	Soluções e reagentes .....	70
2.2	Obtenção do óleo essencial de <i>C. Viminalis</i> .....	70
2.3	Preparo dos complexos de inclusão .....	71
2.3.1	Malaxagem.....	71
2.3.2	Co-precipitação .....	71
2.4	Caracterização dos complexos de inclusão.....	72
2.5	Ensaio de liberação do óleo essencial de <i>C. viminalis in vitro</i> .....	72
2.6	Bioensaios usando o modelo de <i>L. sativa</i> L.....	73
2.7	Atividade fosfolipásica .....	73
2.8	Análise estatística .....	74
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	74
3.1	Termogravimetria .....	74
3.2	Difração de raios-X.....	76
3.3	Microscopia eletrônica de varredura.....	77
3.4	Liberação controlada.....	79
3.5	Bioensaios com o modelo <i>Lactuca sativa</i> L. ....	80
3.6	Atividade fosfolipásica .....	82
4.	CONCLUSÃO.....	83
5.	AGRADECIMENTOS .....	84
6.	REFERÊNCIAS .....	84
<b>QUARTA PARTE – ARTIGO 3 .....</b>		<b>87</b>
<b>ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INVESTIGAÇÃO TEÓRICA DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>CALLISTEMON VIMINALIS</i> .....</b>		<b>87</b>
1.	INTRODUÇÃO.....	89
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	90
2.1	Minimização de energia.....	90
2.2	Simulação do processo de inclusão molecular .....	91
2.3	Dinâmica Molecular .....	92
2.4	Atividade antifúngica do óleo essencial <i>C. viminalis</i> e dos complexos de inclusão .....	93

2.4.1	Obtenção e caracterização do óleo essencial de <i>C. viminalis</i> .....	93
2.4.2	Preparo dos complexos de inclusão .....	93
2.4.3	Atividade antifúngica .....	94
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	95
3.1	Minimização de energia .....	95
3.2	Simulação do processo de inclusão molecular .....	96
3.3	Dinâmica molecular .....	100
3.4	Atividade antifúngica.....	104
4.	CONCLUSÃO.....	106
5.	AGRADECIMENTOS .....	107
6.	REFERÊNCIAS .....	107

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de compostos orgânicos encontrados em diversos tipos de plantas, sua extração pode obtida por diversas partes da planta, como as flores, cascas, frutos, raízes, sementes e folhas. Sua composição química varia, sendo afetada por diversos fatores externos, como clima, solo, local de plantio, horário da colheita. São substâncias líquidas, hidrofóbicas e apresenta como principal característica a volatilidade. São muito sensíveis e podem sofrer degradação sob a ação da luz, oxigênio e temperaturas. Sendo assim, para certas aplicações, verifica-se a necessidade da incorporação em sistemas carreadores pode modificar tais características.

Os OEs obtidos de diferentes partes da planta têm sido amplamente utilizados na indústria de alimentos, cosméticos, inseticidas, entre outras. Quimicamente, são constituídos principalmente de terpenoides, em particular monoterpenos e sesquiterpenos. Os monoterpenos constituem 90% dos OEs e apresentam propriedades farmacológicas relevantes, tais como: antimicrobiana, hipotensiva, antifúngica, anti-inflamatória, alelopática, repelente, e antitumoral (CALDAS et al., 2016).

A utilização de produtos naturais como os OEs em medicamentos ou em alimentos tem crescido muito nos últimos anos, porém sua utilização em concentrações elevadas pode apresentar atividade tóxica, hemolítica, citotóxica e até mutagênica para o ser humano, provocando reações inesperadas durante ou após seu uso (BORS et al., 2012). Além do mais, suas características como insolubilidade aquosa, volatilidade, instabilidade frente a luz, temperatura, oxidação e hidrólise limitam a sua utilização. Por isso é de extrema importância realizar estudos referentes à toxicidade de produtos naturais e buscar alternativas para contornar essas características indesejáveis que os OEs apresentam.

Várias abordagens têm sido realizadas a fim de melhorar a utilização dos OEs e compostos voláteis. Nesse contexto, as ciclodextrinas (CDs) são amplamente utilizadas. As CDs são polímeros cíclicos de glicose, unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, que possuem um formato de cone truncado, com exterior hidrofílico e interior hidrofóbico (TORRES et al., 2018). São solúveis em água e capazes de formar complexos de inclusão (CI) com uma grande variedade

de moléculas em solução, melhorando a solubilidade, estabilidade e disponibilidade da molécula complexada (AGUIAR et al., 2014).

A formação dos CIs pode ser caracterizada através de metodologias analíticas que permitem detectar as variações nas propriedades físico-químicas da molécula hóspede após a inclusão na cavidade das CDs. A maioria dos estudos de caracterização de CIs com CDs são por espectroscopia de absorção na região do UV-Visível, espectroscopia de infravermelho, técnica de fluorescência, espectroscopia de RMN, difração de raios-x, microscopia eletrônica de varredura, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria, estudos de solubilidade e liberação controlada.

A fim de estudar os modos de inclusão de moléculas hóspede na cavidade das CDs, estudos teóricos como a dinâmica molecular, vêm sendo realizados e tem mostrado as diferentes orientações que essa molécula pode obter no processo de inclusão, se tornado de grande valia como suporte a trabalhos experimentais.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi preparar o CI entre  $\beta$ -CD e o óleo essencial de *Callistemon Viminalis* (OEC), realizar sua caracterização físico-química e avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica e fosfolipásica, bem como o bioensaio *in vivo* de toxicidade com as sementes de *Lactuca Sativa* L.

### 2.2 Objetivos específicos

- Preparar o complexo de inclusão do óleo essencial de *Callistemon Viminalis* (OEC) com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) utilizando dois métodos de preparação: malaxagem (MA) e co-precipitação (CO-P);
- Caracterizar os CIs, utilizando as técnicas espectroscopia do UV-visível (UV-vis) e infravermelho (IV), técnicas calorimétricas como a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) e também as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios-x (DRX);
- Avaliar a solubilidade aquosa do OEC e realizar o teste de liberação controlada;
- Realizar testes *in vitro* da atividade antibacteriana dos complexos de inclusão frente a bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e gram-negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella Cholerasuis*;
- Realizar testes *in vitro* da atividade antifúngica frente aos fungos filamentosos *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*;
- Realizar testes *in vitro* da atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> induzida pelo veneno da cobra *Bothrops atrox*;

- Realizar testes *in vivo* de toxicidade utilizando o bioensaio com *Lactuca Sativa L*;
- Realizar cálculos teóricos utilizando modelagem molecular (MM) para observar a formação dos complexos de inclusão com os componentes majoritários presentes no OEC.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Óleos essenciais

Os metabólitos secundários são substâncias de estrutura química e propriedades biológicas variadas e diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas. Além de desempenharem um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes, também representam uma importante fonte de substâncias farmacologicamente ativas que são utilizadas como matéria prima na fabricação de cosméticos, medicamentos e química fina (ROSA et al., 2016).

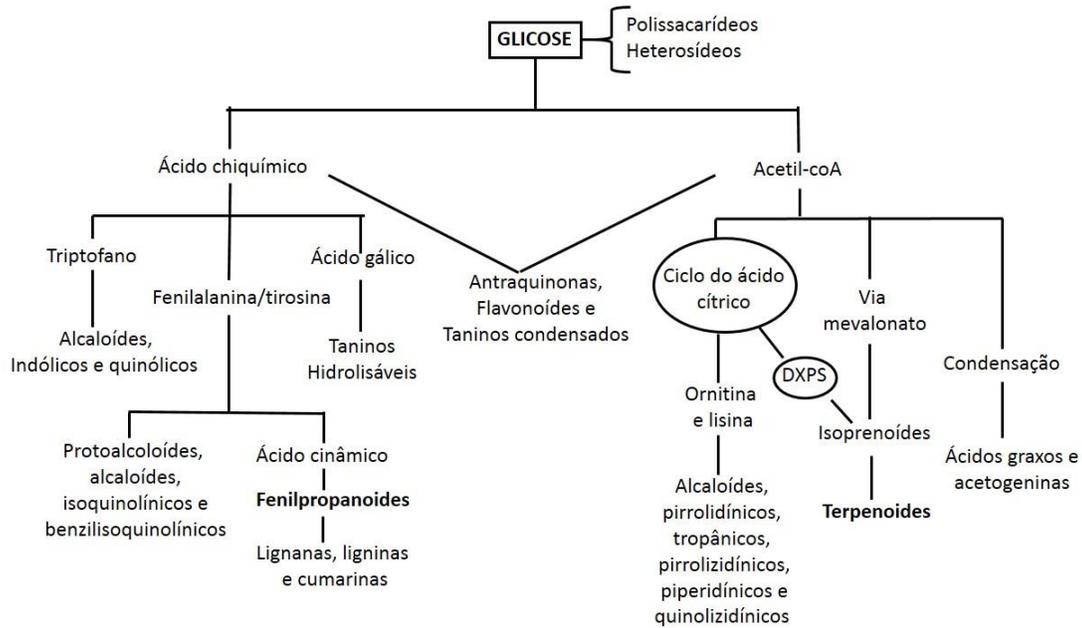
Dentre a classe de metabólitos secundários, temos os óleos essenciais (OEs), que são compostos complexos naturais, voláteis, caracterizados por um forte odor, geralmente incolores ou ligeiramente amarelados e que são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (JURADO et al., 2015). A ISO (International Standard Organization) define os OEs como produtos obtidos de partes de plantas por meio da destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos. Podendo também ser obtidos através de outros métodos, como extração por CO<sub>2</sub> supercrítico e por solventes orgânicos apolares. São formados por inúmeros compostos de origens biossintéticas distintas, que vão desde hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, até compostos sulfurados (SIMÕES et al., 2010).

Geralmente os OEs são encontrados em baixa concentração em diferentes partes das plantas incluindo flores, brotos, cascas, ervas, madeira, frutos, raízes sementes, folhas e ramos (PANDEY et al., 2017). Na mistura, os componentes presentes nos OEs podem apresentar-se em diferentes concentrações, porém, geralmente um, dois ou três deles são encontrados em proporções maiores, sendo denominados de compostos majoritários. Possuem aplicações variadas, especialmente na indústria farmacêutica, cosmética, sanitária, de alimentos e agrícola, podendo apresentar ação bactericida, fungicida, antiviral, antiparasitária, inseticida, anti-inflamatória, citotóxica, anestésica, moluscicida e larvicida (JURADO et al., 2015; PANDEY et al., 2017).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose. Primeiro a glicose é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir

duas vias diferentes. Na primeira via, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico para formar os metabólitos secundários aromáticos, como os fenilpropanoides. Na segunda via, o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coA. Os derivados do acetil-coA produzem os terpenoides, que podem ser formados tanto pela via do mevalonato quanto pela via DXPS (Figura 1) (OOTANI et al., 2013).

Figura 1 - Rota biossintética dos metabólitos secundários



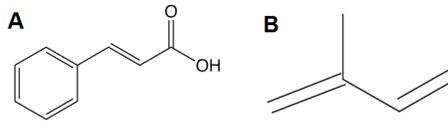
Fonte: adaptado de Simões et al. (2010).

OEs são constituídos por fenilpropanoides e por terpenoides. Os fenilpropanoides são encontrados em menor quantidade e apresentam diferentes propriedades biológicas. São compostos aromáticos com cadeia lateral de três átomos de carbono ligados ao anel aromático (Figura 2a).

Os compostos terpênicos ocorrem em uma grande variedade de espécies vegetais e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural. São biossintetizados a partir do isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) (SIMÕES et al., 2010). Os terpenos são formados a partir de combinações de duas ou mais moléculas de 2-metil-1,3-butadieno, conhecido como isopreno (unidade de cinco átomos de carbono (C5)) (Figura 2b) e são classificados pelo número de unidades isoprênicas que possuem.

Um monoterpene (C10) é constituído por duas unidades de isopreno, um sesquiterpene (C15) e assim por diante. As unidades de isopreno podem ser ligadas de forma a originar cadeias lineares ou moléculas cíclicas (SIMÕES et al., 2010).

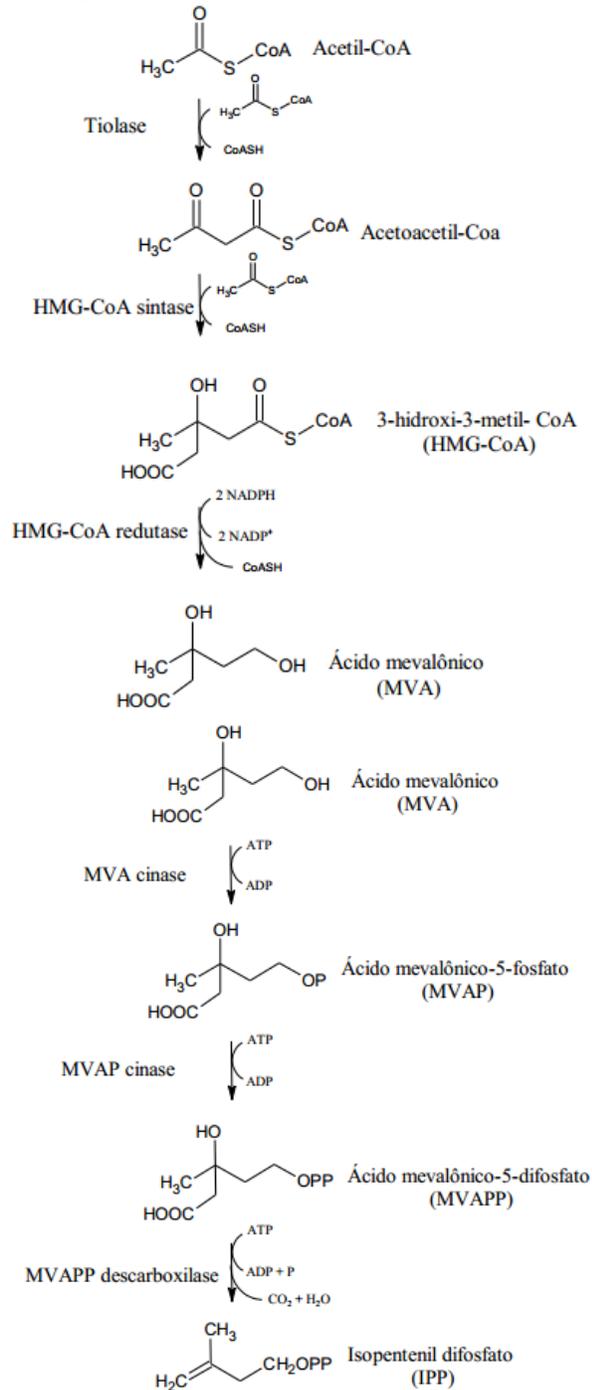
Figura 2 - Estrutura básica: A) fenilpropanoídes e B) isopreno.



Fonte: Própria autora

O IPP, precursor fundamental para a formação dos terpenos, é biossintetizado a partir de duas vias, a via do mevalonato, sendo ativa no citosol e no retículo endoplasmático e a via DXPS, ocorrendo nos plastídios. A rota do ácido mevalônico (Figura 3) envolve a condensação de três moléculas de acetil-CoA em dois passos, acetil-CoA catalisada por tiolase e hidroximetilglutaril-CoA sintase, resultando no 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é subsequentemente reduzido por HMG-CoA redutase em duas reações acopladas obtendo o ácido mevalônico. Duas fosforilações sequenciais do ácido mevalônico dependem de ATP e uma subsequente fosforilação/descarboxilação seguida por eliminação obtém-se então o IPP (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

Figura 3 - Via do mevalonato para a formação do isopentenil difosfato.

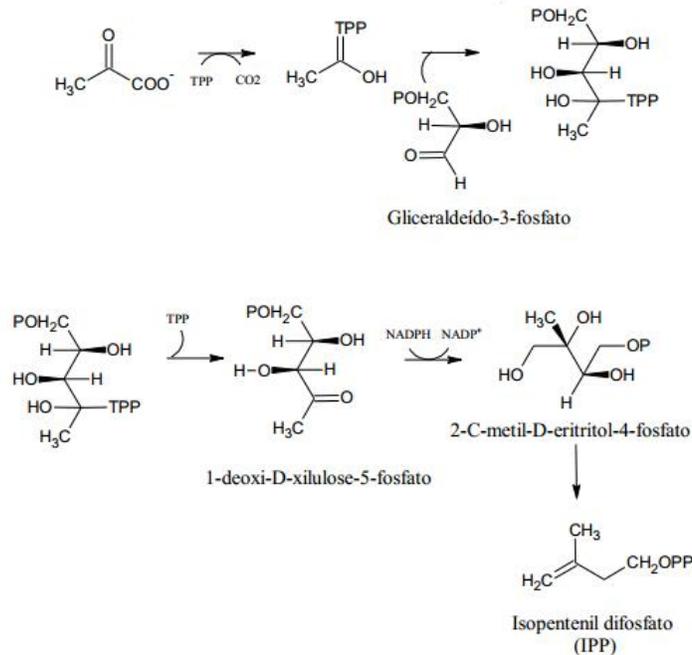


Fonte: Buchanan, Gruissem e Jones (2015).

Na rota biossintética para a formação do IPP pela via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS) (Figura 4), o piruvato reage com tiamina pirofosfato (TPP), dando origem a um

fragmento de dois carbonos, hidroxietil-TPP, que se condensa com gliceraldeído 3- fosfato por transferências C2 da TPP catalisada pela transcetolase. TPP é liberado para formar um composto de cinco átomos de carbono intermediário, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, o qual é rearranjado e reduzido para formar 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato e, subsequentemente, transformado para se obter o IPP (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

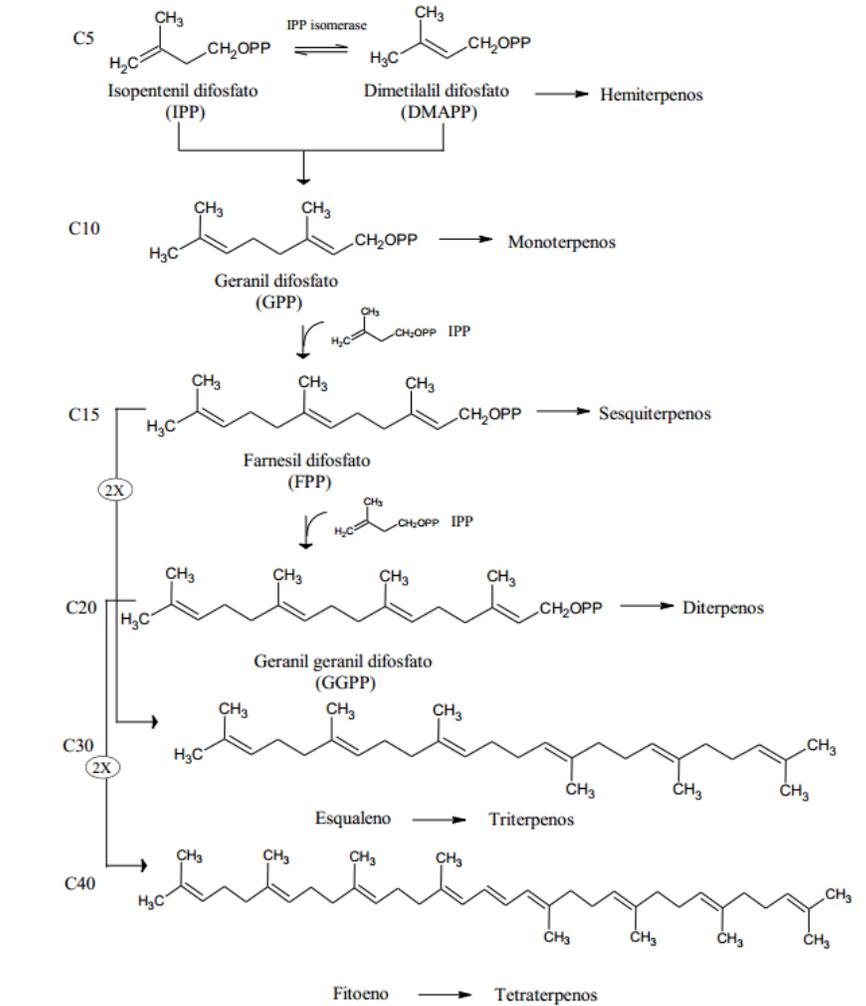
Figura 4 – Via DXPS para a formação do isopentenil difosfato.



Fonte: Buchanan, Gruissem e Jones (2015).

As diferentes classes de terpenos são formadas por adições repetitivas do isopentenil difosfato (Figura 5). O isopentenil difosfato e seu isômero, o dimetialil difosfato (DMAPP), são as unidades penta carbonadas ativas na biossíntese dos terpenos que se unem para formar moléculas maiores. Primeiro o IPP e o DMAPP reagem para formar o *trans*-geranildifosfato (GPP), uma molécula que possui 10 carbonos, onde são formados os monoterpênicos. O GPP pode se ligar a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 carbonos, farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranil geranil difosfato (GGPP), composto que contém 20 carbonos precursores dos diterpenos. Assim, as moléculas de FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40), respectivamente (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

Figura 5 - Biossíntese dos terpenos



Fonte: Buchanan, Grussem e Jones (2015).

### 3.1.1 Óleo essencial de *Callistemon Viminalis*

A família *Myrtaceae* inclui 80 gêneros e 3.000 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais e é conhecida por apresentar um alto teor de terpenos na parte aérea. A maior parte dos constituintes de OEs de *Myrtaceae* são monoterpenos, fenóis e sesquiterpenos, que podem ser obtidos por meio de destilação a vapor das partes aéreas das plantas. Um gênero da família *Myrtaceae* é o *Callistemon*, que engloba mais de 20 espécies de árvores e arbustos (ZANDI-SOHANI, HOJJATI, CARBONELL-BARRACHINA, 2013).

A espécie aromática *Callistemon Viminalis* popularmente conhecida como escova-de-garrafa, é uma árvore de porte arbustivo ou de arvoreta, alcançando de 3 a 7 metros de altura. Suas folhas são em geral pequenas, lanceoladas a lineares, verdes, perenes e aromáticas. Na inflorescência elas têm um formato cilíndrico com numerosos estames. Sua nomenclatura popular deve-se ao formato interessante da florescência, que se parece com uma escovinha (Figura 6). Está distribuída nos trópicos úmidos como a Austrália, América do Sul e na Ásia tropical, e atualmente está espalhada em todo mundo (OYEDEJI et al., 2009; LIU et al., 2016).

Figura 6 - Planta *Callistemon Viminalis* (escova de garrafa).



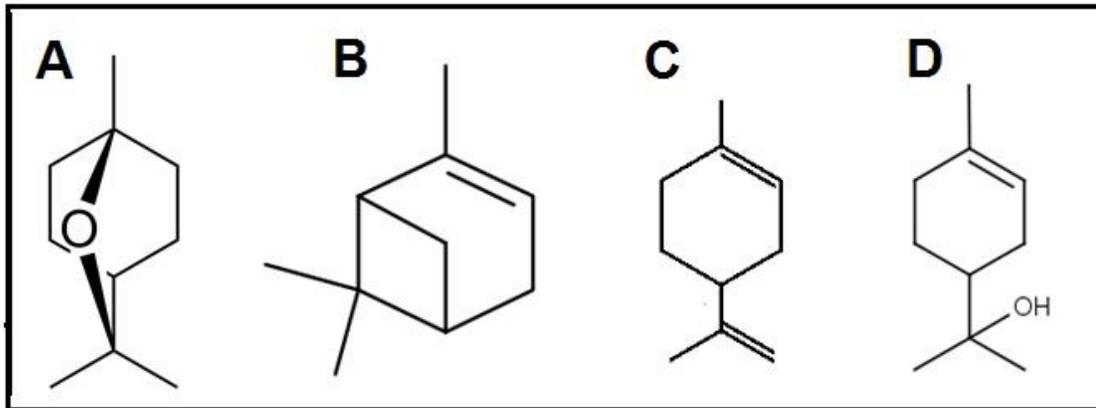
Fonte: Própria autora

O gênero *Callistemon* é conhecido na medicina popular pela sua ação anti-tosse, anti-bronquite e propriedades anti-trombóticas. O óleo essencial obtido de *C. viminalis* (OEC) exibiu propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidante e inseticida. Estudos anteriores indicaram que os extratos foliares e o OEC são considerados como aleloquímicos. Os aleloquímicos são substâncias liberadas por algumas espécies vegetais que afetam o crescimento de outras espécies. Esses compostos são potentes inibidores da germinação e podem ser utilizados como bioherbicidas (BALI et al., 2017).

No estudo da composição química do OEC diversos autores relatam os componentes majoritários como o 1,8 cineol (eucaliptol),  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol e limoneno (Figura 7). Oliveira et al. (2014) estudaram o OEC extraído das flores e obtiveram o 1,8-cineol (66,9%),  $\alpha$ -pineno (16,0%) e limoneno (10,0%). Badawy e Abdelgaleil (2014) obteve para o OEC extraído das folhas 1,8-cineol (71,7%),  $\alpha$ -pineno (11,4%),  $\alpha$ -terpineol (3,1%). Fall et al. (2017) também

obteve o 1,8-cineol (57,2%), limoneno (10,04%) e  $\alpha$ -terpineol (9,56%) para o OEC extraído das folhas. Sales et al. (2017) para as folhas do OEC encontrou 1,8-cineol (84,60%),  $\alpha$ -pineno (10,28%) e  $\alpha$ -terpineol (2,59%).

Figura 7 - Principais componentes majoritários encontrados no OEC. A) 1,8-cineol; B)  $\alpha$ -pineno; C) limoneno e D)  $\alpha$ -terpineol.



Fonte: Própria autora.

O 1,8-cineol, também chamado, eucaliptol ou 1,8-epoxi-p-metano, é um monoterpene líquido incolor com um ponto de ebulição de 175 °C, possui um odor fresco, difusivo, canforoso e de baixa tenacidade, encontrado naturalmente nos OEs de muitas plantas, sendo considerado na maioria dos casos como composto majoritário (BADU, SINGH, 2009). Este monoterpene é amplamente utilizado como agente aromatizante de vários alimentos, tais como produtos lácteos e bebidas não alcoólicas, na indústria farmacêutica e cosmética. Várias aplicações terapêuticas também são atribuídas a esse composto, em particular no tratamento de doenças respiratórias, dor muscular, neurose, reumatismo e cálculos renais. Há, portanto, um potencial significativo para a exposição humana a este composto e apesar dos relatos das várias propriedades biológicas que ele apresenta, não há evidências suficientes sobre o perfil de segurança da administração oral desse monoterpene (CALDAS et al., 2016).

Sales et al. (2017) estudando a atividade antifúngica do OEC obtido das folhas, obteve a inibição do crescimento dos fungos *F. oxysporum* na concentração de 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  e *B. cinerea* na concentração de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Pires et al. (2013), estudando a atividade antimicrobiana do OEC obtido das folhas e flores, obteve a inibição do crescimento bacteriano na concentração igual ou

superior a 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Yadav et al. (2014) avaliaram a toxicidade larval e a alteração de oviposição do extrato vegetal de *C. Viminalis* contra o *Aedes Ibopictus*, vetor da dengue e chikungunya, e concluiu que o extrato pode ser utilizado como inseticida natural no controle desse vetor. Ndomo et al. (2009) relataram em seu trabalho que o OE e os extratos aquosos das folhas de *C. viminalis* apresentou ação anti-helmíntica, antibacteriana e inseticida.

Um novo campo de aplicação dos OEs é na agricultura. Sua menor toxicidade para mamíferos e menor risco ecológico em comparação com substâncias químicas sintéticas, incentivam sua utilização como pesticida. Embora os OEs sejam uma alternativa adequada aos pesticidas sintéticos tradicionalmente utilizados, o número de produtos disponíveis baseados em extratos e OEs de plantas são bastante limitados (HAC-WYDRO, SZYDŁO, 2016).

Sendo assim, é importante estudar o modo de ação e as possíveis utilizações do OEC frente as mais diferentes linhas de atuação, como inseticida, antibacteriana, antifúngica, larvicida, entre outras.

### 3.2 Ciclodextrinas

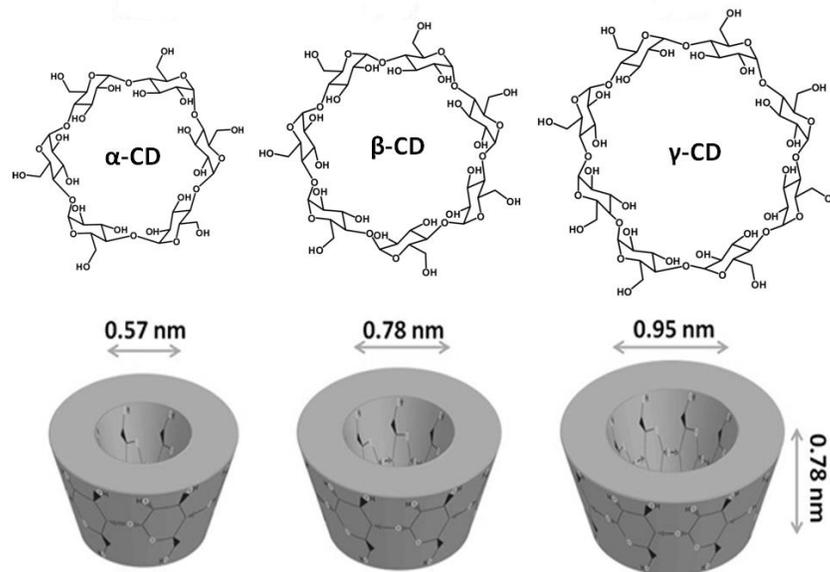
Acredita-se que o primeiro relato da existência de ciclodextrinas (CDs) foi no final do século XIX, quando Villiers (1891) isolou uma pequena quantidade de uma substância cristalina a partir de um meio de cultura de *Bacillus* contendo amido, e deu o nome a essa substância de celulosina, devido a sua semelhança com a celulose. No entanto, foram necessários mais de 50 anos para se confirmar a estrutura das CDs (VENTURINI et al., 2008).

Os polissacarídeos das CDs consistem em unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4. Algumas amilases, como a enzima ciclodextrina glicosiltransferase, são capazes de decompor a estrutura polissacarídica e ligar as duas extremidades dos fragmentos obtidos dando uma dextrina cíclica (IACOVINO et al., 2017).

As CDs naturais mais comuns são as formadas por seis ( $\alpha$ -CD), sete ( $\beta$ -CD) ou oito ( $\gamma$ -CD) unidades de glicose (Figura 8). As ligações e a conformação em cadeia das unidades de glicose permitem que as CDs apresentem uma forma tronco cônica ou de cilindro oco. As hidroxilas primárias (C6) estão localizadas na parte inferior e elas apresentam rotação livre, isso reduz o diâmetro efetivo da cavidade das CDs. Já na parte superior encontram-se as hidroxilas

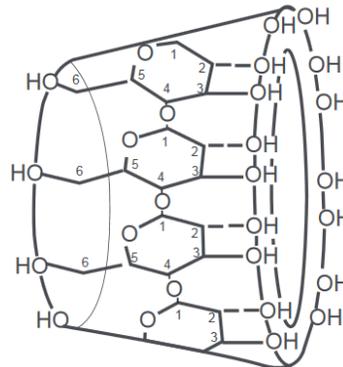
secundárias (C2 e C3), as quais apresentam uma cadeia relativamente rígida e sem rotação (Figura 9) (MIRANDA et al., 2011; GIDWANI, VYAS, 2015).

Figura 8 - Representação esquemática das ciclodextrinas:  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina e  $\gamma$ -ciclodextrina.



Fonte: <https://fi.pinterest.com/pin/424323596114669927/> acesso:09 jun. 2018.

Figura 9 - Estrutura da ciclodextrina.



Fonte: WELLIVER et al., (2008).

Assim, a cavidade das CDs possui caráter hidrofóbico, enquanto a superfície tem caráter hidrofílico. Nesse contexto, verifica-se o aumento da solubilidade de moléculas hospedeiras hidrofóbicas quando complexadas com CDs. Das CDs naturais, a mais utilizada é a  $\beta$ -CD, pois sua cavidade interna pode hospedar moléculas de massa molecular compreendida entre 100 e 400

$\text{g mol}^{-1}$ , faixa de massa molecular da maioria das moléculas de interesse. Além disso, o preço razoável desta CD também propicia seu uso (LYRA et al., 2010; AGUIAR et al., 2014).

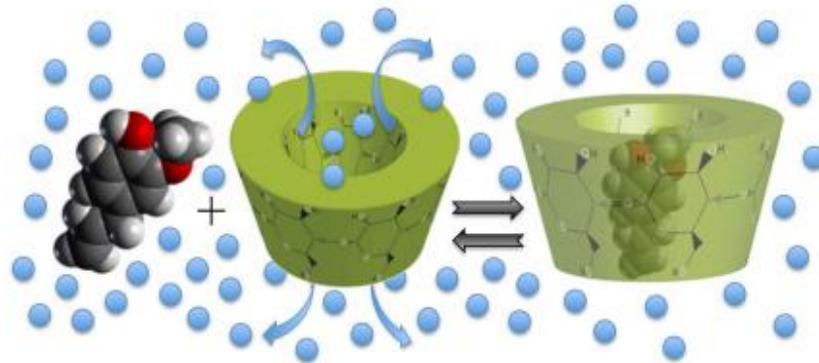
Atualmente, o interesse pelas CDs tem aumentado consideravelmente e o grande investimento em pesquisas possibilitou redução no custo de produção das mesmas, viabilizando sua aplicação nas mais diversas áreas. As CDs, além de aumentarem a solubilidade em água de moléculas hidrofóbicas, podem ser utilizadas para mascarar o sabor e odor desagradáveis, fixar substâncias voláteis, proteger substâncias sensíveis à luz ou oxigênio, transformar substâncias líquidas em pó, mascarar pigmentos ou cores de substâncias, diminuir a irritação gástrica ou ocular e prevenir interações entre substâncias. A baixa toxicidade das CDs é a base para sua aplicação na área farmacêutica, agroquímica, alimentícia e de química fina, assim como na indústria de cosméticos e artigos de higiene pessoal (MURA, 2015).

### **3.3 Complexos de inclusão**

O atributo mais notável das CDs é a sua capacidade de formar complexos de inclusão (CIs) com uma ampla variedade de moléculas (sólidas, líquidas e gasosas) ou suas porções por complexação molecular. Tais complexos são denominados "hospedeiro-hóspede". A molécula hóspede é mantida dentro da cavidade da molécula hospedeira (CD), por um ajuste dimensional entre as duas moléculas (WADHWA et al., 2017).

Em solução aquosa, a cavidade hidrofóbica da CD é preenchida por moléculas de água. A adição de moléculas hidrofóbicas, como fármacos e OEs, promove o deslocamento das moléculas de água, que se encontram originalmente no interior da cavidade da CD (Figura 10). Isto se dá, pois, devido ao microambiente termodinamicamente desfavorável (interação polar-apolar) da cavidade, as moléculas de água tendem a sair da cavidade da CD, pois têm mais liberdade conformacional (isto é, menos ligações de hidrogênio), contribuindo também para um aumento da entropia. Esse processo leva a encapsulação total ou parcial da molécula hóspede na cavidade da CD, tornando-a solúvel em água (MARQUES, 2010).

Figura 10 - Representação esquemática da formação do complexo de inclusão.



Fonte: MURA, (2014).

As forças envolvidas no processo de formação dos CIs são interações de van der Waals e ligações de hidrogênio. A maioria dessas interações é do tipo hospedeiro-hóspede. Todas estas interações podem ser consideradas relativamente “fracas”, mas proporcionam efeitos sinérgicos quando em conjunto. Desta forma, as moléculas interagem umas com as outras, resultando na formação de CIs com estabilidade suficiente para garantir seu isolamento (KURKOV, LOFTSSON, 2013).

A complexação em meio aquoso pode ser caracterizada pela constante de associação ( $K_a$ ) do CI. Essa constante é diretamente proporcional ao grau de associação da molécula hóspede na cavidade da CD, sendo que CIs pouco estáveis liberam rapidamente a molécula hóspede e os muito estáveis o liberam com dificuldade. Os valores de  $K_a$  indicam como a CD influencia na mudança de algumas propriedades da molécula hóspede, como a solubilidade, a estabilização química e física de compostos lábeis e controle da volatilidade. Seus valores podem ser obtidos através de métodos que dependem das alterações físico-químicas da molécula hóspede em diferentes concentrações de CD, fornecendo resultados por ressonância química, medidas de solubilidade de fase, absorvidade molar e outras propriedades ópticas (IACOVINO et al., 2017).

Kfoury et al. (2016) estudaram o efeito da complexação de CDs sobre a solubilidade, fotoestabilidade e atividade antifúngica de alguns fenilpropanoides (PPs). Os melhores resultados referentes ao aumento da solubilidade e estabilidade frente a luz UV após a complexação foi observado para os PPs trans-anetol e estragol. Para o trans-anetol a solubilidade foi aumentada de 3 para 17 vezes e a estabilidade de 18 para 44 vezes. Para o estragol a solubilidade foi aumentada 3 para 12 vezes e a estabilidade de 6 para 18 vezes. Os CIs apresentaram atividade antifúngica,

porém de forma reduzida, quando comparado com os PPs, porém sua utilização pode ser útil para resolver os problemas de solubilidade e estabilidade que esses PPS apresentam.

Rakmai et al. (2017) complexaram o OE de *Achillea millefolium L.* com a HP $\beta$ -CD e observou que a atividade antibacteriana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi melhorada após a complexação. O OE puro apresentou uma concentração mínima inibitória (CMI) de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *Staphylococcus aureus* e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *Escherichia coli* e após a complexação a CMI passou para 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para ambas as bactérias testadas.

Songko et al. (2012) avaliaram a atividade repelente e liberação controlada do OE de citronela contra o mosquito *Aedes aegypti* quando este foi complexado com a  $\beta$ -CD. Nos testes *in vitro* os resultados demonstraram que nas loções preparadas com os CIs, a taxa de liberação do óleo, foi estatisticamente menor do que a loção preparada contendo apenas o OE. O teste *in vivo* contra mosquito *Aedes aegypti* revelou que a loção preparada com o CI na proporção 1:1 (OE: $\beta$ -CD), teve um tempo de proteção menor que 2 horas, no entanto foi maior que o tempo de proteção dos produtos comerciais testados.

Gong et al. (2016) estudaram a atividade antifúngica de um CI entre eugenol e  $\beta$ -CD, em frutos frescos de lichia e verificaram que tanto nos ensaios *in vitro*, contra fungos, quanto nos *in vivo*, nos frutos, houve uma inibição significativa do crescimento das colônias.

### 3.3.1 Preparo dos complexos de inclusão

O método de preparação do CI pode ter uma grande influência sobre as propriedades físico-químicas do CI formado. A maioria dos métodos de preparação de CI sólido inclui diferentes graus de solubilização como etapa intermediária do seu processo de obtenção. A presença da água solubiliza os componentes e favorece a interação hidrofóbica entre a molécula hóspede e a CD. Em alguns casos, a água fomenta a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxílicos e auxilia a captação e manutenção do fármaco na cavidade da CD, fazendo parte da estrutura cristalina do CI no estado sólido (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

Diferentes fatores tais como a temperatura e a misturas de solventes, podem influenciar na complexação. O aquecimento aumenta a solubilidade tanto da CD como da molécula hóspede, aumentando assim a possibilidade de formação do CI. Ao mesmo tempo, pode desestabilizar o CI, porque várias moléculas hóspedes são menos estáveis em temperaturas mais altas. Quando a

molécula hóspede não é prontamente solúvel em água, o uso de solventes orgânicos é necessário, tais como álcoois de cadeia curta (metanol, etanol e isopropanol) que podem ser facilmente removidos por evaporação (SZEJTLI, 1988; IACOVINO et al., 2017).

Para a maioria dos substratos, as técnicas de complexação utilizadas são procedimentos simples e a escolha do método experimental, depende fundamentalmente das características do substrato. Dentre os métodos para a preparação dos CIs, pode-se citar a malaxagem (pasta) e a co-precipitação (LIN, KAO, 1989).

A malaxagem (MA) caracteriza-se por ser um método de preparação em fase semissólida, aplicável a moléculas que possuem como característica a baixa solubilidade em água. É um processo bastante utilizado devido a sua facilidade, ser rápido e processar-se em baixas temperaturas (ideal para compostos voláteis) (VEIGA, PECORELLI, RIBEIRO; 2006). Utilizando pequenas quantidades de água ou solvente, prepara-se uma pasta de CD. Geralmente, pequenas quantidades de etanol é adicionado à pasta preparada. O solvente evapora e o CI formado vai sair como um pó. A quantidade de água e o tempo necessário para obter o pó dependem da molécula hóspede (IACOVINO et al., 2017).

No método de co-precipitação (CO-P), a molécula hóspede é dissolvida em éter dietílico, clorofórmio, benzeno, ou em outro solvente orgânico, e a quantidade apropriada de CD dissolvida em água é adicionada com agitação e aquecimento. Durante o resfriamento ocorre a cristalização. Os cristais são lavados e o precipitado formado pode ser recolhido por decantação, centrifugação, filtração ou seco a 50 °C para se obter uma amostra em pó. O método é útil para substâncias que não são solúveis em água, mas resulta em rendimentos baixos uma vez que os solventes orgânicos utilizados como precipitante podem inibir competitivamente a inclusão. Apesar disso, este método produz CIs com alto grau de pureza. (IACOVINO et al., 2017).

Lima, Alves e Santana, (2012), em sua revisão, explicam que quando um CI com OEs é preparado pelo método de CO-P, há indícios de que o CI formado apresenta baixa retenção do óleo, sendo este de apenas cerca de 63% do valor teórico, enquanto no CI preparado por MA a retenção do óleo é de aproximadamente 99,8%. Esse fato pode ser explicado pela diferença que o processo de aquecimento proporciona durante o procedimento de obtenção da suspensão na co-precipitação, bem como o tempo mais prolongado utilizado no processo de complexação e das etapas de secagem, que podem conduzir a uma relevante evaporação dos componentes voláteis do OE.

A mistura física (MF) não chega a ser considerada um CI, pois se baseia na simples mistura dos componentes sem adição de água, sendo preparado para ser utilizado como controle. A quantidade de tempo requerida para a mistura é variável e depende da molécula hóspede, geralmente este método é realizado à temperatura ambiente (VALLE, 2004).

### **3.4 Caracterização dos complexos de inclusão**

Uma das principais características das CDs é o fato de formarem CIs em solução, e também no estado sólido. As fracas interações que ocorrem entre a molécula hóspede e a CD, característica intrínseca do sistema molecular, dificultam a utilização de algumas técnicas analíticas aplicadas à solução (LYRA et al., 2010).

As propriedades físico-químicas da molécula hóspede e da CD livre são relativamente diferentes das que possuem estes compostos quando estão complexados. Partindo deste conceito, qualquer metodologia que tenha sensibilidade suficiente para medir estas diferenças pode ser utilizada para caracterizar os CI sob diferentes pontos de vista, possibilitando completar este complexo quebra-cabeça e permitindo direcionar os fenômenos de inclusão de acordo com as necessidades (CUNHA-FILHO, SÁ-BARRETO, 2007).

A caracterização analítica de CIs de CD tanto em solução como no estado sólido não é uma tarefa simples e envolve o uso de várias técnicas, cujos resultados quando avaliados em conjunto dão uma maior confiabilidade da formação do CI, visto que cada método explora uma característica particular do CI (LIMA et al., 2016).

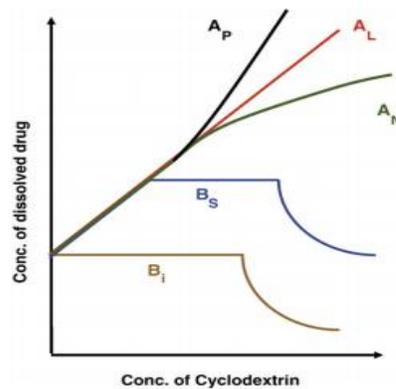
#### **3.4.1 Diagrama de solubilidade de fase**

O diagrama de solubilidade de fase é o mais utilizado para o estudo de complexação, sendo considerada a primeira verificação de CIs em solução. Dentre as propriedades das moléculas hóspedes que se pretende alterar, a solubilidade é a mais evidente. Compostos orgânicos que são pouco solúveis em água, frequentemente exibem uma solubilidade em água aumentada na presença de CDs (MARQUES, 2010).

De acordo com o modelo proposto por Higuchi e Connors (1965), os diagramas podem ser do tipo A e tipo B (Figura 11). Os diagramas do tipo A, podem ser subdivididos em A<sub>L</sub>

(linear),  $A_P$  (isotermas de desvio positivo) e tipo  $A_N$  (isotermas de desvio negativo). As curvas do tipo  $A_L$ , a solubilidade da molécula hóspede aumenta conforme o aumento da concentração da CD, indicando a formação de CIs solúveis. Os diagramas do tipo B podem ser subdivididos em  $B_S$  e  $B_I$ . Sugerem a formação de CIs com baixa solubilidade. A curva do tipo  $B_S$  denota CI solúvel com solubilidade limitada. Inicialmente, há um aumento da concentração da molécula hóspede e, ao atingir o limite de solubilidade, ocorre a precipitação, diminuindo a concentração. Os diagramas do tipo  $B_I$  são obtidos quando o CI é insolúvel e há um equilíbrio inicial, porém, após uma determinada concentração, ocorre a precipitação do CI (MARQUES, 2010).

Figura 11 - Perfis de solubilidade de fases e classificação do complexo de inclusão (Higuchi e Connors, 1965).



Fonte: MARQUES, (2010).

Estudos de solubilidade de fase geralmente são realizados de acordo com o método descrito por Higuchi e Connors, (1965). A fim de explorar a associação molecular da CD com a molécula hóspede ( $K_a$ ), uma quantidade excessiva da molécula hóspede é adicionada a uma concentração variável de uma solução aquosa de CD. A suspensão é agitada até que o equilíbrio seja atingido e as amostras são centrifugadas e filtradas. A solução filtrada é então analisada espectroscopicamente e o diagrama de solubilidade de fase pode ser obtido com a solubilidade da molécula hóspede em função da concentração de CD, de acordo com a equação:

$$K_a = \text{inclinação} / S_0 (1 - \text{inclinação})$$

onde  $S_0$  é definida como sendo a solubilidade intrínseca da molécula hóspede em meio aquoso na ausência da CD (WADHWA et al., 2017).

### 3.4.2 Espectroscopia ultravioleta-visível

A técnica de espectroscopia na região do UV-visível (UV-vis) é uma das mais utilizadas nas determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos. Este fato pode ser explicado pelo baixo custo e pela praticidade da técnica quando comparada a outras. Quando um composto é analisado por espectrofotometria ele absorve luz e essa absorção é o que irá determinar sua concentração, pois a absorbância medida é diretamente proporcional a concentração. Assim, de acordo com a lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de radiação temos:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Onde:

A: absorbância;

$\epsilon$ : absortividade molar da amostra;

b: caminho óptico percorrido;

c: concentração da amostra.

A absorção molecular pode ser realizada na região do visível, infravermelho e ultravioleta. As análises na região do visível são chamadas colorimétricas, isto porque quando a luz é transmitida através do composto a porção que é absorvida é característica de sua cor (HARRIS, 2012).

No processo de absorção da radiação, a energia dos fótons é transferida para as moléculas do meio em análise para provocar transições eletrônicas associadas a transições vibracionais e rotacionais. As mudanças que ocorrem no espectro de UV-vis, devido a formação do CI, são geralmente identificadas pelos deslocamentos batocrômicos (maior comprimento de onda) ou hipocrômicos (menor comprimento de onda), aumento ou diminuição na intensidade dos picos e alargamento de bandas (MURA, 2014).

Essa técnica é um método simples, econômico e rápido para estudar a formação de CI em solução. Modificações no espectro UV-vis de uma molécula hóspede na presença de CDs, pode evidenciar a formação de um CI. No entanto, essa técnica não é específica e sofre com a presença de substâncias interferentes (MURA, 2014).

### 3.4.3 Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) trata das variações de energia molecular associadas às transições vibracionais devido à absorção ou emissão de um fóton, que não é suficientemente energético para causar uma transição eletrônica. A região espectral do infravermelho compreende a radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a  $10\text{ cm}^{-1}$ . Do ponto de vista de aplicação, como também de instrumentação, o espectro no IV é convenientemente dividido em infravermelho próximo (780 a 2500 nm), médio (2500 a 50000 nm) e distante (50000 a  $10^6$  nm) (LIMA et al., 2009).

Em moléculas, os elétrons sofrem efeitos de átomos ou grupos vizinhos, influenciando o estiramento, o comprimento da ligação, o ângulo de ligação e, portanto, a frequência de vibração das ligações químicas. As diferenças específicas geradas por estas interações possibilitam que cada substância tenha um espectro característico. Alterações nas bandas características da molécula hóspede tais como desaparecimento, alargamento, variações na intensidade e/ou mudanças no seu número de onda, podem ser indicativos da formação de CI (LIMA et al., 2009; MURA, 2015).

As bandas dos CIs geralmente são deslocadas ou suas intensidades são alteradas. Entretanto, a massa da molécula hóspede não pode exceder 5-15% da massa do CI, tais alterações são normalmente ofuscadas pelo espectro do hospedeiro (CD) (MARQUES, 2010).

### 3.4.4 Calorimetria exploratória diferencial

Os métodos térmicos são amplamente utilizados na caracterização das CDs e dos CIs, principalmente pela rapidez das análises. Dentre os mais utilizados, tem-se a calorimetria exploratória diferencial (DSC), uma poderosa ferramenta analítica na caracterização em estado sólido de substâncias. Através das curvas de DSC, é possível mensurar a diferença de energia fornecida a uma substância e a um material de referência em função da temperatura, tanto em condições de aquecimento quanto de resfriamento. A formação do CIs pode ser identificada nos perfis de DSC, pelo desaparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos e variações relevantes na entalpia da molécula hóspede pura ou complexada (AGUIAR et al., 2014).

A comparação dos perfis térmicos da MF, da molécula hóspede e CD com perfis dos respectivos CIs é realizada a fim de evidenciar a ocorrência ou não da inclusão da molécula hóspede na cavidade da CD. Na ausência de qualquer tipo de interação entre a molécula hóspede e a CD, as curvas de DSC resultantes deverão corresponder ao somatório das curvas de DSC dos componentes individuais. No caso da formação do CI, as curvas de DSC deverão apresentar um perfil não coincidente com o somatório dos efeitos observados nos termogramas dos componentes isolados (MARQUES, HADGRAFT, KLLAWAY, 1990).

A análise de DSC fornece evidências da formação de CI alterando a temperatura de fusão, volatilização ou sublimação, de forma a deslocar estes eventos para diferentes temperaturas ou promover o seu desaparecimento, a depender do material estudado, principalmente na diferenciação da complexação ou apenas formação de MF (MENEZES et al., 2016).

### **3.4.5 Termogravimetria**

A termogravimetria (TG) de CIs é frequentemente usada em combinação com a análise de DSC, para apoiar e ajudar na interpretação dos resultados. A TG permite determinar as alterações na massa da amostra em relação à mudança de temperatura, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. A derivada correspondente (DTG) transforma os eventos de perda de massa em picos para melhor visualização destes eventos (MURA, 2015). As CDs naturais, quando analisadas por TG sob atmosfera de nitrogênio, apresentam uma primeira perda de massa que ocorre em temperaturas ao redor de 100 °C, correspondente à evaporação da água adsorvida e de cristalização e uma segunda perda de massa correspondente à degradação, que ocorre de 250 a 400 °C, atribuída à decomposição dos macrociclos, onde há diminuição de 70 a 80% da massa (TROTТА, ZANETTI, CAMINO, 2000).

A detecção dos CIs formados baseia-se em comparar a temperatura de início da degradação da molécula hóspede sozinha com o suposto CI formado. Parte-se do princípio que, se houve complexação, a degradação da molécula hóspede ocorrerá em temperaturas mais elevadas, pois estará protegida pela CD (MURA, 2015).

### **3.4.6 Difractometria de raios-x**

A difratometria de raios-X (DRX) de cristal é uma técnica que fornece dados detalhados que permitem obter a estrutura cristalina de amostras, posições dos átomos dentro da rede cristalina, os comprimentos de ligação e os ângulos de ligação (MURA, 2015). É uma técnica usada para determinar a estrutura atômica e molecular de um cristal, na qual os átomos cristalinos fazem com que um feixe de raios X incidentes difrate em muitas direções específicas. Medindo os ângulos e as intensidades dos feixes difratados, pode produzir uma imagem tridimensional da densidade de elétrons dentro do cristal. A partir desta densidade de elétrons, as posições médias dos átomos no cristal podem ser determinadas, bem como suas ligações químicas, sua desordem e várias outras informações (EWALD, 1962).

Tem como vantagem ser uma técnica não destrutiva. Usando esta técnica, a estrutura tridimensional de uma molécula pode ser obtida (MURA, 2015). Ao analisar um material em pó, o gráfico obtido equivale a uma impressão digital da estrutura cristalina, podendo ser utilizada para comparar com um padrão cristalográfico. Quando o material for cristalino, haverá picos específicos indicativos das reflexões dos planos atômicos, enquanto que uma amostra amorfa exibirá uma protuberância larga, chamado de halo amorfo (ARAÚJO, 2016).

### **3.4.7 Microscopia eletrônica de varredura**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta versátil e rápida para geração de imagens, análise de composição, análise de orientação e identificação de fase de materiais, podendo trabalhar com amostras orgânicas e inorgânicas com uma ampla faixa de tamanho, desde nanopartículas até materiais a granel (XING, 2016).

É um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. O MEV utiliza um feixe de elétrons, de pequeno diâmetro, para explorar a superfície de uma amostra, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a

superfície da amostra. O sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação. O feixe interagindo com a amostra produz elétrons e fótons que podem ser coletadas por detectores adequados e convertidas em um sinal de vídeo. A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

O uso desta técnica fornece informações detalhadas do estado de cristalização de CIs obtidos por diferentes técnicas de complexação. O conhecimento detalhado da microestrutura dos materiais permite o entendimento e, em muitos casos, até a previsão das suas propriedades e respostas químicas. Com a MEV, avalia-se a diminuição da cristalinidade das partículas obtidas com diversos métodos para a formação dos CIs no estado sólido, à medida que permite a visualização e diferenciação das partículas de ciclodextrina e dos cristais da molécula hóspede (LYRA et al., 2010).

Em geral, as partículas de CDs são globulares, medindo de 1 a 180  $\mu\text{m}$ , enquanto que os fármacos apresentam-se nas formas cristalinas menores, de formatos irregulares, porém com uma distribuição de tamanho de partícula mais homogênea (RIBEIRO et al., 2003). Nas misturas físicas é possível distinguir as partículas dos fármacos das partículas de CDs. Porém, quando um complexo é formado, o estado cristalino resultante é diferente do obtido pela simples mistura da molécula hóspede com as CDs (LYRA et al., 2010).

### **3.4.8 Modelagem molecular**

A aplicação da química computacional na simulação molecular ao nível atômico está bastante desenvolvida e possui várias aplicações em química. Esta aproximação teórica permite racionalizar e complementar a observação experimental com um enfoque molecular. Sua aplicação no estudo dos fenômenos de inclusão é relativamente recente e está limitada devido ao tamanho e flexibilidade das moléculas de CD e da multiplicidade de interações em meio aquoso, o que obriga a introduzir um grande número de restrições aos modelos matemáticos utilizados pelos programas de computador. Em geral, uma boa correlação com os dados experimentais é

conseguida, possibilitando a representação da conformação tridimensional mais estável do complexo de inclusão (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

O estudo de modelagem molecular (MM) analisa a formação dos CIs e a orientação da molécula hóspede na cavidade da CD (LYRA et al., 2010). Estudos teóricos incluindo a MM em fase gasosa e em meio aquoso, vem sendo apresentados para a investigação dos modos de inclusão de moléculas hóspede na cavidade das CDs, e tem mostrado as diferentes orientações que essa molécula pode obter no processo de inclusão (BANERJEE et al., 2006).

Os diferentes modos de inclusão dessas moléculas na cavidade da CD podem ser atribuídos a forças dirigentes incluindo as forças de van der Waals, fatores estéricos e interações dipolo-dipolo que governam o processo de complexação. Em geral, há acordo sobre o fato de que essas forças desempenham um papel importante dirigindo a formação do complexo e estabilização. Assim, o tamanho, forma e graus de liberdade conformacionais da cavidade da CD é um recurso essencial para se obter uma complexação (QUEVEDO; ZOPPI, 2018). Essas forças têm sido estudadas teoricamente e tais resultados mostram que este processo é geralmente acompanhado por mudanças conformacionais nos anéis glicosídicos das CDs (HAPIOT, TILLOY, MONFLIER, 2006).

#### 4. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, U. N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com  $\beta$ -ciclodextrina, **Química Nova**, v.37, n.1, p.50-55, 2014.
- ARAÚJO, R. F. M. **Preparação e caracterização do complexo de inclusão da riparina em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina**, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Piauí, p.139, 2016.
- BABU, G. D. K.; SINGH, B. Simulation of *Eucalyptus cinerea* oil distillation: A study on optimization of 1,8-cineole production, **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n.2-3, p.226–231, 2009.
- BANERJEE, A. et al. Encapsulation of Prodan in beta-cyclodextrin environments: A critical study via electronic spectroscopy and molecular mechanics, **Journal of Molecular Structure**, v.794, n.1-3, p.181-189, 2006.
- BALI, A. S. et al. Phytotoxicity and weed management potential of leaf extracts of *Callistemon viminalis* against the weeds of rice, **Acta Physiologiae Plantarum**, v.25, n.39, 2017.
- BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi, **Industrial Crops and Products**, v.52, p.776–782, 2014.
- BENIGNI, R. Structure activity relationship studies of chemical mutagens and carcinogens mechanistic investigations and prediction approaches. **Chemical Reviews**, v.105, n.5, p.1767-1800, 2005.
- BORS, M. et al. Evaluation of the effect of *Uncaria tomentosa* extracts on the size and shape of human erythrocytes (in vitro). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.33, n.2, p.127-134, 2012.
- BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. 2 ed., Editora: John Wiley & Sons, 2015. 1280 p.
- CALDAS, G. et al. Repeated-doses and reproductive toxicity studies of the monoterpene 1,8-cineole (eucalyptol) in Wistar rats, **Food and Chemical Toxicology**, v.97, p.297-306, 2016.
- CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p.1-9, 2007.
- DEDAVID B.A.; GOMES C.I.; MACHADO G. **Microscopia Eletrônica de Varredura, Aplicações e preparações de amostras**, Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálise – CEMM, IDEA-PUCRS, Porto Alegre, EDIPUC RS, 2007.
- EWALD P.P. **The Principles of X-ray Diffraction**. In: Ewald P.P. (eds), Fifty Years of X-Ray Diffraction. Springer, chapter 6, 1962.

- FALL, R. et al. Chemical characterization of essential oil from the leaves of *Callistemon viminalis* (D.R.) and *Melaleuca leucadendron* (Linn.), **Asian Pacific Tropical Biomedicine**, v.7, n.4, p.347–351, 2017.
- GIDWANI, B.; VYAS, A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs, **BioMed Research International**, v.2015, p.15, 2015.
- GONG, L. et al. An inclusion complex of eugenol into  $\beta$ -cyclodextrin: Preparation, and physicochemical and antifungal characterization, **Food Chemistry**, v.196, p.324–330, 2016.
- HAC-WYDRO, K.; SZYDŁO, K. The influence of environmentally friendly pesticide – Eucalyptol – alone and in combination with terpinen-4-ol – on model bacterial membranes, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.146, p. 918–923, 2016.
- HARRIS, D. **Análise química quantitativa**, 8. ed., p.898, Editora LTC, Rio de Janeiro, 2012.
- HIGUCHI T.; CONNORS K. A. **Phase-solubility techniques**. In: Reilly CN. editor. Advances in analytical chemistry and instrumentation. New York, NY: **Wiley-Interscience**; p.117-212, 1965.
- IACOVINO, R. et al. Cyclodextrins as Complexing Agents: Preparation and Applications, **Current Organic Chemistry**, v.21, n.2, p.162-176, 2017.
- JURADO, F. R. et al. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling, **Food Engineering Reviews**, v.7, n.3, p.275–297, 2015.
- KFOURY, M. et al. Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins, **Food Chemistry**, v.196, p. 518–525, 2016.
- KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins, Review. **International Journal of Pharmaceutics**, v.453, p.167–180, 2013.
- LIMA, K. M. G. et al. Near and mid infrared optical sensors, **Química Nova**, v.32, n. 6, p.1635-1643, 2009.
- LIMA, J. R.; ALVES, S.; SANTANA, D. P. Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais, **Revista Brasileira de Farmácia**, v.93, n.4, p.397-402, 2012.
- LIMA, P. S. S. et al. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches, **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965–987, 2016.
- LIN, S.Y.; KAO, Y. H. Solid particulates of drug- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes directly prepared by a spray-drying technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v.56, n.3, p.249-259, 1989.
- LIU, H. et al. Calliminols A-E, new terpenoid-conjugated phloroglucinols from the leaves of *Callistemon viminalis*, **Fitoterapia**, v.115, p.142-147, 2016.
- LYRA, M. A. M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina, **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.2, p.117-124, 2010.

MARQUES H, M. C.; HADGRAFT, J.; KLLAWAY, I.; W. Studies of cyclodextrin inclusion complexes I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studies by phase solubility and DSC. **International Journal of Pharmaceutics**, v.63, n.3, p.259–266, 1990.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles, **Journal Flavour Fragrance**, v 25, n.5, p.313–326, 2010.

MENEZES, P. P. et al. Kinetic and physical-chemical study of the inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin containing carvacrol, **Journal of Molecular Structure**, v.1125, p.323-330, 2016.

MIRANDA, J. C. et al. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, 2011.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.101 p.238–250, 2014.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.113, p.226–238, 2015.

NDOMO, A. F. et al. Insecticidal activities of essential oil of *Callistemon viminalis* applied as fumigant and powder against two bruchids, **Journal of Applied Entomology**, v.134, n.4, p.333–341, 2009.

OLIVEIRA, C. M. et al. Chemical composition and allelopathic activity of the essential oil from *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) blossoms on lettuce (*Lactuca sativa L.*) seedlings, **American Journal of Plant Sciences**, v.5, n.24, p.3551-3557, 2014.

OOTANI, M. A. et al. Use of Essential Oils in Agriculture, **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.2, p. 162-174, 2013.

OYEDEJI, O. O. A. et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Callistemon citrinus* and *Callistemon viminalis* from south Africa. **Molecules**, v.14, n.6, p. 1990-1998, 2009.

PANDEY, A. K. et al. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives, **Frontiers in Microbiology**, v.17, p.14, 2017.

PIRES, C. H. et al. Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e flores de *Callistemon viminalis* (sol. ex Gaertn.) G. Don ex. Loudon (Myrtaceae), **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.4, p.597-601, 2013.

QUEVEDO, M. A.; ZOPPI, A. A. Current trends in molecular modeling methods applied to the study of cyclodextrin complexes, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.90, n.1, p.1-14, 2018.

RAKMAI, J. et al. Encapsulation of yarrow essential oil in hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: physicochemical characterization and evaluation of bio-efficacies, **CyTA - Journal of Food**, v.5, n.3, p.409-417, 2017.

Representação esquemática da ciclodextrinas. 2018 Disponível em:  
<https://fi.pinterest.com/pin/424323596114669927/> acesso:09 jun. 2018.

ROSA, R. C. A. et al. Triagem Fitoquímica dos Extratos Aquosos de *Bauhinia candicans*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha pulegium* e *Morus nigra*, **Revista Conexão Ciência**, v. 11, n. 1, 2016.

SALES, T. A. et al. Essential oils from the leaves and flowers of *Callistemon viminalis*: chemical characterization and evaluation of the insecticide and antifungal activities, **American Journal of Plant Sciences**, v.8, n.10, p.2516-2529, 2017.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, p.1104, 2010.

SONGKRO, S. et al. Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with  $\beta$ -cyclodextrin for mosquito repellent, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.72, n.3-4, p.339-355, 2012.

SZEJTLI, J. **Cyclodextrin Technology**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988.

TORRES, L. H. et al. Characterization and cytotoxicity of a benzocaine inclusion complex, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.91, n.1-2, p.9-15, 2018.

TROTTA F.; ZANETTI, M.; CAMINO, G. Thermal degradation of cyclodextrins, **Polymer Degradation and Stability**, v.69, n.3, p.373-379, 2000.

VALLE, E. M. M. D. Cyclodextrins and their uses: a review, **Process Biochemistry**, v. 39, n.9, p.1033-1046, 2004.

VEIGA, F. J. B.; PECORELLI, C. C. M. F.; RIBEIRO, L. S. S. As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica. **Minerva Coimbra Editora**, p.228, 2006.

VENTURINI, C. et al. Properties and recent applications of cyclodextrins, **Química Nova**, v.31, n.2, p. 360-368, 2008.

YADAV, R. et al. Differential Larval Toxicity and Oviposition Altering Activity of Some Indigenous Plant Extracts against Dengue and Chikungunya Vector *Aedes albopictus*, **Journal Arthropod-Borne Diseases**, v.8, n.2, p.174-185, 2014.

WADHWA, G. et al. Essential oil-cyclodextrin complexes: an updated review, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.89, n.1-2, p.39-58, 2017.

WELLIVER, M. et al. Discovery, development, and clinical application of sugammadex sodium, a selective relaxant binding agent, **Drug Des Devel Therapy**, v.2, n.2, p.49-59, 2008.

XING, Q. Information or resolution: Which is required from an SEM to study bulk inorganic materials?. **Scanning**, v.38, n.6, p.864-867, 2016.

ZANDI-SOHANI, N; HOJJATI, M.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. Insecticidal and Repellent Activities of the Essential Oil of *Callistemon citrinus* (Myrtaceae) Against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae), **Neotropical Entomology**, v. 42, n.1, p.89-94, 2013.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1**

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA  
DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*CALLISTEMON VIMINALIS* E  $\beta$ -CICLODEXTRINA**

**Resumo:** O óleo essencial de *Callistemon viminalis* (OEC) é rico em monoterpenos, que apresentam uma ampla variedade de propriedades biológicas, dando destaque para a atividade antimicrobiana. No entanto, as aplicações da OEC são limitadas devido à sua volatilidade e baixa solubilidade em água. A formação de complexos de inclusão (CIs) com ciclodextrinas (CDs) é uma alternativa para melhorar as características de moléculas instáveis como o OEC. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e quantificar o OEC e complexar com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD). Os CIs foram obtidos a partir de duas metodologias e a mistura física (MF) foi preparada para ser utilizada como base de comparação com os CIs. A formação dos CIs foi observada pelas técnicas UV-visível (UV-vis), infravermelho (IV), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e isoterma de solubilidade. A atividade antimicrobiana foi analisada a partir do teste de difusão em ágar. A constante de associação ( $K_a$ ) calculada do CI OEC/ $\beta$ -CD foi de  $1052,2 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ , indicando a forte interação entre o OEC/ $\beta$ -CD. A solubilidade em água do OEC foi significativamente melhorada em 5 vezes pelo estudo de solubilidade de fase. Os resultados de espectroscopia UV-vis e IV e DSC, demonstraram que o CI OEC/ $\beta$ -CD possui diferentes características físico-químicas quando comparado com o OEC livre. A atividade antibacteriana do OEC foi melhorada após a complexação, apresentando uma redução na concentração mínima inibitória (CMI) de 250 para  $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para *S. aureus* e de 250 para  $62,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para a *L.monocytogens*. A complexação do OEC/ $\beta$ -CD é uma alternativa adequada que pode ser utilizada para melhorar a solubilidade deste óleo em sistemas aquosos e reduzir a concentração para ser utilizado em sistemas antimicrobianos.

**Palavras-chave:** Complexo de inclusão. Solubilidade. Atividade biológica. Monoterpenos.

## 1. INTRODUÇÃO

A árvore *Callistemon viminalis*, conhecida popularmente como "escova de garrafa" devido ao formato de suas flores em forma de escova vermelha, possui porte arbustivo, alcançando de 3 a 8 metros de altura, sendo originária da Austrália, mais atualmente é encontrada em todas as regiões tropicais e subtropicais. Suas folhas são em geral pequenas, lanceoladas a lineares, verdes, perenes e aromáticas, com alto conteúdo de óleos essenciais (OEs) (AHMAD; ATHAR, 2017).

A composição química do OE das folhas de *C. viminalis* (OEC) já foi relatado anteriormente, tendo como constituinte majoritário o 1,8-cineol (47,9 - 82,0%) e outros componentes significativos como o  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol e o p-cimeno (OYEDEJI et al., 2009).

Os efeitos biológicos do OEC, bem como dos compostos isolados, é relatado na literatura, sendo que o mesmo possui atividade antibacteriana, alelopática, antiviral, anti-helmíntica, inseticida além de sua utilização na indústria alimentícia e de cosméticos (AHMAD; ATHAR, 2017).

A atividade antimicrobiana do OEC contra várias bactérias patogênicas e uma levedura (*Candida albicans*), foi avaliado por Ernawita, (2013). O OEC apresentou boa atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas e contra a levedura a atividade antibacteriana foi satisfatória, com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 25  $\mu\text{l mL}^{-1}$ . Oyedeji et al. (2009), também observaram que o OEC apresentou uma boa atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus pumilus* quando comparado com antibióticos padrão (gentamicina e tetraciclina).

A aplicação de OEs na indústria pode ser limitada devido a sua alta volatilidade, forte odor, insolubilidade em água e baixa estabilidade físico-química. Sendo assim, a complexação com ciclodextrinas (CDs) pode ser uma alternativa para contornar essas dificuldades e melhorar as características de OEs (GONG et al., 2016).

As CDs são polímeros cíclicos de glicose, unidas por ligações  $\alpha$ -1,4. Possuem um formato de cone truncado, com exterior hidrofílico e cavidade hidrofóbica. As CDs naturais amplamente utilizadas são a  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD consistindo em 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente. São produzidas a partir da hidrólise microbiana de amido pela ação da enzima ciclodextrina

31 glicosiltransferase. As CDs são capazes de formar complexos de inclusão (CI) com uma grande  
32 variedade de moléculas a fim de modificar suas propriedades físico-químicas (TORRES et al.,  
33 2018). Essas alterações nas propriedades físico-químicas ocorridas após a complexação podem  
34 melhorar a solubilidade e favorecer uma liberação mais lenta da molécula complexada  
35 (CARVALHO et al., 2018). Dessa forma, podem representar uma possibilidade de modificar as  
36 características e propriedades de OEs.

37 Assim, o objetivo deste estudo foi extrair e caracterizar o OEC, preparar o CI entre o OEC  
38 e a  $\beta$ -CD por malaxagem (MA) e co-precipitação (CO-P), analisar a formação do CI pelas  
39 técnicas analíticas de espectroscopia UV-visível (UV-vis), espectroscopia de infravermelho (IV)  
40 e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Além disso, avaliar a solubilidade e a atividade  
41 antibacteriana do OEC e de seus respectivos CIs.

42

## 43 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

44

### 45 **2.1 Soluções e reagentes**

46

47 Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura obtida por sistema Milli-Q  
48 (Millipore®, Bedford, MA, EUA). A ciclodextrina utilizada foi a  $\beta$ -ciclodextrina da marca Sigma  
49 Aldrich (97%), etanol (grau HPLC 99,8%, Merck®), ágar Mueller-Hinton (MH),  
50 dimetilsulfóxido (DMSO) e antibiótico cloranfenicol (CL).

51

### 52 **2.2 Obtenção e caracterização do óleo essencial de *C. viminalis***

53

54 As folhas da planta *C. viminalis* (Myrtaceae) foram coletadas no campus da Universidade  
55 Federal de Lavras (UFLA) localizado em Lavras, MG, Brasil. A espécie foi identificada no  
56 Departamento de Biologia da UFLA, com exsicata de número 26.624. O óleo essencial de *C.*  
57 *viminalis* (OEC) foi extraído pela técnica de hidrodestilação usando um aparelho Clevenger  
58 modificado, adaptado a um balão de fundo redondo de 6 litros (ANVISA, 2010). A  
59 caracterização do OEC foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de  
60 massa (GC/MS-Shimadzu, modelo GCMS-QP 2010), seguindo a metodologia descrita por Sales  
61 et al. (2017).

62

63

## 64 **2.3 Preparação dos complexos de inclusão**

65

66 Os complexos de inclusão (CIs) foram preparados a partir de duas metodologias:  
67 malaxagem e co-precipitação. A mistura física (MF) entre o OEC e a  $\beta$ -CD foi utilizada como  
68 controle. A preparação foi realizada com 500 mg da  $\beta$ -CD e 500  $\mu$ L do OEC (1:1), sendo  
69 misturados por 10 minutos em um gral. A mistura formada foi armazenada em microtubo até sua  
70 utilização.

71

### 72 **2.3.1 Malaxagem**

73

74 O CI foi preparado por malaxagem (MA) segundo a metodologia descrita por Menezes et  
75 al. (2012) com modificações. 100  $\mu$ L do OEC foi inicialmente misturado em um gral com 1000  
76 mg de  $\beta$ -CD. Em seguida, 5 mL de uma solução água:etanol (3:1) foram adicionados e a mistura  
77 foi homogeneizada manualmente com um pistilo por 20 minutos até formar uma pasta  
78 homogênea. A pasta obtida foi deixada secando em dessecador a 25 °C por 24h. Posteriormente o  
79 pó obtido foi armazenado em microtubo até sua utilização.

80

### 81 **2.3.2 Co-precipitação**

82

83 O CI foi preparado pelo método de co-precipitação (CO-P) de acordo com Bhandari,  
84 D'arcy e Bich (1998), com modificações. 15 g de  $\beta$ -CD foram dissolvidos em 150 mL de solução  
85 água:etanol (2:1). Essa mistura foi mantida sob aquecimento a 55 °C. 600  $\mu$ L do OEC foram  
86 dissolvidos em 60 mL de solução etanol:água (1:1). Aos poucos a solução de OEC foi adicionada  
87 a solução de  $\beta$ -CD. A proporção utilizada entre a solução contendo OEC e a solução contendo  $\beta$ -  
88 CD foi de (0,5:50). A mistura foi agitada por 4 horas em temperatura ambiente (25 °C) a 150  
89 rpm. A solução final foi refrigerada a 4 °C por 24 horas. Após esse período, o CI formado foi  
90 recuperado por filtração a vácuo e seco na estufa a 50 °C por um período de 24 horas. O pó  
91 resultante foi colocado em placas de Petri e deixado em repouso à temperatura ambiente (25 °C)

92 por mais 24 horas. Após esse período o CI formado foi armazenado em um dessecador até a sua  
93 utilização.

94

## 95 **2.4 Isotermas de solubilidade**

96

97 O estudo da solubilidade de fase foi realizado de acordo com o método descrito por  
98 Higuchi e Connors (1965). O efeito de  $\beta$ -CD na solubilidade de OEC foi avaliado a  $27 \pm 1$  °C  
99 em água ultrapura. Quantidades crescentes de  $\beta$ -CD (0 a 10 mM) foram adicionadas a soluções  
100 contendo OEC em excesso. Após 24 h sob agitação constante, a suspensão foi centrifugada,  
101 filtrada em filtros de 0,22  $\mu$ m MillexGP e quantificada em espectrofotômetro (Varian, modelo  
102 Cary Probe 50) em  $\lambda_{\text{máx}} = 276$  nm. A constante de associação (Ka) foi calculada a partir da  
103 inclinação e do intercepto no gráfico, de acordo com a equação 1:

104

$$105 \quad K_a = \text{inclinação} / S_0 \cdot (1 - \text{inclinação})$$

106

107 onde  $S_0$  é a solubilidade intrínseca da molécula hóspede (OEC).

108

## 109 **2.5 Espectroscopia ultravioleta-visível**

110

111 Os espectros de absorção na região do UV-visível foram registrados em um  
112 espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary 50 Probe. Foram realizadas varreduras entre  
113 200 e 400 nm para o OEC, o  $\beta$ -CD e os CIs preparados em solução de água:etanol (1:1).

114

## 115 **2.6 Infravermelho**

116

117 Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos na região entre 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , em um  
118 espectrômetro Irapinity – Shimadzu, com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e número de acumulações igual a  
119 64 scans. Cerca de 20  $\mu$ L de OEC, 2 mg de  $\beta$ -CD, 2 mg dos CI e 2 mg da MF foram utilizados.  
120 Uma pastilha de KBr foi feita a partir de 198 mg de KBr e os materiais. Posteriormente, as  
121 amostras foram levadas a prensa hidráulica, aplicando uma pressão de 3 toneladas por 1 minuto  
122 para promover um contato entre as amostras e os sólidos da superfície do cristal.

123

124

125

## 126 **2.7 Calorimetria exploratória diferencial**

127

128 As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram registradas em um  
129 equipamento DSC 60 Shimadzu. 5,5 mg das amostras foram pesadas com precisão em panelas de  
130 amostra DSC, que foram hermeticamente seladas e aquecidas a uma taxa de 10 °C min<sup>-1</sup>, em um  
131 intervalo de 30 a 300 °C, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>.

132

## 133 **2.8 Atividade antibacteriana**

134

135 A atividade antibacteriana foi determinada usando a técnica de difusão em cavidade de  
136 ágar de acordo com o método descrito por Camargo et al. (2017). As bactérias avaliadas foram as  
137 gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e  
138 gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539, da coleção  
139 de cultura de microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

140

141 As culturas foram enriquecidas em Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI),  
142 incubado a 37 °C por 24 horas e transferido para um tubo contendo 5 mL de caldo de soja trípica  
143 (TSB), que foi novamente incubado nas mesmas condições até atingir a turbidez de uma solução  
144 padrão de McFarland de 0,5, correspondente a concentração de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Os inóculos  
145 foram então diluídos para concentração de 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> e incorporada ao Ágar Mueller-Hinton  
146 (MH). Uma camada fina de MH puro foi vertida nas placas de Petri e esferas de vidro estéreis  
147 foram colocadas no gel. O ágar em que a bactéria foi inoculada foi derramado sobre a primeira  
148 camada. Após a solidificação, as esferas de vidro foram removidas e 10 µL do OEC e dos CIs nas  
149 concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90, 1,95 e 0 µg mL<sup>-1</sup> em DMSO  
150 foram adicionados a cada poço. O experimento foi realizado em triplicata utilizando o antibiótico  
151 cloranfenicol como padrão positivo e DMSO como padrão negativo. As placas foram incubadas  
152 em BOD a 37 °C, e os diâmetros dos halos de inibição foram medidos após 24 horas.

152

153 A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração capaz  
de promover a inibição das bactérias em estudo.

154

155

156 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

157

158 **3.1 Caracterização e quantificação do óleo essencial de *C.viminalis***

159

160

161

162

163

164

165

166

167

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de *Callistemon viminalis* (OEC) identificados por cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas CG/MS.

Pico	TR (min)	IK	Composto	% do componente
<b>1</b>	5,778	<b>933</b>	<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	<b>15,01</b>
2	7,013	978	$\beta$ -pineno	1,73
3	8,554	1026	p-Cimeno	2,83
<b>4</b>	8,889	<b>1035</b>	<b>1,8 cineol</b>	<b>67,70</b>
5	9,735	1058	$\gamma$ -terpineno	0,53
6	12,133	1121	<i>Exo</i> -fenchol	0,35
7	13,026	1142	<i>Trans</i> -pinocarveol	0,80
8	14,329	1174	Terpinen-4-ol	0,57
9	14,678	1182	p-CMIen-8-ol	1,82
<b>10</b>	15,319	<b>1197</b>	<b><math>\alpha</math>-terpineol</b>	<b>7,72</b>
11	31,489	1587	globulol	0,59
12	32,950	1624	junenol	0,65
<b>TOTAL</b>		-	-	<b>100,3</b>

168

169

170

171

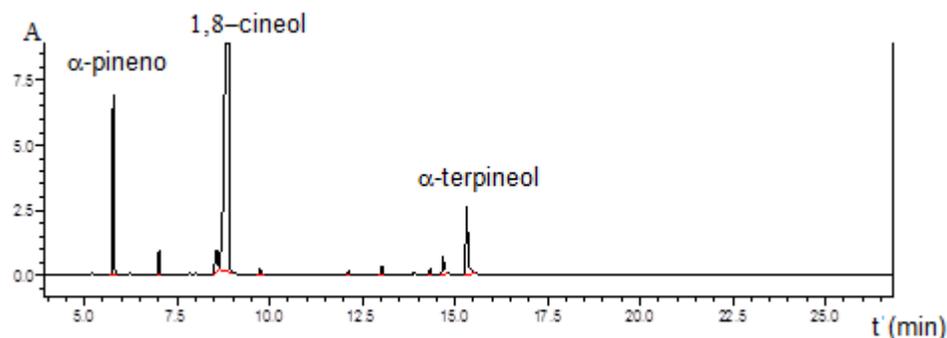
172

IK= índice de Kovats. TR= tempo de retenção em minutos.

173

174

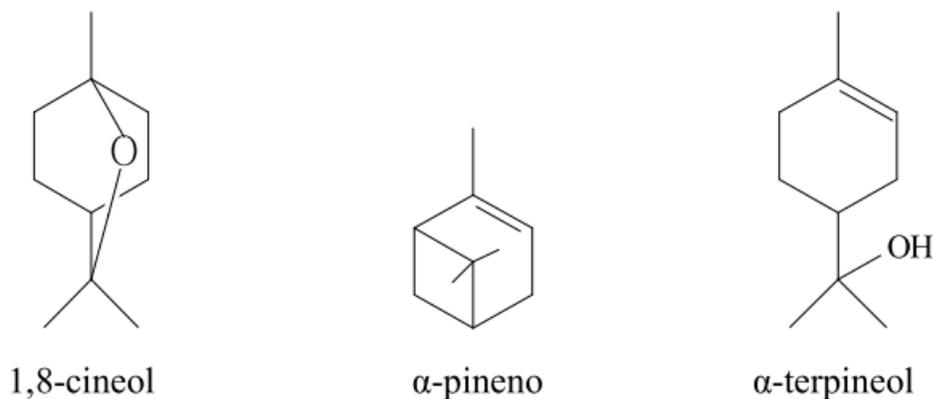
175 Figura 1 – Cromatograma do óleo essencial de *C. viminalis* analisado por cromatografia gasosa  
 176 acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS).



177

178

179 Figura 2 - Principais constituintes químicos presentes nas folhas do óleo essencial de *Callistemon*  
 180 *viminalis* (OEC).



181

182

183 A presença do 1,8-cineol como composto majoritário nas folhas de *C. viminalis* também  
 184 foi relatada por outros autores. Oyedeji et al. (2009) avaliando a composição química deste óleo  
 185 extraídos das folhas colhidas no sul da África, encontrou o 1,8-cineol (61,2%) e  $\alpha$ -pineno  
 186 (6,4%). Oliveira et al. (2014) analisou a composição química do óleo obtido das flores de *C.*  
 187 *viminalis* colhidas em Lavras/MG, Brasil, sendo identificado como majoritários o 1,8-cineol  
 188 (66,9%),  $\alpha$ -pineno (16%) e limoneno (10%). Fall et al. (2017) identificou 1,8-cineol (58,12%),  
 189 limoneno (9,72%),  $\alpha$ -terpineol (9,56%), como componentes majoritários também extraídos das  
 190 folhas de *C. viminalis*. Nesses estudos apresentados, a maioria dos compostos majoritários foram

191 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno e  $\alpha$ -terpineol, sugerindo que os resultados encontrados neste trabalho são  
192 coerentes com os resultados mostrados por diferentes autores.

193 A variação no teor e na composição de OEs está bem documentada na literatura científica  
194 e se deve a influência de diversos fatores como local e horário da coleta, tipo de solo, nutrientes e  
195 a época de coleta, uma vez que a planta pode apresentar variações de seus metabólitos  
196 secundários no verão, primavera, outono e inverno, ou seja, durante todo o ano. A idade da  
197 planta, sazonalidade, temperatura e outros fatores também influenciam praticamente todas as  
198 classes de metabólitos secundários, incluindo os OEs (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Isso  
199 explica as pequenas variações na composição química do OEC encontrado neste trabalho, quando  
200 comparado com a composição química encontrada por outros autores.

201 A planta *C. viminalis* é relatada como sendo uma planta que apresenta algumas  
202 propriedades medicamentosas, sendo usada no tratamento de hemorroidas, gastroenterite, diarreia  
203 e infecções da pele. Essa planta tem sido utilizada por muitos nativos da Austrália e China a  
204 muito tempo, porém sem comprovação científica dos resultados (SALEM et al., 2017).  
205 Entretanto, vários constituintes do seu óleo têm atividades comprovadas, como o monoterpeneo  
206 1,8-cineol, que é amplamente utilizado na indústria farmacêutica e cosmética.

207 Dhakad et al. (2018) relatam em sua revisão que o componente majoritário 1,8-cineol é o  
208 responsável por diversas atividades: antibacteriano, anti-inflamatório e repelente, além de ser  
209 usado em doenças respiratórias como bronquite e asma.

210

### 211 **3.2 Isoterma de solubilidade**

212

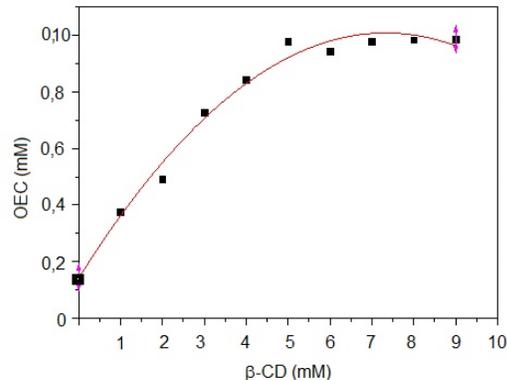
213 A estequiometria do CI OEC/ $\beta$ -CD foi estimada pela técnica de solubilidade de fases, a  
214 partir da relação obtida entre a quantidade de OEC solubilizado e a concentração de  $\beta$ -CD das  
215 soluções. De acordo com Higuchi e Connors (1965), a curva de solubilidade obtida  
216 experimentalmente pode ser definida como a do tipo An, tendo sua solubilidade limitada. Como  
217 apresentado na Figura 3, a solubilidade do OEC aumentou com o aumento na concentração de  $\beta$ -  
218 CD, até um determinado ponto. Na porção linear da curva há a formação do CI na estequiometria  
219 1:1.

220 A solubilidade do OEC aumentou cerca de 8 vezes, passando de 0,14 mM para 0,9 mM. A  
221 partir desse ponto ocorreu a saturação dos sítios de ligação da cavidade da CD e por isso, mesmo

222 com o aumento da concentração de CD a solubilidade do OEC não aumenta mais (MARQUES,  
 223 2010). Pode-se inferir que houve a formação do CI entre o OEC e a  $\beta$ -CD, sendo a incorporação  
 224 do OEC na cavidade da  $\beta$ -CD vantajosa para aumentar a sua solubilidade.

225

226 Figura 3 – Estudo da solubilidade de fase do óleo essencial de *Callistemon viminalis* (OEC) com a  $\beta$ -  
 227 ciclodextrina ( $\beta$ -CD) realizado na temperatura ambiente de 25 °C.



228

229

230 A partir da região linear do gráfico de isoterma (0-5 mM  $\beta$ -CD), determina-se o valor de  
 231  $K_a$ , com valores obtidos na equação da reta ( $Y = 0,1659x + 0,000179$   $r^2 = 0,98$ ). O valor obtido  
 232 por este método foi de  $1111,2 \text{ M}^{-1}$ . Zhang et al. (2015), no seu estudo de caracterização do CI  
 233 entre o trans-anetol e a  $\beta$ -CD, encontrou um valor de  $K_a$  de  $1195 \text{ M}^{-1}$ . Kfoury et al. (2014)  
 234 estudando a complexação entre o trans-anetol e  $\text{HP}\beta\text{-CD}$ , encontrou um valor para a constante de  
 235 associação de  $1510 \text{ M}^{-1}$ . Esses resultados são próximos ao encontrado neste trabalho.

236

237 Os valores de  $K_a$  são bons indicadores para estimar a força de ligação entre a molécula  
 238 hóspede e o hospedeiro, indicando se a molécula está mais associada (inclusa no interior da  
 239 cavidade da CD) ou dissociada (livre em solução). Seu valor numérico é diretamente  
 240 proporcional a associação da molécula hóspede no interior da CD. Um valor de  $K_a$  baixo indica  
 241 uma fraca interação, com uma maior quantidade de moléculas hóspedes livres, enquanto valores  
 242 altos de  $K_a$  indicam que o equilíbrio é perturbado e para se estabelecer a reação avança no  
 243 sentido de formação do CI, obtendo novas condições de equilíbrio. No entanto, valores muito  
 244 altos podem resultar em um retardado ou incompleta liberação da molécula hóspede (SANTOS et  
 245 al., 2015).

245

246

247

248

### 3.3 UV-visível

249

250

251

252

253

254

255

256

257

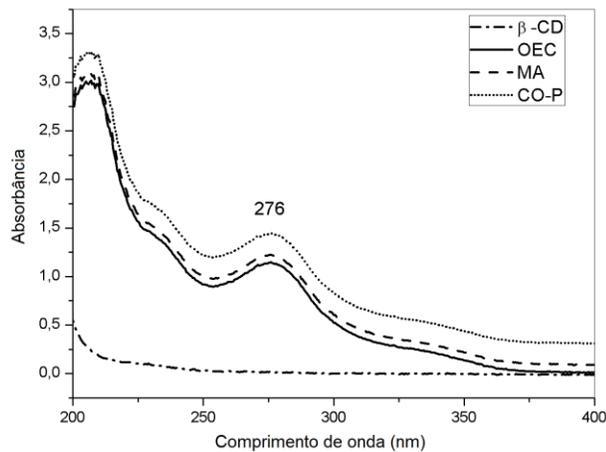
258

259

260

Os espectros de absorção na região do UV-vis foram registrados para o OEC,  $\beta$ -CD e CIs. Como mostrado na Figura 4, a  $\beta$ -CD não apresenta absorção na região do UV-vis, justificada pela ausência de grupos cromóforos em sua molécula. O OEC e os CIs apresentaram absorção máxima em 276 nm, sendo observada apenas a mudança na intensidade, em ambos os métodos de preparo. Isso pode estar relacionado com o OEC entrando na cavidade hidrofóbica da  $\beta$ -CD. A alta densidade eletrônica na cavidade da CD pode resultar na mobilização de elétrons da molécula aprisionada e as mudanças nas interações que ocorrem após a complexação causa a modificação no espectro de UV-vis (WADHWA et al. 2017).

Figura 4 - Espectro de absorção na região do UV-visível do óleo essencial de *C. viminalis* (OEC),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), malaxagem (MA) e co-precipitação (CO-P).



261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

Segundo Mura (2014), modificações no espectro UV-vis de uma molécula hóspede na presença de CDs pode fornecer informações sobre a formação do CI. Mudanças no deslocamento tanto para maiores e menores comprimentos de onda ou aumento e diminuição na intensidade, podem estar relacionados como a formação de CIs. No entanto, a formação de um CI deve ser confirmada juntamente com a combinação de outras técnicas de caracterização, como infravermelho e análises térmicas.

A variação na intensidade de absorção está de acordo com outros autores, que trabalharam com diferentes OEs: Wang et al. (2011) em seu estudo de complexação com o óleo de alho,

271 Aguiar et al. (2014) para o óleo de canela e Zhang et al. (2015) para a complexação da  $\beta$ -CD com  
 272 o trans-anetol.

273

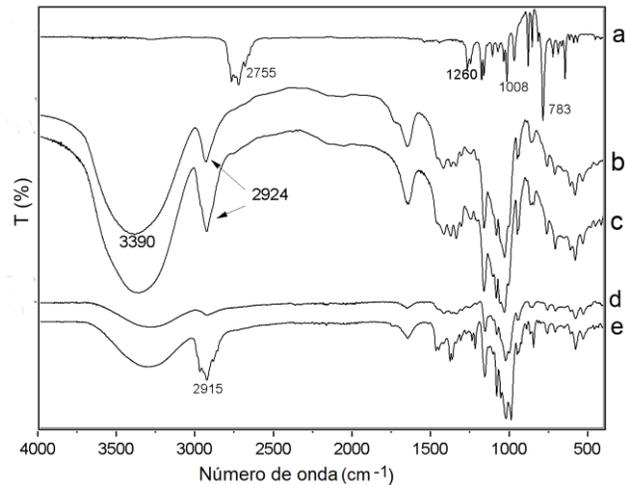
### 274 3.4 Infravermelho

275

276 A partir da análise dos espectros de IV, na Figura 5 podem-se observar as bandas  
 277 resultantes da  $\beta$ -CD, OEC e CIs. Na (Figura 5a) temos as bandas de absorção do OEC. Em 2755  
 278  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento C-H ( $\text{C}1^\circ$  e  $2^\circ$ ), entre 1260 a 1008  $\text{cm}^{-1}$  de deformação angular  $\text{CH}_3$  e  
 279 estiramento C-O éteres, 1018  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento O-H, 875 a 865  $\text{cm}^{-1}$  de C-H de anel aromático  
 280 e 783  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento C-H. Essas bandas são características de compostos orgânicos e se  
 281 assemelham com os compostos majoritários presentes no OEC.

282

283 Figura 5 - Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) das amostras: (a) óleo essencial  
 284 de *C. viminalis* (OEC); (b)  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD); (c) malaxagem (MA), (d) co-  
 285 precipitação (CO-P) e (e) mistura física (MF).



286

287

288 Na (Figura 5b) temos o espectro da  $\beta$ -CD, mostrando em 3390  $\text{cm}^{-1}$  uma banda larga e  
 289 intensa de absorção referente ao estiramento O-H, 2924  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento C-H (grupo  $\text{CH}_2$ ),  
 290 1647  $\text{cm}^{-1}$  de deformação angular H-O-H, 1146  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento C-O-C do anel e da ligação  
 291 glicosídica, 1027  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento C-O-C de álcool e 580  $\text{cm}^{-1}$  de acoplamento das ligações  
 292 do anel (C-C-H, C-O e C-C). Esses resultados estão de acordo com valores encontrados na  
 293 literatura (KFOURY et al., 2014; RAKMAI et al., 2017 e TORRES et al., 2018).

294 Nos espectros de IV dos CIs, bandas características da molécula hóspede desaparecem ou  
295 tiveram sua intensidade reduzida. Na (Figura 5c e 5d) é possível observar que as bandas  
296 referentes ao OEC puro em torno de  $2755\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1260\text{ cm}^{-1}$  a  $783\text{ cm}^{-1}$  desapareceram. Já o  
297 espectro da MF (Figura 5e), não mostrou diferenças significativas, em comparação com os  
298 espectros dos componentes individuais. Tais resultados permitem indicar que a simples mistura  
299 física entre o OEC e a  $\beta$ -CD não foi suficiente para promover a inclusão.

300 Os resultados encontrados na isoterma de solubilidade, indicaram que houve a formação  
301 do CI e, de acordo com o  $K_a$  encontrado, essa complexação é favorável. Com os resultados do  
302 IV, as mudanças ocorridas nos espectros dos CIs, indicam que o OEC está incluído dentro da  
303 cavidade da  $\beta$ -CD, confirmando que a complexação ocorreu. No CI preparado por MA, se utiliza  
304 uma menor quantidade de água, temperatura ambiente e apenas uma agitação manual. Desta  
305 forma, aparenta ser mais vantajoso para a formação do CI em comparação ao método de CO-P,  
306 que utiliza uma maior quantidade de água na sua preparação, aquecimento e agitação magnética  
307 durante um maior período de tempo. Além disso, necessita de secagem em estufa, fatores estes  
308 que podem afetar diretamente a complexação quando se trabalha com compostos voláteis.

309 Vários autores utilizaram a técnica de IV para auxiliar na confirmação da formação do CI,  
310 observando que bandas de absorção características da molécula estudada desapareceram ou  
311 tiveram sua intensidade reduzida após a complexação (SONGKRO et al., 2012; WANG et al.,  
312 2011 e RAKMAI et al., 2018).

313

### 314 **3.5 Calorimetria exploratória diferencial**

315

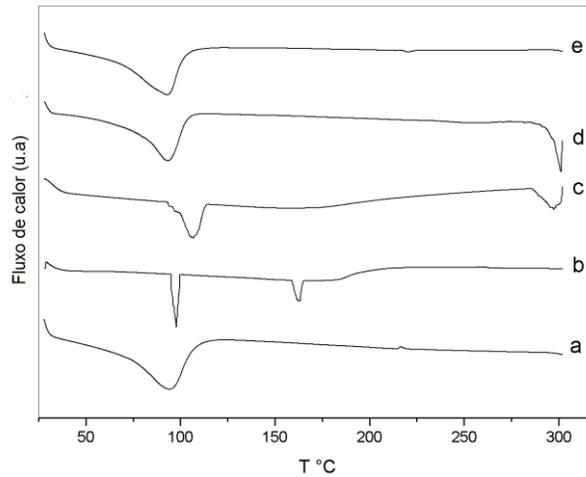
316 A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) pode ser utilizada para confirmar  
317 a formação dos CIs. Quando moléculas hóspedes são incorporadas na cavidade da CD, ocorre  
318 uma mudança na temperatura de fusão e ebulição ou elas desaparecem (MOHAMAD et al.,  
319 2011). Na curva da  $\beta$ -CD o pico endotérmico acentuado em  $95\text{ }^\circ\text{C}$  corresponde a perda de água  
320 presente no interior da cavidade hidrofóbica (Figura 6a). O OEC apresenta dois picos  
321 endotérmicos, em  $97\text{ }^\circ\text{C}$  e  $160\text{ }^\circ\text{C}$  correspondente a perda de água e a sua volatilização,  
322 respectivamente (Figura 6b).

323

324

325  
326  
327

Figura 6- Termogramas obtidos por calorimetria exploratória diferencial (DSC): (a)  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD); (b) óleo essencial de *C. viminalis* (OEC); (c) malaxagem (MA); (d) co-precipitação (CO-P) e (e) mistura física (MF).



328  
329

330 Nas curvas DSC da MA e CO-P (Figura 6c e 6d), é possível observar dois picos  
331 endotérmicos: o primeiro na faixa de 95 – 110 °C que corresponde à liberação de moléculas de  
332 água e provavelmente a liberação do óleo adsorvido na superfície do CI, e o segundo pico na  
333 faixa de 300 °C, referente a decomposição do OEC encapsulado. O pico de volatilização do óleo  
334 foi suprimido, indicando a inclusão do OEC dentro da cavidade da  $\beta$ -CD. O termograma de DSC  
335 da MF mostra que sua curva é muito semelhante a curva da  $\beta$ -CD, não sendo observado nenhum  
336 pico referente ao OEC, que pode ter sido suprimido pelos picos da  $\beta$ -CD (Figura 6e).

337 O aumento na temperatura para a degradação da molécula hóspede complexada quando  
338 comparada com a molécula hóspede livre, sugere que houve uma melhoria substancial na  
339 estabilidade térmica da molécula após sua complexação com o  $\beta$ -CD (TORRES et al., 2018).  
340 Resultados semelhantes foram observados por Menezes et al. (2012), Shrestha, Ho e Bhandari  
341 (2017), Kfoury et al. (2014) e Santos et al. (2015) quando estudaram a complexação entre a  $\beta$ -CD  
342 e diferentes OEs.

343

### 344 3.6 Atividade antibacteriana

345

346 Os valores das concentração mínima inibitória (CMI) do OEC, da  $\beta$ -CD e dos seus  
347 respectivos CIs, obtidas para as bactérias em estudo estão apresentados na Tabela 2.

348

349 Tabela 2 – Concentração mínima inibitória (CMI- $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) do óleo essencial de *C. viminalis* (OEC) e dos  
 350 complexos de inclusão preparados por malaxagem (MA) e co-precipitação (CO-P), a  $\beta$ -  
 351 ciclodextrina e os controles positivo (clorofenicol-CL) e negativo (dimetilsulfoxido-DMSO)  
 352 determinada para os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e  
 353 *Escherichia coli*.

Bactéria	Gram	OEC	CMI				
			MA	CO-P	$\beta$ -CD	DMSO	CL
<i>S. aureus</i>	+	250	125	125	NI	NI	100
<i>L. monocytogenes</i>	+	250	62,5	250	NI	NI	100
<i>E. coli</i>	-	500	500	500	NI	NI	100

354 NI – não inibiu; dimetilsulfóxido (DMSO) – controle negativo; cloranfenicol (CL) – controle positivo  
 355

356 A atividade antibacteriana do OEC puro foi determinada para as bactérias gram positivas  
 357 *S. aureus* e *L. monocytogenes*, obtendo-se um CMI de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  e para a bactéria gram negativa  
 358 *E. coli* um CMI de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Salem et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana do  
 359 OEC sobre diferentes bactérias gram-positivas e gram-negativas. Obtendo para as bactérias gram-  
 360 positivas um alto valor de CMI e baixo valor para as bactérias gram-negativas.

361 A atividade antibacteriana do OEC pode ser atribuída aos monoterpenos presentes nele,  
 362 como 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno e  $\alpha$ -terpineol. A intensidade da atividade antimicrobiana de um OE  
 363 depende da sua origem, condições ambientais e da sua composição. Os componentes do OE  
 364 podem apresentar efeito antimicrobiano sozinho ou em sinergismo com outros componentes,  
 365 alterando a potência antimicrobiana. O que leva a entender as pequenas diferenças relatadas por  
 366 diferentes autores sobre a atividade antimicrobiana presente nos OEs (CALO et al., 2015).

367 A atividade antimicrobiana desses compostos resulta de uma combinação de processos  
 368 que causam distúrbios em células patogênicas e finalmente, sua lise. Um estágio muito  
 369 importante no mecanismo da atividade é a sua incorporação na membrana o que leva a mudanças  
 370 na integridade e permeabilidade, causando perda do material celular (HAC-WYDRO; SZYDLO,  
 371 2016).

372 No CI preparado pelo método MA, uma menor CMI de  $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi observada para a  
 373 bactéria *L. monocytogenes*, seguida pela bactéria *S. aureus* que foi inibida com um CMI de  $125 \mu\text{g}$   
 374  $\text{mL}^{-1}$ . Já para bactéria *E. coli*, por este método de preparação apresentou o mesmo CMI do OEC  
 375 puro. Analisando o CI preparado por CO-P, um CMI de  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi obtido para a bactéria *S.*  
 376 *aureus*. Já para as bactérias *L. monocytogenes* e *E. coli* apresentou a mesma CMI do OEC puro.

377 A bactéria *S. Cholerasuis* não foi inibida por nenhum CIs e nem pelo OEC puro. Já os  
378 resultados microbiológicos obtidos para a  $\beta$ -CD, não indicam a formação de halos de inibição.  
379 Hanci et al. (2014) também não observaram inibição para as bactérias *Staphylococcus aureus*  
380 ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas*  
381 *aeruginosa* ATCC 27853 em seu estudo com a  $\gamma$ -CD modificada (sugadamex) em nenhuma das  
382 concentrações testadas.

383 Comparando-se a CMI dos CIs com o OEC puro, observa-se que a complexação manteve  
384 a atividade antibacteriana do composto, porém, a concentração mínima necessária para a inibição  
385 diminuiu nos CIs. Destaque para o CI preparado por MA que a inibição da bactéria *L.*  
386 *monocytogenes* necessitou de uma menor concentração. Como demonstrado pelo resultado da  
387 solubilidade, a complexação aumentou a solubilidade do OEC, apresentando o efeito inibitório  
388 sobre as bactérias testadas, utilizando uma menor concentração de óleo.

389 Segundo Rakmai et al. (2018) os CIs produzidos com CDs podem aumentar a solubilidade  
390 aquosa de moléculas apolares que são encapsuladas, melhorando assim a eficiência  
391 antimicrobiana de OEs, sendo possível utilizar concentrações mais baixas, devido a uma melhor  
392 acessibilidade dos compostos ativos às células. A atividade antibacteriana é melhorada porque  
393 provavelmente a  $\beta$ -CD melhora o acesso do OE nas regiões onde vai atuar, facilitando a  
394 passagem pela membrana plasmática e sua entrada no citoplasma da célula, ocasionando danos  
395 irreversíveis e levando à morte da bactéria (SANTOS et al., 2015).

396 As bactérias gram-positivas apresentaram maior sensibilidade do que as bactérias gram-  
397 negativas frente ao OEC puro. A maior sensibilidade das bactérias gram-positivas é uma  
398 característica relatada na maioria dos trabalhos realizados com OEs, e se explica pelas diferenças  
399 existentes na parede celular destes dois grupos de bactérias (CAMARGO et al., 2017).

400 Nas bactérias gram-positivas 90 a 95% da parede celular é composta por  
401 peptidoglicanos, facilitando a penetração de componentes hidrofóbicos. Já as bactérias gram-  
402 negativas possuem uma dupla camada externa hidrofílica, que ajuda a prevenir a penetração de  
403 componentes hidrofóbicos, tornando essas bactérias mais resistentes a OEs e a outros extratos  
404 naturais (ANTUNES et al., 2017).

405 A atividade antimicrobiana do óleo da folha de goiaba complexado com HP $\beta$ -CD frente  
406 as bactérias *S. aureus* e *E. coli* foi avaliada por Rakmai et al. (2018). O composto 1,8 cineol  
407 correspondeu a 34% desse óleo. Comparando o CI com o óleo da folha puro, foi observada uma

408 redução na CMI para as bactérias *S. aureus* de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o óleo puro para 125  $\mu\text{g L}^{-1}$  do  
409 CI e *E. coli* de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para óleo puro para 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do CI. Resultados semelhantes aos  
410 encontrados neste trabalho para a bactéria *S. aureus*, no qual foi possível observar uma redução  
411 na CMI.

412

#### 413 4. CONCLUSÃO

414

415 A caracterização química do OEC obteve como composto majoritário o 1,8-cineol  
416 (67,70%). Os resultados deste estudo demonstram que o OEC pode ser complexado com  $\beta$ -CD  
417 para formar CIs, Os resultados obtidos por UV-vis, IV e DSC, demonstram que o CI OEC/ $\beta$ -CD  
418 possui diferentes características físico-químicas do OEC livre. A solubilidade aquosas do OEC  
419 foi significativamente aumentada (aproximadamente 8 vezes) após a inclusão na cavidade da  $\beta$ -  
420 CD. A complexação também melhora a atividade antibacteriana do OEC contra *S. aureus* e *L.*  
421 *monocytogens*, revelando que a complexação com a  $\beta$ -CD pode diminuir a concentração mínima  
422 inibitória necessária para a inibição do crescimento microbiano.

423

#### 424 5. AGRADECIMENTOS

425

426 Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
427 (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho  
428 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Centro de Análise e Prospecção  
429 Química (CAPQ), ao Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos e a Universidade Federal de  
430 Lavras por seu apoio financeiro para a execução desta pesquisa.

431

#### 432 5. REFERÊNCIAS

433

434 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). Farmacopéia Brasileira. [Brazilian  
435 Pharmacopoeae.] 5th Edition, p.198-199, 2010.

436

437 AGUIAR, U. N. et al. Preparation and characterization of the inclusion complex essential oil of *croton*  
438 *zehntneri* with  $\beta$ -cyclodextrin, **Química Nova**, v.37, n.1, p.50-55, 2014.

439

440 ANTUNES, M. D. et al. Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus  
441 essential oil/cyclodextrin inclusion complex, **International Journal of Biological Macromolecules**,  
442 v.104, part A, p.874–882, 2017.

- 443 AHMAD, K; ATHAR, F. Phytochemistry and pharmacology of *Callistemon viminalis* (Myrtaceae): A  
444 review, **The Natural Products Journal**, v.7, n.3, p.1-10, 2017.  
445
- 446 BHANDARI, B. R.; D'ARCY, B. R.; BICH, L. L. T.; Lemon oil to  $\alpha$ -cyclodextrin ratio effect on the  
447 inclusion efficiency of  $\alpha$ -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex, **Journal of**  
448 **Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.4, p.1494, 1998.  
449
- 450 BOZIN, B. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L.  
451 and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55,  
452 n. 19, p. 7879-7885, 2007.  
453
- 454 CALO, J. R. Essential oils as antimicrobials in food systems - a review, **Food Control**, v.54, p.111-119,  
455 2015.  
456
- 457 CAMARGO, K. C. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Hyptis carpinifolia* Benth,  
458 **American Journal of Plant Sciences**, v.8, n. 11, p.2871-2877, 2017.  
459
- 460 CARVALHO, L. B. et al. Complexes between methyltestosterone and  $\beta$ -cyclodextrin for application in  
461 aquaculture production, **Carbohydrate Polymers**, v.179, n.1, p.386-393, 2018.  
462
- 463 DHAKAD, A. K. et al. Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential  
464 oil: a review, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.98, n.3, p.833–848, 2018.  
465
- 466 ERNAWITA, S. F. S. Composition and antimicrobial activity of crude extracts and essential oil of  
467 *Callistemon viminalis* leaves. **Jurnal Biologi Edukasi**, v.1, n.2, p.47-50, 2013.  
468
- 469 FALL, R. et al. Chemical characterization of essential oil from the leaves of *Callistemon viminalis* (D.R.)  
470 and *Melaleuca leucadendron* (Linn.), **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.7, n.4, p.347–  
471 351, 2017.  
472
- 473 GOBBO-NETO, L.; LOPES. N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary  
474 metabolites. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 374-381, 2007.  
475
- 476 GONG, L. et al. An inclusion complex of eugenol into  $\beta$ -cyclodextrin: Preparation, and physicochemical  
477 and antifungal characterization, **Food Chemistry**, v.196, p.324–330, 2016.  
478
- 479 HAC-WYDRO, K.; SZYDLO, K. The influence of environmentally friendly pesticide – Eucalyptol–alone  
480 and in combination with terpinen-4-ol – on model bacterial membranes, **Colloids and Surfaces B:**  
481 **Biointerfaces**, v.146, p.918–923, 2016.  
482
- 483 HANCI, V. et al. *In vitro* evaluation of the antimicrobial characteristics of sugammadex, **Revista**  
484 **Brasileira de Anestesiologia**, v.64, n.2, p. 105–108, 2014.  
485
- 486 HIGUCHI T.; CONNORS K. A. Phase-solubility techniques. In: Reilly CN. editor. Advances in analytical  
487 chemistry and instrumentation. New York, NY: **Wiley-Interscience**; p.117-212, 1965.  
488
- 489 KFOURY, M. et al. Cyclodextrin, an efficient tool for *trans*-anethole encapsulation: Chromatographic,  
490 spectroscopic, thermal and structural studies, **Food Chemistry**, v.164, n.1, p.454–461, 2014.  
491

- 492 MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles, **Journal**  
493 **Flavour Fragrance**, v 25, n.5, p. 313–326, 2010.  
494
- 495 MENEZES, P. P. et al. Solid-state  $\beta$ -cyclodextrin complexes containing geraniol, **Thermochemica Acta**,  
496 v.548, p.45–50, 2012.  
497
- 498 MOHAMAD, S. et al. Conventional Study on Novel Dicationic Ionic Liquid Inclusion with  $\beta$ -  
499 Cyclodextrin, **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, n.2, p.6329-6345, 2011.  
500
- 501 MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A  
502 review, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.101 p.238–250, 2014.  
503
- 504 OLIVEIRA, C. M. et al. Chemical composition and allelopathic activity of the essential oil from  
505 *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) blossoms on lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings, **American Journal**  
506 **of Plant Sciences**, v.5, n.24, p.3551-3557, 2014.  
507
- 508 OYEDEJI, O. O. et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Callistemon*  
509 *citrinus* and *Callistemon viminalis* from South Africa, **Molecules**, v.14, n.6, p. 1990-1998, 2009.  
510
- 511 RAKMAI, J. et al. Encapsulation of yarrow essential oil in hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin:  
512 physicochemical characterization and evaluation of bio-efficacies, **CyTA - Journal of Food**, v.5, n.3,  
513 p.409-417, 2017.  
514
- 515 RAKMAI, J. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in  
516 hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, **Industrial Crops & Products**, v.111, p.219–225, 2018.  
517
- 518 SALEM, M. Z. M. et al. Evaluation of extracts and essential oil from *Callistemon viminalis* leaves:  
519 Antibacterial and antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents, **Asian Pacific Journal of**  
520 **Tropical Medicine**, v.6, n.10, p.785-791, 2013.  
521
- 522 SALEM, M. Z. M. et al. Medicinal and biological values of *Callistemon viminalis* extracts: history,  
523 current situation and prospects. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.10, n.3, p.229–237, 2017.  
524
- 525 SANTOS, E. H. et al. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery  
526 systems for antibacterial and antioxidant applications, **Food Science and Technology**, v.60, n.1, p.583-  
527 592, 2015.  
528
- 529 SHRESTHA, M.; HO, T. M.; BHANDARI, B. R. Encapsulation of tea tree oil by amorphous beta-  
530 cyclodextrin powder, **Food Chemistry**, v.221, p.1474–1483, 2017.  
531
- 532 SONGKRO, S. et al. Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with  
533  $\beta$ -cyclodextrin for mosquito repellent, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**,  
534 v.72, n.3-4, p.339–355, 2012.  
535
- 536 TORRES, L. H. et al. Characterization and cytotoxicity of a benzocaine inclusion complex, **Journal of**  
537 **Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.91, n.1-2, p.9-15, 2018.  
538
- 539 WADHWA, G. et al. Essential oil-cyclodextrin complexes: an updated review, **Journal of Inclusion**  
540 **Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.89, n.1-2, p.39–58, 2017.  
541

- 542 WANG, J. et al. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- $\beta$ -cyclodextrin inclusion  
543 complexes. *Food Chemistry*, v.127, n.4, p.1680–1685, 2011.  
544  
545 ZHANG, W. et al. Preparation, physicochemical characterization and release behavior of the inclusion  
546 complex of trans-anethole and  $\beta$ -cyclodextrin, **Food Research International** n.74, p.55–62, 2015.

**TERCEIRA PARTE – ARTIGO 2****TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CALLISTEMON*  
*VIMINALIS* COMPLEXADO COM CICLODEXTRINAS**

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi investigar a toxicidade do óleo essencial de *Callistemon viminalis* (OEC) e dos complexos de inclusão (CI) entre  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e OEC preparados pelos métodos malaxagem (MA) e co-precipitação (CO-P) e a mistura física como controle (MF), bem como analisar as propriedades físicas do CI obtido. A complexação foi confirmada pela análise termogravimétrica (TGA), que indicou que a degradação térmica do CI  $\beta$ -CD/OEC entre 270-430 °C. As mudanças estruturais e morfológicas observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raio-X (DRX) também confirmaram a formação do CI, no qual observou uma redução no grau de cristalinidade. O teste de liberação controlada mostra que em dois dias OEC puro e MF já tinham liberado 86% e 83%, respectivamente. A taxa de liberação do OEC presente nos CIs preparados por MA e CO-P foi de 65% e 78% respectivamente, após 8 dias de diálise. Os resultados obtidos sugeriram que a formação do CI foi eficiente em retardar a liberação do OEC. A toxicidade do OEC foi reduzida após a complexação, visto que nos CIs a porcentagem de germinação (%GR) para a MA foi 91,3% e para CO-P 75,33%, aumentando também os parâmetros de índice de velocidade de germinação (IVG) e crescimento radicular(CR) quando comparado com OEC. Os CIs inibiram a ação das fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases da peçonha de *Bothrops atrox*. Pode-se sugerir que a formação do CI é uma alternativa para utilização de compostos instáveis, reduzindo sua toxicidade, ampliando suas formas de utilização, de maneira segura para o homem e ao meio ambiente, mantendo suas propriedades biológicas.

**Palavras-chave:** Complexos de inclusão; Toxicidade; Monoterpenos

## 1. INTRODUÇÃO

*Callistemon viminalis*, popularmente conhecida como escova de garrafa, é uma planta ornamental pertencente à família Myrtaceae (SALES et al., 2017). É uma árvore de tamanho médio com folhagem persistente, encontrada em todo o mundo, sendo distribuída principalmente em regiões tropicais. O óleo essencial (OE) de algumas espécies de *Callistemon*, especialmente o de *C. viminalis* (OEC), são ricos em componentes químicos com propriedades inseticidas, fungicidas, antimicrobianas e alelopáticas (OLIVEIRA et al., 2014). O 1,8-cineol, também chamado de eucaliptol, é o principal componente encontrado no OEC (OYEDEJI et al., 2009). É amplamente utilizado como agente aromatizante de vários alimentos processados, em produtos lácteos e bebidas não alcoólicas, além de sua utilização no tratamento de doenças respiratórias, dor muscular, reumatismo e cálculos renais (CALDAS et al., 2016).

A utilização de OEs como medicamentos ou em alimentos vem crescendo muito nos últimos anos, porém sua utilização em doses e concentrações elevadas pode apresentar-se altamente prejudicial à saúde do homem. Os componentes presentes nos OEs podem ser tóxicos, citotóxicos e até mutagênicos, provocando reações inesperadas durante ou após seu uso em alguns casos (BORS et al., 2012). Desse modo é de extrema importância realizar estudos referentes à toxicidade de produtos naturais, a fim de obter uma margem razoável para uso com segurança (BENIGNI, 2005).

Ensaio com plantas superiores como a *Lactuca sativa L.* são utilizadas para avaliar a toxicidade de diversos compostos, associando a efeitos que uma determinada substância pode causar na germinação, desenvolvimento inicial e ciclo celular. As vantagens de usar modelos de plantas em ambientes de estudos de toxicidade são seu baixo custo, fácil manuseio e sensibilidade, bem como sua semelhança com modelos animais, incluindo células humanas (VENCESLAU et al., 2017).

As peçonhas de serpentes também têm sido amplamente utilizadas como ferramentas laboratoriais para estudos fisiológicos, avaliando a toxicidade de diversos compostos de origem vegetal. As peçonhas são constituídas principalmente por proteínas (fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases), que têm várias atividades biológicas, tais como enzimáticas, miotóxicas, cardiotoxícas e citotóxicas. Fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e proteases, presentes em peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*, podem agir diretamente sobre os eritrócitos, miócitos, fatores da cascata da coagulação

32 sanguínea, células epiteliais e endotélio vascular, causando desorganização fisiológica e  
33 resultando em coagulação ou hemólise intravascular (REZENDE et al., 2017).

34 Os OEs geralmente tem baixa solubilidade aquosa e são suscetíveis à degradação  
35 promovida pelo calor, metais, oxigênio, luz e radicais livres. A complexação em ciclodextrinas  
36 (CDs) é uma alternativa para tentar proteger o OE desses fatores externos e também melhorar a  
37 sua solubilidade, estabilidade aquosa, diminuir a concentração a ser utilizada e favorecer uma  
38 liberação mais lenta da molécula complexada (KFOURY et al., 2016; CARVALHO et al., 2018).

39 As CDs são polímeros cíclicos de glicose que vêm sendo utilizadas como agentes  
40 complexantes porque são capazes de formar complexos de inclusão (CI) com uma grande  
41 variedade de moléculas a fim de modificar suas propriedades físico-químicas. Possuem um  
42 formato de cone truncado, com exterior hidrofílico e cavidade hidrofóbica. As CDs naturais  
43 amplamente utilizadas são a  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD consistindo em 6, 7 e 8 unidades de glicose,  
44 respectivamente (TORRES et al., 2018).

45 Assim, o objetivo deste estudo foi preparar o CI incorporando OEC na  $\beta$ -CD, caracterizar  
46 a formação do CI  $\beta$ -CD/OEC por termogravimetria (TG), microscopia eletrônica de varredura  
47 (MEV) e difração de raios-X (DRX), bem como avaliar o perfil de liberação do OEC complexado  
48 e investigar a toxicidade do OEC livre e complexado através de ensaios *in vitro*.

49

## 50 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

51

### 52 **2.1 Soluções e reagentes**

53

54 Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura obtida por Sistema Milli-Q  
55 (Millipore®, Bedford, MA, EUA). A ciclodextrina utilizada foi a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) da  
56 marca Sigma Aldrich (97%) e o etanol (grau HPLC 99,8%) da marca Merck.

57

### 58 **2.2 Obtenção do óleo essencial de *C. Viminalis***

59

60 As folhas da planta *C. viminalis* (Myrtaceae) foram coletadas no campus da Universidade  
61 Federal de Lavras (UFLA) localizado em Lavras, MG, Brasil. A espécie foi identificada no  
62 Departamento de Biologia da UFLA, com exsicata de número 26.624. O óleo essencial de *C.*

63 *viminalis* (OEC) foi extraído pela técnica de hidrodestilação usando um aparelho Clevenger  
64 modificado, adaptado a um balão de fundo redondo de 6 litros (ANVISA, 2010). A  
65 caracterização do OEC foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de  
66 massa (GC/MS-Shimadzu, modelo GCMS-QP 2010), seguindo a metodologia descrita por Sales  
67 et al., (2017).

68

### 69 **2.3 Preparo dos complexos de inclusão**

70

71 Os complexos de inclusão (CIs) foram preparados a partir de duas metodologias:  
72 malaxagem e co-precipitação. A mistura física (MF) entre o OEC e a  $\beta$ -CD foi utilizada como  
73 controle. A preparação foi realizada com 500 mg da  $\beta$ -CD e 500  $\mu$ L do OEC (1:1), sendo  
74 misturados por 10 minutos em um gral. A mistura formada foi armazenada em microtubo até sua  
75 utilização.

76

#### 77 **2.3.1 Malaxagem**

78

79 O CI foi preparado por malaxagem (MA) segundo a metodologia descrita por Menezes et  
80 al. (2012) com modificações. 100  $\mu$ L do OEC foi inicialmente misturado em um gral com 1000  
81 mg de  $\beta$ -CD. Em seguida, 5mL de uma solução água:etanol (3:1) foram adicionados e a mistura  
82 foi homogeneizada manualmente com um pistilo por 20 minutos até formar uma pasta  
83 homogênea. A pasta obtida foi deixada secando em dessecador a 25 °C por 24h. Posteriormente o  
84 pó obtido foi armazenado em microtubo até sua utilização.

85

#### 86 **2.3.2 Co-precipitação**

87

88 O CI foi preparado pelo método de co-precipitação (CO-P) de acordo com Bhandari,  
89 D'arcy e Bich (1998), com modificações. 15 g de  $\beta$ -CD foram dissolvidos em 150 mL de solução  
90 água:etanol (2:1). Essa mistura foi mantida sob aquecimento a 55 °C. 600  $\mu$ L do OEC foram  
91 dissolvidos em 60 mL de solução etanol:água (1:1). Aos poucos a solução de OEC foi adicionada  
92 a solução de  $\beta$ -CD. A proporção utilizada entre a solução contendo OEC e a solução contendo  $\beta$ -  
93 CD foi de (0,5:50). A mistura foi agitada por 4 horas em temperatura ambiente (25 °C) a 150

94 rpm. A solução final foi refrigerada a 4 °C por 24 horas. Após esse período, o CI formado foi  
95 recuperado por filtração a vácuo e seco na estufa a 50 °C por um período de 24 horas. O pó  
96 resultante foi colocado em placas de Petri e deixado em repouso à temperatura ambiente (25 °C)  
97 por mais 24 horas. Após esse período o CI formado foi armazenado em um dessecador até a sua  
98 utilização.

99

## 100 **2.4 Caracterização dos complexos de inclusão**

101

102 A análise termogravimétrica (TG) foram obtidas por meio de termobalança utilizando-se  
103 um aparelho Shimadzu Modelo 60 AH. Utilizou-se uma massa de 5,5 mg de amostra, sob  
104 atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 mL.min<sup>-1</sup>, com faixa de temperatura de 40 a 700 °C e  
105 taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>.

106 Os difratogramas de raios-X (DRX) foram registrados no difratômetro Shimadzu XRD-  
107 6000 utilizando-se uma radiação fixa de 0,154 nm, empregando-se filtro de níquel, com ângulos  
108 de difração variando de 5 θ a 30 θ a uma velocidade de varredura de 2θ min<sup>-1</sup>.

109 As micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) LEO EVO  
110 40XVP. As amostras foram montadas em suportes de alumínio usando fita dupla-face e cobertas  
111 com ouro coloidal sob atmosfera de argônio sob vácuo por 180 s no evaporador BALZERS SCD  
112 050.

113

## 114 **2.5 Ensaios de liberação do óleo essencial de *C. viminalis* in vitro**

115

116 Os ensaios de liberação do óleo essencial de *C. viminalis* (OEC) foram realizados de  
117 acordo com a metodologia adaptada descrita por Carvalho et al. (2018). O experimento foi  
118 realizado em triplicata, utilizando um compartimento de diálise com área transversal de 1,54 cm<sup>2</sup>.  
119 Utilizou-se uma membrana de poro de exclusão de 1.000 Da (Sigma-Aldrich) para separação  
120 entre a amostra e o meio aquoso contendo 10% de etanol. Alíquotas de 2 mL das soluções de CIs  
121 e OEC livre na concentração de 6,6 x 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> foram colocados no compartimento doador e  
122 imersos no compartimento do receptor. A liberação do OEC foi monitorada por leituras  
123 espectrometria a 276 nm.

124

## 2.6 Bioensaios usando o modelo de *L. sativa* L.

O protocolo descrito por Aragão et al. (2015) foi seguido para as análises macroscópicas: porcentagem de germinação (%GR), índice de velocidade de germinação (IVG) e taxa de crescimento radicular (CR). Foram testados o OEC, a MF e os CIs, todos na concentração de  $5 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ . Os controles negativo e positivo foram água pura e OEC não complexado, respectivamente. As sementes de *L. sativa* (variedade Manteiga) foram colocadas em papel de filtro em placas de Petri (9 cm  $\varnothing$ ) com 3 mL das soluções de tratamento. Cada placa de Petri continha 30 sementes, e havia 5 placas de Petri por tratamento. O número de sementes germinadas foi contada a cada 8 horas, num total de 48 horas de exposição, sendo possível calcular o IVG de acordo com a eq.1.

$$\text{IVG} = (N_y - (N_y - 1)) \times 1 / y \quad (1)$$

Onde  $N_y$  representa o número de sementes germinadas num dado período e  $y$  representa o número total de avaliações.

A %GR foi calculada conforme a eq.2 após 48hs de exposição. O comprimento da raiz foi obtido com um paquímetro digital (LEE Tools, China) após 120 h de exposição, obtendo-se o CR.

$$\%GR = (SG / ST \times 100) \quad (2)$$

Onde, SG é o número total de sementes germinadas e ST o número total de sementes por tratamento.

## 2.7 Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi avaliada, como descrito por Gutiérrez et al. (1988). Um gel foi preparado (0,01 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ ; gema de ovo diluído 1:3 v  $\text{v}^{-1}$  em PBS; azida sódica a 0,005%, com agarose a 1%, pH 7,2). Após solidificação do gel, foram feitos orifícios de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro. A concentração final das soluções do OEC, MF e dos CIs

156 foi de 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  num volume final de 30  $\mu\text{L}$ . Foi avaliada a inibição da atividade fosfolipásica  
157 induzida pela peçonha de serpente de *Bothrops atrox* na concentração de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os  
158 tratamentos foram incubados em banho maria a 37 °C por 30 minutos. Para a atividade  
159 fosfolipásica as proporções testadas entre peçonha/OEC ou CIs foram de 1:0,1; 1:0,5; 1:1; 1:2,5;  
160 1:5 e 1:10 (m:m). Os ensaios foram realizados em triplicata. Os géis contendo as amostras foram  
161 mantidos em câmara de cultura celular a 37°C por 24 horas, e a formação de um halo translúcido  
162 em torno do orifício no gel caracterizando a atividade fosfolipásica, foi quantificado medindo-se  
163 o diâmetro do halo (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982; RANGEL et al., 1997).

164

## 165 **2.8 Análise estatística**

166

167 Os parâmetros avaliados no ensaio com a *L. sativa* (%GR, IVG e CR) e na atividade  
168 fosfolipásica, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas  
169 com o controle positivo pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

170

## 171 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

172

### 173 **3.1 Termogravimetria**

174

175 A termogravimetria (TG) é uma maneira eficaz de estudar mudanças nas propriedades  
176 físicas e químicas de materiais (ABARCA et al., 2016). As curvas de TG e DTG de todas as  
177 amostras são apresentadas na Figura 1 e seus respectivos percentuais de perda de massa ( $\Delta m$ ) na  
178 Tabela 1. Para a curva do OEC foi possível observar apenas um único evento térmico entre 40 e  
179 180 °C, com um  $\Delta m = 98,4\%$ . Esse ponto é caracterizado como o de volatilização do OEC. Esse  
180 resultado está de acordo com a temperatura de ebulição do composto majoritário (1,8-cineol), que  
181 se volatiliza em até 175 °C (BADU; SINGH, 2009).

182

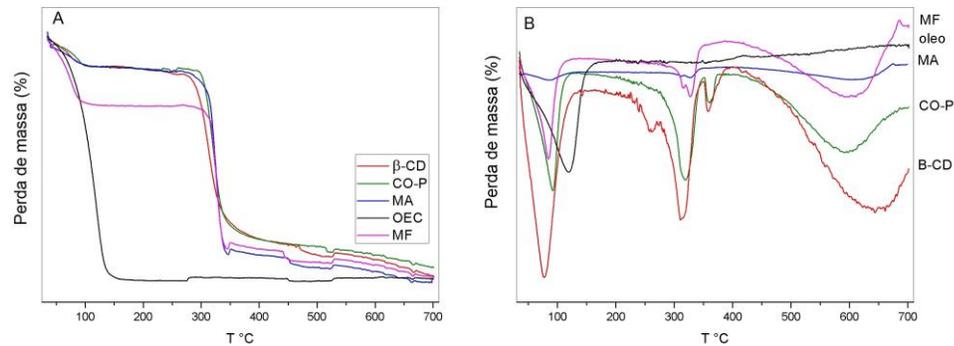
183

184

185

186

187 Figura 1 – Curvas da análise termogravimétrica do óleo essencial de *C. viminalis* (OEC),  $\beta$ -ciclodextrina  
 188  $\beta$ -CD, mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-precipitação (CO-P). (a) curva de  
 189 termogravimetria (TG) e (b) curva da derivada da termogravimetria (DTG).



190  
 191

192 Tabela 1- Porcentagem de perda de massa do óleo essencial de *C. viminalis* (OEC),  $\beta$ -ciclodextrina  $\beta$ -CD,  
 193 mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-precipitação (CO-P) nas faixas de temperaturas de  
 194 30 a 120 °C; 40 a 180 °C e 270 a 430 °C.

Amostras	Perda de massa %		
	Faixa de Temperatura		
	30 °C – 120 °C	40 °C – 180 °C	270 °C – 430 °C
OEC	-	98,4	-
CO-P	11,1	-	65,4
MA	13,2	-	73,3
$\beta$ -CD	11,0	-	59,0
MF	26,0	-	57,0

195

196 As curvas de TG da  $\beta$ -CD, MF e dos CIs apresentaram dois eventos térmicos: O primeiro  
 197 evento na faixa de temperatura de 30-120 °C corresponde à liberação de moléculas de água e de  
 198 alguns componentes do OEC. O segundo evento térmico foi observado na faixa de temperatura  
 199 de 270-430 °C, onde a  $\beta$ -CD e os CIs começam a se decompor. Os resultados obtidos neste  
 200 estudo estão de acordo com Mura (2015), que relata que as curvas de TG das CDs, são  
 201 caracterizadas por duas perdas de massa. A primeira perda de massa ocorre em temperaturas  
 202 próximas de 100 °C, sendo devidas à desidratação da CD. Enquanto a segunda perda de massa  
 203 ocorre em temperaturas superiores a 300 °C, sendo atribuída à decomposição dos macrociclos.  
 204 Diante de tais resultados, pode-se afirmar que houve formação do CI entre OEC/ $\beta$ -CD, uma vez  
 205 que a complexação é responsável em aumentar a estabilidade térmica do composto, visto que sua  
 206 volatilização quando complexado ocorreu em temperaturas mais elevadas.

207

208 Na MF uma  $\Delta m = 26,0\%$  é observada na faixa de temperatura entre 30 e 120 °C,  
 relacionada à liberação das moléculas de água da  $\beta$ -CD e a volatilização do OEC. A maior perda

209 de massa na MF em comparação com as amostras obtidas por CO-P e MA indica que parte do  
 210 OEC foi volatilizado, caracterizando a ausência da complexação com a  $\beta$ -CD. Resultados  
 211 semelhantes foram observados por Guimarães et al. (2015), Menezes et al. (2016) e Andrade et  
 212 al. (2017) que também obtiveram uma maior perda de massa para a mistura física na primeira  
 213 faixa de temperatura (30-170 °C) quando comparado com a  $\beta$ -CD e CIs.

214

215

### 3.2 Difração de raios-X

216

217

218

219

220

221

222

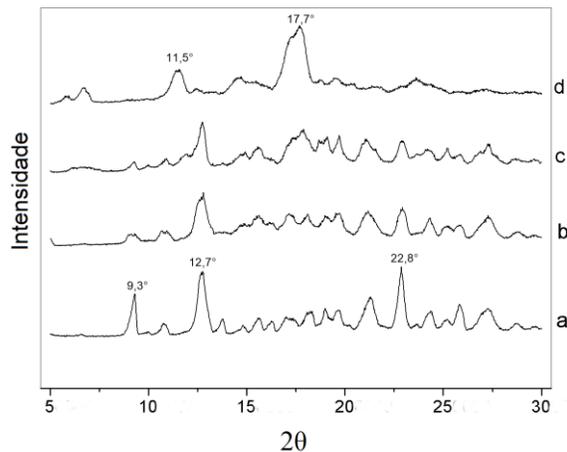
223

224

225

226

Figura 2 - Difratoograma de raio-x. (a)  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD); (b) mistura física (MF); (c) co-precipitação (CO-P); (d) malaxagem (MA).



227

228

229

230

231

232

O difratograma da MF e do CI preparado por CO-P (Figura 2b e 2c), apresentam um padrão cristalográfico similar. O pico em 12,7° da  $\beta$ -CD também está presente nessas amostras e na região entre 14,0° a 27,3° observa-se a redução na intensidade dos picos e uma maior cristalinidade é observada, sugerindo que o OEC está livre no meio, havendo pouca ou nenhuma

233 interação com a  $\beta$ -CD. Segundo Shrestha, Ho e Bhandari, (2017) nos CIs preparados com etanol,  
234 como é o caso do CI preparado por CO-P, as moléculas de etanol interagem com as moléculas de  
235 CD aumentando sua mobilidade e desencadeando a cristalização.

236 No CI preparado por MA (Figura 2d), uma redução significativa no grau de cristalinidade  
237 é observado. Visto que os picos do difratograma são mais alargados, e isso significa que o nível  
238 de cristalização é muito baixo (SHRESTHA, HO E BHANDARI, 2017). Apenas dois picos de  
239 maior intensidade foram identificados em  $11,5^\circ$  e  $17,7^\circ$ . A diminuição no grau de cristalinidade  
240 de uma amostra observada pela técnica DRX, sugere que ocorreu uma mudança estrutural do  
241 composto, passando de estrutura cristalina para uma estrutura amorfa. Essa mudança sugere a  
242 formação do CI e foi confirmada pela técnica MEV, onde essas mudanças superficiais foram  
243 observadas.

244

### 245 **3.3 Microscopia eletrônica de varredura**

246

247 As características morfológicas obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)  
248 são apresentadas na Figura 3 em três aumentos diferentes (252X, 688X e 1780X). Na (Figura 3a)  
249 são apresentadas as micrografias da  $\beta$ -CD, suas partículas no estado sólido se apresentam na  
250 forma de cristais retangulares com tamanho na ordem de grandeza de  $100 \mu\text{m}$ , o que está de  
251 acordo com outras abordagens descritas na literatura (ZHANG et al., 2015; ANDRADE et al.,  
252 2017).

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

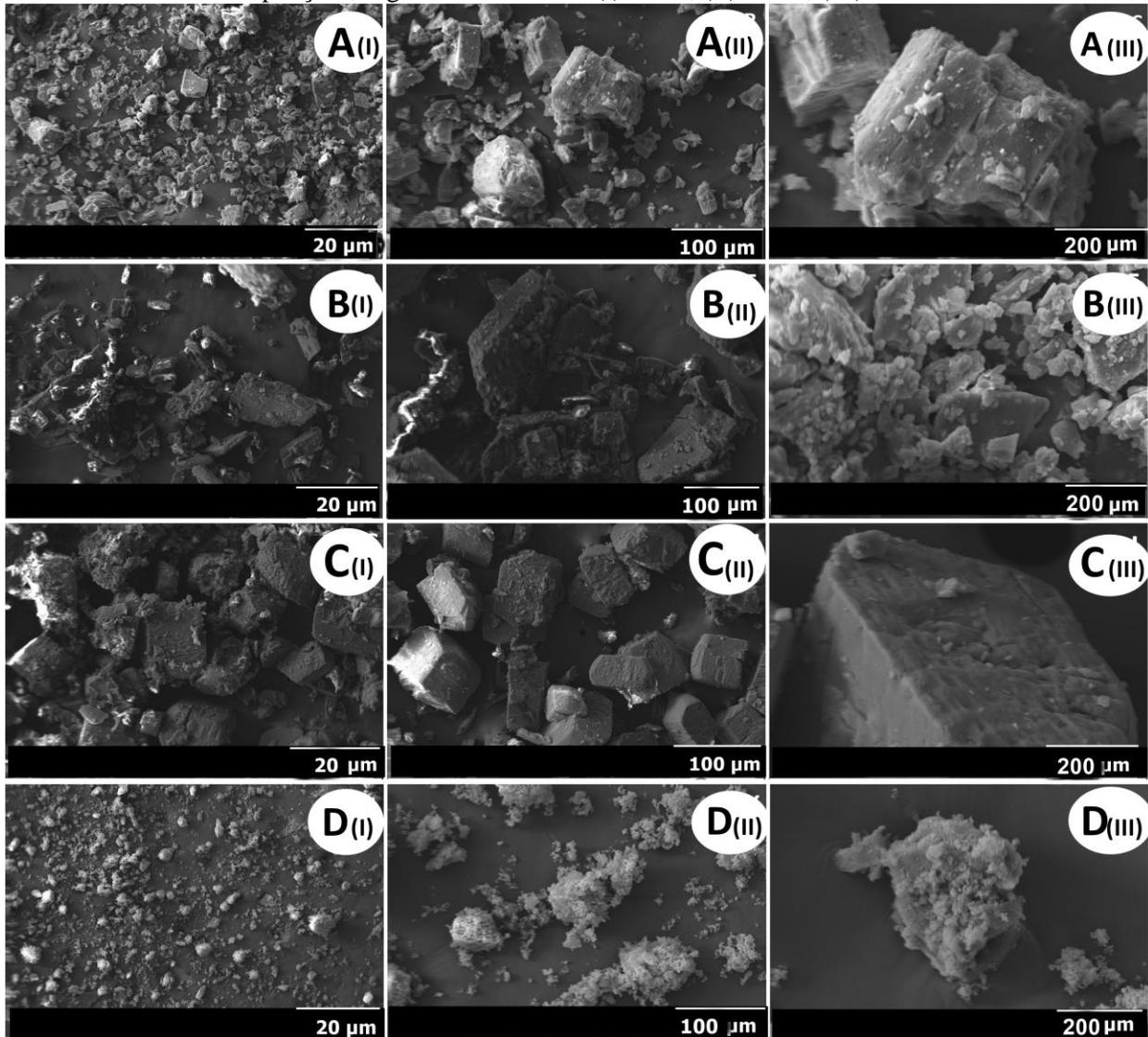
263

264

265

266

267 Figura 3 - Micrografias de varredura (A)  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD); (B) mistura física (MF); (C) co-  
 268 precipitação (CO-P); (D) malaxagem (MA). Todas as amostras foram apresentadas em três  
 269 diferentes ampliações, seguindo a ordem de (I) 252X, (II) 688X; (III) 1780X.



270  
271

272 As micrografias da MF (Figura 3b) se apresentam semelhantes as da  $\beta$ -CD pura, com a  
 273 formação de aglomerados com os cristais da  $\beta$ -CD de formato irregular, indicando a baixa  
 274 capacidade de complexação deste método. Na Figura 3c temos a morfologia do CI preparado por  
 275 CO-P, onde não foi observada a redução na cristalinidade. As partículas se apresentaram de  
 276 forma regular e bem definida, confirmando os resultados encontrados pela análise de raios-x,  
 277 onde foi observada a cristalinidade da amostra.

278 Ao se referir as micrografias da MA (Figura 3d), observa-se uma mudança drástica no  
 279 formato e aspecto das partículas. Ocorreu uma intensa redução da cristalinidade, com a formação  
 280 de agregados amorfos, característico da modificação química superficial de dimensões menores  
 281 àquelas encontradas nos cristais da  $\beta$ -CD. Essas mudanças na morfologia dos cristais são uma  
 282 forte evidência da formação do CI e juntamente com os resultados de raios-x pode-se confirmar a  
 283 complexação pelo método MA. Trabalhos anteriores com diferentes OEs também relataram essas  
 284 mudanças ocorridas após a complexação (WANG et al., 2011; MENEZES et al., 2014;  
 285 GUIMARÃES et al., 2015).

286

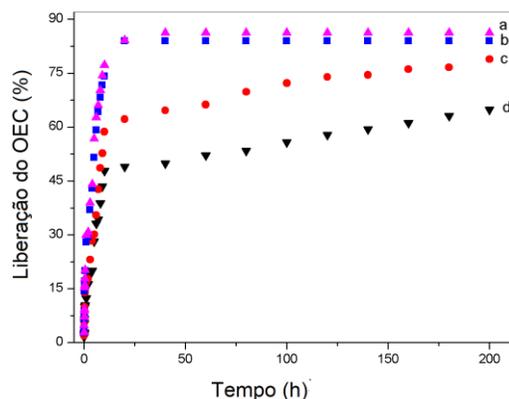
### 287 3.4 Liberação controlada

288

289 A curva de liberação do OEC no sistema de diálise (Figura 4) mostra o efeito da  
 290 complexação na taxa de liberação da molécula hóspede, sendo que neste sistema apenas a  
 291 molécula hóspede tem a capacidade de atravessar os poros da membrana (CARVALHO et al.,  
 292 2018). O perfil das curvas é caracterizado por uma fase inicial de liberação rápida seguida por  
 293 uma liberação retardada. As curvas do OEC e da MF indicam estabilização após 2 dias de diálise,  
 294 sendo que após esse período 86% e 83% do OEC já havia sido liberado, respectivamente. A taxa  
 295 de liberação do OEC presente nos CIs preparados por MA e CO-P foi de 65% e 78%  
 296 respectivamente, após 8 dias de diálise. Tais resultados sugerem que a formação do CI entre  
 297 OEC/ $\beta$ -CD foi eficiente em retardar a liberação do OEC, sendo mais eficaz no método de  
 298 preparação por MA.

299

300 Figura 4 - Porcentagem de liberação (a) óleo essencial de *C. viminalis* (OEC); (b) mistura física  
 301 (MF); (c) co-precipitação (CO-P) e (d) malaxagem (MA), em função do tempo.



302

303 A formação do CI pode efetivamente modificar o comportamento de liberação da  
 304 molécula hóspede. O impedimento estérico da superfície da  $\beta$ -CD fornece a proteção contra a  
 305 evaporação da molécula hóspede após sua inclusão na cavidade da  $\beta$ -CD (WANG et al., 2011).

306

### 307 **3.5 Bioensaios com o modelo *Lactuca sativa* L.**

308

309 A Tabela 2 mostra os resultados dos parâmetros de porcentagem de germinação (%GR),  
 310 índice de velocidade de germinação (IVG) e taxa de crescimento radicular (CR) de sementes de  
 311 *Lactuca sativa* L.

312

313 **Tabela 2-** Variação do índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (%GR) e  
 314 taxa de crescimento radicular (CR) de sementes de *L. sativa* em função de diferentes tratamentos.

Tratamentos	Variáveis Analisadas		
	%GR	IVG	CR
<b>CO-P</b>	75,33 b	5,96 b	0,21 a
<b>MA</b>	91,3 c	10,04 a	0,23 a
<b>MF</b>	2,66 a	0,14 c	0,10 b
<b>OEC</b>	0,00 a	0,00 c	0,00 b
<b>H<sub>2</sub>O</b>	92,00 c	9,41 a	0,22 a

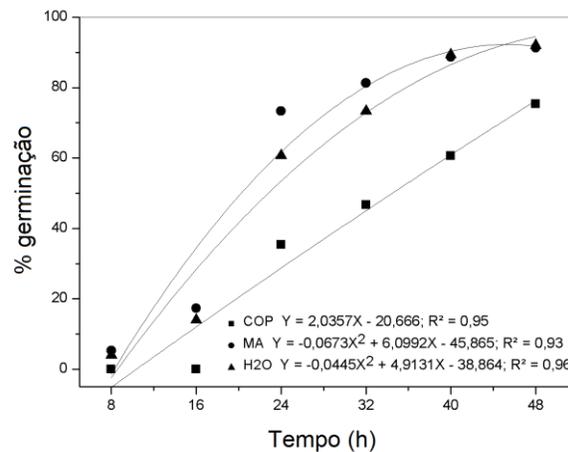
315 Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a  
 316 5% de probabilidade.

317

318 Os resultados da %GR e IVG dos CIs foram significativos quando comparados com OEC  
 319 e MF. Houve redução da toxicidade do OEC após a complexação, visto que nos CIs as sementes  
 320 de *L. sativa* germinaram, ao contrário do controle positivo (OEC) em que não foi observada  
 321 germinação. O CI preparado por MA apresentou uma %GR de 91,3% e IVG de 10,04, em que  
 322 este tratamento não diferiu estatisticamente do controle negativo (água destilada) (Figura 5). Esse  
 323 resultado confirma os dados obtidos no teste de liberação controlada, no qual foi possível  
 324 confirmar que o CI preparado por MA retardou a liberação do OEC, podendo ser considerado o  
 325 tratamento com menor toxicidade. O CI preparado por CO-P também obteve resultados  
 326 significativos quando comparado com o controle positivo, apresentando uma %GR de 75,33% e  
 327 um IVG de 5,96.

328

329 Figura 5 - Porcentagem de germinação das sementes de *L. sativa* nos tratamentos malaxagem (MA), co-  
 330 precipitação (CO-P) e água destilada, avaliados a cada 8 horas por um período de 48 h.  
 331 Obs: os tratamentos OEC e MF não são representados neste gráfico porque não apresentaram %GR.



332  
 333

334 O CR das sementes de alface foi diretamente afetado pelo OEC e pela MF, ao contrário  
 335 dos CIs que apresentaram CR estatisticamente igual a água. O parâmetro CR é mais eficaz em  
 336 indicar a toxicidade do composto testado, uma vez que é diretamente afetado pela germinação  
 337 tardia, o que se reflete em um valor mais baixo de IVG (VENCESLAU et al., 2017).

338 Oliveira et al. (2014), estudou a toxicidade das flores do OEC, sobre as sementes de *L.*  
 339 *sativa*, observaram que este OE apresenta aumento da toxicidade com o aumento da  
 340 concentração. Esses mesmos autores relataram que a toxicidade do OEC deve-se à presença dos  
 341 componentes majoritários, 1,8-cineol (66,93%),  $\alpha$ -pineno (16,0%) e  $\alpha$ -terpineol (10,04%) ou ao  
 342 sinergismo químico entre todos os compostos presentes. Neste estudo os componentes  
 343 majoritários identificados através da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa  
 344 (CG-MS), foram o 1,8-cineol (67,7%),  $\alpha$ -pineno (15,01%) e  $\alpha$ -terpineol (7,72%), resultados esses  
 345 semelhantes ao encontrado por Oliveira et al. (2014), corroborando com os resultados obtidos  
 346 para o OEC neste trabalho.

347 Bali et al. (2017) estudaram a fitotoxicidade do extrato das folhas de *C. viminalis* na  
 348 germinação e crescimento inicial de arroz (*Oryza sativa* L.). O estudo concluiu que o extrato de  
 349 *C. viminalis* retardou a germinação e crescimento de ervas daninhas associadas ao arroz sob  
 350 condições de laboratório e de estufa. Venceslau et al. (2017) avaliaram as mudanças da  
 351 toxicidade da atrazina quando esta foi complexada com CDs ancoradas com sílica. Utilizou como  
 352 modelo vegetal as sementes *L. sativa* e observou que a atrazina livre induz efeitos genotóxicos

353 nas raízes. O CI entre a atrazina e  $\gamma$ -CD/sílica reduziu consideravelmente os efeitos genotóxicos  
 354 da atrazina, tornando uma opção viável para reduzir toxicidade deste herbicida em plantas não  
 355 alvo.

356

357

### 3.6 Atividade fosfolipásica

358

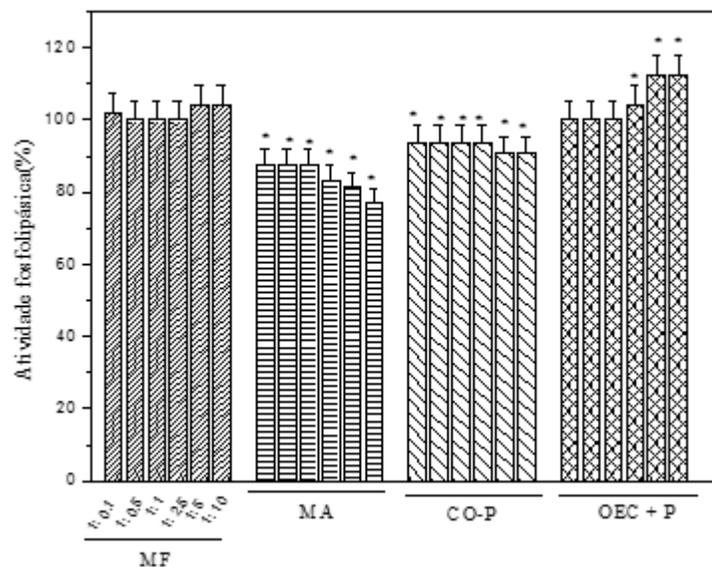
359 A atividade fosfolipásica (%) induzida pela peçonha de serpente da espécie *Bothrops*  
 360 *atrox* previamente incubada com OEC está apresentada na Figura 6.

361

362 O OEC previamente incubado com peçonha (OEC+P) potencializou significativamente a  
 363 ação das fosfolipases  $A_2$  presentes na peçonha entre 4% e 13%, nas maiores proporções (1:2,5;  
 364 1:5 e 1:10 peçonha/OEC m:m) quando comparado ao controle positivo (peçonha). A atividade  
 365 fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. atrox* não foi inibida pelo OEC preparado por MF em  
 366 nenhuma proporção analisada. Rezende et al. (2017), relataram que os fosfolipídios que  
 367 constituem as membranas podem ser degradados por compostos naturais, e eles podem interagir  
 368 com diferentes compostos, resultando na desestabilização das membranas e alteração no fluxo de  
 369 líquidos e íons através das membranas.

369

370 Figura 6 - Avaliação da atividade enzimática de fosfolipase  $A_2$  presentes na peçonha de *Bothrops atrox*,  
 371 para mistura física (MF), malaxagem (MA), co-precipitação (CO-P) e óleo essencial *C.*  
 372 *viminalis* + peçonha (OEC+P). \*difere estatisticamente do respectivo controle positivo pelo  
 373 teste Tukey ( $p < 0,05$ ).



374

375

376 O CI preparado por MA nas menores proporções (1:0,1; 1:0,5; 1:1 e 1:2,5 peçonha/MA  
377 m:m) apresentou inibição significativa de 12,5% e na maior proporção (1:10 m:m) exerceu  
378 inibição de 23% da atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. atrox*. O CI preparado por  
379 CO-P apresentou inibição significativa de 6,2% nas proporções (1:0,1; 1:0,5; 1:1 e 1:2,5 m:m) e  
380 de 9,4% nas proporções de (1:5 e 1:10 m:m).

381 A ação de fosfolipases A<sub>2</sub> presentes nas peçonhas resultam em quebra de componentes  
382 das membranas celulares causando a lise de hemácias. Em adição, a quebra de fosfolipídeos de  
383 membranas resulta na geração do ácido araquidônico que é precursor de eicosanoides, atuantes  
384 principalmente na resposta inflamatória e no processo de coagulação sanguínea. Assim a inibição  
385 de fosfolipases A<sub>2</sub> por compostos naturais destaca o potencial de uso destes como anti-  
386 inflamatórios e anticoagulantes, sendo de grande importância no contexto médico-científico.  
387 (NIRMAL; PRABA; VELMURUGAN, 2008).

388 Nos CIs foram observados inibição da atividade fosfolipásica. Isso por ter ocorrido  
389 porque a  $\beta$ -CD aprisionou o OEC em sua cavidade, deixando-o parcialmente indisponível para  
390 interagir com a peçonha, reduzindo a toxicidade dos CIs estudados.

391

#### 392 4. CONCLUSÃO

393

394 A formação do CI entre o OEC/ $\beta$ -CD foi confirmada através das técnicas de TG, DRX e  
395 MEV. Foi possível observar que o OEC apresenta toxicidade frente a sementes de alface,  
396 afetando sua %GR, IVG, CR e potencializa a atividade fosfolipásica quando induzidas por  
397 peçonhas. Com a complexação, em todos os testes realizados, foi possível observar que a  
398 toxicidade do OEC foi reduzida. Porém mais estudos relacionados com relação a toxicidade  
399 devem ser realizados. O comportamento de liberação do OEC foi efetivamente modificado,  
400 sendo retardado de forma mais expressiva no CI preparado por MA.

401 A formação do CI pode ser considerada uma alternativa para contornar os problemas de  
402 volatilidade e solubilidade que os OEs apresentam, além de reduzir sua toxicidade e serem  
403 utilizados em menores concentrações. Desta forma, pode-se obter um modo mais seguro para sua  
404 utilização na área farmacêutica, alimentícia ou até mesmo na agricultura.

405

406

407 **5. AGRADECIMENTOS**

408

409 Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
 410 (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho  
 411 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Centro de Análises e  
 412 Prospecção Química (CAPQ), ao Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos e a Universidade  
 413 Federal de Lavras pelo apoio financeiro e para a execução desta pesquisa.

414

415 **6. REFERÊNCIAS**

416

417 ABARCA, R. et al. Characterization of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil  
 418 component, **Food Chemistry**, v.196, p.968–975, 2016.

419

420 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). Farmacopéia Brasileira. [Brazilian  
 421 Pharmacopeae.] 5th Edition, p.198-199, 2010

422

423 ANDRADE, T. A. et al. Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion  
 424 complexes of *Hyptis martiusii* Benth essential oil in  $\beta$ -cyclodextrin, **Biomedicine & Pharmacotherapy**,  
 425 v.89, p.201–207, 2017.

426

427 ARAGÃO F. B. et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on *Lactuca sativa* L.  
 428 **Allelopathy Journal**, v.35, n.2, p.259–272, 2015.

429

430 BADU, G. D. K.; SINGH, B. Simulation of Eucalyptus cinerea oil distillation: A study on optimization of  
 431 1,8-cineole production, **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n.2-3, p.226–231, 2009.

432

433 BALI, A. S. et al. Phytotoxicity and weed management potential of leaf extracts of *Callistemon viminalis*  
 434 against the weeds of rice, **Acta Physiologiae Plantarum**, v.39, n.1, p.25, 2017.

435

436 BENIGNI, R. Structure activity relationship studies of chemical mutagens and carcinogens mechanistic  
 437 investigations and prediction approaches. **Chemical Reviews**, Washington, v.105, n.5, p.1767-1800,  
 438 2005.

439

440 BHANDARI, B. R.; D'ARCY, B. R.; BICH, L. L. T.; Lemon oil to  $\alpha$ -cyclodextrin ratio effect on the  
 441 inclusion efficiency of  $\alpha$ -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex, **Journal of**  
 442 **Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.4, p.1494, 1998.

443

444 BORS, M. et al. Evaluation of the effect of *Uncaria tomentosa* extracts on the size and shape of human  
 445 erythrocytes (*in vitro*). **Environmental toxicology and pharmacology**, Amsterdam, v.33, n.2, p.127-134,  
 446 2012.

447

448 CALDAS, G. F. R. et al. Repeated-doses and reproductive toxicity studies of the monoterpene 1,8-cineole  
 449 (eucalyptol) in Wistar rats, **Food and Chemical Toxicology**, v.97, p.297-306, 2016.

450

- 451 CARVALHO, L. B. et al. Complexes between methyltestosterone and  $\beta$ -cyclodextrin for application in  
452 aquaculture production, **Carbohydrate Polymers**, v.179, n.1, p.386-393, 2018.  
453
- 454 DENEGRI, M. E. G. et al. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA(2) Ba SpII RP4  
455 of the Bothrops alternatus snake venom from, **Toxicon**, v.56, n.1, p.64-74, 2010.  
456
- 457 GUIMARÃES, A. G. et al. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of  
458 oregano, with  $\beta$ -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental  
459 protocols, **Chemico-Biological Interactions**, v.227, p.69-76, 2015.  
460
- 461 GUTIÉRREZ, J. M. et al. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent  
462 antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v.26, n.4, p.411-413, 1988.  
463
- 464 KAYACI, F. et al. Functional electrospun polymeric nanofibers incorporating geraniol-cyclodextrin  
465 inclusion complexes: High thermal stability and enhanced durability of geraniol. **Food Research**  
466 **International**, v.62, p.424-431, 2014.  
467
- 468 KFOURY, M. et al. Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in  
469 cyclodextrins, **Food Chemistry**, v.196, p.518-525, 2016.  
470
- 471 MENEZES, P. P. et al. Inclusion complex of (2)-linalool and  $\beta$ -cyclodextrin, **Journal of Thermal**  
472 **Analysis and Calorimetry**, v.115 n.3, p.2429-2437, 2014.  
473
- 474 MENEZES, P. P. et al. Kinetic and physical-chemical study of the inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin  
475 containing carvacrol, **Journal of Molecular Structure**, v.1125, p. 323-330, 2016.  
476
- 477 MUNHUWEYI, K. et al. Physical and antifungal properties of  $\beta$ -cyclodextrin microcapsules and  
478 nanofibre films containing cinnamon and oregano essential oils, **Food Science and Technology**, v.87,  
479 p.413-422, 2018.  
480
- 481 MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A  
482 review, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.113, p. 226-238, 2015.  
483
- 484 NIRMAL N.; PRABA G.O.; VELMURUGAN, D. Modeling studies on phospholipase A2-inhibitor  
485 complexes, **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**; v.45, n.4, p.256-62. 2008.  
486
- 487 OLIVEIRA, C. M. et al. Chemical composition and allelopathic activity of the essential oil from  
488 *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) blossoms on lettuce (*Lactuca sativa L.*) seedlings, **American Journal**  
489 **of Plant Sciences**, v.5, n.24, p.3551-3557, 2014.  
490
- 491 OYEDEJI, O. O. A. et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of  
492 *Callistemon citrinus* and *Callistemon viminalis* from south Africa, **Molecules**, v.14, n.6, p. 1990-1998,  
493 2009.  
494
- 495 PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection on phospholipase activity  
496 in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v.20, p.7-14, 1982.  
497
- 498 RANGEL, M. et al. Hemolytic Activity in Extracts of the Diatom Nitzschia. **Toxicon**, v.35, n.2, p.305-  
499 309, 1997.  
500

- 501 REZENDE, D. A. C. S. et al. Essential Oils from *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus*  
502 *officinalis*, *Peumus boldus* and *Foeniculum vulgare*: Inhibition of Phospholipase A2 and Cytotoxicity to  
503 Human Erythrocytes, **American Journal of Plant Sciences**, v.8, p.2196-2207, 2017.  
504
- 505 SALES, T. A. et al. Essential oils from the leaves and flowers of *callistemon viminalis*: chemical  
506 characterization and evaluation of the insecticide and antifungal activities, **American Journal of Plant**  
507 **Sciences**, v.8, n.10, p.2516-2529, 2017.  
508
- 509 SHRESTHA, M.; HO, T. M.; BHANDARI, B. R. Encapsulation of tea tree oil by amorphous  $\beta$ -  
510 cyclodextrin powder, **Food Chemistry**, v.221, p.1474–1483, 2017.  
511
- 512 SONGKRO, S. et al. Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with  
513  $\beta$ -cyclodextrin for mosquito repellent, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**,  
514 v.72, n.3-4, p.339–355, 2012.  
515
- 516 TORRES, L. H. et al. Characterization and cytotoxicity of a benzocaine inclusion complex, **Journal of**  
517 **Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.91, n.1-2, p.9-15, 2018.  
518
- 519 VENCESLAU, A. F. A. et al. Cyclodextrins as effective tools to reduce the toxicity of atrazine, **Energy,**  
520 **Ecology and Environment**, v.3, p.81-86, 2017.  
521
- 522 WANG, J. et al. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- $\beta$ -cyclodextrin inclusion  
523 complexes, **Food Chemistry**, v.127, n.4, p.1680–1685, 2011.  
524
- 525 ZHANG, W. et al. Preparation, physicochemical characterization and release behavior of the inclusion  
526 complex of trans-anethole and  $\beta$ -cyclodextrin, **Food Research International** n.74, p.55–62, 2015.

### **QUARTA PARTE – ARTIGO 3**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INVESTIGAÇÃO TEÓRICA DA  
FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DOS COMPONENTES  
MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CALLISTEMON VIMINALIS***

**Resumo:** O óleo essencial de *Callistemon viminalis* (OEC) é rico em componentes químicos com diversas propriedades biológicas, porém são muito sensíveis e facilmente degradados. Uma alternativa para contornar esses problemas é formação de complexos de inclusão (CI) com ciclodextrinas (CDs). Estudos teóricos são realizados para entender o mecanismo de associação, o posicionamento 3D e as interações que ocorrem entre a molécula hóspede e a molécula hospedeira (CDs). O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo teórico com os três componentes majoritários presente no OEC (1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno e  $\alpha$ -terpineol), complexados com a  $\beta$ -CD, a fim de observar teoricamente a formação do CI, estimar as energias de complexação e suas estruturas. Busca-se ainda avaliar a atividade antifúngica do OEC. O componente majoritário terpineol na posição 'up' a-aa (axial-anti, anti), obteve-se o CI mais estável ( $\Delta E = -69,42 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), representando 65,5% da população. O pineno nas posições 'up' e 'down' obteve estabilidade energética semelhante, porém a posição 'down' equivale a 82,4% da população. Com o cineol é formado o CI menos estável quando comparado com o terpineol e pineno, pois apresenta a maior restrição de movimento no interior da  $\beta$ -CD, com um  $\Delta E$  de  $-42,25 \text{ kJ mol}^{-1}$ , representando 70,2% da população na posição 'up'. A concentração mínima inibitória (CMI) para os CIs foi reduzido quando comparado com o OEC puro. O fungo *A. flavus* de  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  reduziu para  $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o CI preparado por MA e para o fungo *A. ochraceus* de  $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  reduziu para  $15,62 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o CI preparado para a MA e CO-P. Todos os CIs avaliados são energeticamente favoráveis e fornecem um bom potencial para o uso como fungicidas.

**Palavras-chave:** Monoterpeno; Dinâmica molecular; Ciclodextrina.

## 1. INTRODUÇÃO

Muitos compostos naturais presentes em plantas, ervas e especiarias têm mostrado atividade biológica e servem como uma fonte de agentes antimicrobianos e antifúngicos contra vários patógenos (MUNHUWEYI et al., 2018). Entre esses compostos, os óleos essenciais (OEs) recebem destaque, sendo definidos como metabólitos secundários constituídos de dezenas de compostos químicos pertencentes às classes dos fenilpropanoides e dos terpenoides, apresentando dois ou três constituintes majoritários (MIRANDA et al., 2015).

*Callistemon viminalis*, popularmente conhecida como escova de garrafa, é uma planta ornamental pertencente à família Myrtaceae (SALES et al., 2017). É uma árvore de tamanho médio com folhagem persistente e encontrada em todo o mundo, sendo distribuída principalmente em regiões tropicais. Diversos autores relatam que o óleo essencial de *C. viminalis* (OEC), é rico em diversos componentes químicos, sendo que os mais encontrados e considerados como componentes majoritários são o 1,8 cineol (50-80%),  $\alpha$ -pineno (10-20%),  $\alpha$ -terpineol (2-15%) e limoneno (2-10%) (OLIVEIRA et al., 2014; BADAWY, ABDELGALEIL, 2014; FALL et al., 2017; SALES et al., 2017). Esses componentes possuem propriedades inseticidas, fungicidas, antimicrobianas, antifúngicas e alelopáticas (CALDAS et al., 2016).

A principal desvantagem da utilização de produtos à base de OEs é a sua rápida degradação frente à luz solar, agentes oxidantes e umidade. Para superar esses problemas, técnicas de preservação dos OEs tornaram-se um dos tópicos de pesquisa mais atraentes dentro da indústria (LAWTRAKUL; INTHAJAK; TOOCHINDA, 2014). A complexação com ciclodextrinas (CDs) é uma técnica eficaz, porque consegue aprisionar em sua cavidade substâncias hidrofóbicas formando complexos de inclusão (CI). Isso leva a isolar as moléculas de sua deterioração ambiente, aumentando sua solubilidade aquosa, reduzindo sua volatilidade e mantendo suas propriedades biológicas (KOURFY et al., 2015).

A  $\beta$ -CD é um oligossacarídeo cíclico amplamente utilizado como agente complexante porque é capaz de formar CI com uma grande variedade de moléculas. É o composto mais adequado para encapsulamento de OEs, devido ao tamanho da sua cavidade (0,6-0,8 nm) comportar moléculas cuja massa molecular está compreendida entre (80–250 g mol<sup>-1</sup>) além da facilidade de produção e baixo custo. Apresenta-se com um formato de cone truncado com uma cavidade hidrofóbica e uma superfície hidrofílica (SHRESTHA; HO; BHANDARI, 2017).

32 As propriedades da molécula hóspede como solubilidade e estabilidade aquosa podem ser  
33 alteradas após a complexação, mas depende muito da afinidade de ligação com a molécula  
34 hospedeira (CD) (KOURFY et al., 2015). As CDs tem atraído muito interesse no meio científico  
35 devido a sua vasta aplicabilidade industrial. Neste sentido, nas últimas décadas a modelagem  
36 molecular (MM) tem se tornado de grande valia como suporte a trabalhos experimentais. Estudos  
37 de interação computacional entre compostos são de fundamental importância para entender o  
38 mecanismo de associação, o posicionamento tridimensional e a energia de interação (HAPIOT;  
39 TILLOY; MONFLIER, 2006).

40 Estudos teóricos incluindo a MM em fase gasosa e em meio aquoso, vem sendo  
41 apresentados para a investigar como a molécula hóspede se encaixa na cavidade das CDs, e tem  
42 mostrado as diferentes orientações que a molécula pode obter no processo de inclusão  
43 (BANERJEE et al., 2006). O modo como a molécula hóspede se encaixa na cavidade da CD pode  
44 ser atribuído a forças dirigentes incluindo as forças de van der Waals, efeitos hidrofóbicos e  
45 eletrônicos, fatores estéricos e interações dipolo-dipolo que governam o processo de  
46 complexação. Essas forças têm sido estudadas teoricamente e tais resultados mostram que este  
47 processo é geralmente acompanhado por mudanças conformacionais nos anéis glicosídicos das  
48 CDs (HAPIOT; TILLOY; MONFLIER, 2006).

49 Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo teórico de MM com os três  
50 componentes majoritários do OEC (1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno e  $\alpha$ -terpineol), complexados com a  $\beta$ -  
51 CD, como o intuito de observar a ocorrência da formação do CI, estimar as energias de  
52 complexação e ilustrar a estrutura do CI mais favorável, bem como avaliar a atividade antifúngica  
53 do OEC.

54

## 55 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

56

### 57 **2.1 Minimização de energia**

58

59 Foram feitas a otimização das estruturas dos 3 componentes majoritários do OEC 1,8-  
60 cineol,  $\alpha$ -pineno e  $\alpha$ -terpineol, em suas distintas possibilidades conformacionais. O cineol e o  
61 pineno são moléculas rígidas, portanto não apresentam possibilidades de variação  
62 conformacional. No entanto, o terpineol pode apresentar-se nas formas axial (a) e equatorial (e), e

63 cada forma pode ter mais 9 variações de acordo com as possibilidades de giros gauche+, gauche-  
64 e anti. As nomenclaturas utilizadas na ordem (1-2,3) foram em 1: a (axial) ou e (equatorial); e em  
65 2 e 3: a (anti), p (gauche +), m (gauche -) para os ângulos diedros formados por H-C-C(Me<sub>2</sub>)-O e  
66 CH-C(Me<sub>2</sub>)-O-H.

67

68 Exemplo: (a-aa= axial-anti, anti e e-aa= equatorial-anti, anti).

69

70 Os cálculos foram realizados com o programa Macromodel (Macromodel, 2014) existente  
71 dentro do pacote Maestro. Os cálculos de Mecânica e Dinâmica Molecular foram realizados  
72 utilizando o campo de forças AMBER\* (AMBER\*, 2012). Os cálculos de mecânica molecular  
73 foram realizados em água (exceto para as estruturas isoladas em que os cálculos foram realizados  
74 no vácuo), utilizando os parâmetros de constante dielétrica e de cargas atômicas fornecidas pelo  
75 próprio campo de forças. As minimizações energéticas foram feitas mediante o método de  
76 otimização de Polak-Ribiere Conjugated Gradient (PRCG), com critério de convergência de 0,05  
77 kJ mol<sup>-1</sup>.

78

## 79 **2.2 Simulação do processo de inclusão molecular**

80

81 A simulação do processo de inclusão molecular foi realizada com todas as estruturas  
82 isoladas. A partir desse ponto todos os cálculos foram determinados em água como meio de  
83 solvatação. Com a simulação do processo de inclusão pode-se encontrar os mínimos de energia  
84 locais para cada um dos confôrmeros possíveis. Para as minimizações, foram feitas a orientação  
85 das moléculas nas posições ‘up e down’, como apresentado no esquema abaixo (Figura 1). A CD  
86 foi mantida fixa por 3 átomos (oxigênios glicosídicos) no plano xy que estão representados de cor  
87 verde, e as moléculas hóspedes fixas por um único átomo no eixo z, podiam ter suas posições  
88 alternadas de -16 até 16 ângstroms passando pela cavidade da β-CD.

89

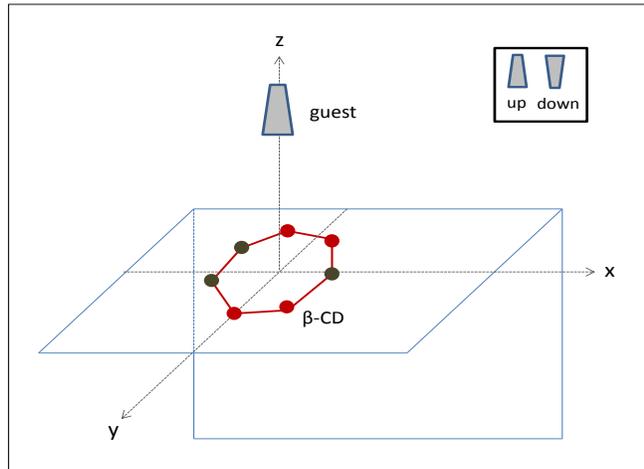
90

91

92

93

94 Figura 1 - Esquema representativo da orientação de uma molécula de CD no plano xy e a molécula  
 95 hóspede no eixo z.



96  
 97 Fonte: Própria autora.  
 98

99 Após a avaliação das possibilidades de complexação, de todas as estruturas em seus  
 100 distintos modos conformacionais e 2 posições, foram feitos os estudos para a realização dos  
 101 cálculos de dinâmica molecular para os CIs de mais baixa energia.

102

### 103 2.3 Dinâmica Molecular

104

105 Todas as simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas utilizando as  
 106 estruturas inicialmente obtidas pelos cálculos de mecânica molecular. As simulações foram feitas  
 107 utilizando o algoritmo Verlet (dinâmica molecular padrão) (Verlet, 1967), a uma temperatura de  
 108 298 K, com “passo de tempo” de 1,5 fs, tempo de equilíbrio de 4000 ps e tempos de simulação de  
 109 15000 ps.

110

111 Para comparação das energias antes e após a complexação os cálculos foram feitos para os  
 112 sistemas de posição de menor energia obtida por mecânica molecular e também pelo sistema  
 113 contendo um hóspede a uma distância de 16 ângstrons do centro da cavidade, onde  
 aparentemente os efeitos energéticos entre as duas estruturas são desprezíveis.

114

115

116

117

## 2.4 Atividade antifúngica do óleo essencial *C. viminalis* e dos complexos de inclusão

### 2.4.1 Obtenção e caracterização do óleo essencial de *C. viminalis*

As folhas da planta *C. viminalis* (Myrtaceae) foram coletadas no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA) localizado em Lavras, MG, Brasil. A espécie foi identificada no Departamento de Biologia da UFLA, com exsicata de número 26.624. O óleo essencial de *C. viminalis* (OEC) foi extraído pela técnica de hidrodestilação usando um aparelho Clevenger modificado, adaptado a um balão de fundo redondo de 6 litros (ANVISA, 2010). A caracterização do OEC foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (GC/MS-Shimadzu, modelo GCMS-QP 2010), seguindo a metodologia descrita por Sales et al., (2017).

### 2.4.2 Preparo dos complexos de inclusão

Os complexos de inclusão (CIs) foram preparados a partir de duas metodologias: malaxagem e co-precipitação. A mistura física (MF) entre o OEC e a  $\beta$ -CD foi utilizada como controle. A preparação foi realizada com 500 mg da  $\beta$ -CD e 500  $\mu$ L do OEC (1:1), sendo misturados por 10 minutos em um gral. A mistura formada foi armazenada em microtubo até sua utilização.

O CI foi preparado por malaxagem (MA) segundo a metodologia descrita por Menezes et al. (2012) com modificações. 100  $\mu$ L do OEC foi inicialmente misturado em um gral com 1000 mg de  $\beta$ -CD. Em seguida, 5mL de uma solução água:etanol (3:1) foram adicionados e a mistura foi homogeneizada manualmente com um pistilo por 20 minutos até formar uma pasta homogênea. A pasta obtida foi deixada secando em dessecador a 25 °C por 24h. Posteriormente o pó obtido foi armazenado em microtubo até sua utilização.

O CI foi preparado pelo método de co-precipitação (CO-P) de acordo com Bhandari, D'arcy e Bich (1998), com modificações. 15 g de  $\beta$ -CD foram dissolvidos em 150 mL de solução água:etanol (2:1). Essa mistura foi mantida sob aquecimento a 55 °C. 600  $\mu$ L do OEC foram dissolvidos em 60 mL de solução etanol:água (1:1). Aos poucos a solução de OEC foi adicionada a solução de  $\beta$ -CD. A proporção utilizada entre a solução contendo OEC e a solução contendo  $\beta$ -

149 CD foi de (0,5:50). A mistura foi agitada por 4 horas em temperatura ambiente (25 °C) a 150  
150 rpm. A solução final foi refrigerada a 4 °C por 24 horas. Após esse período, o CI formado foi  
151 recuperado por filtração a vácuo e seco na estufa a 50 °C por um período de 24 horas. O pó  
152 resultante foi colocado em placas de Petri e deixado em repouso à temperatura ambiente (25 °C)  
153 por mais 24 horas. Após esse período o CI formado foi armazenado em um dessecador até a sua  
154 utilização.

155

### 156 **2.4.3 Atividade antifúngica**

157

158 A atividade antifúngica do OEC, da MF e CIs foi realizada no Laboratório de  
159 Micotoxinas e Micologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da  
160 Universidade Federal de Lavras. Foram utilizadas três espécies de fungos filamentosos:  
161 *Aspergillus carbonarius* (CCDCA 10507) *Aspergillus flavus* (CCDCA 10508) e *Aspergillus*  
162 *ochraceus* (CCDCA 10506) da coleção de cultura de microrganismos do Departamento de  
163 Ciência dos Alimentos da UFLA.

164 A análise do efeito inibitório sobre fungos filamentosos foi realizada utilizando o teste de  
165 difusão em disco aceito pelo Food and Drug Administration (FDA) e estabelecido pelo National  
166 Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Foi utilizado um inóculo na concentração  
167 de  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , com contagem em Câmara de Newbauer. O inóculo foi transferido para a  
168 placa contendo meio de Agar Extract Malt (MEA), pela técnica de espalhamento em superfície.  
169 Discos de papel filtro estéreis de 5 mm de diâmetro foram embebidos com 10  $\mu\text{L}$  do OEC, MF e  
170 e dos CIs foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5;  
171 31,25, 15,62 e 7,81  $\mu\text{L mL}^{-1}$  foram colocados sobre o meio de cultura, como sugerido por  
172 Andrade et al. (2015). Como controle negativo foi utilizado DMSO e como controle positivo o  
173 fungicida sintético fluodioxonil (2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). As placas foram incubadas em BOD, a 25 °C, por  
174 um período de 72 horas, o teste foi realizado em triplicata. O halo de inibição foi medido a partir  
175 da circunferência do disco de papel até a borda com crescimento de microorganismos (Barry,  
176 Thornsberry, 1991).

177 As medidas ortogonais foram obtidas, cada um correspondendo à média de duas medidas  
178 diametralmente opostas. A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor

179 concentração necessária para a inibição do crescimento do fungo. A porcentagem de inibição  
180 (%I) foi calculada utilizando a equação:

181

$$182 \quad (\%I) = (dc - dt) / dc \times 100,$$

183

184 onde dc é o diâmetro do crescimento micelial do controle (fluodioxonil) e dt é o diâmetro do  
185 crescimento micelial do tratamento.

186

### 187 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

188

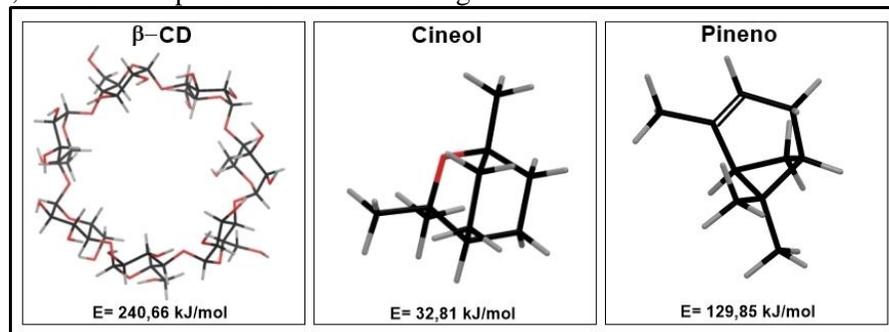
#### 189 3.1 Minimização de energia

190

191 As (Figuras 2 e 3) mostram as estruturas isoladas otimizadas associadas aos valores de  
192 energia associado a cada molécula. Como apresentado na Figura 2, as moléculas cineol e pineno,  
193 apresentam um alto valor de energia. Essas moléculas são rígidas e não possuem variação  
194 conformacional.

195

196 Figura 2 - Estruturas conformacionais das moléculas rígidas isoladas.  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), cineol e  
197 pineno, com seus respectivos valores de energia.



198

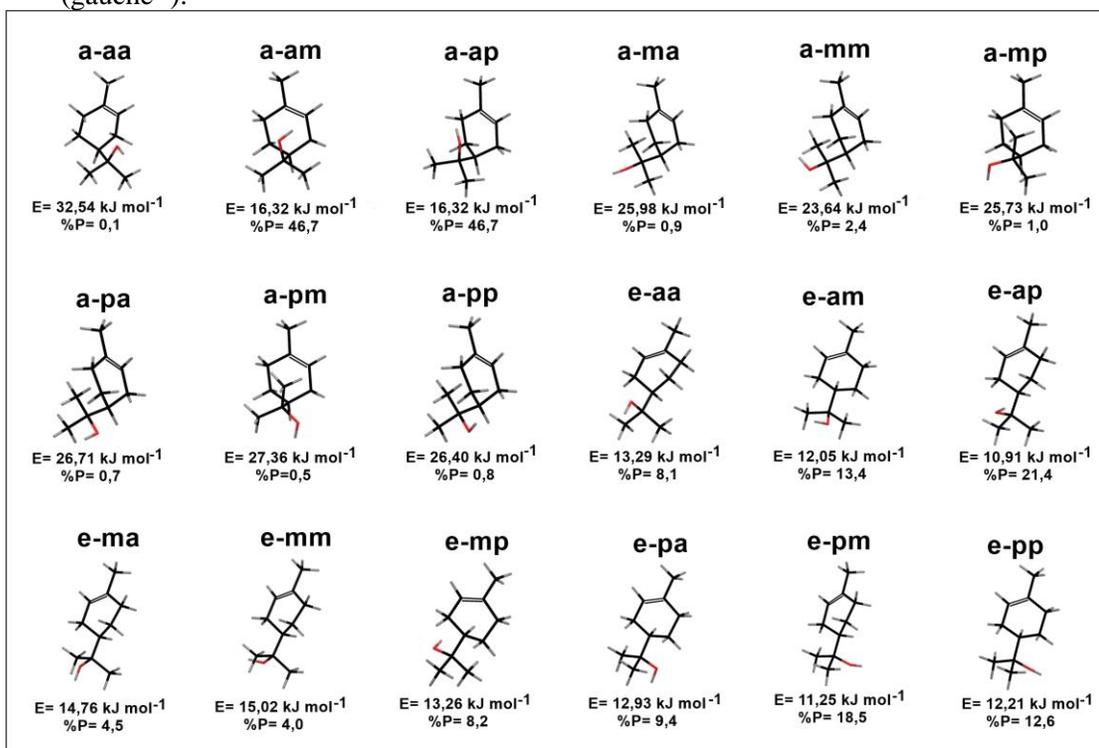
199

200 A Figura 3, para a conformação axial parece existir um par de confôrmeros, a-am (axial-  
201 anti, gauche-) e a-ap (axial-anti, gauche+), que apresentam menor energia relativa que os demais  
202 e parecem formar a grande parte da população dos confôrmeros axiais, com a mesma  
203 porcentagem populacional (%P) de 46,7%. Já o confôrmero equatorial não tem uma conformação

204 preferida, a população está bastante distribuída entre os distintos confôrmeros que apresentam  
 205 energias relativas semelhantes.

206

207 Figura 3 - Estrutura do terpineol nas suas diferentes conformações na posição axial e equatorial, e seus  
 208 respectivos valores de energia e porcentagem populacional (%P). As nomenclaturas utilizadas  
 209 na ordem (1-2 3) foram em 1: a (axial) ou e (equatorial); e em 2 e 3: a (anti), p (gauche +), m  
 210 (gauche -).



211

212

213

### 3.2 Simulação do processo de inclusão molecular

214

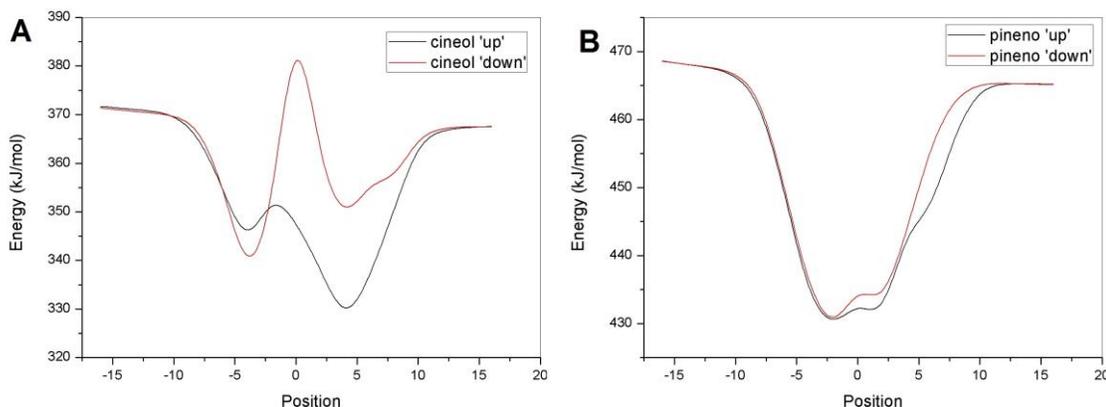
215 As minimizações de energia foram feitas para cada conformação possível. As curvas de  
 216 energia diferenciam quais estruturas e em qual posição apresentam as energias mais baixas,  
 217 indicando maior estabilidade.

218

219 O perfil de energia livre caracterizado pela inclusão do cineol orientado nas posições ‘up’  
 220 e ‘down’ são apresentados na Figura 4a. A posição ‘up’ mantém inicialmente o cineol mais  
 221 próximo à cavidade estreita da CD. É o que apresenta o menor mínimo de energia (E) 326,79 KJ  
 222 mol<sup>-1</sup> a uma distância em relação ao centro da β-CD (d(A)\*) de 4 Å. E percebe-se uma  
 223 porcentagem populacional (%P) de 96,9% frente a apenas 3,1% em relação à posição ‘down’  
 (Tabela 1).

224  
225

Figura 4 - Perfil de energia livre obtida para inclusão das moléculas a) cineol e b) pineno na cavidade da CD.

226  
227

228

**Tabela 1.** Mínimos de energia e porcentagem de população para o cineol e para o pineno.

	Cineol		Pineno	
	'up'	'down'	'up'	'down'
<b>d (Å)*</b>	4	-4	-2	-2
<b>E = kJ mol<sup>-1</sup></b>	326,79	335,33	429,24	428,75
<b>ΔE=kJ mol<sup>-1</sup></b>	0	8,54	0,49	0
<b>%P</b>	96,9	3,1	45,1	54,9

229  
230

d(A)\* posição em relação ao centro da CD.

231

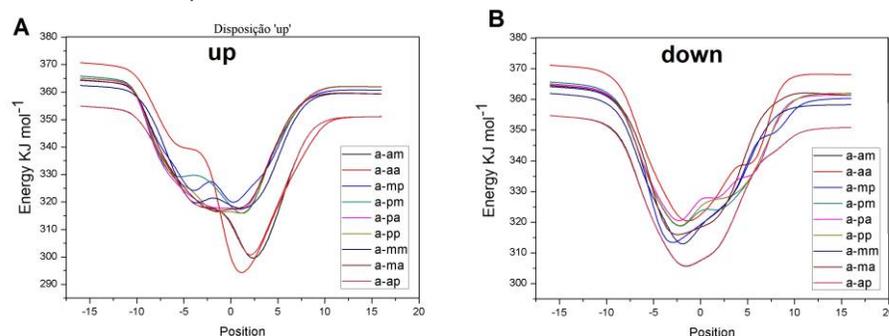
Para o pineno, o perfil de energia livre em ambas as posições de simulação ('up' ou 'down') é idêntica (Figura 4b). Com E= 429,24 KJ mol<sup>-1</sup> para a posição 'up' E= 428,75 KJ mol<sup>-1</sup> para a posição 'down', apresentando d(A)\* de -2. Å. %P para as ambas as posições é muito semelhante (Tabela 1), sendo um indício de que deve haver ao menos duas posições distintas para o pineno no interior da cavidade da β-CD que são energeticamente estáveis.

236

O perfil de energia livre do terpineol na conformação axial nas posições 'up' e 'down' é apresentado na Figura 5. O terpineol axial 'up' (Figura 5a) revela uma maior %P para a conformação a-aa (57,5%), com E=292,43 KJ mol<sup>-1</sup>, localizada inicialmente no centro da β-CD e as conformações a-am e a-ap aparecem em seguida com %P muito parecidas 19,8% e 20,6%, respectivamente (Tabela 2). Em uma visão geral, a simulação com o terpineol axial na posição 'up' indica mínimos de energia para os confôrmeros cujos ângulos diedro H-C-C(Me<sub>2</sub>)-O se encontram em conformação anti.

243

244 Figura 5 - Perfil de energia livre obtida para inclusão da molécula terpineol axial nas posições a) 'up' e b)  
 245 'down' na cavidade da  $\beta$ -CD.



246  
 247

248 Tabela 2. Mínimos de energia e percentagem de população para o terpineol axial 'up' e 'down'.

<i>axial 'up'</i>	<i>d (Å)*</i>	<i>E = kJ mol<sup>-1</sup></i>	<i>ΔE = kJ mol<sup>-1</sup></i>	<i>%P</i>
$\beta$ -CD-terp(a-aa)	0	292,43	0	57,5
$\beta$ -CD-terp(a-am)	2	295,07	2,64	19,8
$\beta$ -CD-terp(a-ap)	2	294,74	2,31	22,6
$\beta$ -CD-terp(a-ma)	-2	315,55	23,12	0,0
$\beta$ -CD-terp(a-mm)	2	316,79	24,36	0,0
$\beta$ -CD-terp(a-mp)	0	315,79	23,36	0,0
$\beta$ -CD-terp(a-pa)	2	315,58	23,15	0,0
$\beta$ -CD-terp(a-pm)	2	313,15	20,72	0,0
$\beta$ -CD-terp(a-pp)	2	313,54	21,11	0,0
<b><i>axial 'down'</i></b>				
$\beta$ -CD-terp(a-aa)	-2	318,67	14,97	0,1
$\beta$ -CD-terp(a-am)	-2	303,70	0,00	46,4
$\beta$ -CD-terp(a-ap)	-2	303,59	0,09	44,7
$\beta$ -CD-terp(a-ma)	-2	315,58	11,88	0,4
$\beta$ -CD-terp(a-mm)	-2	309,14	5,44	5,2
$\beta$ -CD-terp(a-mp)	-4	311,12	7,42	2,3
$\beta$ -CD-terp(a-pa)	-2	317,27	13,57	0,2
$\beta$ -CD-terp(a-pm)	-2	315,95	12,25	0,3
$\beta$ -CD-terp(a-pp)	-2	315,86	12,16	0,3

249 d(A)\* posição em relação ao centro da CD.

250

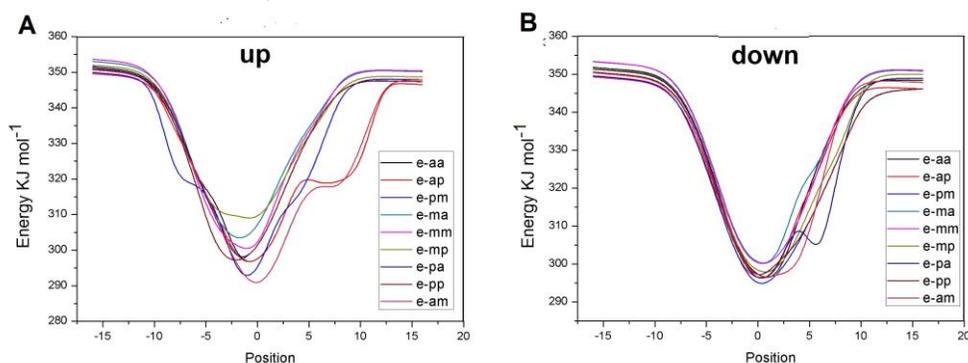
251 No direcionamento realizado com a posição axial 'down' (Figura 5b), a população de  
 252 confôrmeros se encontra igualmente distribuída entre as conformações a-am (46,4%) e a-ap  
 253 (44,7%), sendo que para a conformação a-ap é observado o menor mínimo de  $E = 303,59 \text{ kJ mol}^{-1}$   
 254 apresentando  $d(A)^*$  de  $-2 \text{ \AA}$  (Tabela 2). Em ambas as estruturas, a hidroxila está voltada para o  
 255 interior do anel, indicando que promovem maior estabilidade a essas conformações. Neste caso,

256 os mínimos de energia são observados que a molécula incluída permanece à cavidade maior da  
257 CD.

258 O perfil de energia livre do terpineol na conformação equatorial nas posições ‘up’ e ‘down’  
259 é apresentado na Figura 6. A posição do terpineol equatorial ‘up’, é revelada menores mínimos de  
260 energia para os confômeros e-am e e-pm (Figura 6a). O confômero e-am está localizado no  
261 centro da cavidade da CD, com  $E = 288,44 \text{ KJ mol}^{-1}$ , apresentando a maior %P de 69,2%. O  
262 confômero e-pm está localizado a  $d(A)^*$  de  $-2 \text{ \AA}$  da cavidade da CD, com uma  $E = 291,91 \text{ KJ mol}^{-1}$ ,  
263 representando 17,1% da %P (Tabela 3). Os CIs orientados de mais baixa energia têm a  
264 molécula hóspede no centro da  $\beta$ -CD (e-am) ou voltado para a cavidade ampla (e-pm).

265

266 Figura 6 - Perfil de energia livre obtida para inclusão da molécula terpineol equatorial nas posições a) ‘up’  
267 e b) ‘down’ na cavidade da  $\beta$ -CD.



268

269

270 **Tabela 3.** Mínimos de energia e percentagem de população para o terpineol equatorial ‘up’ e ‘down’.

<b>Eq. ‘up’</b>	<b><math>d(A)^*</math></b>	<b><math>E = \text{kJ mol}^{-1}</math></b>	<b><math>\Delta E = \text{kJ mol}^{-1}</math></b>	<b>%</b>
$\beta$ -CD-terp(e-aa)	0	296,191	7,751	3,0
$\beta$ -CD-terp(e-am)	0	288,44	0	69,2
$\beta$ -CD-terp(e-ap)	0	296,25	7,81	3,0
$\beta$ -CD-terp(e-ma)	-2	301,862	13,422	0,3
$\beta$ -CD-terp(e-mm)	0	299,258	10,818	0,9
$\beta$ -CD-terp(e-mp)	0	307,907	19,467	0,0
$\beta$ -CD-terp(e-pa)	-2	295,984	7,544	3,3
$\beta$ -CD-terp(e-pm)	-2	291,91	3,47	17,1
$\beta$ -CD-terp(e-pp)	-2	296,046	7,606	3,2
<b>Eq. ‘down’</b>				
$\beta$ -CD-terp(e-aa)	2	295,74	2,6	10,0
$\beta$ -CD-terp(e-am)	0	295,8	2,66	9,8
$\beta$ -CD-terp(e-ap)	0	295,33	2,19	11,8
$\beta$ -CD-terp(e-ma)	0	299,33	6,19	2,4

$\beta$ -CD-terp(e-mm)	0	299,01	5,87	2,7
$\beta$ -CD-terp(e-mp)	0	297,27	4,13	5,4
$\beta$ -CD-terp(e-pa)	0	294,49	1,35	16,6
$\beta$ -CD-terp(e-pm)	0	293,14	0	28,7
$\beta$ -CD-terp(e-pp)	0	295,18	2,04	12,6

271 d(A)\* posição em relação ao centro da CD

272

273 No caso do terpineol equatorial na posição ‘down’, verifica-se que a população está  
 274 bastante distribuída entre as diferentes possibilidades de conformação (Figura 6b). Como pode  
 275 ser observado na Tabela 3, não existe uma grande variação energética entre os confômeros,  
 276 sendo mais abundante o confômero e-pm, com uma %P de 28,7% e E= 293,1 KJ mol<sup>-1</sup>,  
 277 localizado no centro da cavidade da CD.

278 Realizando um cálculo populacional envolvendo todas as simulações com os confômeros  
 279 axiais e equatoriais (Tabela 4), nas posições ‘up’ e ‘down’, observa-se maior abundância de CIs  
 280 com o terpineol equatorial (84,8%). Dentre estes, o de menor energia e, portanto mais abundante  
 281 é o e-am. No entanto, a existência de 15% do confômero axial pode representar algumas  
 282 alterações em determinadas propriedades como as constantes de acoplamento H-H.

283

284 Tabela 4 - População para o terpineol equatorial e axial.

Confômero	População (%)			
	Axial ‘up’	Axial ‘down’	Equatorial ‘up’	Equatorial ‘down’
aa	8,6	0,0	1,9	2,3
am	3,0	0,1	43,1	2,2
ap	3,4	0,1	1,8	2,7
ma	0,0	0,0	0,2	0,5
mm	0,0	0,0	0,5	0,6
mp	0,0	0,0	0,0	1,2
pa	0,0	0,0	2,1	3,8
pm	0,0	0,0	10,6	6,5
pp	0,0	0,0	2,0	2,8
<b>Total (%)</b>	<b>15,2</b>			<b>84,8</b>

285

### 286 3.3 Dinâmica molecular

287

288 A análise por simulações de modelagem molecular tem por objetivo investigar a afinidade  
 289 entre a molécula hóspede e a molécula hospedeira, por meio das energias de ligação, potenciais  
 290 locais de ligação e prever a sua estabilidade pela diferença nas energias de interação (YANG et

291 al., 2011). O cálculo da energia de ligação representa principalmente o alcance das forças de van  
 292 der Waals e as interações eletrostáticas. O valor numérico mais elevado da energia significa mais  
 293 forte interação entre as moléculas (XIONG, ZHAO e SONG, 2014).

294 A variação de energia cinética ( $\Delta E$ ) foi usada como parâmetro teórico para encontrar as  
 295 configurações mais estáveis dos CIs. Os cálculos de DM para os CIs de mais baixa energia foram  
 296 avaliados e os resultados são apresentados na Tabela 5. Os resultados teóricos apresentaram  
 297 variações de energia após a formação dos CIs. O terpineol é a molécula mais flexível, podendo  
 298 adotar diferentes conformações. Dentre as conformações escolhidas para realizar os cálculos  
 299 estão as menos energéticas, para a conformação axial (a-aa e a-am) e equatorial (e-am e e-pm),  
 300 nas posições 'up' e 'down', respectivamente.

301

302 Tabela 5 - Energias dos complexos de inclusão mediante Dinâmica Molecular

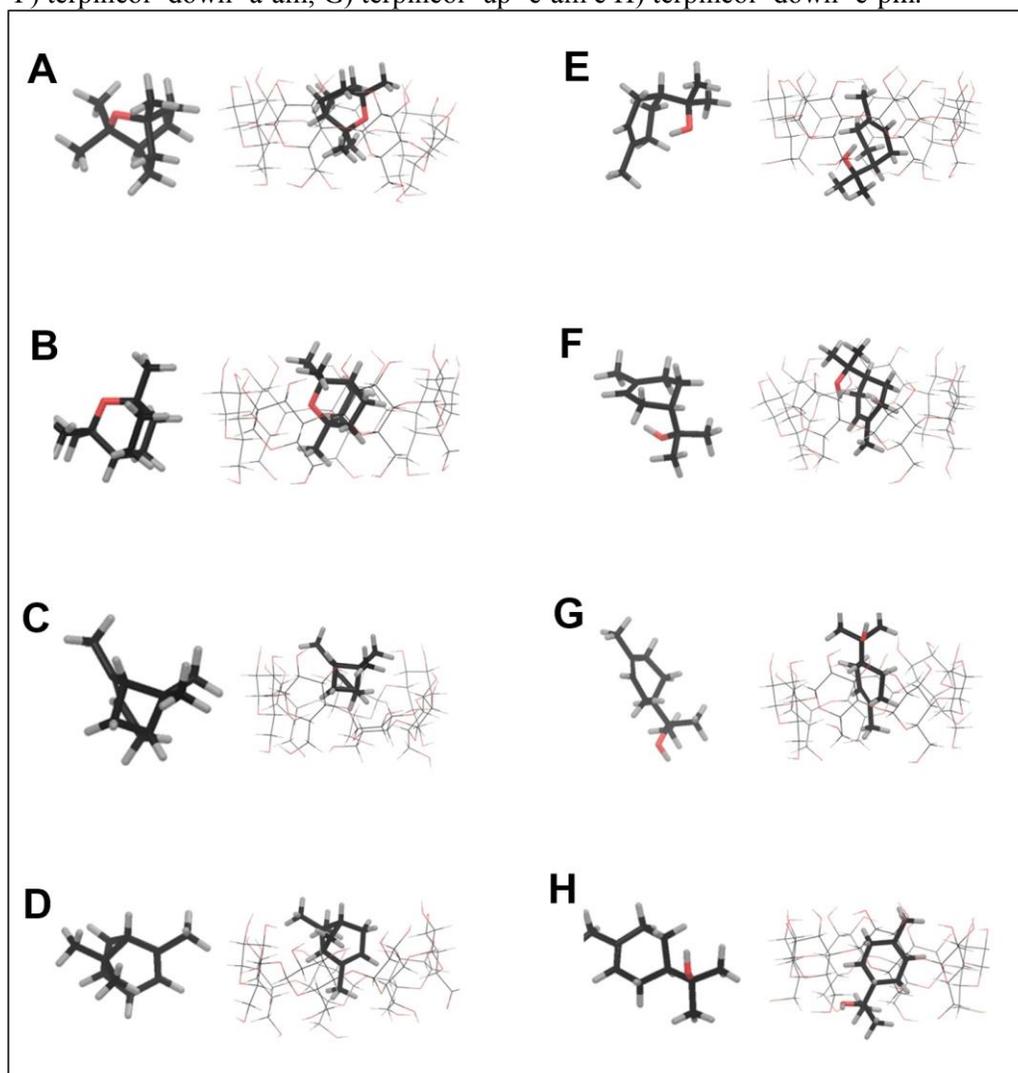
Molecule/ Conformation	Position	kinetic energy (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta E$ kinetic (kJ mol <sup>-1</sup> )	Total energy (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta E$ total (kJmol <sup>-1</sup> )	Std dev	%P
Cineol 'up'	-16	652,9	-1,71	1555,68	-42,25	2,07	70,2
	-4	651,19		1513,43		2,22	
Cineol 'down'	16	653,67	-1,94	1549,41	-33,86	1,13	29,8
	-4	651,73		1515,55		2,75	
Pinene 'up'	-16	639,52	1,43	1638,17	-45,62	2,59	17,6
	-2	640,95		1592,55		2,18	
Pinene 'down'	-16	640,28	0,27	1634,71	-45,99	2,28	82,4
	-2	640,55		1588,72		2,05	
Terp. 'up' a-aa	-16	652,47	-0,62	1543,41	-69,42	2,08	65,5
	0	651,85		1473,99		1,94	
Terp. 'down' a-am	-16	651,97	1,88	1537,60	-45,45	2,06	0,0
	-2	653,85		1492,15		3,39	
Terp. 'up' e-am	16	651,77	-0,80	1527,18	-51,32	2,08	30,8
	2	650,97		1475,86		2,55	
Terp. 'down' e-pm	16	651,34	2,19	1533,63	-52,47	2,47	3,6
	0	653,53		1481,16		2,22	

303 Todos os cálculos foram feitos em água utilizando campo de forças AMBER\*. Ao término das simulações  
 304 as temperaturas se mantiveram, não havendo uma grande variação ( $300,5 \pm 0,7$  K).

305 Na Figura 7 é apresentada a molécula hóspede orientada fora da cavidade da  $\beta$ -CD (fixo  
306 por um único átomo a 16 ângstrons da cavidade) e após a complexação. Estas estruturas  
307 confirmam que os três compostos aromáticos podem ser complexados com a  $\beta$ -CD. Pode-se  
308 observar que após os cálculos de mecânica molecular, que a orientação da molécula hóspede que  
309 confere maior estabilidade apresenta sua maior parte inserida dentro da cavidade da  $\beta$ -CD. Não  
310 ocorrendo de forma semelhante com todas as moléculas hóspedes após a dinâmica molecular  
311 feita em água.

312

313 Figura 7 - Dinâmica molecular da molécula hóspede antes e após a complexação com a  $\beta$ -CD. A) cineol  
314 'up'; B) cineol 'down'; C) pineno 'up'; D) pineno 'down'; E) terpineol 'up' a-aa;  
315 F) terpineol 'down' a-am; G) terpineol 'up' e-am e H) terpineol 'down' e-pm.



316

317           Dentre os componentes majoritários do OEC estudados, o CI formado com o cineol é o  
318 que apresenta a maior restrição quanto ao movimento no interior da cavidade da  $\beta$ -CD, uma vez  
319 que sua estrutura apresenta maior rigidez que os demais (Figura 7a e b). A complexação é  
320 energeticamente favorável, porém é a menos estável ('up'  $\Delta E$  de  $-42,25 \text{ kJ mol}^{-1}$  e 'down'  $\Delta E$  de  
321  $-33,86 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), quando comparada com o pineno e terpineol (Tabela 5). Pela dinâmica  
322 molecular a orientação inicial da molécula no interior da cavidade interfere na posição final ao  
323 término da simulação, que é distinta para o cineol. Neste caso o cineol 'up' apresenta uma  
324 população (%P) maior de 70,2% em relação ao 'down' de 29,8%.

325           Ciobanu et al. (2013) estudando a complexação dos componentes majoritários (incluindo  
326 cineol) presentes no OE de *M. piperita*, com diferentes CDs, obteve por modelagem molecular  
327 que todos os componentes majoritários estudados podem ser complexados com a  $\beta$ -CD,  
328 formando CIs estáveis. Porém, para o cineol o CI mais estável foi obtido quando este foi  
329 complexado com a  $\gamma$ -CD, devido ao tamanho da cavidade da  $\gamma$ -CD e as formas que o cineol pode  
330 assumir.

331           Lawtrakul, Inthajak e Toochinda (2014) relata que a estrutura do cineol carece de  
332 flexibilidade de ligação. De acordo com o impedimento estérico, o cineol pode entrar na cavidade  
333 da  $\beta$ -CD pelo lado mais largo e pode formar apenas um CI, devido a molécula de cineol ser rígida  
334 e não apresentar variações conformacionais. O grupo dimetil da molécula de cineol oferece a  
335 possibilidade da formação de CIs por interação hidrofóbica.

336           A complexação do pineno nas posições 'up' e 'down' (Figura 7c e d) confere a ambas  
337 uma estabilidade energética semelhante com um  $\Delta E$  de  $-45,62 \text{ kJ mol}^{-1}$  e  $-45,99 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Tabela  
338 5). No entanto a conformação adotada pelo pineno 'down' apresenta maior restrição energética  
339 relacionada à sua mobilidade no interior da cavidade como mostra a menor variação da energia  
340 cinética. Apesar da maior restrição com relação a mobilidade, em termos populacionais, a  
341 conformação adotada pelo pineno 'down' é de 82,4% em relação ao 'up' de 17,6%.

342           No caso dos CIs com o terpineol, os cálculos de dinâmica molecular mostram uma maior  
343 estabilidade para as estruturas em posição axial e que estão parcialmente inclusas na cavidade da  
344  $\beta$ -CD, uma terminando com a hidroxila voltada para a cavidade mais larga ('down') (Figura 7f) e  
345 outra para a mais estreita ('up') (Figura 7e). Apresentando mais baixa energia o CI cuja hidroxila  
346 está voltada para a cavidade mais estreita da  $\beta$ -CD, terp. 'up' a-aa ( $\Delta E = -69,42 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) (Figura

347 7e), representando 65,5% da população dos CIs formados pelos 4 confôrmeros avaliados (Tabela  
348 5).

349 Essa conformação apresenta a hidroxila voltada para o interior da cavidade da  $\beta$ -CD,  
350 cujas variações em energia eletrostática sugerem que as interações hidrofóbicas e de hidrogênio  
351 devem estar tornando essa conformação mais estável na presença da  $\beta$ -CD. Esse comportamento  
352 foi relatado por Kfoury et al. (2015) quando investigou a complexação do  $\alpha$ -terpineol com a  $\beta$ -  
353 CD.

354 Nas conformações equatoriais a formação do CI pode ocorrer tanto da posição ‘up’,  
355 quanto ‘down’ com energias muito semelhantes de  $\Delta E = -51,32 \text{ kJ mol}^{-1}$  para o terp. ‘up’ e-am e  
356  $\Delta E = -52,47 \text{ kJ mol}^{-1}$  para terp. ‘down’ e-pm. No entanto uma maior mobilidade ocorre quando a  
357 hidroxila do terpineol está voltada para a cavidade mais estreita (‘up’) (Figura 7g), apresentando  
358 uma população de 30,8% contra 3,6% da posição ‘down’.

359

### 360 3.4 Atividade antifúngica

361

362 É bem conhecido que os OEs exibem excelentes atividades antibacterianas e antifúngicas  
363 (PRAKASH et al., 2015). Contudo, sua aplicação é desafiada por sua alta volatilidade que leva à  
364 sua liberação rápida (GONG et al., 2016). No presente estudo, foi analisada qual seria a  
365 concentração mínima inibitória (CMI) necessária para que os CIs inibissem a ação dos  
366 microorganismos testados e a porcentagem de inibição (%I). Esses resultados encontram-se na  
367 Tabela 6 e Figura 8, respectivamente.

368

369 Tabela 6 - Concentração mínima inibitória (CMI)  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e comprimento dos halos de inibição

370 causados pelo óleo essencial de *C. viminalis* (OEC) e dos complexos de inclusão (CIs) para os  
371 fungos avaliados.

Fungo	CMI					
	OEC	MA	CO-P	$\beta$ -CD	DMSO	FL
<i>A. flavus</i>	125	62,5	125	NI	NI	3
<i>A. carbonarius</i>	500	500	500	NI	NI	3
<i>A. ochraceus</i>	62,5	15,62	15,62	NI	NI	3

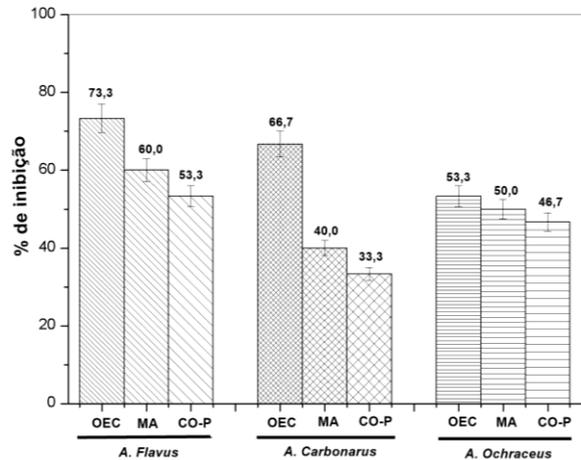
372 FL – fluodioxonil; DMSO – dimetilsulfóxido

373

374

375  
376  
377  
378

Figura 8 - Porcentagem de inibição do óleo essencial de *C. viminalis* (OEC), malaxagem (MA), co-precipitação (CO-P), mistura física (MF) sobre os fungos *A. flavus*, *A. carbonarius* e *A. ochraceus* no CMI na qual houve a inibição.



379  
380

381 Para todos os fungos estudados o OEC puro apresentou uma maior porcentagem de  
382 inibição, sendo que a maior diferença para os CIs foi observada para o fungo *A. flavus*, com %I  
383 de 73,3%. Os componentes presentes nos OEs atuam nas hifas do micélio dos fungos.  
384 Consequentemente, provocam a perda de rigidez e integridade da parede da célula e a perda de  
385 componentes citoplasmáticos que resultam em morte celular. Compostos mais hidrofóbicos como  
386 no caso dos OEs, têm maior capacidade de dissolver e acumular na membrana celular hidrofóbica  
387 do fungo, que induz a desestabilização da membrana. A membrana celular pode,  
388 consequentemente, ser considerada como o principal local de ação dessas moléculas (KFOURY  
389 et al., 2016).

390 Sales et al. (2017), avaliando a atividade antifúngica do OE das folhas de *C. viminalis*,  
391 observou que o crescimento dos fungos *F. oxysporum* e *B. cinerea* foi inibido nas concentrações  
392 de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

393 A atividade antifúngica foi observada para todos os CIs estudados. Para o fungo *A. flavus*,  
394 o CI preparado por malaxagem (MA) obteve um menor CMI de 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com uma %I de  
395 60%. Já para o fungo *A. carbonarius* a mesma CMI de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi observada para o OEC e  
396 para os CIs, porém observou-se a variação na %I. O OEC inibiu 66,7%, seguido pelos CIs  
397 preparados por MA 40% e CO-P 33,3%. Para o fungo *A. ochraceus* os CIs apresentaram uma

398 menor CMI de  $15,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$  quando comparado com o OEC ( $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com %I de 50% e  
399 46,7% para MA e CO-P, respectivamente.

400 A atividade antifúngica do CI do eugenol/ $\beta$ -CD foi avaliada por Gong et al. (2016) sobre  
401 o crescimento micelial dos fungos presentes na lichia. Os autores observaram que o crescimento  
402 micelial foi fortemente inibido pelo CI em 92,6% após 30 dias de armazenamento.

403 A  $\beta$ -CD foi avaliada separadamente nas mesmas concentrações utilizadas nos CIs e  
404 confirmou-se que não apresentava qualquer atividade inibitória do crescimento dos fungos  
405 testados. Munhuwey et al. (2018) estudou o efeito da complexação entre  $\beta$ -CD com os OEs de  
406 canela e orégano e observaram que a  $\beta$ -CD não apresentou atividade antifúngica contra o  
407 crescimento do fungo de *Botrytis sp.*, atribuindo esse fato a  $\beta$ -CD atuando como fonte de  
408 carboidratos para o fungo. A estrutura química das CDs (natureza hidrofílica e volume) não  
409 permite que elas, permeiem nas membranas biológicas. Já os CIs podem liberar a molécula  
410 hóspede de forma lenta, assim, qualquer efeito observado só poderia ser atribuído à atividade da  
411 molécula hóspede e não a molécula de CD (KFOURY et al., 2016).

412

#### 413 **4. CONCLUSÃO**

414

415 O componente majoritário terpineol na posição 'up' a-aa (axial-anti, anti), quando  
416 complexado com a  $\beta$ -CD, obteve o CI mais estável, pois apresentou menor energia. Porém, no  
417 caso do OEC, esse composto não está sozinho e a complexação dele e dos outros componentes  
418 pode sofrer influência da população presente, interações e sinergismo entre eles e também com os  
419 demais componentes presentes no OEC, mesmo que em menor quantidade. Por fim, todos os CIs  
420 avaliados, utilizando campo de forças Amber\*, são energeticamente favoráveis. Assim, é possível  
421 confirmar que os componentes majoritários encontrados no OEC foram complexados com a  $\beta$ -  
422 CD.

423 As CDs podem ser consideradas materiais promissores para a formação de CIs com  
424 compostos naturais como os OEs, resolvendo os problemas como a baixa solubilidade e  
425 volatilidade que eles apresentam. Para todos os fungos estudados o OEC apresentou uma maior  
426 porcentagem de inibição, porém a atividade antifúngica também foi observada para todos os CIs  
427 estudados, sendo necessária uma menor CMI para os fungos *A. flavus* e *A. ochraceus*. Desta

428 forma, apresentam um bom potencial para o uso como fungicidas, reduzindo ou substituindo o  
429 uso de fungicidas sintéticos.

## 430 5. AGRADECIMENTOS

431  
432 Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
433 (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho  
434 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Centro de Análises e  
435 Prospecção Química (CAPQ), Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos e a Universidade  
436 Federal de Lavras por seu apoio financeiro e apoio para a execução desta pesquisa.

437

## 438 6. REFERÊNCIAS

439

440 AMBER\*, Version of the original AMBER program (Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I.  
441 R., Merz, K. M., Kollman, P. A. (1995) A second generation force field for the simulation of proteins,  
442 nucleic acids and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 117, 5179) tailored for  
443 MACROMODEL, 2012.

444

445 BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A M. Composition and antimicrobial activity of essential oils  
446 isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi, **Industrial Crops and**  
447 **Products**, v.52, p.776–782, 2014.

448

449 BANERJEE, A. et al. Encapsulation of Prodan in beta-cyclodextrin environments: A critical study via  
450 electronic spectroscopy and molecular mechanics, **Journal of Molecular Structure**, v.794, n.1-3, p.181-  
451 189, 2006.

452

453 BARRY A. L; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: diffusion test procedures. In: Balows, A.;  
454 Hausler, Jr. W. J.; Herrmann, K. L.; et al. (eds) *Manual of Clinical Microbiology*. **American Society for**  
455 **Microbiology**, p.1117-1125, 1991.

456

457 CALDAS, G. F. R. et al. Repeated-doses and reproductive toxicity studies of the monoterpene 1,8-cineole  
458 (eucalyptol) in Wistar rats, **Food and Chemical Toxicology**, v.97, p.297-306, 2016.

459

460 CIOBANU, A. et al. Retention of aroma compounds from *Mentha piperita* essential oil by cyclodextrins  
461 and crosslinked cyclodextrin polymers, **Food Chemistry**, v. 138, n.1, p.291–297, 2013.

462

463 FALL, R. et al. Chemical characterization of essential oil from the leaves of *Callistemon viminalis* (D.R.)  
464 and *Melaleuca leucadendron* (Linn.), **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.7, n.4, p.347–  
465 351, 2017.

466

467 GONG, L. et al. An inclusion complex of eugenol into b-cyclodextrin: Preparation, and physicochemical  
468 and antifungal characterization, **Food Chemistry**, v.196, p.324–330, 2016.

469

- 470 HAPIOT, F.; TILLOY, S.; MONFLIER, E. Cyclodextrins as Supramolecular Hosts for Organometallic  
471 Complexes, **Chemical Reviews**, v.106, n3, p.1-15, 2006.  
472
- 473 KFOURY, M. et al. Investigation of the complexation of essential oil components with cyclodextrins,  
474 **Supramolecular Chemistry**, v. 27, p.620–628, 2015.  
475
- 476 KFOURY, M. et al. Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in  
477 cyclodextrins, **Food Chemistry**, v.196, p.518–525, 2016.  
478
- 479 LAWTRAKUL, L.; INTHAJAK, K.; TOOCHINDA, P. Molecular calculations on  $\beta$ -cyclodextrin  
480 inclusion complexes with five essential oil compounds from *Ocimum basilicum* (sweet basil),  
481 **ScienceAsia**, v. 40, n.2, p.145–151, 2014.  
482
- 483 MIRANDA, C. A. S. F. et al. Comparative analyses of potential allelopathic of *thymus vulgaris* essential  
484 oil and its major constituent in germination and vigor of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.), **e-xacta**, v. 8, p.  
485 45-53, 2015.  
486
- 487 MUNHUWEYI, K. et al. Physical and antifungal properties of  $\beta$ -cyclodextrin microcapsules and  
488 nanofibre films containing cinnamon and oregano essential oils, **Food Science and Technology**, v.87,  
489 p.413-422, 2018.  
490
- 491 OLIVEIRA, C. M. et al. Chemical composition and allelopathic activity of the essential oil from  
492 *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) blossoms on lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings, **American Journal**  
493 **of Plant Sciences**, v.5, n.24, p.3551-3557, 2014.  
494
- 495 PRAKASH, B. et al. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination  
496 and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges, **Food Control**, v.47,  
497 p.381–391, 2015.  
498
- 499 SALES, T. A. et al. Essential oils from the leaves and flowers of *Callistemon viminalis*: chemical  
500 characterization and evaluation of the insecticide and antifungal activities, **American Journal of Plant**  
501 **Sciences**, v.8, n.10, p.2516-2529, 2017.  
502
- 503 SHRESTHA, M.; HO, T. M.; BHANDARI, B. R. Encapsulation of tea tree oil by amorphous  $\beta$ -  
504 cyclodextrin powder, **Food Chemistry**, v.221, p.1474–1483, 2017.  
505
- 506 VERLET, L. Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones  
507 molecules. *Physical Review*, v.159, p.1, 98, 1967.  
508
- 509 YANG, L., et al Preparation of highly pure daidzin on oligo- $\beta$ -cyclodextrin-Sepharose HP and  
510 investigation of chromatographic behavior of isoflavones by molecular docking. **Journal of**  
511 **Chromatography B**. v.879, n.20, p.1773– 1780, 2011.  
512
- 513 XIONG, X. et al Exploring host–guest interactions of sulfobutylether-  $\beta$ -cyclodextrin and phenolic acids  
514 by chemiluminescence and site-directed molecular docking. **Analytical Biochemistry**, v.460, p.54–60,  
515 2014.