

GABRIEL PRIMINI FELTRAN

**Estudo comparativo da complexação de monoterpenos em
ciclodextrina: preparação, caracterização química,
desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica.**

Campinas (SP)

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GABRIEL PRIMINI FELTRAN

**“Estudo comparativo da complexação de monoterpenos em ciclodextrina:
preparação, caracterização química, desenvolvimento tecnológico e avaliação
biológica”**

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação defendida pelo aluno

Gabriel Primini Feltran

e orientada pelo Prof. Dr. Marcos José
Salvador.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre
em Ciências, na área de concentração Fármacos,
Medicamentos e Insumos para Saúde.


Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salvador

Campinas,

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira – CRB 8/6972

F347e Feltran, Gabriel Primini, 1987-
Estudo comparativo da complexação de monoterpenos em ciclodextrina : preparação, caracterização química, desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica / Gabriel Primini Feltran. – Campinas, SP: [s.n.], 2014.

Orientador: Marcos José Salvador.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ciclodextrinas. 2. Estudo comparativo. 3. Monoterpenos.
I. Salvador, Marcos José, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparative study of monoterpenes complexation in cyclodextrins : preparation, physicochemical characterization, technological development and biological evaluation

Palavras-chave em Inglês:

Cyclodextrins

Comparative Study

Monoterpenes

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Marcos José Salvador [Orientador]

Cristiane Yumi Koga Ito

Paulo César Pires Rosa

Data da defesa: 18-12-2014

Programa de Pós Graduação: **Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos**

Campinas, 18 de dezembro de 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos José Salvador



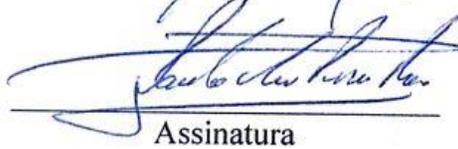
Assinatura

Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito



Assinatura

Prof. Dr. Paulo César Pires Rosa



Assinatura

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner

Assinatura

Dra. Ildenize Barbosa da Silva Cunha

Assinatura

RESUMO

Os monoterpenos são uma importante classe de produtos naturais com odor e sabor intenso e que contém muitas moléculas que apresentam atividade biológica, incluindo a atividade antimicrobiana, e aplicações na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. Entretanto, são substâncias lipofílicas, voláteis e apresentam certa instabilidade química. Ciclodextrinas (CDs) são carreadores macrocíclicos, capazes de complexar, aumentar a solubilidade em água e estabilizar um largo espectro de substâncias e que, atualmente, têm sido objeto de pesquisas e de desenvolvimento de novos produtos pela indústria farmacêutica. Neste trabalho procedeu-se um estudo comparativo da complexação de quatro monoterpenos (citral, β -mirceno, limoneno e 1,8-cineol) em β CD e HP- β CD, bem como a avaliação biológica desses compostos, complexados ou não. Após essas avaliações realizou-se o desenvolvimento de um enxaguante bucal contendo o monoterpeno mais promissor no combate ao biofilme dentário. Para a caracterização físico-química do complexo de inclusão monoterpeno-CD foram utilizadas técnicas espectroscópicas (UV-Vis), cromatográficas (CG-EM) e calorimétricas (DSC), avaliando a solubilidade dos complexos em água e porcentagem de inclusão dos monoterpenos em CD. Foi realizado um *screening* da atividade antimicrobiana dos quatro monoterpenos em estudo frente à quatro cepas de bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Escherichia coli* ATCC 10538 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175) e quatro cepas de fungos (*Candida albicans* ATCC 10231; *Candida dubliniensis* ATCC 22019; *Candida tropicalis* ATCC 157 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019). Essa avaliação foi realizada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (concentração que inibiu 50% do desenvolvimento microbiano, CIM) e Concentração Biocida Mínima (concentração que inibiu em 100% o desenvolvimento microbiano, CBM). O monoterpeno citral mostrou-se mais efetivo (CBM citral = 2,5 μ L/mL) frente à cepa de *S. mutans* (ATCC 25175). A partir desses resultados o citral foi o monoterpeno escolhido para dar continuidade aos estudos propostos no projeto. Avaliou-se o efeito do citral isoladamente, complexado e incorporado em formulações de enxaguante bucal, frente ao crescimento e aderência de *S. mutans* (ATCC 25175) em superfície sólida. Avaliou-se, também, a citotoxicidade do citral e de algumas formulações de enxaguante bucal verificando-se baixa citotoxicidade frente a cultura de queratinócitos humanos (HaCat). Tanto o citral em sua forma livre como complexado em CDs apresentou atividade frente a cepa indicadora de *S. mutans* (ATCC 25175), impedindo a formação do biofilme *in vitro* em concentração sub-inibitória (CBM/2 = 1,25 μ L/mL). Ao avaliar o citral e seus complexos de inclusão incorporados nas formulações de enxaguante bucal,

observou-se manutenção do efeito antibacteriano *in vitro* frente a cepa de *S. mutans* (ATCC 25175) e uma melhor solubilidade do complexo de inclusão citral-HP β CD se comparado ao monoterpeno não complexado em CD.

ABSTRACT

Monoterpenes are an important class of natural products with intense flavor and odor and can exhibit biological activity including antimicrobial activity, and applications in the pharmaceutical, cosmetic and food industry. However, monoterpenes are lipophilic and volatile substances which demonstrate some chemical instability. Cyclodextrins (CDs) are macrocyclic carriers capable of complexing a wide range of substances and increase their water solubility currently been the subject of research and development of new products for the pharmaceutical industry. In this project a comparative study was carried complexing four monoterpenes (citral, β -myrcene, limonene and 1,8-cineole) in β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin, and biological evaluation of such monoterpenes, complexed or not. After these assessments was performed to develop a mouthwash containing the most promising monoterpene to combat dental biofilm. For physico-chemical characterization of the inclusion complex monoterpene-CD spectroscopic (UV-Vis), chromatographic (GC-MS) and calorimetric (DSC) were used to evaluate the solubility of the complex in water and percentage of inclusion of these monoterpenes in cyclodextrin. Antimicrobial activity screening for the monoterpenes was conducted across four strains of bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 10538 and *Streptococcus mutans* ATCC 25175) and four strains of fungi (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida dubliniensis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 157 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019). This evaluation was performed by determining the minimum inhibitory concentration (concentration that inhibited 50% of microbial growth, MIC) and Minimum Biocide Concentration (concentration that inhibited 100% microbial development, MBC). The monoterpene citral was more effective (MBC citral = 2.5 μ L/mL) against the strain of *S. mutans* (ATCC 25175). From these results the monoterpene citral was chosen to continue the studies in the proposed project. Were evaluated the effect of citral alone, complexed and incorporated into mouthwash formulations, to the growth and adherence of *S. mutans* (ATCC25175) on a solid surface. It was also assessed the cytotoxicity of citral and some mouthwash formulations afford low cytotoxicity against human keratinocytes (HaCat) cell culture. Both citral and citral complexed with CDs presented activity against the indicator strain of *S. mutans* (ATCC25175), preventing the formation of biofilms *in*

vitro in the sub-inhibitory concentration ($MBC/2 = 1.25\mu L/mL$). When evaluating citral and their inclusion complexes embedded in mouthwash formulations, the *in vitro* antibacterial effect against *S. mutans* (ATCC 25175) was maintained and an increased solubility of the inclusion complex citral-HP β CD compared to monoterpene uncomplexed with CD.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract.....	ix
Lista de figuras	xvii
Lista de tabelas.....	xxi
Lista de símbolos e abreviaturas	xxv
1. INTRODUÇÃO	1
Considerações gerais sobre os óleos essenciais	1
Considerações gerais sobre os monoterpenos	1
Considerações gerais sobre Ciclodextrinas.....	2
Considerações gerais sobre o uso de CDs como agentes complexantes	4
Considerações sobre o uso de substâncias de origem natural em produtos farmacêuticos.....	6
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Preparação de amostras-piloto, otimização de metodologia e avaliação da cinética de formação	9
3.2. Preparação dos complexos de inclusão.....	10
3.3. Isotermas de solubilidade	10
3.4. Avaliação da porcentagem de monoterpeno presente nos complexos de inclusão	11
3.5. Calorimetria Diferencial de Varredura	15
3.6. Microscopia eletrônica de varredura	15
3.7. Avaliação da atividade biológica in vitro.....	16
3.8. Formulação de enxaguante bucal	18
3.9. Avaliação da citotoxicidade em culturas de células.....	20

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Otimização de metodologia e avaliação da cinética de formação	21
4.2. Isotermas de solubilidade	23
4.3. Avaliação da porcentagem de monoterpeno presente nos complexos de inclusão	26
4.4. Calorimetria Diferencial de Varredura	46
4.5. Microscopia eletrônica de varredura	48
4.6. Avaliação da atividade biológica <i>in vitro</i>	51
4.7. Avaliação da citotoxicidade em cultura de células	58
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
6. REFERÊNCIAS	62
7. ANEXOS	66

DEDICATÓRIA

Dedico essa Dissertação de Mestrado à minha família: José Luis Feltran, Rosana Primini Feltran e Talita Primini Feltran, por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado em todas as minhas decisões. Sem o apoio de vocês a caminhada seria muito mais difícil.

Dedico, também, a todos envolvidos direta ou indiretamente nesse trabalho apoiando, dando conselhos e contribuindo para superar os obstáculos superados durante o percurso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos José Salvador por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho e por ter sempre acreditado no meu potencial para o desenvolvimento deste estudo.

Aos meus pais pelo apoio e incentivo tanto motivacional como financeiro, pois sem eles o desenvolvimento do trabalho seria muito mais difícil.

Aos colegas de laboratório Caroline Caramano de Lourenço e Nathalia Luiza Andrezza por terem me dado todo o suporte na realização dos experimentos na área de microbiologia.

Ao Laboratório de Tecnologia Fitofarmacêutica e Bioensaios do DBV/IB/UNICAMP coordenado pelo Prof. Dr. Marcos José Salvador por ter fornecido todos os equipamentos e recursos para o desenvolvimento deste estudo.

Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, Faepex-UNICAMP e FAPESP pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral do isopreno.	1
Figura 2: Estruturas dos monoterpenos que serão estudados: a) β -mirceno; b) citral; c) limoneno; d) 1,8-cineol.....	2
Figura 3: Estrutura geral da β CD (A) e HP- β CD (B).	3
Figura 4: (A) Espectros de absorção no UV-Vis para o citral nos tempos de 10 minutos a 12 horas. (B) Cinética de formação dos complexos de inclusão do citral em β CD na proporção molar (1:1) e HP- β CD na proporção molar (1:1). Dados representados pela média \pm d.p. (n=3).	22
Figura 5: Tipos de isotermas de solubilidade. S_0 = solubilidade da molécula “convidada” na ausência de CD; Isotermas do tipo A (A_P , A_L , A_N) = complexos muito solúveis (a solubilidade é limitada pela solubilidade da CD); B_S = complexo de solubilidade limitada; B_I = complexos insolúveis (Adaptado de Fromming et. al., 1994).....	23
Figura 6: Diagrama de solubilidade do citral com β CD e HP- β CD após 72 horas de equilíbrio. Dados apresentados em média \pm d.p. (n=3).....	24
Figura 7: Diagrama de solubilidade do β -mirceno com β CD e HP- β CD após 72 horas de equilíbrio. Dados apresentados em média \pm d.p. (n=3).	25
Figura 8: Diagrama de solubilidade do limoneno com β CD e HP- β CD após 72 horas de equilíbrio. Dados apresentados em média \pm d.p. (n=3).	25
Figura 9: Diagrama de solubilidade do 1,8-cineol com β CD e HP- β CD após 72 horas de equilíbrio. Dados apresentados em média \pm d.p. (n=3).	26

Figura 10: Porcentagem de monoterpene extraída em relação ao número de extrações realizadas.	27
Figura 11: Linearidade do método para quantificação do citral. Análise em triplicata para cada ponto.....	28
Figura 12: Linearidade do método para quantificação do β -mirceno. Análise em triplicata para cada ponto.....	29
Figura 13: Linearidade do método para quantificação do limoneno. Análise em triplicata para cada ponto.....	30
Figura 14: Linearidade do método para quantificação do 1,8-cineol. Análise em triplicata para cada ponto.....	31
Figura 15: Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis estudadas para o citral a 99% de confiança.	41
Figura 16: Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis estudadas para o β -mirceno a 99% de confiança.	42
Figura 17: Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis estudadas para o limoneno a 99% de confiança.	42
Figura 18: Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis estudadas para o 1,8-cineol a 99% de confiança	43
Figura 19: Termogramas de DSC para β CD (A); HP- β CD (B); citral (C) e complexo de inclusão citral- β CD (D) e complexo de inclusão citral-HP- β CD (E).....	47

Figura 20: (A) CD em sua forma pura. Aumento de 100x (B) HP- β CD em sua forma pura. Aumento de 100x.....48

Figura 21: (A) Mistura física citral/ β CD (1:1, m/m). Aumento de 100x. (B) Mistura física citral/HP- β CD (1:1, m/m). Aumento de 100x.....49

Figura 22: Complexo citral/ β CD obtido pelo método de precipitação. (A) Aumento de 100x (B) Aumento de 500x.....49

Figura 23: Complexo de inclusão citral/ β CD obtido pelo método de atomização. (A) Aumento de 100x (B) Aumento de 8000x. Complexo de inclusão citral/HP- β CD obtido pelo método de atomização (C) Aumento de 100x (D) Aumento de 4000x.....50

Figura 24: Efeito do monoterpeno citral e amostras controle na formação de placa bacteriana frente a indicadora *S. mutans* (ATCC 25175). Monoterpeno citral nas concentrações CBM/2 (A); CBM (B) e 2CBM (C). Controle positivo: Clorexidina 0,12% (D) e Controle negativo: Água destilada estéril (E) CBM citral = 2,5 μ L/mL.....53

Figura 25: Efeito do complexo de inclusão monoterpeno citral- β CD e amostras controle na formação de placa bacteriana frente a indicadora *S. mutans* (ATCC 25175). Complexo de inclusão citral- β CD nas concentrações CBM/2 (A); CBM (B) e 2CBM (C). Controle positivo: Clorexidina 0,12% (D) e Controle negativo: Água destilada estéril (E) CBM citral = 2,5 μ L/mL54

Figura 26: Efeito do complexo de inclusão monoterpeneo citral-HP β CD e amostras controle na formação de placa bacteriana frente a indicadora *S. mutans* (ATCC 25175). Complexo de inclusão citral-HP β CD nas concentrações CBM/2 (A); CBM (B) e 2CBM (C). Controle positivo: Clorexidina 0,12% (D) e Controle negativo: Água destilada estéril (E). CBM citral = 2,5 μ L/mL.....55

Figura 27: Efeito do citral na viabilidade de células de queratinócitos humanos (HaCat). Valores expressos como média das análises em triplicata. O CV obtido nessas análises foi menor que 5%.59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características físico-químicas dos monoterpenos em estudo.	2
Tabela 2: Dimensões moleculares e propriedades físico-químicas da alfa, beta e gamma ciclodextrina (Szejtli, 2004)	3
Tabela 3: Rampa de aquecimento para o monoterpeno citral.	12
Tabela 4: Rampa de aquecimento para o monoterpeno β -mirceno.....	12
Tabela 5: Rampa de aquecimento para o monoterpeno limoneno.	12
Tabela 6: Rampa de aquecimento para o monoterpeno 1,8-cineol.	13
Tabela 7: Matriz de planejamento experimental para o ensaio da robustez.	15
Tabela 8: Componentes utilizados na formulação de enxaguante bucal.	19
Tabela 9: Formulações de enxaguante bucal preparadas com o monoterpeno citral complexado ou não complexado em CDs.	20
Tabela 10: Dados obtidos da curva analítica para o citral.	28
Tabela 11: Dados obtidos da curva analítica para o β -mirceno.....	29
Tabela 12: Dados obtidos da curva analítica para o limoneno.	29
Tabela 13: Dados obtidos da curva analítica para o 1,8-cineol.	30
Tabela 14: Resultados da precisão intra e intercorrida para os complexos de inclusão citral/CD.....	32
Tabela 15: Resultados da precisão intra e intercorrida para os complexos de inclusão β -mirceno/CD.....	33

Tabela 16: Resultados da precisão intra e intercorrida para os complexos de inclusão limoneno/CD.	34
Tabela 17: Resultados da precisão intra e intercorrida para os complexos de inclusão 1,8-cineol/CD.	35
Tabela 18: Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método para quantificação do monoterpeno citral.	37
Tabela 19: Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método para quantificação do monoterpeno β -mirceno.	38
Tabela 20: Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método para quantificação do monoterpeno limoneno.	39
Tabela 21: Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método para quantificação do monoterpeno 1,8-cineol.	40
Tabela 22: Porcentagem de citral presente nos complexos de inclusão em β CD e HP- β CD. Análise em triplicata e resultados expressos em termos de média e CV.	44
Tabela 23: Porcentagem de β -mirceno presente nos complexos de inclusão em β CD e HP- β CD. Análise em triplicata e resultados expressos em termos de média e CV.	44
Tabela 24: Porcentagem de limoneno presente nos complexos de inclusão em β CD e HP- β CD. Análise em triplicata e resultados expressos em termos de média e CV.	45
Tabela 25: Porcentagem de 1,8-cineol presente nos complexos de inclusão em β CD e HP- β CD. Análise em triplicata e resultados expressos em termos de média e CV.	45

Tabela 26: Atividade antimicrobiana para os monoterpenos citral, β -mirceno, limoneno e 1,8-cineol frente às cepas indicadoras de bactérias e fungos.	52
Tabela 27: Avaliação do efeito na formação de biofilme bacteriano e da atividade antibacteriana do monoterpeno citral e da formulação contendo o monoterpeno citral.	56
Tabela 28: Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar (técnica do poço em camada dupla) das formulações de enxaguante bucal estudadas frente a indicadora <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).	58

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CD: Ciclodextrina

α CD: alfa-ciclodextrina

β CD: beta-ciclodextrina

γ CD: gamma-ciclodextrina

HP- β CD: hidroxipropil-beta-ciclodextrina

UV-Vis: Ultravioleta-visível

RMN: Ressonância magnética nuclear

CG-EM: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

DSC: calorimetria diferencial de varredura *em inglês*

CIM: Concentração inibitória mínima

CBM: Concentração bactericida mínima

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

μ g/mL: microgramas por mililitro

m/V: proporção massa/volume

mm: milímetro

μ m: micrometro

nm: nanometro

mM: milimolar

mg: miligrama

mL: mililitro

μ L: microlitro

m: metro

$^{\circ}$ C: graus Celsius

mL/min: mililitro por minuto

$^{\circ}$ C/min: graus Celsius por minuto

mg/mL: miligramas por mililitro

1. INTRODUÇÃO

Considerações gerais sobre os óleos essenciais

Óleos essenciais são uma mistura de compostos voláteis caracterizados por apresentarem sabor e odor intenso. Geralmente estão presentes em temperos, ervas aromáticas, frutas e flores (Trombeta *et. al.*, 2005; Sherry *et. al.*, 2013). Estas substâncias são denominadas terpenos: produtos do metabolismo secundário de espécies vegetais e representados predominantemente por monoterpenos, sesquiterpenos e derivados fenilpropanóides (Tian *et. al.*, 2011). A composição química dos óleos essenciais pode depender do clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita e da técnica empregada na extração (maceração, destilação, dentre outras) (Santos *et. al.*, 2010). A concentração desses terpenos em uma determinada espécie vegetal funciona como repelentes naturais para alguns predadores, atrair insetos polinizadores e contribuir para a interação com outras espécies vegetais. A partir desses relatos, os terpenos podem apresentar atividade antimicrobiana contra um grande número de espécies de microrganismos (fungos e bactérias) incluindo espécies resistentes aos antimicrobianos presentes no mercado, fazendo com que estas substâncias sejam de grande interesse para a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (Carson *et. al.*, 1995; Oliveira *et. al.*, 2008).

Considerações gerais sobre os monoterpenos

Os monoterpenos são substâncias originadas de produtos naturais e formadas por duas unidades de isopreno (Figura 1). São lipofílicos, voláteis e quimicamente instáveis podendo ou não apresentar atividade biológica.

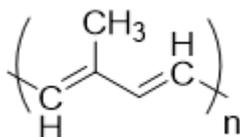


Figura 1: Estrutura geral do isopreno.

Embora a atividade biológica dos monoterpenos esteja descrita na literatura, são poucos os relatos de atividade relacionada a substância isolada. É sabido que óleos essenciais que apresentam composição majoritária dos monoterpenos que serão avaliados

neste projeto, possuem atividade antimicrobiana frente a diferentes espécies de fungos e bactérias como *C. albicans*, *Aspergillus sp.*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *S. mutans*, entre outros (Ünlü *et. al.*, 2002; Saddig *et. al.*, 2010; Singh *et. al.*, 2010; Tavares *et. al.*, 2010).

No presente estudo, foram escolhidos quatro monoterpenos: β -mirceno, citral, limoneno e 1,8-cineol (Figura 2) buscando avaliar comparativamente a complexação individual desses compostos em β CD e HP- β CD, avaliar a atividade biológica e elaborar formulações de enxaguante bucal contendo o monoterpeno mais promissor frente à atividade biológica para auxiliar na prevenção da formação do biofilme dentário. As principais características físico-químicas desses compostos podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características físico-químicas dos monoterpenos em estudo.

Monoterpeno	Massa molar (g/mol)	Densidade (g/mL)	Ponto de ebulição (°C)	Solubilidade em água	*LogP
Citral	152,24	0,89	229	Insolúvel	3,17
β -mirceno	136,23	0,79	167	Insolúvel	4,58
Limoneno	136,24	0,84	176	Insolúvel	4,45
1,8-cineol	154,24	0,92	176	insolúvel	2,82

*Propriedade predita usando o *software* ACD/LogP

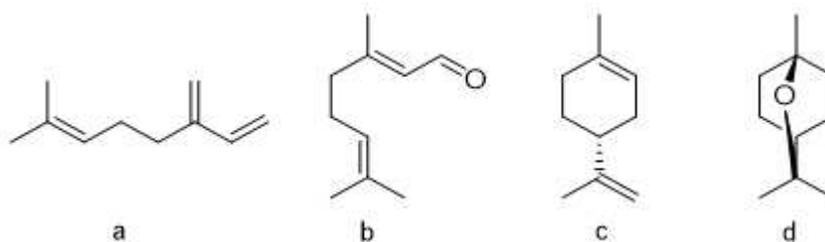


Figura 2: Estruturas dos monoterpenos que serão estudados: a) β -mirceno; b) citral; c) limoneno; d) 1,8-cineol.

Considerações gerais sobre Ciclodextrinas

O uso de CDs é uma entre várias técnicas conhecidas de complexação (Guedes *et. al.*, 2008). Este procedimento visa aumentar a solubilidade em água de moléculas hidrofóbicas e estabilizar um largo espectro de substâncias fazendo com que o estudo seja

objeto de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos pela indústria farmacêutica (Pinho *et. al.*, 2014). As CDs são carreadores macrocíclicos derivados de açúcares que são formadas a partir de uma degradação enzimática pela ciclodextrina glicosiltransferase. Constituem uma família de oligossacarídeos possuindo seis (α CD), sete (β CD) ou oito (γ CD) unidades de glicose ligadas através de ligações α -(1,4). A estrutura geral é formada pelo arranjo dessas moléculas de glicose apresentando uma cavidade hidrofóbica e uma superfície hidrofílica auxiliando na formação de complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas. Esse arranjo confere diferenças no diâmetro da cavidade hidrofóbica e na solubilidade em água dessas CDs podendo atuar como agente complexante frente a diversos compostos. As características físico-químicas dessas CDs podem ser observadas na Tabela 2 (Ruktanonchai *et. al.*, 2011; Mourtzinis *et. al.*, 2008).

Tabela 2: Dimensões moleculares e propriedades físico-químicas da alfa, beta e gamma ciclodextrina (Szejtli, 2004)

Tipo de CD	Unidades de glicose	Peso molecular (g/mol)	Dimensões moleculares (Å)			Solubilidade a 25°C (g/100mL H ₂ O)
			Diâmetro interno	Diâmetro externo	Altura	
Alfa	6	973	5,7	13,7	7,0	14,50
Beta	7	1135	7,8	15,3	7,0	1,85
Gamma	8	1297	9,5	16,9	7,0	23,20

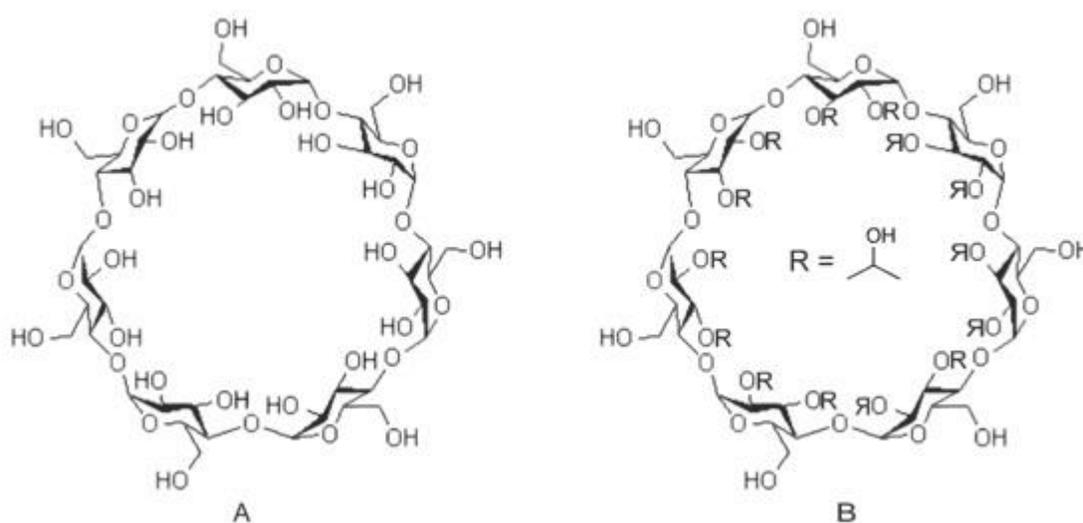


Figura 3: Estrutura geral da β CD (A) e HP- β CD (B).

Além do número de moléculas de glicose presentes na formação das CDs, estas podem ou não apresentar substituintes promovendo, assim, diferentes características físico-químicas. A diferença entre a β CD e a HP- β CD está na presença do radical hidroxipropila ligado à sua estrutura (Figura 3).

A inclusão de substâncias hidrofóbicas na cavidade da CD pode ser atribuída às interações entre a molécula a ser complexada e a parede interna da estrutura através de interações do tipo dipolo-dipolo e *Van der Waals* (Li *et. al.*, 2007; Marreto *et. al.*, 2008).

Apesar do conhecimento sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais cujos componentes majoritários são os monoterpenos, seu uso é bastante limitado devido à baixa solubilidade em água e alta instabilidade quando expostos a altas temperaturas, luz e oxigênio. Dentre as várias técnicas de complexação com o objetivo de aumentar a solubilidade em água e a estabilidade de substâncias voláteis como os monoterpenos, as que têm se mostrado mais efetivas são as que empregam CDs. Este fato se deve à interação de regiões hidrofóbicas das moléculas de monoterpenos com a cavidade central das CDs (Shiga *et. al.*, 2003; Szente *et. al.*, 2004; Li *et. al.*, 2007; Ruktanonchai *et. al.*, 2011).

Considerações gerais sobre o uso de CDs como agentes complexantes

Sistemas de liberação sustentada podem ser usados com o objetivo de melhorar a eficácia e o índice terapêutico de moléculas bioativas. CDs são carreadores macrocíclicos, capazes de complexar e estabilizar um largo espectro de substâncias e que, atualmente, têm sido objeto de pesquisas e de desenvolvimento de novos produtos pela indústria farmacêutica. A formação de complexos de inclusão em CDs tem sido estudada e os resultados demonstram melhora nas propriedades farmacológicas de fármacos aumentando a eficácia e a segurança dos mesmos. A utilização das CDs como agentes complexantes visa aumentar a solubilidade aquosa de fármacos pouco solúveis e sua biodisponibilidade e estabilidade. Além disso, CDs podem, por exemplo, ser usadas para diminuir a irritação gastrointestinal causada por alguns fármacos, converter substâncias líquidas em microcristais ou em pós amorfos e prevenir interações fármaco-fármaco e fármaco-excipiente (Dollo *et. al.*, 1998; Loftsson *et. al.*, 2001; Loftsson *et. al.*, 2005; Loftsson *et. al.*, 2007).

Um exemplo de estudos de complexação de monoterpenos em CDs são os isômeros do citral que são constituintes ativos que contribuem para às atividades biológicas do óleo de capim-limão (óleo essencial de *Cymbopogon citratus*), incluindo atividade antibacteriana, antifúngica e inseticida. O óleo essencial de *C. citratus* é uma rica fonte de citral, uma mistura dos isômeros E-citral (geranial) e Z-citral (neral). O grupo aldeído do E-citral está em configuração *trans*, o que permite uma melhor acessibilidade do mesmo à água. O grupo aldeído do Z-citral está na configuração *cis* e, portanto, é menos acessível. As diferenças entre as estruturas moleculares podem levar a diferentes propriedades físico-químicas. Por exemplo, E-citral tem um odor intenso de limão, enquanto Z-citral tem um odor de limão mais suave e mais doce. Embora o óleo essencial de *C. citratus* tenha mostrado elevado potencial como agente antimicrobiano de amplo espectro de ação, a sua utilização prática é limitada devido a fraca solubilidade aquosa e baixa estabilidade a temperatura elevada, frente a atmosfera de oxigênio e exposição a luz. Para superar estas limitações de uso, um processo de estabilização é, portanto, necessário e tem sido estudado pelo uso da complexação com CD. Weisheimer *et. al.* (2010) relataram a preparação de micropartículas de β CD e HPCD contendo citral a partir do óleo essencial de *C. citratus*, pelo método da atomização e precipitação. Ruktanonchai *et. al.* (2011) reportaram a complexação entre dois isômeros de citral em óleo essencial de *C. citratus* e variados tipos de CDs (α CD, β CD e γ CD), sendo os complexos formados estudados por modelagem molecular e em termos de caracterização físico-química. Os resultados obtidos revelaram que os isômeros de citral podem formar espontaneamente complexos de inclusão com a CD numa proporção molar de citral/CD de 1:2 ou de 1:1. A formação do complexo entre E-citral e CD foi mais favorável do que entre Z-citral e CD, observando-se melhor estabilidade térmica dos complexos de inclusão CD-citral em relação ao citral no óleo essencial. Estes fatos mostram a viabilidade do emprego de CDs em complexos de inclusão com monoterpenos. Entretanto, estudos comparativos quanto as atividades biológicas, como antimicrobiana, e em formulações farmacêuticas dos complexos formados ainda são escassos.

Considerações sobre o uso de substâncias de origem natural em produtos farmacêuticos

As últimas décadas têm registrado um crescimento no interesse em produtos elaborados com base em ativos de origem natural como, por exemplo, cosméticos, medicamentos entre outros. Além de apresentarem novas estratégias terapêuticas, esses produtos ganham valor estratégico sobre os seus possíveis usos industriais e econômicos em diversos segmentos (Jones *et. al.*, 2004). Produtos oriundos de plantas utilizados na prática odontológica têm mostrado resultados efetivos sobre o controle da formação do biofilme dentário, podendo interferir na síntese de polissacarídeos (dextrano), agindo nas enzimas que produzem estas substâncias, ou sobre a estrutura dentária (Paolino *et. al.*, 1985). O biofilme dentário é formado pela associação de microrganismos que podem estar presentes ou não na flora bacteriana da cavidade oral. (Kroes *et. al.*, 1999; Marsh, 2004). O processo de formação do biofilme dentário é complexo e multifatorial podendo estar relacionados à fatores socioeconômicos, culturais e biológicos. (Negrini *et. al.*, 2009). Este processo ocorre devido à diversos fatores como a má remoção física de resíduos provenientes da alimentação, de uma dieta rica em carboidratos, defeitos na formação do esmalte dentário, entre outros. Várias espécies de *Streptococcus* estão relacionadas com a formação do biofilme dentário. Entre elas pode-se destacar o *S. mutans*. O desenvolvimento de cáries e gengivites está diretamente relacionado com a formação do biofilme dentário, sendo necessário seu controle e prevenção na manutenção da saúde bucal. Neste sentido, muitos agentes químicos vêm sendo estudados, dentre eles os produtos naturais, como componentes tanto nos géis dentifrícios como nos enxaguantes bucais, visando um possível emprego como adjuvante na terapia das doenças periodonticas e na profilaxia de rotina (Mandel, 1988; Carson *et. al.*, 1995; Axelsson *et. al.*, 2002; Charles *et. al.*, 2004).

Os antimicrobianos dos antissépticos bucais rompem a parede celular e inibem a atividade da célula microbiana. Adicionalmente, previnem a agregação bacteriana e diminuem sua multiplicação. Entre os compostos ativos mais utilizados em antissépticos bucais tem-se a clorexidina, cloreto de cetilpiridínio e triclosan, além de óleos essenciais. A clorexidina, um dos biocidas mais utilizados em formulações antissépticas, é uma biguanida catiônica que age principalmente sobre bactérias Gram-positivas, além de leveduras e dermatófitos, enquanto que o cloreto de cetilpiridínio age principalmente sobre bactérias

Gram-positivas e leveduras. Entre os compostos fenólicos, o triclosan tem sido o mais utilizado em formulações para controle do biofilme dentário, apresentando ação principalmente contra bactérias Gram-positivas, no entanto, este ativo tem sido utilizado em associação a copolímeros, que aumentam seu espectro de ação sobre bactérias Gram-negativas e leveduras (Mandel, 1988; Charles *et. al.*, 2004; Silva *et. al.* 2009; Sharma *et. al.*, 2010; Cortelli *et. al.*, 2012).

Inicialmente, a grande maioria dos enxaguantes bucais apresentava clorexidina e álcool em sua formulação (Ayad *et. al.*, 2011; Santos *et. al.*, 2010), ambos com o objetivo de reduzir o número de microrganismos que participam da formação do biofilme dentário. Porém, esses componentes, além de apresentar sabor desagradável, podem produzir irritações na mucosa oral. Apesar de, atualmente, serem encontrados diversos produtos que não apresentam álcool em sua formulação, a clorexidina ainda se faz presente em muitos desses produtos. O uso prolongado de clorexidina no tratamento de doenças da cavidade oral pode levar à perda do paladar, sensibilidade e amarelamento do esmalte dentário (Helms *et. al.*, 1995). Além disso, a presença de álcool e clorexidina na formulação de enxaguantes bucais aumentam ainda mais o desconforto de alguns pacientes que se encontram em tratamento quimioterápico ou estão imunodeprimidos e fazem uso deste tipo de enxaguante bucal (Shapiro *et. al.*, 2002; Claffey, 2003; Bahna *et. al.*, 2007; Rawlinson *et. al.*, 2008).

O enxaguante que apresenta o maior histórico de uso é composto por solução hidroalcoólica contendo timol, mentol e eucaliptol. Embora sejam normalmente utilizados como flavorizantes, os monoterpenos podem contribuir com a propriedade antimicrobiana do produto e agem principalmente sobre bactérias Gram-positivas e leveduras. Os produtos existentes são formulados empregando-se misturas de ativos e a maioria apresenta atividade biocida associada ao efeito na formação do biofilme dentário. No Brasil, os enxaguantes bucais são categorizados como produtos de higiene pessoal e cosméticos, sendo as formulações que apresentam indicações específicas, como antissépticos, antibiofilme e de uso infantil, classificadas como produtos de grau 2 (Anvisa, 2000). Santos *et al.* (2010) avaliaram o efeito do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (Tomilho) incorporado em uma formulação farmacêutica de uso oral livre de álcool, frente a cepa de *S. mutans* (ATCC 25175), determinando-se sua CIM e o efeito na formação do biofilme dentário. A CIM obtida

para o óleo de tomilho foi de 100 µg/mL. Os ensaios de formação de biofilme dentário (ensaios microbianos e análise macroscópica de aderência) confirmaram a eficácia destes produtos naturais, com possível emprego na odontologia preventiva. Sharma *et. al.* (2010) demonstraram a superioridade do enxaguante bucal contendo óleo essencial quando comparado a um enxaguante contendo 0,05% de cloreto de cetilpiridínio como ativo em estudo clínico de seis meses de duração. Da mesma forma Cortelli *et. al.* (2012) também realizaram estudo clínico comparativo da eficácia antibiofilme e antigengivite de um enxaguante bucal contendo óleo essencial com melhores resultados se comparado a um enxaguante contendo cloreto de cetilpiridínio como ativo.

Os monoterpenos beta mirceno, citral, limoneno e 1,8-cineol foram escolhidos por apresentarem atividade biológica frente a cepas de micro-organismos que fazem parte da flora da mucosa oral e que participam da formação do biofilme bacteriano, sendo moléculas com potencial para ser empregada em enxaguantes bucais. Entretanto, são substâncias lipofílicas, voláteis e apresentam certa instabilidade química. A complexação desses monoterpenos em ciclodextrina visa aumentar sua solubilidade em água e sua estabilidade. A elaboração de um enxaguante bucal contendo algum desses monoterpenos como agente ativo contribuirá para o desenvolvimento de um produto biologicamente ativo e livre de clorexidina e álcool que podem causar irritação da mucosa oral além de deixar sabor desagradável para o usuário. Até o momento, não foram encontrados estudos comparativos quanto as atividades biológicas, como antimicrobiana e antibiofilme bacteriano e em formulações farmacêuticas de enxaguantes bucais dos complexos formados com estes monoterpenos. Assim, com este estudo buscou-se uma abordagem multidisciplinar, de vanguarda e atual, trabalhando-se com bioensaios de bancada, estudo de tecnologia farmacêutica e desenvolvimento de procedimentos analíticos de maneira a realizar o estudo comparativo da complexação de monoterpenos em ciclodextrina: preparação, caracterização química, desenvolvimento tecnológico e avaliação de atividade biológica *in vitro*.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar comparativamente a complexação individual dos monoterpenos β-mirceno, citral, limoneno e 1,8-cineol em βCD e HP-βCD, com o

preparo, a caracterização físico-química e avaliação biológica *in vitro* das formulações monoterpeno-ciclodextrina, visando melhorar a estabilidade e aumentar a solubilidade aquosa destes derivados do isopreno, de maneira a se ter uma veiculação mais homogênea e com melhora de suas propriedades biológicas. Ainda procedeu-se a elaboração de enxaguante bucal contendo como ativo o monoterpeno mais promissor quanto a bioatividade sozinho e em complexo de inclusão com CDs e avaliou-se o efeito da formulação e amostras controles na formação de placa bacteriana frente a cepa indicadora de *S. mutans* (ATCC 25175) e na formação de biofilme bacteriano *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparação de amostras-piloto, otimização de metodologia e avaliação da cinética de formação

O monoterpeno citral e CDs (β CD e HP- β CD) foram adquiridos comercialmente da *sigma-aldrich*. Os complexos sólidos foram obtidos de acordo com metodologia descrita por Weisheimer *et. al.* (2010) com adaptações. À uma solução de CD 10% (m/v) em água destilada foram adicionadas quantidades apropriadas do monoterpeno citral na proporção molar de 1:1 (citral:CD). A suspensão resultante foi mantida sob agitação por 12 horas. Durante esse período, alíquotas dessa suspensão foram coletadas (intervalos de 10 minutos na primeira hora, 30 minutos na segunda e terceira horas, 60 minutos até 8 horas e uma última alíquota em 12 horas de experimento). Essas alíquotas foram diluídas apropriadamente e avaliadas por espectrofotometria no UV-Vis no comprimento de onda de 243nm. Após o período de agitação, as suspensões foram secas pelos métodos de precipitação e atomização.

3.1.1. Secagem por precipitação

Após o período de agitação, a suspensão resultante foi mantida em geladeira por 16 horas e filtrada em membrana de 0,45 μ m. O sólido obtido foi seco em estufa a 50°C por 24 horas. O material resultante foi armazenado em dessecador sob vácuo para posterior análise por CG-EM.

3.1.2. Secagem por atomização

Após o período de agitação, a suspensão resultante foi seca em mini *spray dryer* modelo B-290 (Büchi Labortechnik AG). As condições de secagem foram adaptadas de acordo com a metodologia descrita por Weisheimer *et. al.* (2010). O material resultante foi armazenado em dessecador sob vácuo para posterior análise por CG-EM.

Condições do *Spray Dryer*:

Velocidade da bomba:	0,18%
Aspirador:	80%
Diâmetro do atomizador:	1,4mm
Temperatura de entrada:	120°C
Temperatura de saída:	80°C

3.2. Preparação dos complexos de inclusão

Monoterpenos (cital, β -mirceno, limoneno e 1,8-cineol) e CDs (β CD e HP- β CD) foram adquiridos comercialmente da *sigma-aldrich*.

Após análises das amostras-piloto utilizando o monoterpeno citral como referência, todos os complexos monoterpeno/CD foram preparados utilizando a mesma metodologia para fins comparativos.

À uma solução de CD 10% (m/v) em água destilada foram adicionadas quantidades apropriadas do monoterpeno na proporção molar de 1:1 (monoterpeno:CD). A suspensão resultante foi mantida sob agitação por 4 horas. Após o período de agitação, as suspensões foram secas pelo método de atomização nas condições descritas no item 3.1.2. O material resultante foi armazenado em dessecador sob vácuo para futura caracterização físico-química.

3.3. Isotermas de solubilidade

A avaliação da solubilidade na presença de CD foi realizada de acordo com o método proposto por Higuchi & Connors, 1965 com adaptações. Para isso, foram preparadas

soluções contendo o monoterpene em excesso (20mM) variando-se a concentração de CD (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16mM). As soluções foram mantidas em oscilação (100 oscilações por minuto) por 72 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas e filtradas em membrana de 0,45µm. O sobrenadante foi diluído e analisado por espectrofotometria no UV-Vis ou CG-EM. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4. Avaliação da porcentagem de monoterpene presente nos complexos de inclusão

A avaliação da porcentagem de inclusão dos monoterpenos na cavidade da CD foi realizada por CG-EM. A metodologia utilizada foi desenvolvida e validada de acordo com a RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA.

3.4.1. Eficiência do processo de extração

Para a avaliação do processo de extração prévia à análise da porcentagem de inclusão foram pesados cerca de 20mg do complexo de inclusão em tubo de vidro com tampa e solubilizados em 2mL de água deionizada. Adicionaram-se, à suspensão resultante, 1mL de hexano e o tubo foi mantido em banho termostatizado à 85°C por 20 minutos. A fase hexânica foi transferida para balão volumétrico de 5mL contendo 50µL de solução padrão interno octadecano a 2,5mg/mL e completou-se o volume com hexano. A solução resultante foi avaliada por CG-EM. Repetiu-se o procedimento por mais quatro vezes.

3.4.2. Validação de Metodologia Analítica

Na validação da metodologia analítica para a quantificação do complexo de inclusão monoterpene-CD avaliou-se os parâmetros de seletividade, intervalo e linearidade, precisão, exatidão e robustez. As amostras foram preparadas de acordo com o procedimento descrito no item 113.4.1 agrupando as frações em balão volumétrico de 5mL contendo 50µL de solução padrão interno. As análises foram realizadas em equipamento CG-EM modelo GC 2010/QP2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipado com injetor automático AOC-20i (Shimadzu) e usando analisador de seletivo de espectrometria de massas (EM). As condições cromatográficas gerais podem ser observadas abaixo e a rapma de aquecimento

para cada monoterpeneo pode ser observada nas Tabelas 3 a 6. A análise de EM foi realizada empregando-se voltagem 70eV com taxa de aquisição de 0,3s para massas no intervalo entre 40 a 350 Da.

Condições Cromatográficas Gerais:

Coluna: Restek Rtx-5MS 30m x 0,32mm ID, 0,25µm
 Temperatura do injetor: 250°C
 Temperatura do detector: 250°C
 Fluxo do gás de arraste: 1,52 mL/min
 Modo de injeção: Splitless
 Volume de injeção: 1,0µL

Tabela 3: Rampa de aquecimento para o monoterpeneo citral.

Taxa de Aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
–	60	2
5	140	–
15	245	–

Tabela 4: Rampa de aquecimento para o monoterpeneo β-mirceno.

Taxa de Aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
–	60	3
20	240	1

Tabela 5: Rampa de aquecimento para o monoterpeneo limoneno.

Taxa de Aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
–	60	2
5	100	0
30	245	2

Tabela 6: Rampa de aquecimento para o monoterpeneo 1,8-cineol.

Taxa de Aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
–	60	3
5	100	0
30	245	2

a) Seletividade

Para a avaliação da seletividade foram realizadas análises do hexano utilizado no preparo de amostra e da matriz (CD) verificando a presença de interferentes no tempo de retenção do composto a ser quantificado. A matriz (CD) foi submetida ao mesmo método de preparo de amostra conforme descrito no item 3.4.1. Foi avaliada, também, a pureza de pico através da comparação dos espectros de massas dos analitos no começo, meio e fim da eluição.

b) Intervalo e linearidade

Para a construção das curvas analíticas, soluções-estoque de citral (5,9mg/mL), β -mirceno (2,4mg/mL), limoneno (4,32mg/mL) e 1,8-cineol (4,26mg/mL) foram diluídas (0,3; 0,4; 0,5; 0,6 e 0,7mL) em balão volumétrico de 5mL contendo 50 μ L de solução padrão interno octadecano a 0,03mg/mL. As amostras foram injetadas em triplicata.

c) Precisão

Para a avaliação da precisão, amostras dos complexos de inclusão monoterpeneo/CD foram submetidas ao processo de extração conforme descrito no item 3.4.1 e avaliadas por CG-EM. Foram preparadas 6 amostras para a para a precisão intracorrída (repetibilidade) e outras 6 amostras em dias diferentes para a precisão intercorrída, totalizando 3 dias de experimentos. A porcentagem de inclusão foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de Inclusão} = \frac{m_{\text{Complexo}}}{m_{\text{Monterpeno}}} \times \frac{C_{\text{experimental}}}{m_{\text{Amostra}}} \times 100$$

Onde:

- m_{Complexo} : Massas teóricas utilizadas no preparo do complexo de inclusão: Massa de ciclodextrina (mg) + massa de monoterpeneo (mg);
- $m_{\text{Monoterpeneo}}$: massa teórica de monoterpeneo utilizada na preparo do complexo de inclusão;
- $C_{\text{experimental}}$: Concentração experimental obtida após análise (mg/mL);
- m_{Amostra} : massa de complexo de inclusão utilizada no preparo da amostra para análise (mg).

d) *Exatidão*

Para a avaliação da exatidão, utilizou-se o método da recuperação do padrão. Para isso, pesou-se quantidades apropriadas da matriz CD e esta foi fortificada com os analitos em estudo em três níveis de concentração (baixo, médio e alto) abrangendo todo o intervalo da curva analítica. As amostras foram submetidas ao processo de extração conforme descrito no item 3.4.1 e avaliadas por CG-EM.

e) *Robustez*

Para o ensaio de robustez avaliou-se o efeito de três variáveis, sendo duas delas correspondente ao preparo de amostra (tempo de extração e volume de hexano), e uma correspondente às condições cromatográficas (temperatura do injetor) realizando-se um planejamento fatorial 2^3 variando-se as condições para mais e para menos, totalizando oito experimentos. Os dados foram processados utilizando o *software Statistica 10*. A Tabela 7 mostra a matriz de planejamento utilizada no ensaio de robustez.

Tabela 7: Matriz de planejamento experimental para o ensaio da robustez.

Ensaio	Tempo de extração (min)	Volume de hexano (mL)	Temperatura do injetor (°C)
1	15	0,8	245
2	15	1,2	245
3	25	0,8	245
4	25	1,2	245
5	15	0,8	255
6	15	1,2	255
7	25	0,8	255
8	25	1,2	255

3.4.3. Porcentagem de inclusão

Após validação de metodologia analítica, os complexos de inclusão obtidos foram analisados por CG-EM conforme metodologia descrita no item 3.4.1. As amostras foram preparadas em triplicata e os resultados expressos em termos de média, desvio padrão e coeficiente de variação.

3.5. Calorimetria Diferencial de Varredura

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizada com o monoterpeno mais promissor (citral) complexado e não complexado em β CD e HP- β CD. As análises foram realizadas em um equipamento *DSC 2910 TA Instruments* pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp. Amostras de 10mg foram aquecidas a uma velocidade de 10°C/min em uma faixa de 25°C a 280°C em atmosfera de nitrogênio.

3.6. Microscopia eletrônica de varredura

Os complexos de inclusão dos monoterpenos em β CD e HP- β CD bem como as misturas físicas monoterpeno/CD foram fixadas, com o auxílio de fita de carbono, em *stubs*

de alumínio. Esses *stubs* foram submetidos à metalização em ouro por 180 segundos. As amostras foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura.

3.7. Avaliação da atividade biológica in vitro

3.7.1. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica

A avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica na triagem inicial dos monoterpenos sozinhos foi realizada de acordo com metodologia preconizada pela ANVISA (2013); Salvador *et. al.* (2004) e Costa *et. al.* (2010) com adaptações empregando-se o método da microdiluição em placa de 96 poços e leitura empregando-se sal de tetrazólio (Costa *et. al.*, 2010). Diluições seriadas de soluções 20µL/mL dos monoterpenos em propilenoglicol:água esterilizada (1:19 v/v) foram avaliadas frente a cepas indicadoras de bactérias e leveduras padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC). Para bactérias foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Escherichia coli* (ATCC 10538) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) cultivadas por 24 horas a 37°C em ágar sacarose e microaerofilia (para *S. mutans*) e ágar Müller Hinton (MH) para as demais cepas. Para leveduras foram utilizadas cepas de *Candida albicans* (ATCC 10231); *Candida dubliniensis* (ATCC 22019); *Candida tropicalis* (ATCC 157) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) cultivadas por 48 horas a 30°C em ágar Sabouraud Dextrose (ASD), determinando-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Biocida Mínima (CBM). A atividade antimicrobiana foi detectada pela adição de 20µL da solução aquosa esterilizada a 0,5% de TTC (*triphenyl tetrazolium chloride*, Merck). MIC foi definida como a menor concentração das amostras-teste que inibiu o crescimento microbiano visualmente e por leitura em leitor de microplaca no comprimento de onda de 570nm e tendo como referência a amostra controle negativo e controle do inóculo. Foi considerada como CIM a menor concentração onde se observou a presença de inibição de 50% do desenvolvimento microbiano e CBM a menor concentração onde se observou a inibição de 100% do desenvolvimento microbiano. Para a avaliação da CBM, coletou-se material do poço contendo a amostra-teste e inoculou-se em placas contendo meio MH ou ASD para a verificação se o efeito era biocida ou não. Como controle positivo foi utilizado Gluconato de

Clorexidina 0,12% (Periogard®) e como controle negativo propilenoglicol:água esterilizada (1:19, v/v). Os experimentos foram realizados em duplicata.

As cepas indicadoras são mantidas como culturas puras no Laboratório de Tecnologia Fitofarmacêutica e de Bioensaios do DBV/IB/Unicamp.

3.7.2. Avaliação da formação do biofilme bacteriano

Os experimentos foram realizados como descrito por Santos *et. al.* (2010). Foram utilizados cerca de 3mL de caldo sacarosado juntamente com uma superfície sólida como corpo de prova (que consiste em um capilar de vidro estéril moldado no formato de uma begala). Nesse meio foi preparado o inoculo da cepa padrão de *S. mutans* (ATCC 25175) de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala *McFarland*. Em seguida, foram adicionados o monoterpene citral ou seus complexos de inclusão em β CD e HP- β CD na CBM e CBM/2, bem como as formulações de enxaguante bucal preparadas contendo como ativo o monoterpene citral ou seus complexos de inclusão em CDs. Como controle positivo foi utilizado 1mL de clorexidina aquosa 0,12% e controle negativo 1mL de água destilada estéril. Após a preparação dos tubos, estes foram incubados em microaerofilia a 37°C por 24 e 48 horas. Decorrido o período de incubação a formação de biofilme bacteriano em superfície sólida foi avaliada visualmente (análise macroscópica) e microscopicamente (MEV) em aumento de 5000x. Os experimentos foram realizados em duplicata. Os corpos de prova, após período de incubação, foram cuidadosamente retirados com alça de platina e colocados em placas descartáveis estéreis para avaliação da ação antibiofilme dos enxaguantes. Os corpos de prova foram transferidos para tubos contendo 2 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e sonicados por 3 ciclos de 30 segundos. A partir das suspensões obtidas foram preparadas diluições seriadas que foram semeadas em duplicata em placa de ágar BHI. Estas placas foram incubadas por 24 horas, a 37°C e microaerofilia para contagem unidades de formação de colônia, sendo obtidos os valores de UFC/mL.

3.7.3. Avaliação da atividade antibacteriana dos enxaguantes bucais

A ação antibacteriana das formulações de enxaguante bucal preparadas contendo como ativo o monoterpeno citral ou seus complexos de inclusão em CDs foi determinada pelo método de difusão em ágar pela técnica de poço em camada dupla seguindo metodologia para os ensaios de susceptibilidade de acordo com as normas internacionais do manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e como descrito por Salvador *et. al.* (2004) com adaptações. Foi utilizada como cepa indicadora padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) de *S. mutans* (ATCC 25175) cultivada por 48 horas a 37°C em ágar sacarose e microaerofilia. No plaqueamento a camada base foi obtida pela adição de 20,0mL de ágar Müller Hinton (MH) em placas de 20x150mm. Após a solidificação adicionaram-se 5,0mL de MH, a cerca de 40°C, inoculado com as cepas padrão de *S. mutans* (5.10^6 UFC/mL) obtendo-se, assim, a camada *seed*. A seguir foram confeccionados poços com 5,0mm de diâmetro. Em cada poço foram aplicados 20µL das soluções controle (positivo e negativo) e amostras-teste de enxaguante bucal formulação controle e formulação contendo como ativo monoterpeno citral. Como controle positivo foi utilizado Gluconato de Clorexidina 0,12% (Periogard®) e como controle negativo propilenoglicol:água esterilizada (1:19, v/v) e formulações de enxaguante bucal controle sem princípio ativo contendo conservante e formulações sem princípio ativo e sem conservante. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.8. Formulação de enxaguante bucal

A formulação de enxaguante bucal foi preparada de acordo com o método desenvolvido pelo grupo de pesquisa e os componentes utilizados estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Componentes utilizados na formulação de enxaguante bucal.

Componente	Função	Concentração (%)
Água destilada	Veículo	80,00
Glicerina	Veículo / umectante	15,00
Óleo de mamona hidrogenado	Veículo / umectante	2,000
Cocoaminopropilbetaína	Tensoativo	1,500
Metilparabeno	Conservante	0,200
Fosfato de sódio monohidratado	Tamponante	0,090
Fosfato de sódio anidro	Tamponante	0,050
Fluoreto de sódio	Anti-cárie	0,050
Corante	Corante	0,005
Sacarina	Edulcorante	0,050
Polivinilpirrolidona	Formador de filme	0,100
Citral complexado e não complexado em CD	Princípio ativo antimicrobiano	0,250

O princípio ativo foi dissolvido em óleo de mamona hidrogenado (fase 1). O metilparabeno foi dissolvido em glicerina (fase 2). Os demais componentes da formulação foram dissolvidos em água destilada (fase 3). Misturaram-se as três fases e adicionou-se o corante. Foram preparadas 14 formulações de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9: Formulações de enxaguante bucal preparadas com o monoterpene citral complexado ou não complexado em CDs.

Identificação da formulação	Definição
BS	Formulação sem princípio ativo e sem conservante
BC	Formulação sem princípio ativo e com conservante
OES1	Formulação contendo citral na CBM/2 e sem conservante
OEC1	Formulação contendo citral na CBM/2 e com conservante
OES2	Formulação contendo citral na CBM e sem conservante
OEC2	Formulação contendo citral na CBM e com conservante
CDS1	Formulação contendo o complexo citral- β CD na CBM/2 e sem conservante.
CDC1	Formulação contendo o complexo citral- β CD na CBM/2 e com conservante.
CDS2	Formulação contendo o complexo citral- β CD na CBM e sem conservante.
CDC2	Formulação contendo o complexo citral- β CD na CBM e com conservante.
HPS1	Formulação contendo o complexo citral-HP β CD na CBM/2 e sem conservante.
HPC1	Formulação contendo o complexo citral-HP β CD na CBM/2 e com conservante.
HPS2	Formulação contendo o complexo citral-HP β CD na CBM e sem conservante.
HPC2	Formulação contendo o complexo citral-HP β CD na CBM e com conservante.

3.9. Avaliação da citotoxicidade em culturas de células

A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada utilizando-se o método colorimétrico MTT (Mosmann, 1983) para o monoterpene mais promissor citral e para as formulações de enxaguante bucal contendo citral e seus complexos de inclusão em CDs frente a culturas de células de queratinócitos humanos (HaCat). As culturas de células foram repicadas em solução salina e meio DMEM com L-glutamina (1%), soro fetal bovino (10%), ciprofloxacino (1%) e aminoácidos não essenciais (1%) e incubadas por 24 horas a 37°C em estufa de CO₂. Foram distribuídos 100 μ L da suspensão de células (5x10⁴ células) em microplaca de

96 poços e as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado e as amostras foram adicionadas nas concentrações finais de 0,05–250,00µg/mL) em DMSO/RPMI 1640 (1:99, v/v) para um volume final de 200µL de meio. Decorrido o período de incubação por 24 horas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂, cada poço foi lavado com PBS e foram adicionados 100µL de PBS/poço e 20µL de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, tetrazol*) (solução estoque a 0,30mg/mL em meio não suplementado com soro fetal bovino inativado) e novamente incubadas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ por 4 horas. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado de cada poço e foi adicionado 1mL de DMSO para solubilizar os sais de formazan gerados a partir da redução do MTT, procedendo-se a leitura das absorbâncias em leitor de microplaca no comprimento de onda de 570nm. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico Doxorubicina nas mesmas concentrações das amostras-teste e como controle negativo o diluente propilenoglicol:água esterilizada (1:19, v/v). Foram analisadas, também, em cada placa teste, uma amostra controle do meio de cultura (sem células), uma amostra da suspensão celular (controle do inoculo) e o controle das amostras teste e do diluente. Os experimentos foram realizados, pelo menos, em triplicata. Os resultados foram expressos em termos de viabilidade celular, calculadas por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin 8.0. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelo grupo de pesquisas do Laboratório de Tecnologia Fitofarmacêutica e Bioensaios do DBV/IB/UNICAMP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização de metodologia e avaliação da cinética de formação

Os experimentos de cinética de formação foram realizados com o objetivo de avaliar o tempo necessário para que a solução contendo CD e citral atinja o equilíbrio. Avaliou-se a cinética de formação do citral com βCD e HP-βCD. Alterações no espectro de absorção no UV-Vis, tais como, deslocamentos ou aumento/diminuição no pico de absorção máxima do composto a ser complexado pode ser indicativo da formação dos complexos de inclusão (Bekers *et. al.*, 1991; Araujo 2005; Weisheimer *et. al.*, 2010; Ruktanonchai *et. al.*, 2011).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados podem ser observados na Figura 4.

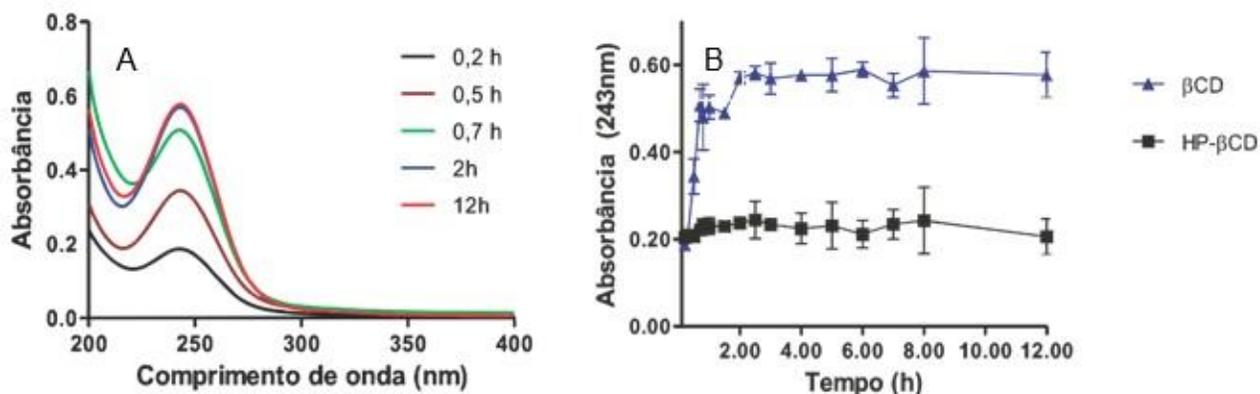


Figura 4: (A) Espectros de absorção no UV-Vis para o citral nos tempos de 10 minutos a 12 horas. (B) Cinética de formação dos complexos de inclusão do citral em β CD na proporção molar (1:1) e HP- β CD na proporção molar (1:1). Dados representados pela média \pm d.p. ($n=3$).

Na solução contendo citral e β CD observou-se que o equilíbrio foi atingido após 2 horas de agitação. Esse fato pode ser evidenciado pelo aumento no pico de absorção máxima do citral podendo ser indicativo da complexação citral- β CD. Por outro lado, na solução contendo citral e HP- β CD o tempo necessário para se atingir o equilíbrio foi inferior, o que pode ser verificado por alterações mínimas no pico de absorção máxima do citral a partir do tempo zero.

Avaliando-se o processo de secagem, o método da atomização obteve maior rendimento (75%) e melhor porcentagem de complexação (79%) quando comparado com o método da precipitação no qual o rendimento foi de 67% e a porcentagem de complexação de 51%.

Através dos resultados dessas análises e para fins comparativos, padronizou-se uma metodologia para o preparo dos complexos de inclusão monoterpene-CD fixando-se o tempo de agitação em 4 horas (para garantir que a suspensão atinja o equilíbrio) e atomização como método de secagem.

4.2. Isotermas de solubilidade

Sabe-se que a interação de regiões hidrofóbicas das moléculas de monoterpenos com a cavidade central das CDs pode levar a um aumento de solubilidade e estabilidade desse composto (Shiga *et. al.*, 2003; Szente *et. al.*, 2004; Li *et. al.*, 2007; Ruktanolchai *et. al.*, 2011). A construção de isotermas de solubilidade avalia a solubilidade do monoterpeno na presença de diferentes concentrações de CD. O método desenvolvido por Higuchi & Connors, 1965 propõe uma aproximação teórica utilizada na caracterização de complexos de inclusão em solução aquosa. A interação da molécula “convidada” com CD pode promover a formação de complexos de baixa ou elevada solubilidade em água (Fromming *et. al.*, 1994). A correlação entre a concentração da molécula “convidada” e concentração de CD pode ser observada na Figura 5.

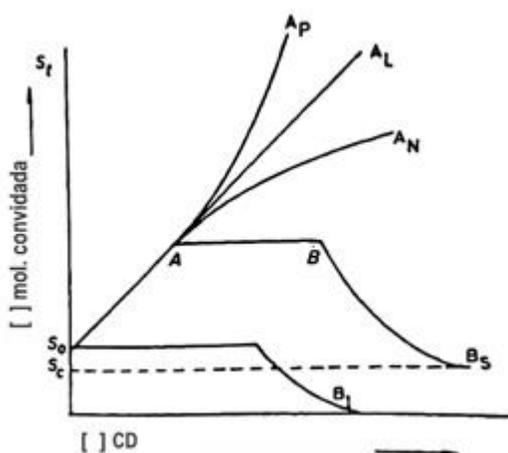


Figura 5: Tipos de isotermas de solubilidade. S_0 = solubilidade da molécula “convidada” na ausência de CD; Isotermas do tipo A (A_P , A_L , A_N) = complexos muito solúveis (a solubilidade é limitada pela solubilidade da CD); B_S = complexo de solubilidade limitada; B_I = complexos insolúveis (Adaptado de Fromming *et. al.*, 1994).

As curvas obtidas podem apresentar-se de duas formas:

- Isotermas do tipo A: Os complexos que seguem esse tipo de isoterma apresentam-se como solúveis em água tendo sua solubilidade limitada à solubilidade da CD.
- Isotermas do tipo B_S : Os complexos que seguem esse tipo de isoterma apresentam-se como complexos de solubilidade limitada ou seja, a solubilidade da

molécula “convidada” aumenta até uma determinada concentração de CD. O aumento da concentração pode levar à uma redução da solubilidade.

- Isotermas do tipo B₁: Os complexos que seguem esse tipo de isoterma apresentam-se como complexos insolúveis em água, ou seja, a solubilidade é reduzida com o aumento da concentração de CD.

As concentrações do monoterpreno presente nas soluções foram calculadas utilizando-se as curvas analíticas previamente elaboradas (Anexo 1 a 4). Para os complexos de inclusão do monoterpreno com β CD, o comportamento é de acordo com a curva do tipo B₁ (Fromming *et. al.*, 1994) em que a solubilidade do monoterpreno permanece inalterada ou até que todas as moléculas sejam convertidas em complexos insolúveis em água. Diferentemente dos complexos monoterpreno- β CD, para o complexo de inclusão monoterpreno-HP- β CD a curva corresponde ao tipo A (Fromming *et. al.*, 1994), formando apenas complexos solúveis em água. (Figura 6 a 9).

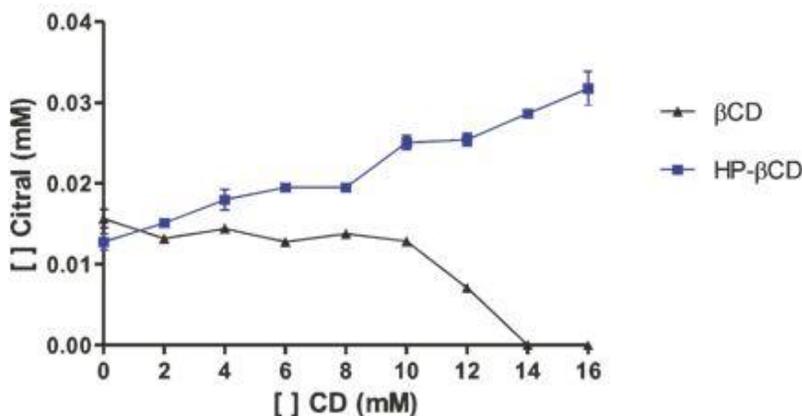


Figura 6: Diagrama de solubilidade do citral com β CD e HP- β CD após 72 horas de equilíbrio. Dados apresentados em média \pm d.p. (n=3).

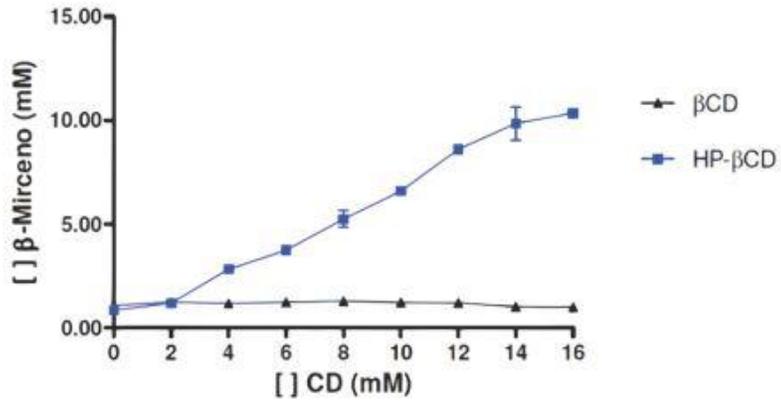


Figura 7: Diagrama de solubilidade do β -mirceno com β CD e HP- β CD após 72 horas de equilíbrio. Dados apresentados em média \pm d.p. ($n=3$).

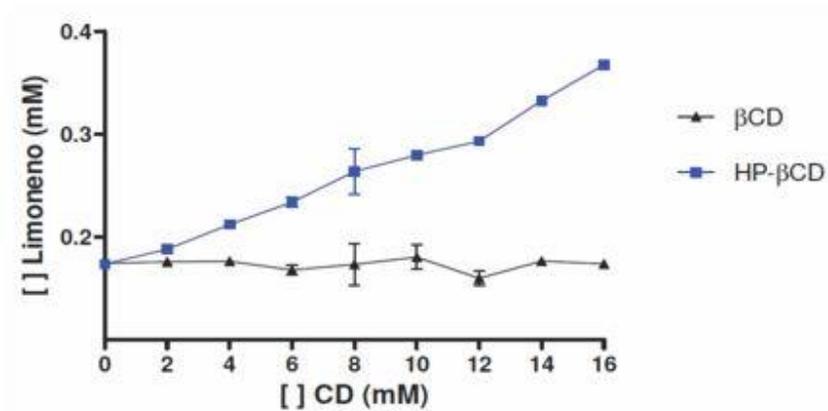


Figura 8: Diagrama de solubilidade do limoneno com β CD e HP- β CD após 72 horas de equilíbrio. Dados apresentados em média \pm d.p. ($n=3$).

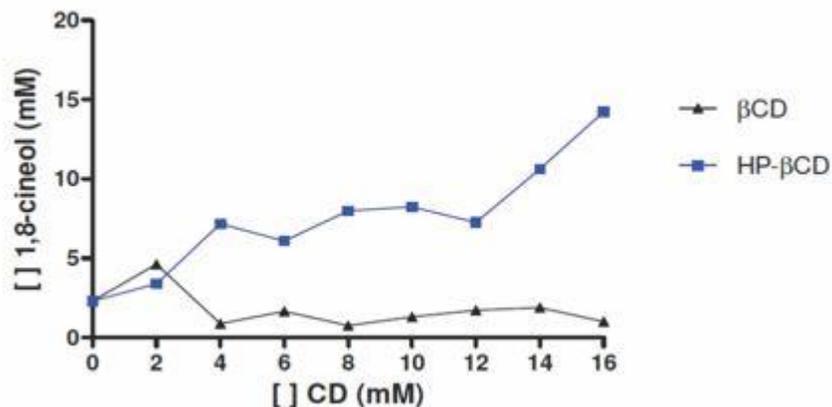


Figura 9: Diagrama de solubilidade do 1,8-cineol com β CD e HP- β CD após 72 horas de equilíbrio. Dados apresentados em média \pm d.p. (n=3).

4.3. Avaliação da porcentagem de monoterpeno presente nos complexos de inclusão

4.3.1. Eficiência do processo de extração

Após as análises individuais das frações hexânicas por CG-EM observou-se a recuperação de 86% do monoterpeno presente nos complexos de inclusão com CD na primeira extração. Os resultados mostraram que foram necessárias quatro extrações para que se esgotasse todo o analito presente nos complexos, fato evidenciado pela ausência do mesmo na quinta extração. Para a validação da metodologia analítica foi padronizada a realização de quatro extrações prévias à injeção das amostras no sistema cromatográfico. A Figura 10 mostra o perfil de extração do método aplicado.

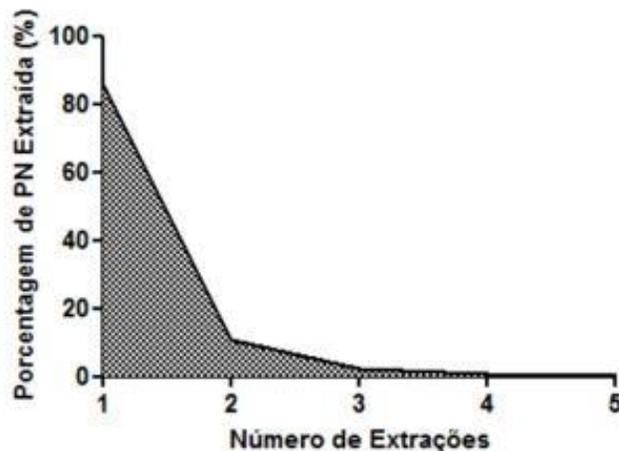


Figura 10: Porcentagem de monoterpeno extraída em relação ao número de extrações realizadas.

4.3.2. Validação de Metodologia Analítica

a) Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Analisando os cromatogramas obtidos observou-se a ausência de interferentes no tempo de retenção dos picos referentes ao analito e padrão interno octadecano (Anexo 5 a 8).

Foi avaliada, também, a pureza de pico verificada pela correlação entre os espectros de massas no começo meio e fim da eluição do pico do analito (Anexo 9 a 13). Observou-se, para cada composto, o mesmo padrão de fragmentação para os espectros de massas avaliados indicando que não existem outras substâncias co-eluído juntamente com os picos das substâncias de interesse.

A partir dos dados analisados os métodos cromatográficos foram considerados seletivos para a quantificação do citral, β -mirceno, limoneno e 1,8-cineol.

b) Intervalo e linearidade

A linearidade avalia a capacidade do método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado. Determinou-se 5 pontos de concentrações diferentes para cada monoterpeno em estudo e os resultados foram expressos de acordo com a razão obtida entre a área

correspondente ao monoterpeno e a área do padrão interno. Os dados podem ser observados nas Tabela 10 a 13. A partir desses dados avaliou-se a regressão linear. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação linear (r) é de 0,99. As curvas obtidas podem ser observadas nas Figura 11 a 14. Os valores de r obtidos para o citral, β -mirceno, limoneno e 1,8-cineol apresentaram-se dentro do critério mínimo aceitável, portanto os métodos analíticos foram considerados lineares para o intervalo especificado.

Tabela 10: Dados obtidos da curva analítica para o citral.

Ponto	Concentração (mg/mL)	Razão 1	Razão 2	Razão 3	Média
60%	0,35	6,22	6,27	6,27	6,25
80%	0,47	8,53	8,37	8,47	8,46
100%	0,59	10,75	10,85	10,81	10,80
120%	0,71	12,98	12,90	12,95	12,95
140%	0,83	15,35	15,12	15,43	15,30

Equação da Reta: $y = 19,135x - 0,5379$
 $r = 0,9999$

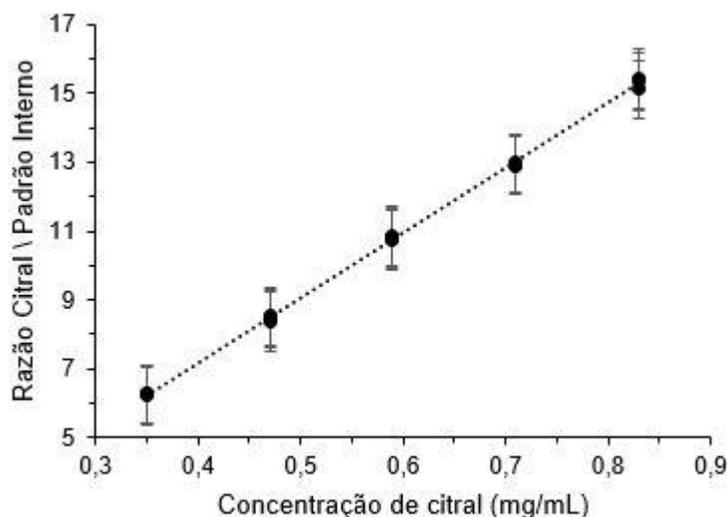


Figura 11: Linearidade do método para quantificação do citral. Análise em triplicata para cada ponto.

Tabela 11: Dados obtidos da curva analítica para o β -mirceno.

Ponto	Concentração (mg/mL)	Razão 1	Razão 2	Razão 3	Média
60%	0,14	2,23	2,15	2,21	2,20
80%	0,19	2,83	2,91	2,79	2,84
100%	0,24	3,65	3,53	3,53	3,57
120%	0,29	4,12	4,17	4,25	4,18
140%	0,34	4,87	4,76	4,91	4,85

Equação da Reta: $y = 13,831x - 0,2081$
 $r = 0,9997$

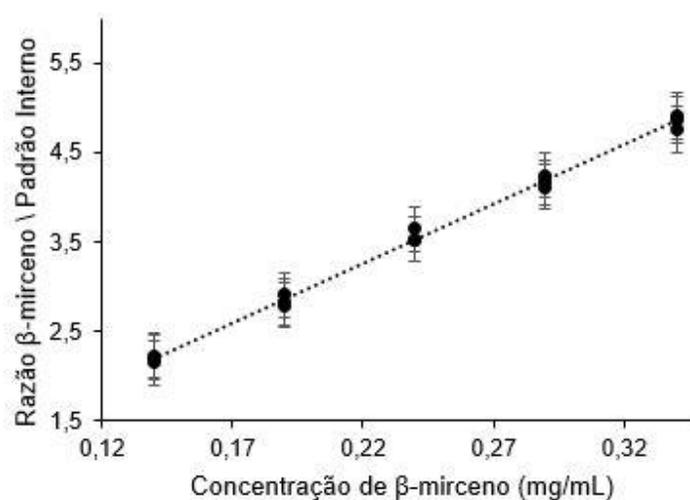


Figura 12: Linearidade do método para quantificação do β -mirceno. Análise em triplicata para cada ponto.

Tabela 12: Dados obtidos da curva analítica para o limoneno.

Ponto	Concentração (mg/mL)	Razão 1	Razão 2	Razão 3	Média
60%	0,26	2,97	2,86	2,90	2,91
80%	0,35	3,72	3,71	3,74	3,72
100%	0,43	4,90	4,85	4,81	4,85
120%	0,52	6,32	6,35	6,31	6,33
140%	0,60	7,54	7,23	7,31	7,36

Equação da Reta: $y = 13,3218x - 0,7210$
 $r = 0,9957$

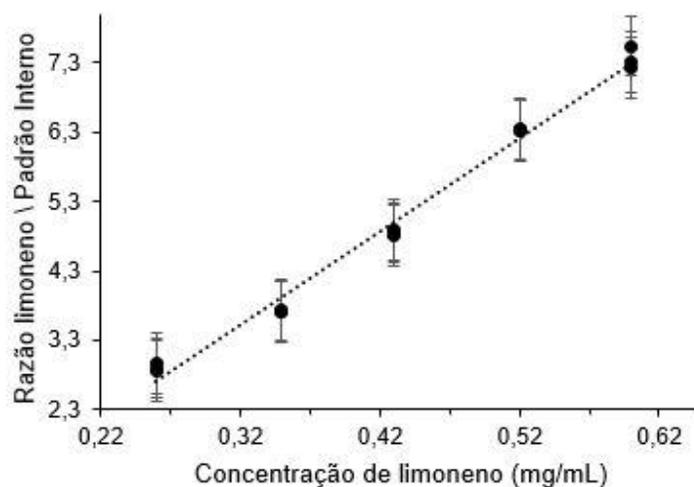


Figura 13: Linearidade do método para quantificação do limoneno. Análise em triplicata para cada ponto.

Tabela 13: Dados obtidos da curva analítica para o 1,8-cineol.

Ponto	Concentração (mg/mL)	Razão 1	Razão 2	Razão 3	Média
60%	0,26	2,37	2,39	2,40	2,39
80%	0,34	3,39	3,30	3,31	3,34
100%	0,43	4,20	4,19	4,23	4,21
120%	0,51	4,88	4,89	4,96	4,91
140%	0,60	5,89	5,87	5,89	5,88

Equação da Reta: $y = 10,0352x - 0,1290$

$r = 0,9988$

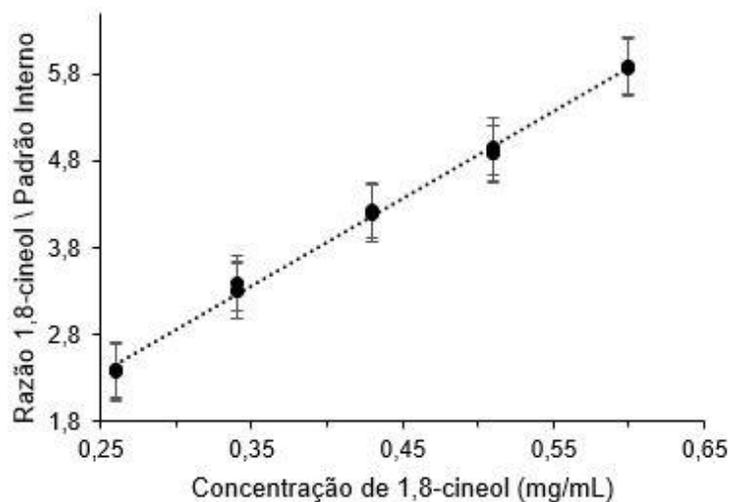


Figura 14: Linearidade do método para quantificação do 1,8-cineol. Análise em triplicata para cada ponto.

c) Precisão

É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: precisão intracorrida (repetibilidade), precisão intercorridas e precisão interlaboratorial (reprodutibilidade). Para a quantificação dos monoterpenos em estudo a precisão foi determinada através dos testes de precisão intracorrida e precisão intercorrida. A precisão intracorrida avalia a repetibilidade do método analítico medindo a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste).

A precisão intercorrida determina a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, realizando as determinações em dias diferentes (mínimo dois dias diferentes) e/ou com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. A precisão foi realizada em 3 dias diferentes utilizando no primeiro dia os resultados obtidos em condições de repetibilidade ($n = 6$) e nos outros dias análises em triplicata, totalizando 12 determinações.

Os resultados da precisão foram expressos (Tabela 14 a 17) como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), não sendo admitidos valores superiores a 5%. Foi realizado o teste F para a comparação dos resultados das 12 determinações. Os coeficientes de variação obtidos na análise das replicatas dos complexos de inclusão monoterpeno/CD foram inferiores a 5% e valores de F calculados menores que o tabelado

mostrando que a diferença entre os resultados obtidos não é significativa e que os métodos analíticos utilizados para a quantificação dos monoterpênos são precisos.

Tabela 14: Resultados da precisão intra e intercorrida para os complexos de inclusão citral/CD.

Ensaio	Amostra	Massa (mg)	Razão Citral/padrão Interno	% Inclusão em βCD
Dia 1	1	20,00	5,66	74,42
	2	20,60	5,92	75,31
	3	20,10	5,92	77,17
	4	21,60	6,32	76,45
	5	25,40	7,49	76,57
	6	21,70	6,52	78,48
Média (n=6): 76,40% Desvio padrão: 1,42 CV: 1,90%				
Dia 2	1	21,50	6,95	77,24
	2	20,90	6,75	77,27
	3	21,70	6,99	76,93
Dia 3	1	25,20	7,36	75,82
	2	21,30	6,12	75,28
	3	25,40	7,35	75,20
Média (n=12) 76,34% Desvio padrão: 1,16 CV: 1,52% Teste F: 2,14 < 5,05				
Teste F realizado a 95% de confiança. Valor calculado menor que valor tabelado indica que a diferença entre os valores obtidos nas precisão não é significativa				

Tabela 15: Resultados da precisão intra e intercorrida para os complexos de inclusão β -mirceno/CD.

Ensaio	Amostra	Massa (mg)	Razão β -mirceno/padrão Interno	% Inclusão em β CD
Dia 1	1	12,30	3,79	94,79
	2	11,50	3,48	92,64
	3	10,00	3,12	94,88
	4	10,10	3,11	93,50
	5	10,50	3,27	94,94
	6	10,00	2,99	90,75
Média (n=6): 93,58% Desvio padrão: 1,67 CV: 1,80%				
Dia 2	1	10,80	4,22	96,13
	2	10,30	3,97	95,30
	3	10,40	4,12	97,65
Dia 3	1	10,90	3,58	94,34
	2	11,20	3,61	92,64
	3	12,10	3,92	92,42
Média (n=12) 94,17% Desvio padrão: 1,87 CV: 1,99% Teste F: 1,49 < 5,05				
<p>Teste F realizado a 95% de confiança. Valor calculado menor que valor tabelado indica que a diferença entre os valores obtidos nas precisão não é significativa</p>				

Tabela 16: Resultados da precisão intra e intercorrida para os complexos de inclusão limoneno/CD.

Ensaio	Amostra	Massa (mg)	Razão limoneno/padrão Interno	% Inclusão em βCD
Dia 1	1	23,30	5,12	77,81
	2	21,40	4,39	74,12
	3	20,40	4,22	75,17
	4	20,70	4,28	74,98
	5	19,00	3,98	76,79
	6	20,50	4,34	76,62
Média (n=6): 75,92% Desvio padrão: 1,28 CV: 1,81				
Dia 2	1	22,00	5,94	73,63
	2	19,90	5,29	71,26
	3	19,60	5,32	72,83
Dia 3	1	20,50	5,44	71,45
	2	21,30	6,02	77,22
	3	21,60	5,98	75,57
Média (n=12) 74,79% Desvio padrão: 2,18 CV: 2,92% Teste F: 2,92 < 5,05				
<p>Teste F realizado a 95% de confiança. Valor calculado menor que valor tabelado indica que a diferença entre os valores obtidos nas precisão não é significativa</p>				

Tabela 17: Resultados da precisão intra e intercorrida para os complexos de inclusão 1,8-cineol/CD.

Ensaio	Amostra	Massa (mg)	Razão 1,8-cineol/padrão Interno	% Inclusão em β CD
Dia 1	1	20,70	4,03	78,21
	2	21,70	4,31	79,63
	3	20,90	4,26	81,74
	4	22,20	4,32	78,01
	5	20,20	4,02	79,95
	6	19,90	3,97	80,18
Média (n=6): 79,62% Desvio padrão: 1,38 CV: 1,73%				
Dia 2	1	20,20	3,92	78,03
	2	20,50	4,12	80,68
	3	20,70	4,11	79,71
Dia 3	1	22,40	4,53	80,96
	2	24,20	5,07	83,63
	3	20,20	4,10	81,49
Média (n=12) 94,17% Desvio padrão: 1,67 CV: 2,01% Teste F: 1,83 < 5,05				

Teste F realizado a 95% de confiança. Valor calculado menor que valor tabelado indica que a diferença entre os valores obtidos nas precisão não é significativa

d) Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis, tais como: a utilização de material de referência, comparação dos resultados obtidos com

aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, pelo método de adição de padrão ou pelo teste de recuperação.

O teste de recuperação é o mais simples de ser aplicado quando se tem disponibilidade de um branco da matriz. O resultado é expresso pela porcentagem de recuperação, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{C_{\text{encontrada}} \times 100}{C_{\text{adicionada}}}$$

Onde, **C encontrada** corresponde à concentração encontrada do analito na amostra fortificada e **C adicionada** corresponde à concentração adicionada do analito na amostra fortificada.

Os resultados obtidos podem ser observados nas

Tabela 18 a 21. Os métodos utilizados mostraram-se exatos, pois os valores das médias da porcentagem de recuperação encontram-se dentro dos parâmetros especificados (80 a 120%).

Tabela 18: Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método para quantificação do monoterpeno citral.

Amostra	Vol. Sol. Estoque (mL)	[] teórica (mg/mL)	Razão Citral/Padrão Interno	[] obtida (mg/mL)	Recuperação (%)
1			4,82	0,30	96,92
2	0,3	0,31	4,76	0,29	95,85
3			4,73	0,29	95,28
4			8,06	0,49	94,90
5	0,5	0,52	8,11	0,49	95,54
6			8,29	0,51	97,57
7			11,72	0,71	97,46
8	0,7	0,73	11,87	0,72	98,72
9			11,88	0,72	98,78
				Média:	96,78%

Tabela 19: Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método para quantificação do monoterpeno β -mirceno.

Amostra	Vol. Sol. Estoque (mL)	[] teórica (mg/mL)	Razão β -mirceno/Padrão Interno	[] obtida (mg/mL)	Recuperação (%)
1			2,25	0,15	102,49
2	0,3	0,14	2,29	0,15	104,29
3			2,20	0,14	98,99
4			3,39	0,23	95,78
5	0,5	0,24	3,21	0,22	90,50
6			3,22	0,22	90,74
7			4,75	0,33	97,76
8	0,7	0,34	4,76	0,33	97,86
9			4,60	0,31	94,64
				Média:	97,01%

Tabela 20: Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método para quantificação do monoterpeno limoneno.

Amostra	Vol. Sol. Estoque (mL)	[] teórica (mg/mL)	Razão limoneno/Padrão Interno	[] obtida (mg/mL)	Recuperação (%)
1			3,62	0,26	83,96
2	0,3	0,26	3,68	0,26	85,69
3			3,67	0,26	85,40
4			6,13	0,41	94,00
5	0,5	0,43	6,11	0,41	93,66
6			6,10	0,41	93,48
7			8,47	0,60	96,18
8	0,7	0,60	8,59	0,61	97,67
9			8,57	0,61	97,42
				Média:	91,94%

Tabela 21: Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método para quantificação do monoterpeneo 1,8-cineol.

Amostra	Vol. Sol. Estoque (mL)	[] teórica (mg/mL)	Razão 1,8-cineol/Padrão Interno	[] obtida (mg/mL)	Recuperação (%)
1	0,3	0,26	2,38	0,25	97,82
2			2,34	0,25	96,26
3			2,37	0,25	97,43
4	0,5	0,43	3,98	0,41	96,12
5			4,08	0,42	98,46
6			4,12	0,42	99,39
7	0,7	0,60	5,73	0,58	97,89
8			5,67	0,58	96,89
9			5,79	0,59	98,90
				Média:	97,68%

e) Robustez

A robustez é a medida da capacidade do método analítico em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, indicando confiança durante seu uso normal. A robustez do método é avaliada através de parâmetros modificados e a respectiva determinação do seu efeito (se houver) sobre os resultados a serem obtidos com a metodologia.

As respostas de cada experimento foram processadas no *software Statistica10* e os efeitos das variáveis principais e das interações dos fatores 2 a 2 foram avaliadas a 99% de confiança ($p=0,01$) e erro puro.



Figura 15: Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis estudadas para o citral a 99% de confiança.

Na Figura 15 observa-se os resultados da robustez do método para quantificação do monoterpeno citral. A linha vermelha no gráfico representa o valor de 2,7180 correspondente ao valor de t de *student* tabelado a 99% de confiança. Os valores de t obtidos para os efeitos principais e para a interação dos efeitos 2 a 2 são menores, em módulo, que o valor de t tabelado, mostrando que os efeitos não são significativos, portanto, o método pode ser considerado robusto. A mesma análise foi realizada para os métodos analíticos para quantificação dos monoterpenos β -mirceno, limoneno e 1,8-cineol. Analogamente à discussão para o método do citral, os resultados obtidos mostram que os efeitos não são significativos e os métodos podem ser considerados robustos. Os gráficos de Pareto para os demais monoterpenos podem ser observados nas Figura 16 a 18.



Figura 16: Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis estudadas para o β -mirceno a 99% de confiança.

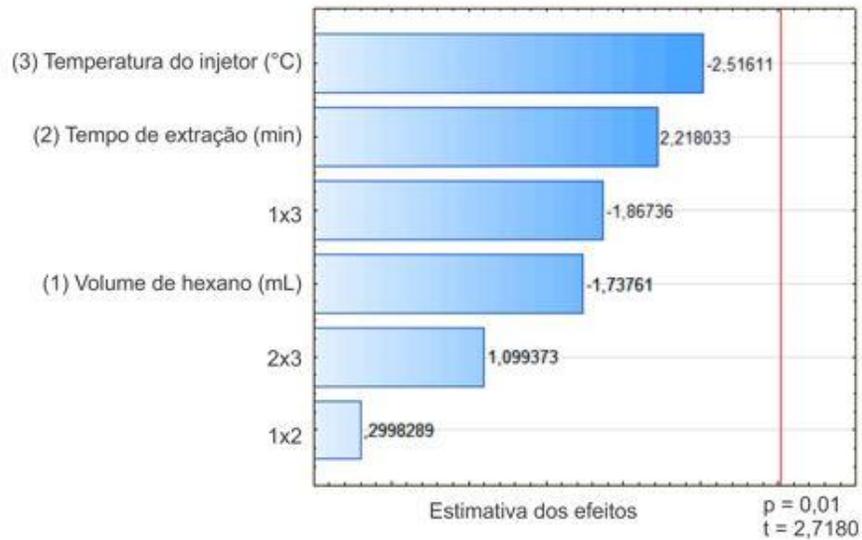


Figura 17: Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis estudadas para o limoneno a 99% de confiança.

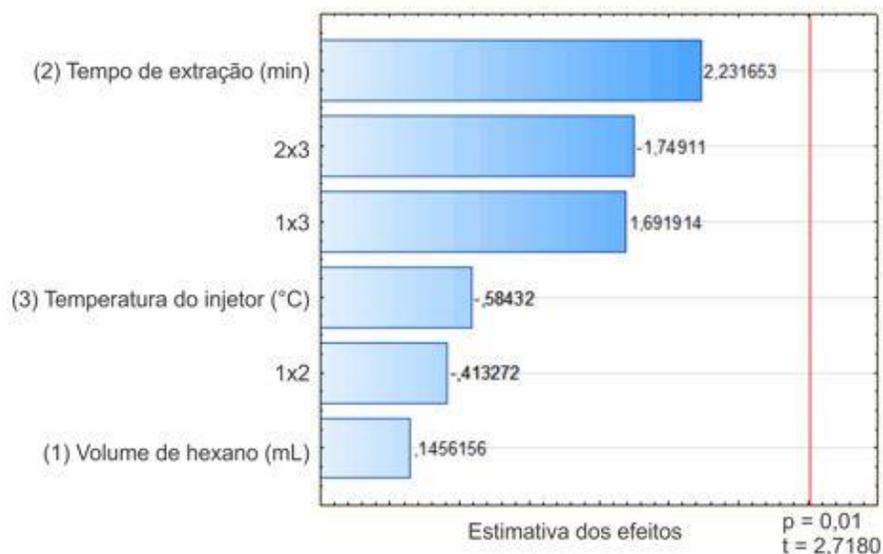


Figura 18: Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis estudadas para o 1,8-cineol a 99% de confiança

4.3.3. Porcentagem de inclusão

Após validação de metodologia analítica, realizou-se a quantificação dos monoterpenos presentes nos complexos de inclusão em β CD e HP- β CD. Os resultados podem ser observados nas Tabela 22 a 25.

Tabela 22: Porcentagem de citral presente nos complexos de inclusão em β CD e HP- β CD. Análise em triplicata e resultados expressos em termos de média e CV.

Amostra	Massa de complexo (mg)	Massa de monoterpeno (mg) (teórica)	Massa de monoterpeno (mg) (experimental)	% de inclusão
Citral/ β CD Rendimento: 75,0%	20,40	2,95	2,35	79,78
	20,70	2,99	2,35	78,64
	20,90	3,02	2,39	79,37
			Média:	79,26
			CV (%):	0,73
Citral/HP- β CD Rendimento: 78,4%	36,10	3,63	1,49	41,03
	36,80	3,70	1,51	40,93
	37,50	3,77	1,53	40,73
			Média:	40,90
			CV (%):	0,39

Tabela 23: Porcentagem de β -mirceno presente nos complexos de inclusão em β CD e HP- β CD. Análise em triplicata e resultados expressos em termos de média e CV.

Amostra	Massa de complexo (mg)	Massa de monoterpeno (mg) (teórica)	Massa de monoterpeno (mg) (experimental)	% de inclusão
β -mirceno/ β CD Rendimento: 73,7%	12,30	1,36	1,29	94,79
	10,00	1,11	1,05	94,88
	10,50	1,17	1,11	94,94
			Média:	94,87
			CV (%):	0,08
β -mirceno/HP- β CD Rendimento: 66,7%	39,50	4,68	0,15	3,11
	37,70	4,47	0,13	3,02
	37,50	4,45	0,14	3,10
			Média:	3,07
			CV (%):	1,69

Tabela 24: Porcentagem de limoneno presente nos complexos de inclusão em β CD e HP- β CD. Análise em triplicata e resultados expressos em termos de média e CV.

Amostra	Massa de complexo (mg)	Massa de monoterpeno (mg) (teórica)	Massa de monoterpeno (mg) (experimental)	% de inclusão
Limoneno/ β CD Rendimento: 70,2%	21,40	2,82	1,92	74,12
	20,40	2,59	1,85	75,17
	20,70	2,47	1,88	74,98
			Média:	74,76
			CV (%):	0,75
Limoneno/HP- β CD Rendimento: 69,3%	26,40	3,19	0,009	0,28
	25,80	3,12	0,009	0,28
	26,80	3,24	0,009	0,29
			Média:	0,29
			CV (%):	1,90%

Tabela 25: Porcentagem de 1,8-cineol presente nos complexos de inclusão em β CD e HP- β CD. Análise em triplicata e resultados expressos em termos de média e CV.

Amostra	Massa de complexo (mg)	Massa de monoterpeno (mg) (teórica)	Massa de monoterpeno (mg) (experimental)	% de inclusão
1,8-cineol/ β CD Rendimento: 74,1%	20,70	2,65	2,07	78,21
	21,70	2,78	2,21	79,63
	22,20	2,84	2,22	78,01
			Média:	78,62
			CV (%):	1,12
1,8-cineol/HP- β CD Rendimento: 67,1%	28,10	3,43	0,67	19,47
	29,70	3,62	0,69	18,97
	27,90	3,40	0,61	18,00
			Média:	18,82
			CV (%):	3,98

Em todos os complexos de inclusão obtidos, observa-se uma maior porcentagem de inclusão nos complexos com β CD. Essa porcentagem de inclusão pode ser explicada pelo menor impedimento estérico e maior hidrofobicidade da cavidade da β CD. Já nos complexos de inclusão com HP- β CD compostos mais apolares (β -mirceno e limoneno) praticamente não apresentam interação com a cavidade interna quando comparados com o citral e o 1,8-cineol. O maior impedimento estérico promovido pelo grupo hidroxipropil e a presença de oxigênio na molécula convidada pode explicar essa diferença na porcentagem de inclusão (Kfoury *et. al.*, 2014).

4.4. Calorimetria Diferencial de Varredura

Análises térmicas como a DSC são bastante empregadas na caracterização de complexos de inclusão em estado sólido, fornecendo resultados qualitativos e indicativos da formação do complexo de inclusão. Os resultados são apresentados como termogramas indicando a diferença de calor absorvido nas amostras analisadas. As análises das CDs em sua forma pura, do monoterpeneo citral e dos complexos de inclusão citral- β CD e citral-HP- β CD podem ser observadas na Figura 19.

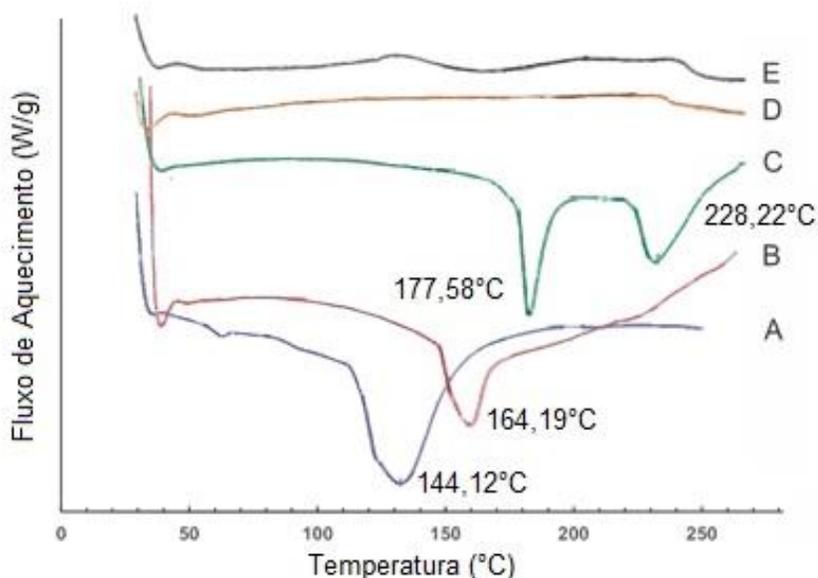


Figura 19: Termogramas de DSC para β CD (A); HP- β CD (B); citral (C) e complexo de inclusão citral- β CD (D) e complexo de inclusão citral-HP- β CD (E)

De um modo geral, CDs podem ser adquiridas com diferentes graus de hidratação que variam de acordo com a forma de acondicionamento da mesma. Essa hidratação pode ser caracterizada pela presença de água na cavidade das CDs ou ocupando espaços intersticiais. (Giodarno *et. al.* 2001).

O termograma da Figura 19A e 19B são relativos às CDs (β CD e HP- β CD) em sua forma pura. É possível observar picos em 144,1°C e 164,2°C relativos à perda de água de solvatação da cavidade da ciclodextrina.

O termograma da Figura 19C refere-se ao monoterpene citral. Pode-se observar um pico referente ao ponto de ebulição do citral em 228,2°C.

Ao analisar os termogramas das Figuras 19D e 19E, referentes aos complexos de inclusão citral- β CD e citral-HP- β CD observa-se o desaparecimento dos picos referentes à água presente na cavidade das CDs bem como o pico referente ao ponto de ebulição do citral. Esse fato pode indicar a inclusão do monoterpene na cavidade das CDs, levando a substituição da água de hidratação e estabilização do monoterpene citral, uma vez que houve um aumento do ponto de ebulição do citral. (Fromming *et. al.* 1994).

4.5. Microscopia eletrônica de varredura

Ao analisar os complexos de inclusão dos monoterpenos em CD e suas respectivas misturas físicas individualmente, não se observaram diferenças significativas entre as amostras. Na discussão a seguir serão apresentados, a título de exemplo, os resultados obtidos para os complexos de inclusão citral/CD. Os resultados de MEV para os demais monoterpenos estudados podem ser observadas nos Anexo 14 a 16 e apresentaram partículas com resultados similares aos discutidos a seguir para o citral.

As análises de MEV das ciclodextrinas puras de β CD e HP- β CD mostraram cristais retangulares de tamanho entre 70 e 90 μ m (Figura 20A) e esféricos de diâmetro entre 50 e 100 μ m respectivamente (Figura 20B).

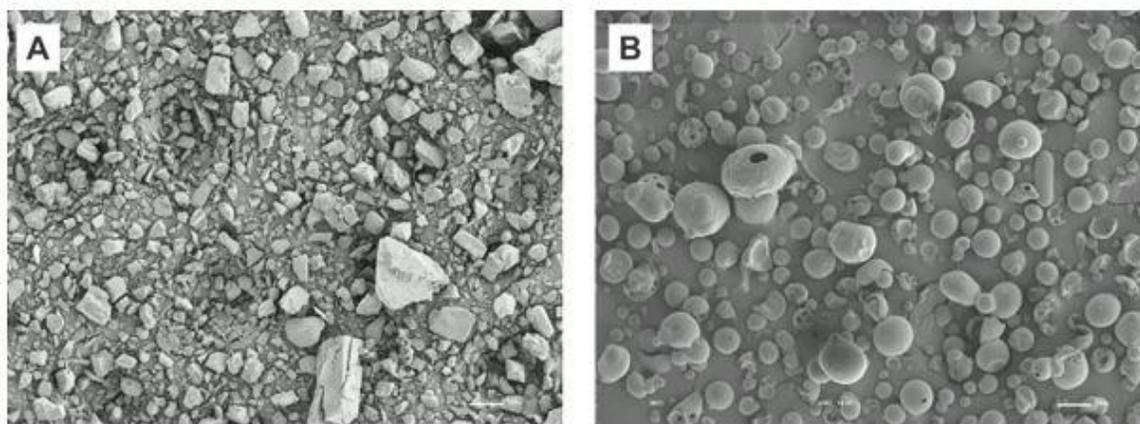


Figura 20: (A) CD em sua forma pura. Aumento de 100x (B) HP- β CD em sua forma pura. Aumento de 100x

Com relação às misturas físicas citral/ β CD e citral/HP- β CD pode ser observado a formação de aglomerados com os cristais da β CD e HP- β CD de formato irregular, porém, conservando-se a morfologia das CDs em sua forma pura.

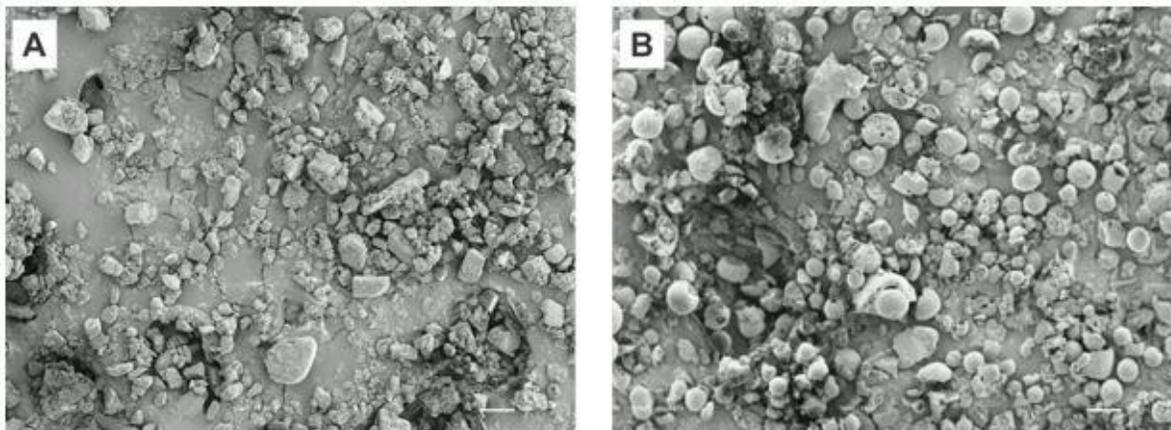


Figura 21: (A) Mistura física citral/ β CD (1:1, m/m). Aumento de 100x. (B) Mistura física citral/HP- β CD (1:1, m/m). Aumento de 100x

Durante a otimização da metodologia analítica, dois métodos de secagem (por precipitação e por atomização em *spray dryer*) foram avaliados para o citral. As partículas obtidas por precipitação do complexo de inclusão citral/ β CD também foram avaliadas por MEV. Nos complexos preparados pelo método de precipitação pode se observar a formação de partículas de tamanhos menores (10 a 20 μ m) e não uniformes ocorrendo, também, a perda da estrutura da β CD pura.

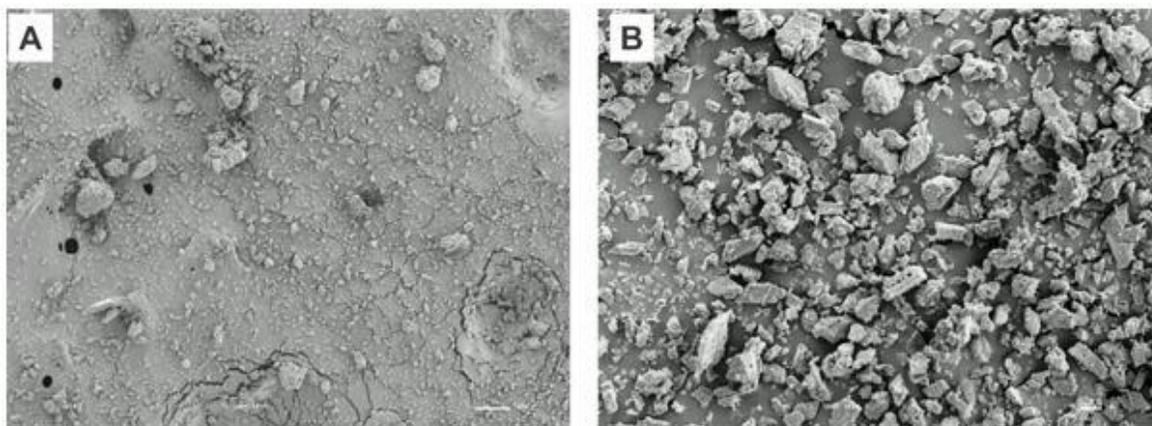


Figura 22: Complexo citral/ β CD obtido pelo método de precipitação. (A) Aumento de 100x (B) Aumento de 500x

A interação dos monoterpenos com HP- β CD promoveu a formação de complexos de inclusão solúveis em solução aquosa dificultando a obtenção desses complexos pelo método de precipitação sendo preparados adequadamente somente pelo método de atomização.

Nos complexos preparados pelo método de atomização observou-se a formação de partículas de tamanhos menores (1 a 5 μ m) e de morfologia uniforme alterando a estrutura pura tanto para a β CD como para a HP- β CD embora ainda apareça alguns cristais maiores (70-80 μ m) e de formato irregular nos complexos com β CD. Através das imagens de microscopia eletrônica pode-se afirmar que o método de secagem por atomização produz partículas de tamanho menor e mais uniformes quando comparado com o método de secagem por precipitação.

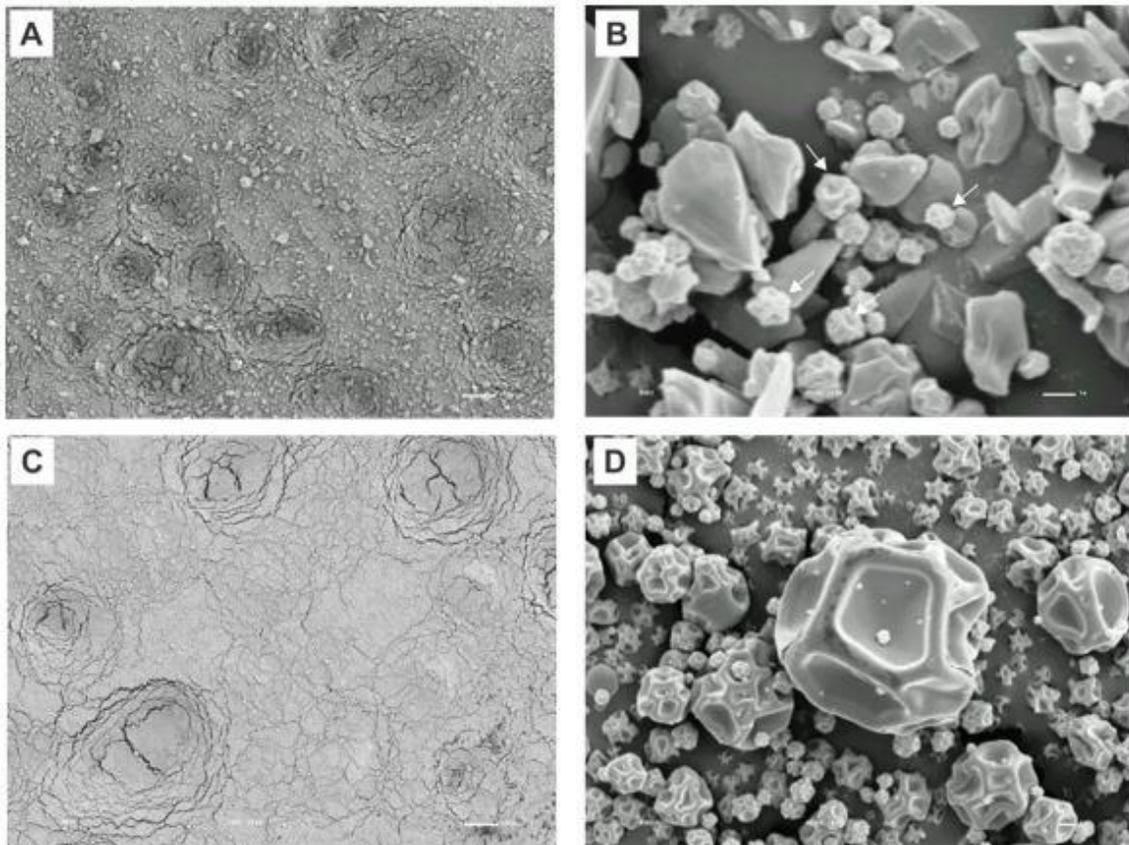


Figura 23: Complexo de inclusão citral/ β CD obtido pelo método de atomização. (A) Aumento de 100x (B) Aumento de 8000x. Complexo de inclusão citral/HP- β CD obtido pelo método de atomização (C) Aumento de 100x (D) Aumento de 4000x

4.6. Avaliação da atividade biológica in vitro

4.6.1. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica

Empregando-se os ensaios microbiológicos verificou-se que o monoterpene citral apresentou melhor atividade frente às cepas de bactérias e fungos quando comparado com os demais monoterpenos estudados na etapa de triagem. Observou-se, também, que, na concentração e condições experimentais empregadas, o monoterpene 1,8-cineol não apresentou atividade biológica frente às cepas indicadoras de bactérias e fungos investigadas. Os resultados podem ser observados na Tabela 26. O monoterpene citral apresentou atividade sobre as bactérias Gram-positivas e as leveduras avaliadas. A concentração inibitória mínima (CIM) obtida para este monoterpene frente *S. mutans* (ATCC 25175) foi de 1% (0,12µL/mL = 100µg/mL), 0,14µL/mL = 120µg/mL para *S. aureus* (ATCC 14458) e 0,09µL/mL = 75,0µg/mL para as cepas de *Candida* estudadas.

Para as demais etapas previstas neste estudo (avaliação da formação do biofilme bacteriano dos complexos de inclusão monoterpene-CD e da formulação de enxaguante bucal contendo o monoterpene ativo) o monoterpene escolhido foi o citral, pois apresentou melhor atividade antimicrobiana (CBM da ordem de 2,5µL/mL = 2250µg/mL e CIM na ordem de 0,12µL/mL = 100µg/mL) para a indicadora *S. mutans* (ATCC 25175).

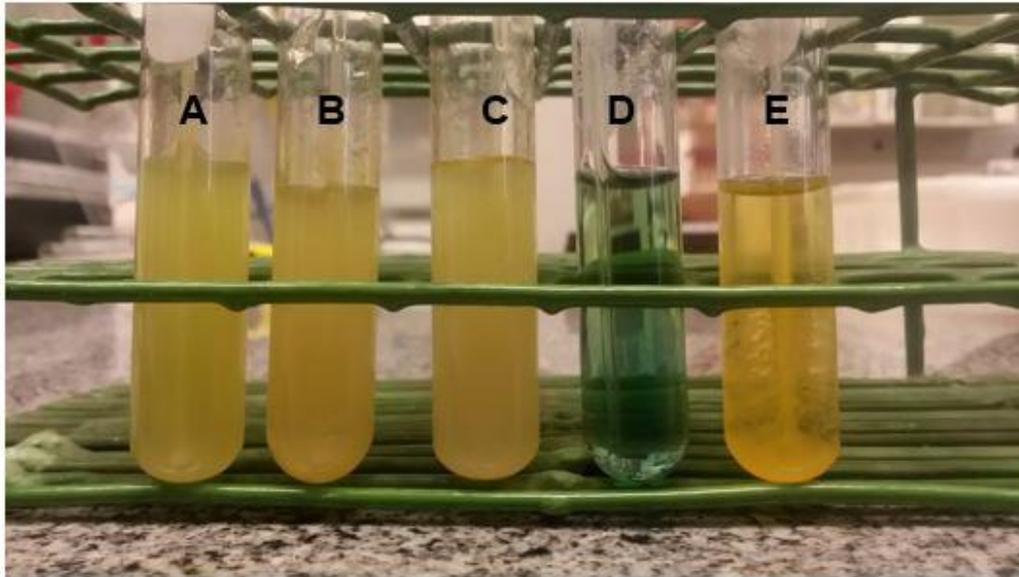
Tabela 26: Atividade antimicrobiana para os monoterpenos citral, β -mirceno, limoneno e 1,8-cineol frente às cepas indicadoras de bactérias e fungos.

Cepa indicadora	CBM ($\mu\text{L}/\text{mL}$)*			
	Citral	β -mirceno	Limoneno	1,8-cineol
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	10,0	2,5	20,0	Resistente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1,25	10,0	Resistente	Resistente
<i>Echerichia coli</i> (ATCC 10538)	0,625	10,0	20,0	Resistente
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	2,5	Resistente	Resistente	Resistente
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	1,25	20,0	20,0	Resistente
<i>Candida dubliniensis</i> (ATCC 777157)	0,625	20,0	20,0	Resistente
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 157)	0,625	2,5	10	Resistente
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	1,25	20,0	20,0	Resistente

* Resultados expressos em termos de concentração biocida mínima (CBM) em $\mu\text{L}/\text{mL}$ como média de análise em triplicata de cada diluição. ^aResistente = efeito antimicrobiano não observado até a maior concentração estudada de 20,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Controle positivo: Bacitracina 200UI/mL para bactérias e cetoconazol 5mg/mL para fungos. Controle negativo:propilenoglicol:água esterilizada (1:19, v/v).

4.6.2. Avaliação da formação do biofilme bacteriano

A avaliação da formação do biofilme bacteriano foi realizada com o monoterpeno citral isolado e complexado com βCD e HP- βCD . Foram preparadas três amostras nas concentrações CBM/2; CBM e 2CBM. A formação do biofilme de *S. mutans* (ATCC 25175) foi avaliada de forma visual em corpo de prova de vidro.



*Figura 24: Efeito do monoterpeno citral e amostras controle na formação de placa bacteriana frente a indicadora *S. mutans* (ATCC 25175). Monoterpeno citral nas concentrações CBM/2 (A); CBM (B) e 2CBM (C). Controle positivo: Clorexidina 0,12% (D) e Controle negativo: Água destilada estéril (E) CBM citral = 2,5 μ L/mL*

Nas Figuras 24A, 24B e 24C, apesar da turbidez presente nos tubos de ensaio, observou-se a ausência de formação de biofilme bacteriano no corpo de prova. A turbidez pode ser explicada pela baixa solubilidade em água do monoterpeno citral. A presença do biofilme pode ser observada na Figura 24E que corresponde ao controle negativo promovendo o crescimento bacteriano no período estudado. No tubo contendo controle positivo (Figura 24D) observou-se uma solução límpida e ausência de formação de biofilme no corpo de prova.

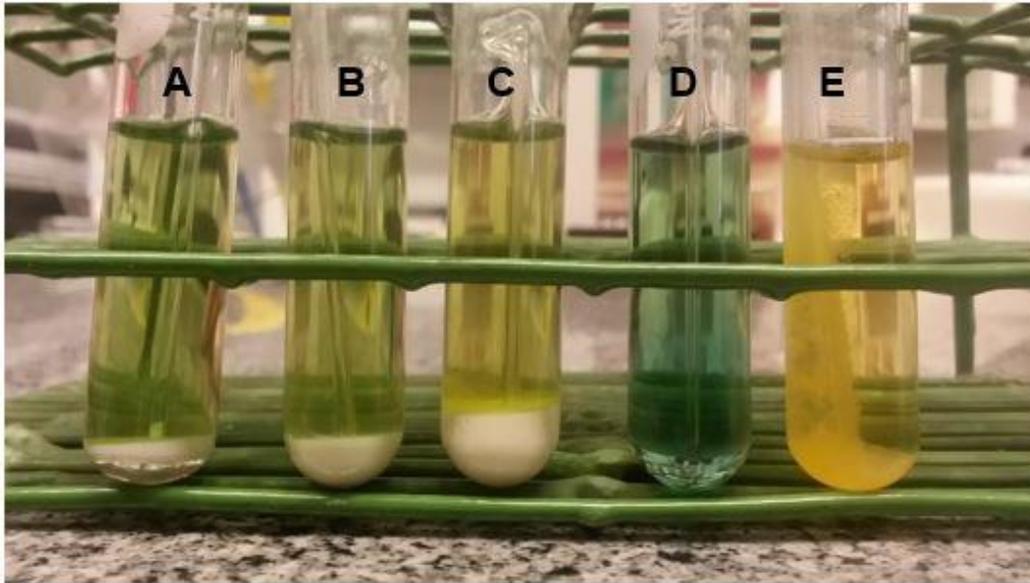


Figura 25: Efeito do complexo de inclusão monoterpeneo citral- β CD e amostras controle na formação de placa bacteriana frente a indicadora *S. mutans* (ATCC 25175). Complexo de inclusão citral- β CD nas concentrações CBM/2 (A); CBM (B) e 2CBM (C). Controle positivo: Clorexidina 0,12% (D) e Controle negativo: Água destilada estéril (E) CBM citral = 2,5 μ L/mL

Apesar de observar-se a presença de um precipitado branco característico da baixa solubilidade da β CD, a liberação do citral na solução contendo o micro-organismo *S. mutans* promoveu uma atividade antimicrobiana nas três concentrações avaliadas, fato evidenciado pela ausência da formação de biofilme quando comparados com os controles positivo e negativo (Figura 25).

O mesmo pôde ser observado ao avaliar os complexos de inclusão citral-HP β CD. Ocorreu a inibição da formação do biofilme bacteriano nas três concentrações avaliadas, além de se obter uma solução límpida e sem precipitado, característico do aumento da solubilidade em água do monoterpeneo citral quando complexado com HP- β CD. (Figura 26).

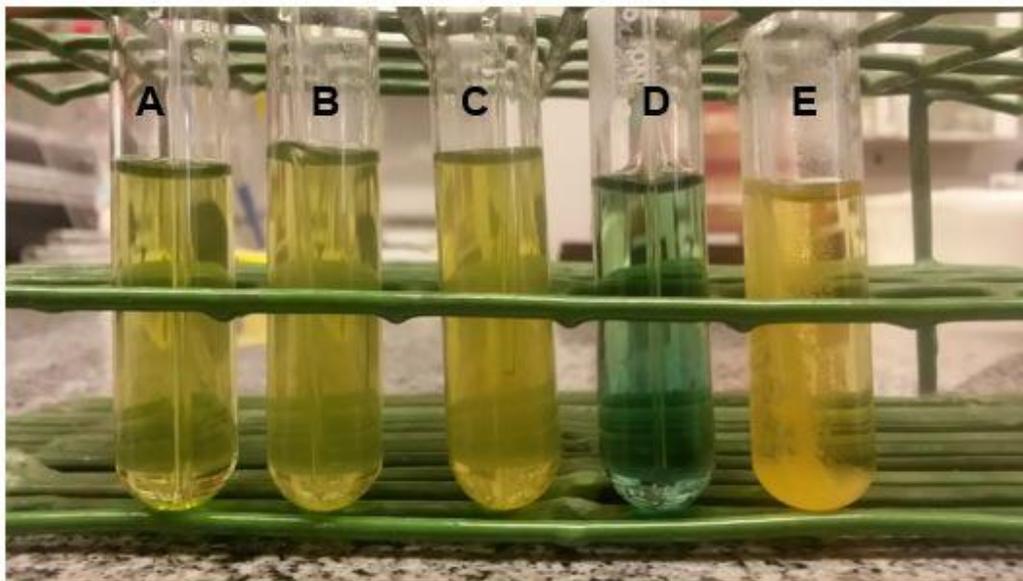


Figura 26: Efeito do complexo de inclusão monoterpeno citral-HP β CD e amostras controle na formação de placa bacteriana frente a indicadora *S. mutans* (ATCC 25175). Complexo de inclusão citral-HP β CD nas concentrações CBM/2 (A); CBM (B) e 2CBM (C). Controle positivo: Clorexidina 0,12% (D) e Controle negativo: Água destilada estéril (E).
CBM citral = 2,5 μ L/mL

De modo geral, o monoterpeno citral nas concentrações CBM/2, CBM e 2CBM e complexado ou não com CDs, apresenta atividade frente a formação de biofilme bacteriano do microrganismo *S. mutans* (ATCC 25175), sendo o complexo de inclusão citral-HP β CD melhor incorporado em soluções aquosas sem alterar a atividade biológica do monoterpeno citral.

Formulações de enxaguante bucal contendo o monoterpeno citral também foram submetidas à avaliação da atividade antibiofilme. Nesse estudo constatou-se que na presença do monoterpeno citral bem como de seus complexos de inclusão em β CD e HP- β CD na CBM/2 em formulação de enxaguante bucal, também não se observou macroscopicamente aderência de bactérias no corpo de prova e os resultados foram confirmados por microscopia eletrônica de varredura e por análise microbiológica dos corpos de prova pela contagem de UFC/mL (Tabela 27).

Formulações contendo o monoterpeno citral foram avaliadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Fitofarmacêutica e Bioensaios do DBV/IB/UNICAMP e verificou-se que não houve crescimento microbiano, o que indica que nessa concentração o

produto é bactericida. Já os resultados das formulações controle (branco) indicaram que o conservante pode estar agindo como coadjuvante frente a cepa indicadora estudada pois mesmo na ausência de citral o produto com conservante reduziu o número de colônias passando de 100 mil (controle sem conservante) para 132 colônias (controle com conservante), entretanto quando o corpo de prova foi analisado pro MEV estas formulações controle não inibiram a formação da placa bacteriana. Os resultados podem ser observados na Tabela 27.

Tabela 27: Avaliação do efeito na formação de biofilme bacteriano e da atividade antibacteriana do monoterpeno citral e da formulação contendo o monoterpeno citral.

Amostras	Avaliação Microscópica da formação de placa por MEV (aderência)	Contagem de UFC/mL	Interpretação frente ao microrganismo
Monoterpeno citral, CBM/2	–	0	Bactericida
OEC1:Formulação com conservante + citral, CBM/2	–	0	Bactericida
OES1:Formulação com conservante + citral, CBM/2	–	0	Bactericida
CDC1:Formulação com conservante + citral-βCD, CBM/2	–	0	Bactericida
HPC1:Formulação com conservante + citral-HP-βCD, CBM/2	–	0	Bactericida
BC: Formulação Controle Branco com conservante	+	132	Bacteriostático
BS: Formulação Controle Branco sem conservante	+	> 10 ⁵	Sem efeito antimicrobiano
Controle negativo Água destilada esterilizada	+	> 10 ⁵	Sem efeito inibitório

*–: ausência de aderência bacteriana; + presença de aderência bacteriana. CBM citral = 2,5µL/mL

A atividade antibacteriana do monoterpeno citral sozinho do seu complexo de inclusão em CD (β CD e HP β CD) e dos enxaguantes bucais formulados também foi avaliada pelo método de difusão em ágar frente à cepa de *S. mutans* (ATCC 25175). Os resultados podem ser observados na Tabela 28.

Os maiores halos de inibição podem ser observados nos controles positivos (cital 25mm e clorexidina 34mm). Os enxaguantes bucais presentes atualmente no mercado apresentam em sua formulação a clorexidina sendo um antimicrobiano eficiente no combate ao *S. mutans* (ATCC 25175).

Apesar de não se observar diferenças significativas, as formulações que apresentaram melhores resultados frente à inibição do crescimento do *S. mutans* (ATCC 25175) foram aquelas contendo o monoterpeno citral complexado com HP- β CD. Esse fato pode ser explicado pelo aumento da solubilidade do citral em água e de sua estabilidade química (volatilidade) podendo otimizar a atividade antibacteriana desse monoterpeno.

Tabela 28: Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar (técnica do poço em camada dupla) das formulações de enxaguante bucal estudadas frente a indicadora Streptococcus mutans (ATCC 25175).

Amostra	Diâmetro dos halos de inibição (mm)
Citral 100%	25
Citral CBM/2	-
Clorexidina 0,12%	34
Diluyente	-
BS	-
BC	-
OES1	16
OEC1	15
OES2	15
OEC2	16
CDS1	16
CDC1	17
CDS2	17
CDC2	17
HPS1	18
HPC1	18
HPS2	18
HPC2	18

*: Resultados expressos em termos de diâmetro (halo) de inibição do desenvolvimento microbiano, em milímetros. -: efeito antimicrobiano não observado. Amostras: citral 100%; citral na CBM/2; BS: Formulação sem princípio ativo e sem conservante, BC: Formulação sem princípio ativo e com conservante, OES1: Formulação contendo citral na CBM/2 e sem conservante, OEC1: Formulação contendo citral na CBM/2 e com conservante, OES2: Formulação contendo citral na CBM e sem conservante, OEC2: Formulação contendo citral na CBM e com conservante, CDS1: Formulação contendo o complexo citral-βCD na CBM/2 e sem conservante, CDC1: Formulação contendo o complexo citral-βCD na CBM/2 e com conservante, CDS2: Formulação contendo o complexo citral-βCD na CBM e sem conservante, CDC2: Formulação contendo o complexo citral-βCD na CBM e com conservante, HPS1: Formulação contendo o complexo citral-HPβCD na CBM/2 e sem conservante, HPC1: Formulação contendo o complexo citral-HPβCD na CBM/2 e com conservante, HPS2: Formulação contendo o complexo citral-HPβCD na CBM e sem conservante, HPC2: Formulação contendo o complexo citral-HPβCD na CBM e com conservante. CBM citral = 2,5µL/mL

4.7. Avaliação da citotoxicidade em cultura de células

A avaliação da citotoxicidade para o citral foi realizada em estudos anteriores pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Fitofarmacêutica e Bioensaios do DBV/IB/UNICAMP. Os resultados indicam que o para o citral a 250µg/mL= 0,28µL/mL (concentração 2,3 vezes maior que a CIM do citral para a cepa indicadora de *S. mutans* ATCC 15175) apresenta baixa citotoxicidade frente à cultura de queratinócitos humanos (HaCat), apresentando número de células viáveis de HaCat acima de 80% (Figura 27).

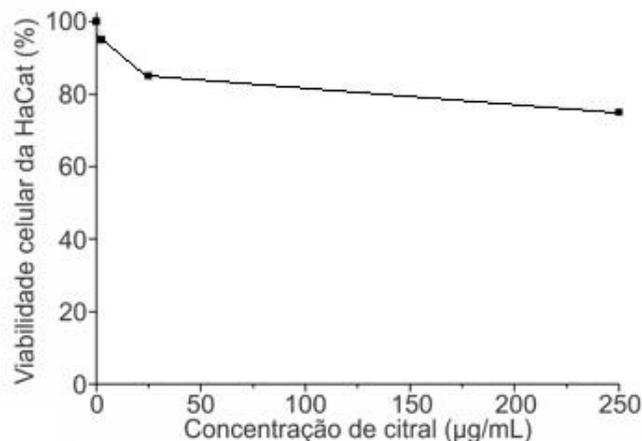


Figura 27: Efeito do citral na viabilidade de células de queratinócitos humanos (HaCat). Valores expressos como média das análises em triplicata. O CV obtido nessas análises foi menor que 5%.

Foram realizados, também, ensaios de citotoxicidade para as formulações contendo citral isolado e complexos de inclusão citral- β CD e citral-HP β CD. As amostras foram avaliadas a 250 μ g/mL. Os resultados indicam que para formulações do branco sem conservante (BS) a viabilidade celular da HaCat foi de 95,0%. Para formulações do branco com conservante (BC) a viabilidade celular foi de 80,0%. Para as formulações contendo citral (OEC1), citral- β CD (CDC1) e citral-HP β CD (HPC1) a 250 μ g/mL a viabilidade celular foi de 81,0%; 76,0% e 79,0% respectivamente indicando baixa citotoxicidade frente à cultura de queratinócitos humanos (HaCat).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitiram concluir que os monoterpenos citral, limoneno, β -mirceno e 1,8-cineol podem ser complexados em β CD e HP- β CD. Os dados destes estudos mostraram que o método de secagem por atomização promove maiores rendimentos, eficiência de complexação e partículas menores e mais uniformes quando comparado com o método de precipitação. Observou-se, também, que os monoterpenos mais hidrofóbicos (β -mirceno e limoneno) apresentaram maior afinidade pela β CD e a presença de oxigênio nas moléculas de citral e 1,8-cineol contribuiu para aumentar a

interação dessas substâncias com a HP- β CD. Analisando as isotermas de solubilidade observou-se a formação de complexos de inclusão insolúveis com β CD. Já os complexos formados com HP- β CD apresentaram-se solúveis em água mostrando que a solubilidade desses monoterpenos pode ser alterada na presença de CDs.

Análises complementares como a calorimetria diferencial de varredura dos complexos de inclusão com o monoterpeno mais promissor (cital) forneceram dados indicativos da formação dos complexos de inclusão e aumento do ponto de ebulição do citral, levando à uma maior estabilização desse monoterpeno na forma complexada quando comparado com sua forma livre.

As investigações dos efeitos antibacterianos indicam que a formulação do enxaguante bucal sem álcool contendo citral (na CBM/2) apresentou efeito antibiofilme *in vitro* no modelo experimental utilizado. Tanto no ensaio de cultivo em meio de cultura apropriado como na microscopia observou-se que a formulação evitou a formação do biofilme comparando com os controles positivo (Clorexidina 0,12%) e negativo (ensaio somente com água destilada; formulação base sem o óleo essencial e sem conservante e formulação base sem o óleo essencial e com conservante). Inicialmente verificou-se que o citral exerceu considerável atividade antibacteriana frente a indicadora *S. mutans* (ATCC 25175). Nas formulações de enxaguante bucal preparadas com citral observou-se que macroscopicamente não houve aderência a superfície sólida e no plaqueamento do caldo verificou-se que não houve crescimento microbiano, o que indica que nesta concentração o produto é bactericida. Já os resultados das formulações controle (Branco) indicaram que o conservante pode estar agindo como coadjuvante frente à cepa indicadora estudada, pois mesmo na ausência do citral (princípio ativo) o produto com conservante reduziu as colônias passando de 100 mil (formulação controle sem conservante) para 132 colônias (formulação controle com conservante). Estes resultados foram confirmados pela análise por MEV da superfície sólida do corpo de prova de vidro. Assim, os resultados mostraram atividade antibiofilme para as formulações de enxaguante bucal contendo citral frente a *S. mutans* (ATCC 25175) que é uma indicadora que se apresenta como agente importante na formação do biofilme dentário e no desenvolvimento de cáries. O enxaguante desenvolvido no presente estudo não contém álcool na sua formulação e foi formulado contendo somente citral ou citral em complexo de inclusão com β CD e HP- β CD.

O enxaguante bucal contendo o monoterpeno citral ou seus complexos de inclusão em CDs apresentaram efeito antibacteriano e baixa citotoxicidade frente a queratinócitos *in vitro*. Entretanto, estudos mais detalhados *in vitro* e *in vivo* com estas formulações e com os monoterpenos estudados e seus complexos de inclusão em CDs devem ser realizados com o objetivo de melhorar a estabilidade química, solubilidade, eficácia, o índice terapêutico e a biodisponibilidade de maneira a adequá-los para um possível emprego profilático e/ou terapêutico, tais como:

Estudos de aderência e de toxicidade

- Estudos detalhados da influência do citral e dos complexos de inclusão no mecanismo de aderência e formação do biofilme podem ser realizados com o objetivo de otimizar os efeitos das formulações de enxaguante bucal.
- Investigação do efeito biológico frente a outros micro-organismos no modelo de biofilme *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliação da toxicidade *in vivo*;

Estudos de tecnologia farmacêutica e de estabilidade

- As formulações foram testadas logo após o preparo. Não foram conduzidos estudos de estabilidade para avaliar o teor de Citral presente e efeitos a longo prazo no combate à formação de biofilme bacteriano.
- Realização de estudos farmacotécnicos e de tecnologia farmacêutica empregando outros sistemas de liberação sustentada.
- Estudos detalhados de análise estrutural dos complexos de inclusão por técnicas como Ressonância Magnética Nuclear, Espectroscopia no infravermelho etc. para elucidação dos mecanismos de interação Monoterpeno-CD no complexo de inclusão.

6. REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução - RDC 79, de 31 de agosto de 2000. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 31 de agosto. 2000, n.169-E, Seção 1, p. 34;

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003;

Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA), Manual Clinical And Laboratory Standards Institute – CLSI (antigo NCCLS). www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp. Acesso em: 20/08/2013.

Araújo, D. R. Desenvolvimento e avaliação farmacológica de formulações de liberação controlada com anestésicos locais amino-amidas cíclicos: bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína. [tese]. Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2005;

Axelsson, P.; Albandar, J. M.; Rams, T. E. Prevention and control of periodontal diseases in developing and industrialized nations. *Periodontol.***29**, 235–246, 2002;

Ayad, F.; Prado, R.; Mateo, L. R.; Stewart, B.; Szewczyk, G.; Arvanitidou, E.; Panagakos, F. S. A comparative investigation to evaluate the clinical efficacy of an alcohol-free CPC-containing mouthwash as compared to a control mouthwash in controlling dental plaque and gingivitis: a six-month clinical study on adults in San Jose, Costa Rica. *J Clin Dent.***22**, 204-212, 2011;

Bahna, P.; Hanna, H. A.; Dvorak, T.; Vaporciyan, A.; Chambers, M.; Raad, I. Antiseptic effect of a novel alcohol-free mouthwash: A convenient prophylactic alternative for high-risk patients. *Oral Oncology*, **43**, 159-164, 2007;

Bekers, O.; Uijtendaal, E.V.; Beijnen, J.H.; Bult, A.; Underberg, W.J.M. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **17**, 1503-1549, 1991;

Carson, C. F.; Cookson, B. D.; Farrelly, H. D.; Riley, T. V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**, 421-424, 1995;

Charles, C.H.; Mostler, K.M.; Bartels, L.L.; Mankodi, S.M. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J. Clin. Periodontol.***31**, 878–84, 2004;

Claffey, N., Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. *J. Clin. Periodontol.***30**, 22–24, 2003;

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 7th ed. Approved guideline M7–A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved guideline - CLSI document M27-A7, v. 26, n. 2, Wayne, Pennsylvania, USA, 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals: Approved Standards. CLSI Document M31-A3, vol. 28, n.8, Wayne, PA, 2008.

Connors, K. A.; Higuchi, T.; Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 4, 117-212, 1965;

Cortelli, S. C.; Cortelli, J. R.; Wu, M. M.; Simmons, K.; Charles, C. A. Comparative antiplaque and antigingivitis efficacy of a multipurpose essential oil-containing mouthrinse and a cetylpyridinium chloride-containing mouthrinse: A 6-month randomized clinical trial. *Quintessence Int.* **43**, 82-94, 2012;

Fromming, K. H.; Szejtli, J. Topics in Inclusion Science – Cyclodextrins in Pharmacy, Hungria, Kluwer Academic Publishers.33-34, 1994;

Gebara, E.C.E.; Zardetto, C.G.D.C.; Mayer, M.P.A. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. *Rev. Odontol. USP*, **10**, 251-56, 1996;

Giordano, F.; Novak, C.; Moyano, J. R.; Thermal analysis of Cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochim. Acta.* **380** (2), 123-151, 2001;

Guedes, F. de Lima; Alves, G. M. C.; dos Santos, F. L. A.; de Lima, L. F.; Rolim, L. A.; Neto, P. J. R. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar disponibilidade de fármacos. *Ver. Bras. Farm.*, **89** (3), 220-225, 2008;

Jones, A. e Duerbeck, K. Natural ingredients for cosmetics. EU Market Survey; Centre for the Promotion of Imports from developing countries (CBI). Setembro, 2004;

Kfoury, M.; Auezova, L.; Fourmentin, S.; Greige-Gerges, H.; Investigation of monoterpenes complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* In press, 2014;

Kroes, I.; Lepp, P. W.; Reiman, D. A.; Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14547-14552, 1999;

Li, X.; Jin, Z.; Wang, J.; Complexation of allyl isothiocyanate by α - and β -cyclodextrin and its controlled release characteristics. *Food Chem.* **103**, 461-466, 2007;

Mandel, I. D. Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* **15**, 488–498, 1988;

Marreto, R. N.; Almeida, E. E. C. V.; Alves, P. B.; Nicolau, E. S., Nunes, R. S.; Matos, C. R. S.; Araujo, A. A. S. Thermal analysis and gás chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. *Thermochim. Acta*, **47**, 53-58, 2008;

Marsh, P. D. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res*; **38**, 204-211, 2004;

Mosmann, T. Related Articles, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63, 1983.

Mourtzinou, I.; Kalogeropoulos, N.; Papadakis, S.E.; Konstantinou, K.; Karathanos, V. T. Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in beta-cyclodextrin and modified starch. *J. Food Sci.* **73**, 89-94, 2008;

Negrini, T. C.; Duque, C.; Höfling, J. F.; Gonçalves, R. B.; Fundamental mechanisms of immune response to oral bacteria and the main perspectives of a vaccine against dental caries: A brief review. *Rev. odonto ciênc.* **24(2)**, 198-204, 2009;

Oliveira, S. M. M.; Lorscheider, J. A.; Nogueira, M. A. Avaliação In Vitro de Gel Dentifrício Contendo Óleos Essenciais sobre Bactérias Cariogênicas. *Lat. Am. J. Pharm.*, **27**, 266-269, 2008;

Paolino, V.J.; Kashket, S. inhibition by cocoa extracts of biosynthesis of extracellular polysaccharide by human oral bacteria. *Arch. Oral Biol.* **30**, 359-63, 1985;

Pinho, E.; Grootveld, M.; Soares, G.; Henriques, M.; Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr. Polym.* **101**, 121-135, 2014;

Rawlinson, A. S.; Pollington, T. F.; Walsh, D. J.; Lamb, I.; Marlow, J.; Haywood, P. W. Efficacy of two alcohol-free cetylpyridinium chloride mouthwashes - a randomized double-blind crossover study. *J. Clin. Periodontol.* **35**, 230-235, 2008;

Ruktanonchai, U. R.; Srinuanchai, W.; Saesoo, S.; Sramala, I.; Puttipipatkachorn, S.; Soottitantawat, A.; Encapsulation of Citral Isomers in Extracted Lemongrass Oil with Cyclodextrins: Molecular Modeling and Physicochemical Characterizations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 2340-2345, 2011;

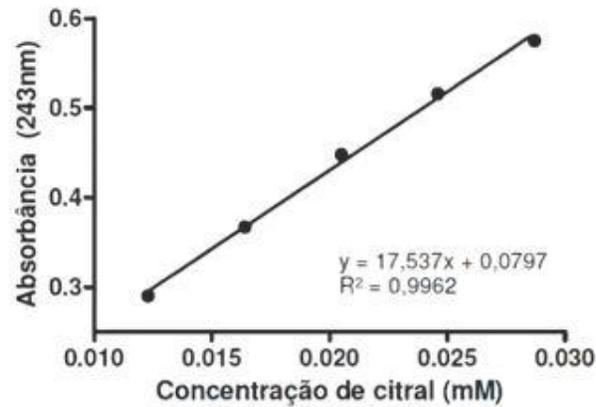
Saddiq, A. A.; Khayyat, S. A.; Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pestic. Biochem. Physiol.* **98**, 89-93, 2010;

Santos, E. S. I.; Pereira, D. F. A.; Teodoro, G. R.; Del Ciampo, J. O.; Ogasawara, M. S.; Canettieri, A. C. V.; Khouri, S.; Salvador, M. J. Essential oil of *Thymus vulgaris*: preparation of pharmaceutical mouthwash formulation and in vitro evaluation of the bacterial plaque-inhibiting properties. *Latin Am. J. Pharm.*, **29**, 941-947, 2010;

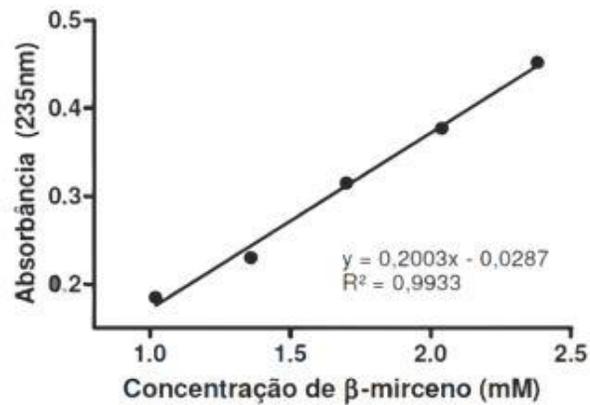
Shapiro, S.; Giertsen, E.; Guggenheim, B. An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouth rinses. *Caries Res.*, **36**, 93-100, 2002;

- Sharma N. C.; Araujo, M. W.; Wu, M. M.; Qaqish, J.; Charles, C. H. Superiority of an essential oil mouthrinse when compared with a 0.05% cetylpyridinium chloride containing mouthrinse: a six-month study. *Int Dent J*. **60**, 175-180, 2010;
- Sherry, M.; Charcosset, C.; Fessi, H.; Greige-Gerges, H. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *J. Liposome Res.* **23(4)**, 268-275, 2013;
- Shiga, H.; Yoshii, H.; Taguchi, R.; Nishiyama, T.; Furuta, T.; Linko, P.; Release characteristics of flavor from spray dried powder in boiling water and during rice cooking. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 426-428, 2003;
- Silva, M.F.; dos Santos, N. B.; Stewart, B.; DeVizio, W.; Proskin, H. M. A clinical investigation of the efficacy of a commercial mouthrinse containing 0.05% cetylpyridinium chloride to control established dental plaque and gingivitis. *J Clin Dent.*, **20**, 55-61, 2009;
- Singh, P.; Shukla, R.; Prakash, B.; Kumar, A.; Singh, S.; Mishra, P. K.; Dubey, N. K.. Chemical profile, antifungal, anti-aflatoxinogenic and antioxidant activity of Citrus maxima Burm. and Citrus sinensis (L) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 1734-1740, 2010;
- Szejtli J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem.* **76(10)**, 1825-1845, 2004;
- Szente, L.; Szejtli, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Tech.*, **15**, 137-142, 2004;
- Tavares, A. C.; Gonçalves, M. J.; Cruz, M. T.; Cavaleiro, C.; Lopes, M. C.; Canhoto, J.; Salgueiro, L. R. Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: Chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. *J. Ethnopharmacol.*, **130**, 593-598, 2010;
- Tian, J.; Ban, X.; Zeng, H.; He, J.; Huang, B.; Wang O.; Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int. J. Food Microbiol.* **145**, 464-470, 2011;
- Trombetta, D.; Castelli, F.; Sarpietro, M.G.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzantini, G.; Bisignano, G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**, 2474-2478, 2005.
- Ünlü, M.; Daferera, D.; Dönmez, E.; Polissiou, M.; Tepe, B.; Sökmen, A. Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). *J. Ethnopharmacol.*, **83**, 117-121, 2002;
- Weisheimer, V.; Miron, D.; Silva, C. B.; Guterres, S. S.; Schapoval, E. E. Microparticles containing lemongrass volatile oil preparation, characterization and thermal stability. *Pharmazie*, **65**, 885-890, 2010.

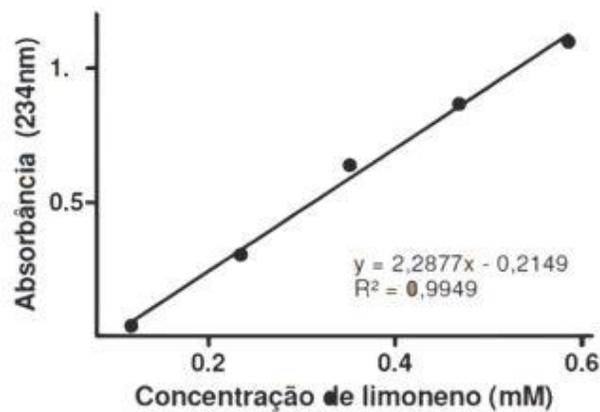
7. ANEXOS



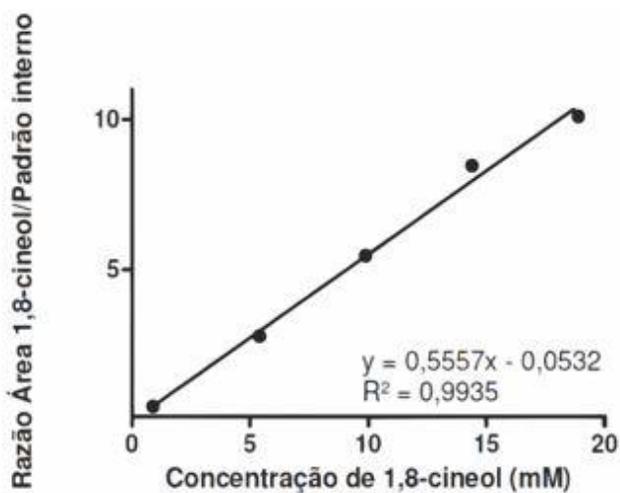
Anexo 1: Curva analítica utilizada para a quantificação do monoterpene citral em análises de solubilidade.



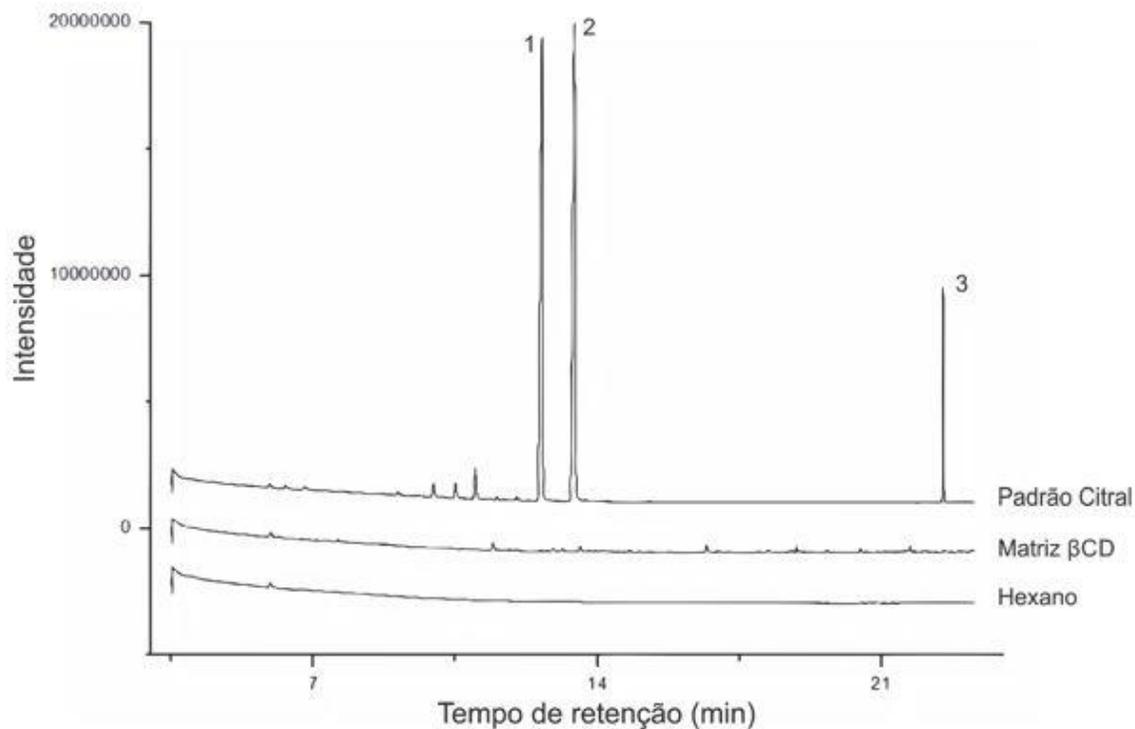
Anexo 2: Curva analítica utilizada para a quantificação do monoterpene β -mirceno em análises de solubilidade.



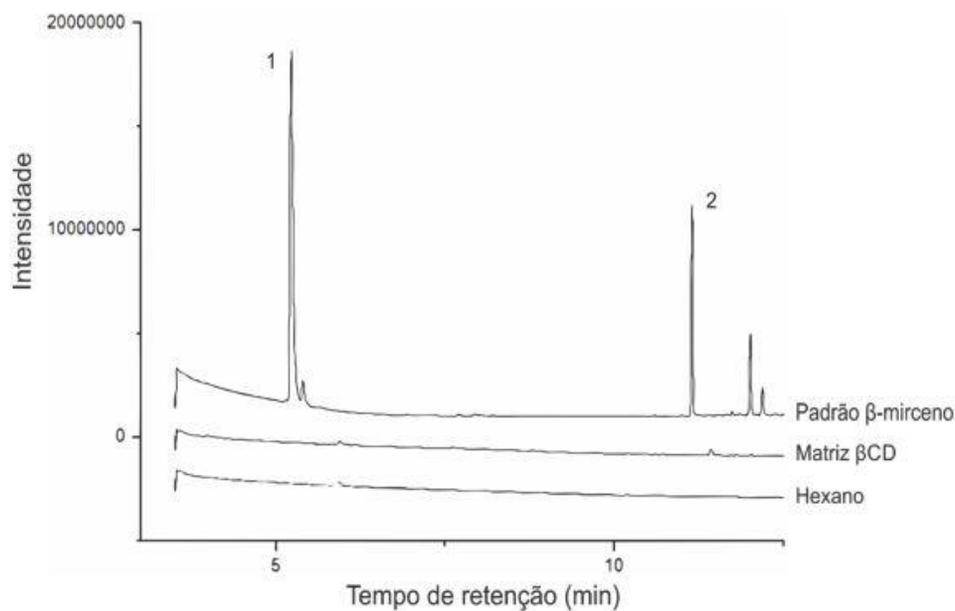
Anexo 3: Curva analítica utilizada para a quantificação do monoterpeno β -limoneno em análises de solubilidade.



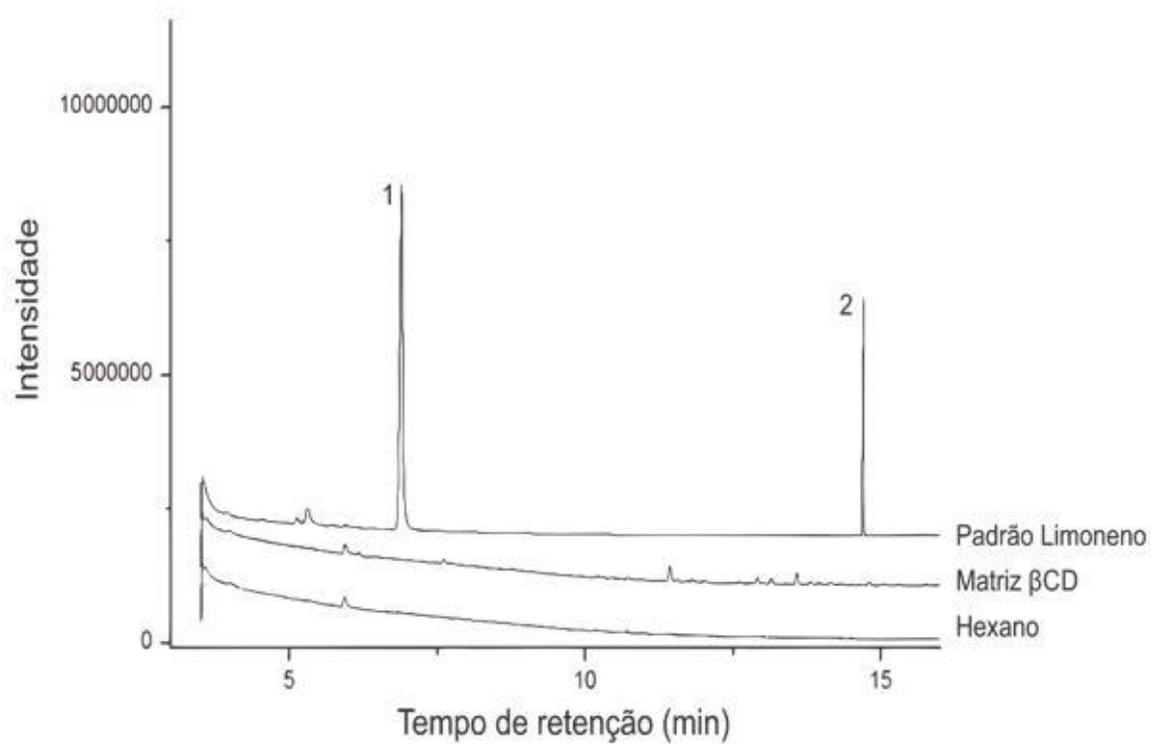
Anexo 4: Curva analítica utilizada para a quantificação do monoterpeno 1,8-cineol em análises de solubilidade.



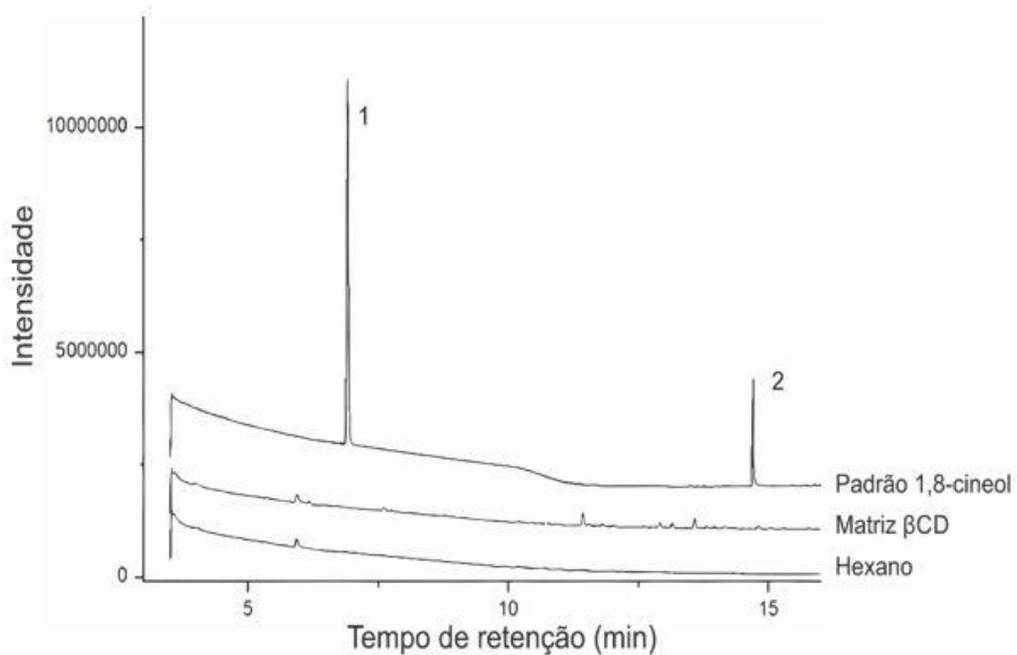
Anexo 5: Cromatogramas obtidos após injeção de hexano, matriz CD e padrão citral. (1) Citral: tempo de retenção 12,63min; (2) geraniol: tempo de retenção 13,44min; (3) padrão interno octadecano: tempo de retenção 22,50min.



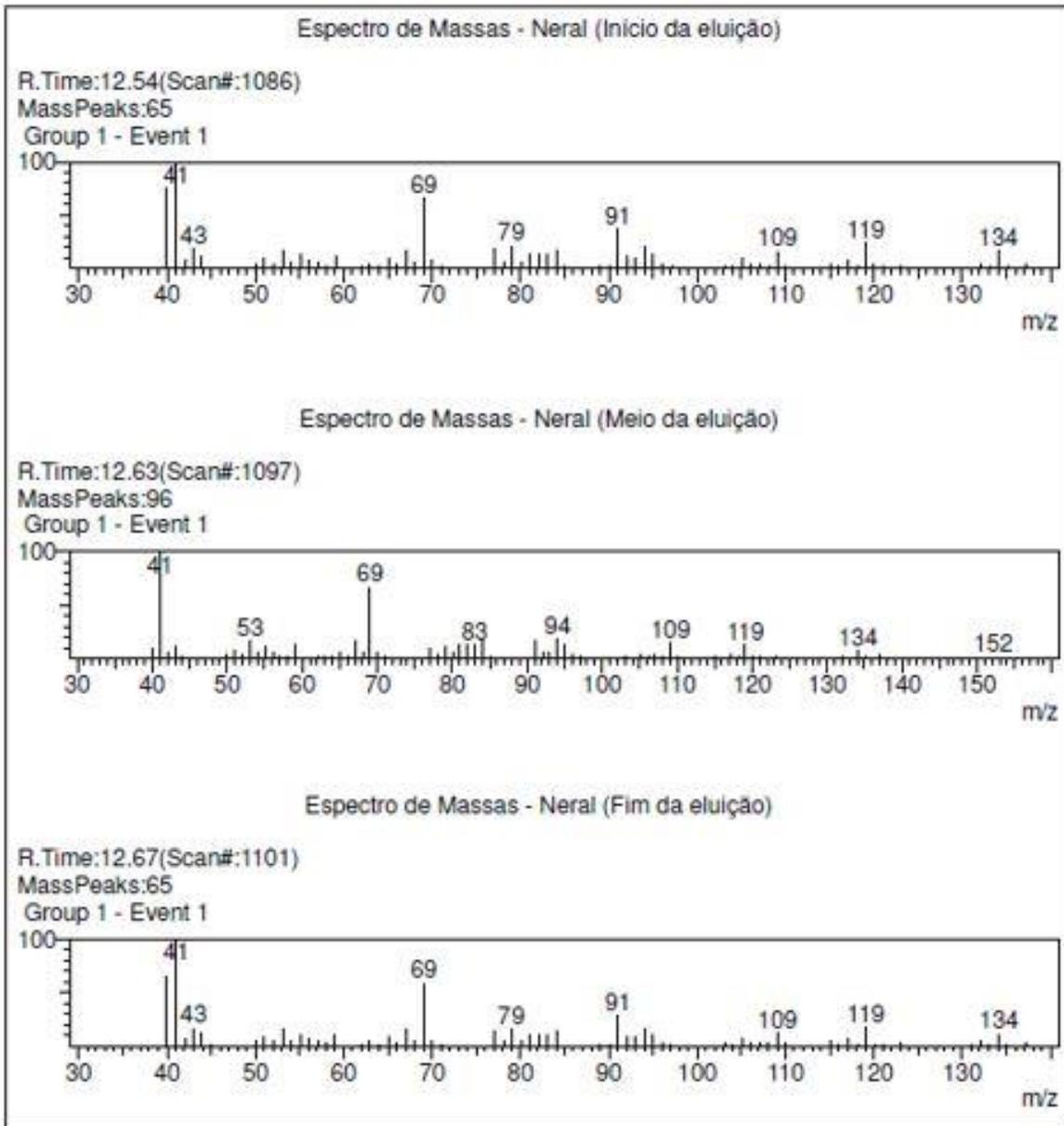
Anexo 6: Cromatogramas obtidos após injeção de hexano, matriz CD e padrão β -mirceno. (1) β -mirceno: tempo de retenção 5,22min; (2) padrão interno octadecano: tempo de retenção 11,14min.



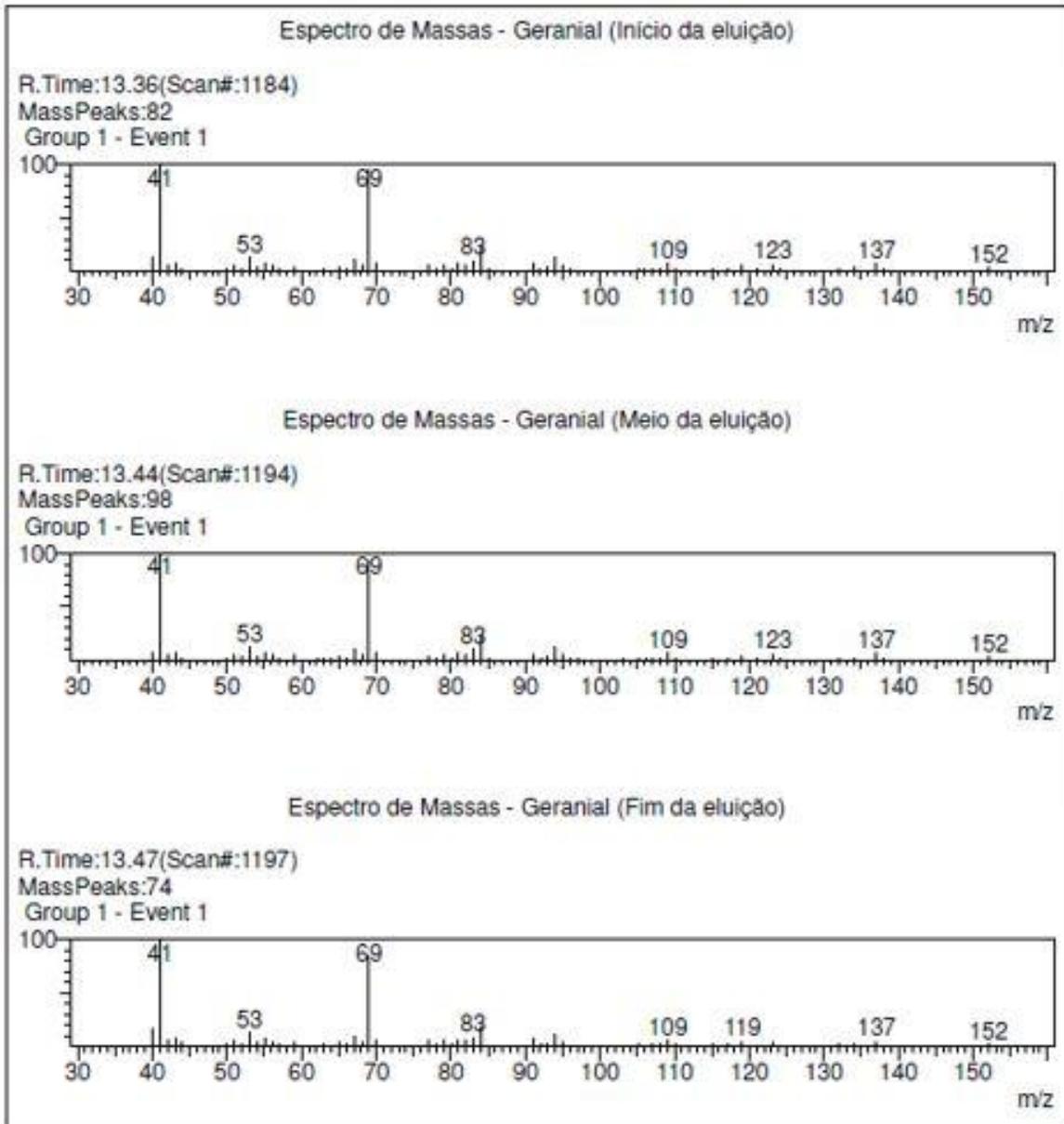
Anexo 7: Cromatogramas obtidos após injeção de hexano, matriz CD e padrão limoneno. (1) limoneno: tempo de retenção 6,89min; (2) Padrão interno octadecano: tempo de retenção 14,69min.



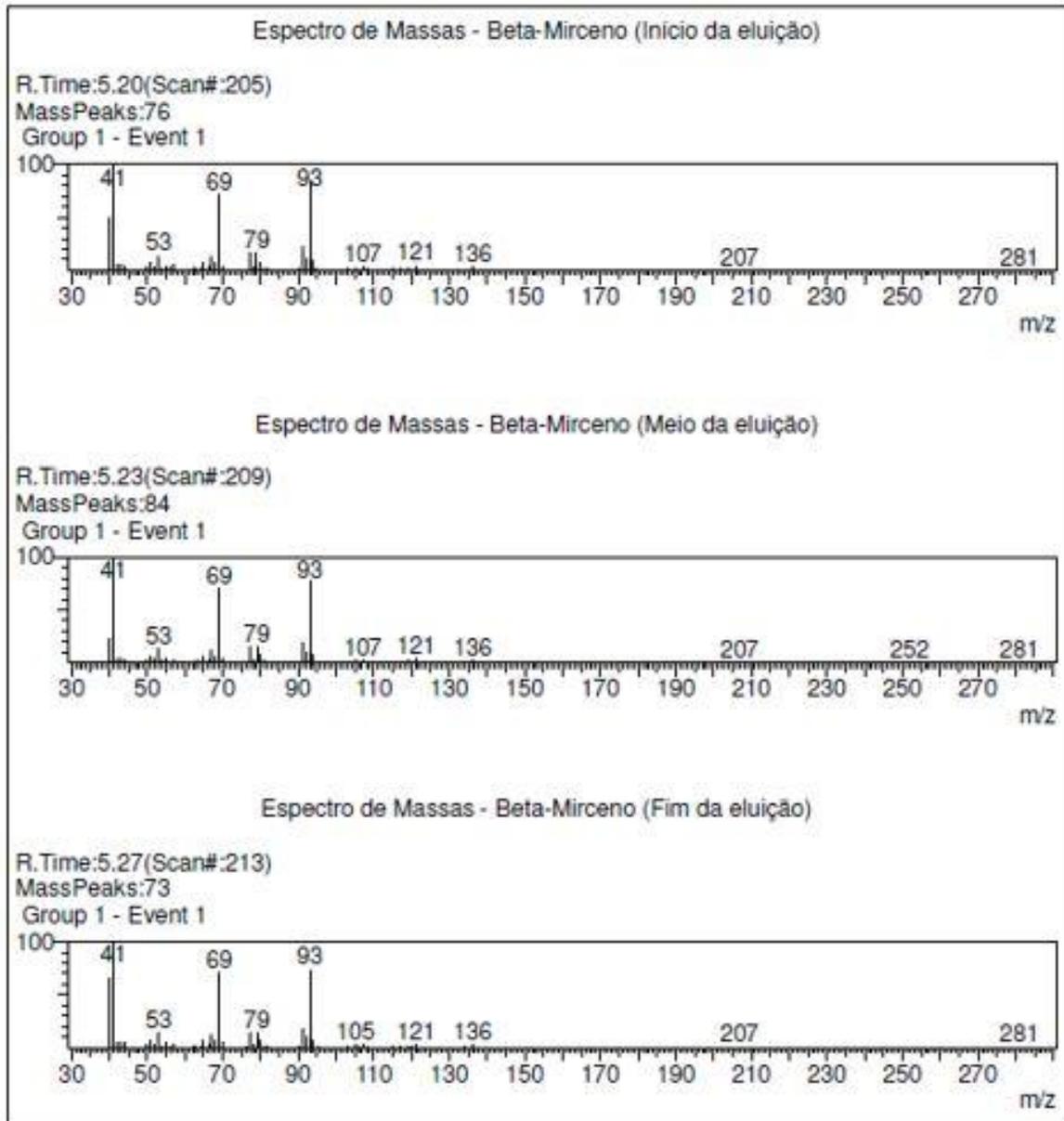
Anexo 8: Cromatogramas obtidos após injeção de hexano, matriz CD e padrão 1,8-cineol. (1) 1,8-cineol: tempo de retenção 6,94min; (2) Padrão interno octadecano: tempo de retenção 14,70min.



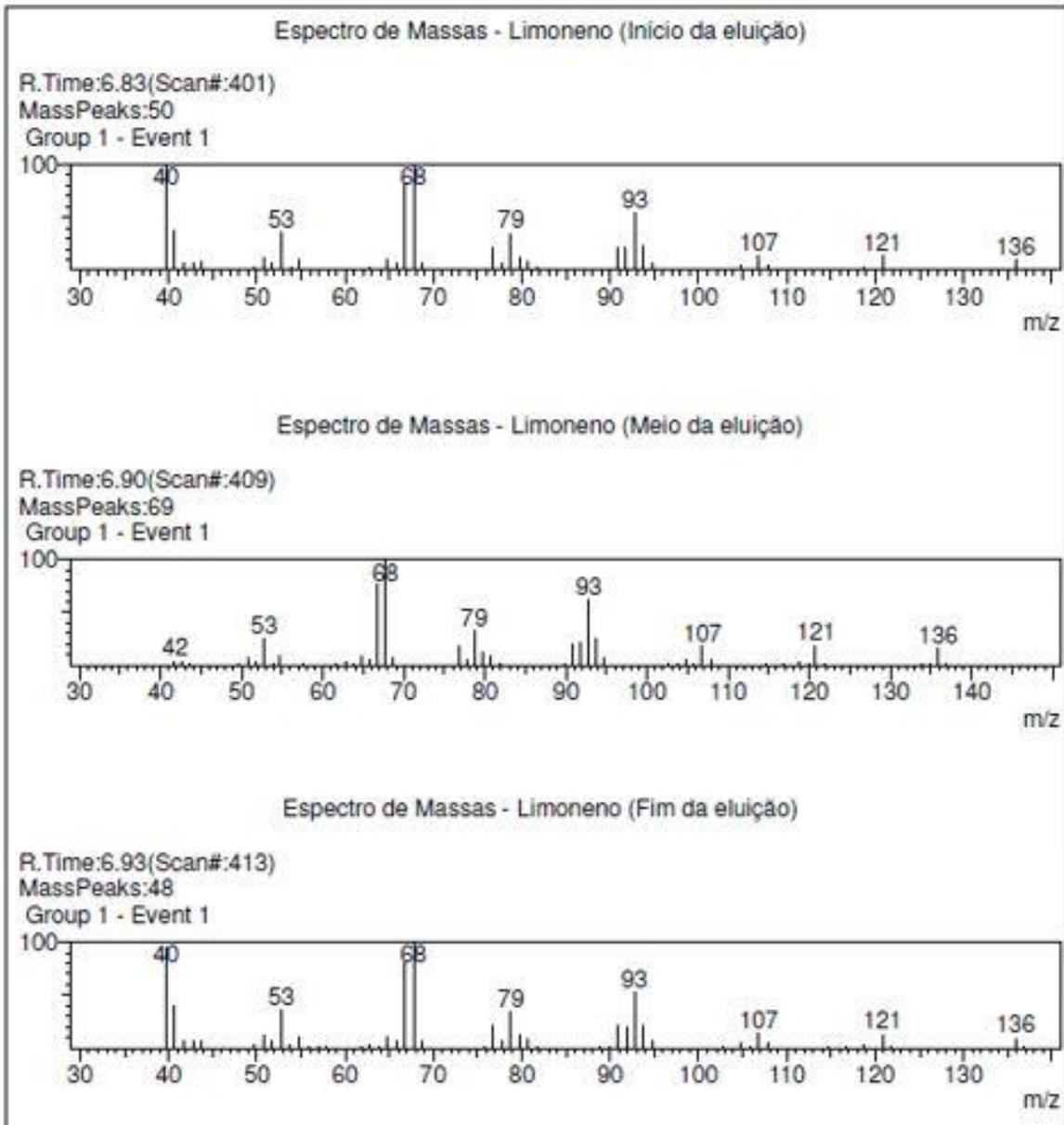
Anexo 9: Espectros de massas obtidos no começo, meio e fim da eluição do pico referente ao neral.



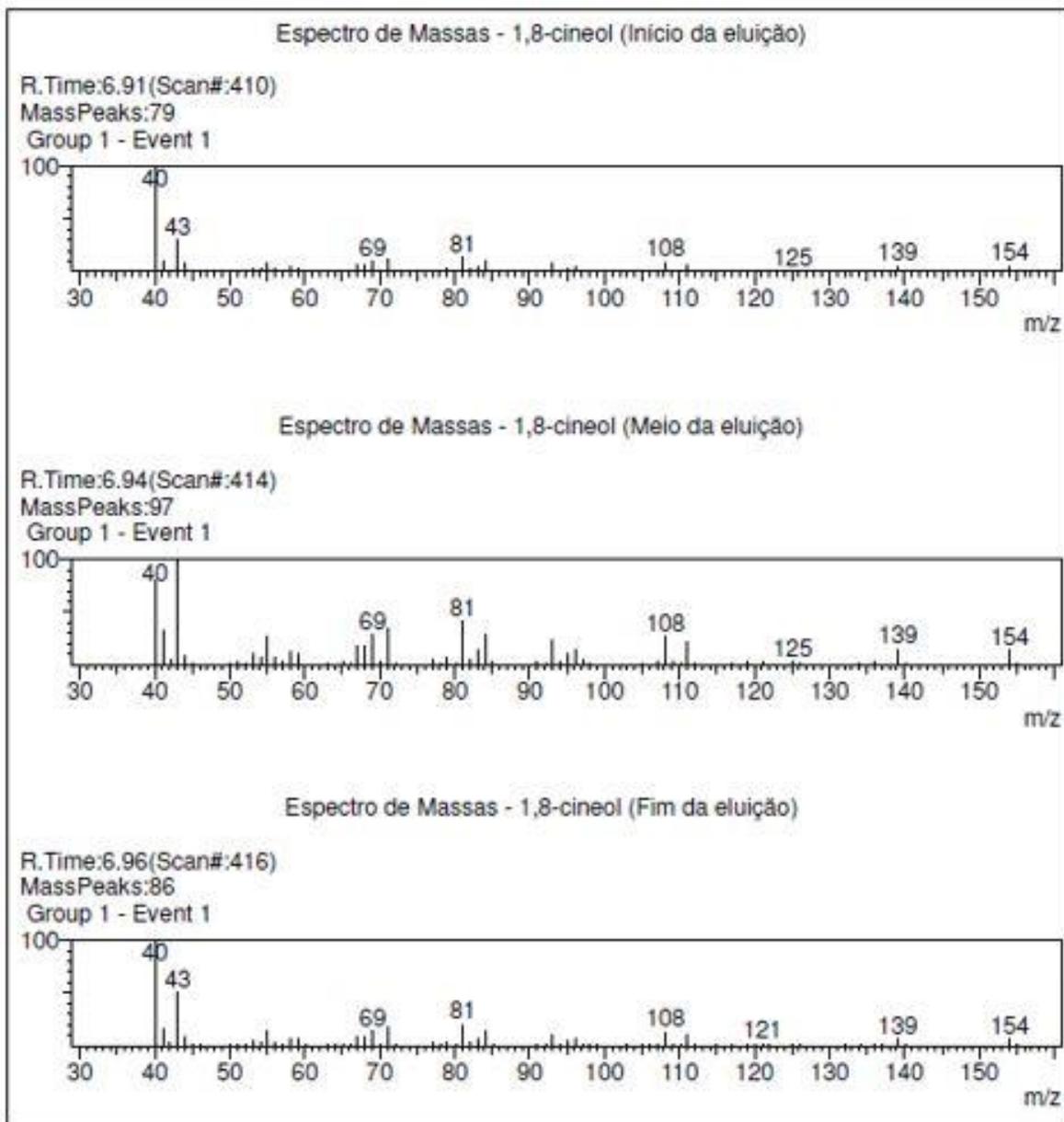
Anexo 10: Espectros de massas obtidos no começo, meio e fim da eluição do pico referente ao geranial.



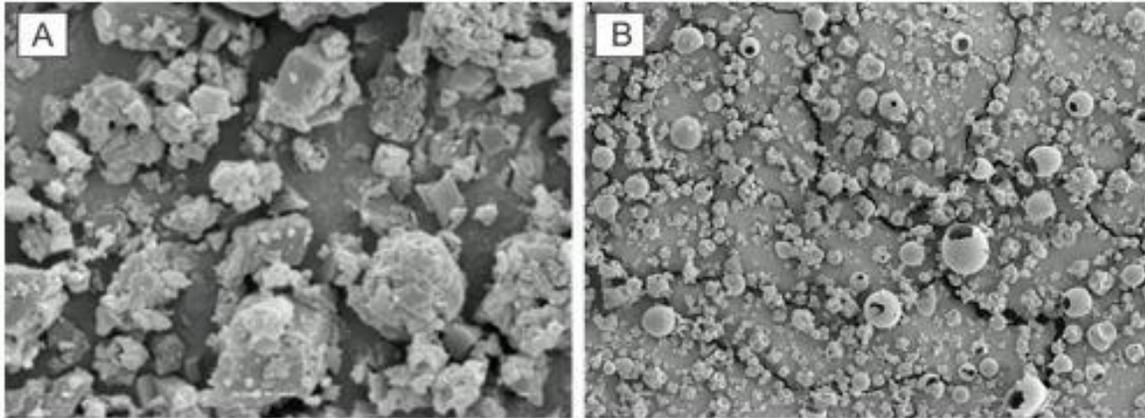
Anexo 11: Espectros de massas obtidos no começo, meio e fim da eluição do pico referente ao β -mirceno.



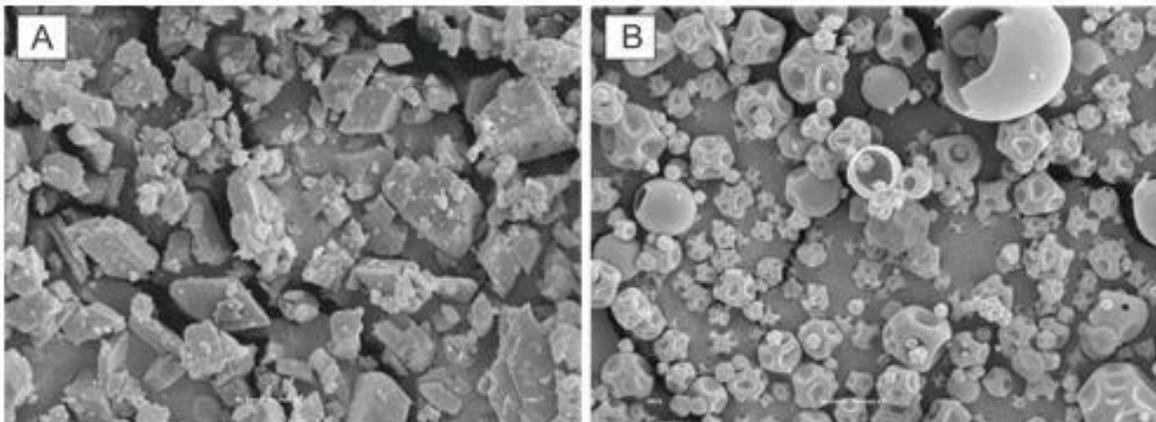
Anexo 12: Espectros de massas obtidos no começo, meio e fim da eluição do pico referente ao limoneno.



Anexo 13: Espectros de massas obtidos no começo, meio e fim da eluição do pico referente ao 1,8-cineol.



Anexo 14: (A) Complexo de inclusão β -mirceno/ β CD obtido pelo método de atomização. Aumento de 1000x (B) Complexo de inclusão β -mirceno/HP- β CD obtido pelo método de atomização de 4000x.



Anexo 15: (A) Complexo de inclusão limoneno/ β CD obtido pelo método de atomização. Aumento de 1000x (B) Complexo de inclusão limoneno/HP- β CD obtido pelo método de atomização de 4000x