



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

VINICIUS PAES AZEVEDO

Óleo essencial das raízes de *Chrisopogon zizanioides* (L.) Roberty
(Poaceae) e seu complexo de inclusão em #- ciclodextrina COMO
FONTE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

Essential oil from the roots of *Chrisopogon zizanioides* (L.) Roberty
(Poaceae) and its inclusion complex in #- cyclodextrin AS A
SOURCE OF BIOACTIVE MOLECULES

CAMPINAS

2024

VINICIUS PAES AZEVEDO

**Óleo essencial das raízes de *Chrisopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae)
e seu complexo de inclusão em #- ciclodextrina COMO FONTE DE
MOLÉCULAS BIOATIVAS**

**Essential oil from the roots of *Chrisopogon zizanioides* (L.) Roberty
(Poaceae) and its inclusion complex in #- cyclodextrin AS A SOURCE OF
BIOACTIVE MOLECULES**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia, da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre
em Biologia Molecular e Morfofuncional, na área de
Biologia Celular.*

*Dissertation presented to the Institute of Biology of the
University of Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Molecular and
Morphofunctional Biology, degree in Cell Biology.*

Orientador: PROF. DR. MARCOS JOSÉ SALVADOR

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNO VINÍCIUS PAES AZEVEDO, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. MARCOS JOSÉ SALVADOR

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Azevedo, Vinícius Paes, 1997-
Az25o Óleo essencial das raízes de *Chrisopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae) e seu complexo de inclusão em #- ciclodextrina como fonte de moléculas bioativas / Vinícius Paes Azevedo. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

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

1. *Chrysopogon zizanioides*. 2. Óleos voláteis. 3. Beta-ciclodextrinas. 4. Antibióticos. 5. Citotoxicidade. 6. Bioensaios. I. Salvador, Marcos José, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Essential oil from the roots of *Chrisopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae) and its inclusion complex in #-cyclodextrin as source of bioactive molecules

Palavras-chave em inglês:

Chrysopogon zizanioides

Oils, Volatile

Beta-cyclodextrins

Antibiotics

Cytotoxicity

Biological assay

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestre em Biologia Molecular e Morfofuncional

Banca examinadora:

Marcos José Salvador [Orientador]

Valquíria Aparecida Matheus

Silmara Marques Allegretti

Data de defesa: 25-11-2024

Programa de Pós-Graduação: Biologia Molecular e Morfofuncional

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0005-5592-7406>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/4255143297895075>

Campinas, 25 de novembro de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos José Salvador

Profa. Dra. Valquíria Aparecida Matheus

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa Biologia Molecular Morfofuncional do Instituto de Biologia.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha amada família: meu pai, Adilson de Assis Azevedo, minha mãe, Silvana de Cássia Paes Azevedo, e meus irmãos, Victor Paes Azevedo e Muller de Assis Vilas Boas. Agradeço-lhes pelo apoio incondicional e pelo constante incentivo ao longo desta jornada acadêmica.

Também expresso minha gratidão às diversas pessoas envolvidas direta e indiretamente neste trabalho. Aos alunos e orientadores que compartilharam suas perspectivas e conhecimentos, contribuindo significativamente para este estudo. Não posso deixar de mencionar a equipe de limpeza, cujo papel essencial na manutenção de um ambiente de trabalho propício não passa despercebido. A todos vocês, minha sincera gratidão pelo apoio e colaboração ao longo desta jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Também contou com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processos nº 06/06079-4, 15/03726-8 e 21/09693-5), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo nº 306603/2022-5 e 427859/2018-2) e do Fundo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão-UNICAMP (FAEPEX-UNICAMP).

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos José Salvador pela oportunidade de realizar o trabalho em seu laboratório, pelos ensinamentos, paciência e apoio na realização do mestrado.

Aos meus pais por terem me motivado e incentivado durante toda trajetória e ajudado em diversas ocasiões e de todas as formas.

A todos os meus colegas de laboratório por terem me dado apoio para realização ao desenvolvimento de minha pesquisa.

Aos membros da Comissão Examinadora de qualificação e defesa, pela disponibilidade, atenção e pelas valiosas considerações.

À Universidade Estadual de Campinas, pela estrutura e ao Laboratório de Metabolismo Vegetal e de simbiotes e Tecnologia de Bioativos (LMTB) do Departamento de Biologia Vegetal/IB/UNICAMP por ter me proporcionado todos os equipamentos e condições para a realização da pesquisa.

RESUMO

No metabolismo vegetal, os metabólitos primários estão envolvidos em processos vitais que são essenciais para a vida do organismo como a fotossíntese e a respiração. Por outro lado, os componentes do metabolismo secundário tais como terpenos, flavonoides, alcalóides atuam conferindo vantagens para a perpetuação e sobrevivência das espécies em seus ecossistemas, sendo fundamentais nas interações entre as plantas e o ambiente. Muitos desses metabólitos secundários apresentam propriedades biológicas que os tornam recursos terapêuticos valiosos.

A planta *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty, anteriormente conhecida como *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash e popularmente chamada de grama de vetiver, é utilizada na medicina etnofarmacológica para tratar diversas condições, incluindo reumatismo, entorses e infecções. O óleo essencial extraído das raízes de *C. zizanioides* é amplamente reconhecido na medicina tradicional por suas propriedades antibióticas, antifúngicas, antimaláricas, anti-inflamatórias, antiácidas, carminativas, estimulantes e antidiabéticas.

Entretanto, a utilização de óleos essenciais pode apresentar limitações devido à sua volatilidade, instabilidade química e baixa solubilidade em água. Nesse contexto, sistemas de liberação modificada, como o encapsulamento de substâncias em β -ciclodextrina (β -CD), surgem como alternativas tecnológicas para superar esses desafios. Este estudo teve como objetivo principal preparar o complexo de inclusão do óleo essencial das raízes de *C. zizanioides* em β -CD, caracterizar seus constituintes químicos e avaliar as atividades biológicas (antibacteriana e citotoxicidade) tanto do óleo essencial quanto do complexo.

O complexo de inclusão foi preparado utilizando a técnica de secagem por atomização em spray-dryer, resultando em uma porcentagem de inclusão de 45,17% para o cedr-8-en-13-ol e um rendimento de 19,24% para o pó do complexo. As análises físico-químicas realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) mostraram o carregamento seletivo de alguns constituintes do óleo essencial no complexo com β -CD, incluindo delta-Selineno e gamma-Gurjuneno epóxido, com o Cedr-8-en-13-ol como componente majoritário, reconhecido na literatura por sua atividade antimicrobiana.

A composição química do óleo permitiu, por meio de análises *in silico*, a predição de atividades biológicas (antineoplásica, antitumoral, antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória) e seus mecanismos de ação, como a inibição da síntese de colesterol, da biossíntese da parede celular e da expressão de MMP9. A atividade antibacteriana foi avaliada *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* N315 (MRSA) resistente à meticilina, além de análises sobre a viabilidade celular em linhagens tumorais (SK-MEL-103, melanoma e PC-3, próstata) e não tumorais em culturas de células de fibroblasto (3T3) e queratinócitos (HaCat), comparando os efeitos do óleo essencial puro e do encapsulado em β -CD. De modo geral, o óleo essencial de *C. zizanioides* e seu complexo de inclusão em β -CD apresentaram baixa toxicidade para as linhagens não tumoral 3T3 com valores de IC_{50} maiores que 250 μ g/mL e o complexo de inclusão do óleo essencial em β -CD mostrou uma redução da viabilidade para SK-MEL-103 (IC_{50} =73,74 μ g/mL). Tanto o óleo essencial como seu complexo apresentaram ação antibacteriana a 200 μ g/mL frente a *Staphylococcus aureus* (N315), resistente à meticilina. Os dados obtidos indicam que o óleo essencial das raízes de *C. zizanioides* e seu complexo de inclusão em β -ciclodextrina apresentam potencial como fonte de substâncias bioativas. Com isso, foi conduzido um estudo que envolveu o óleo essencial de *C. zizanioides* em complexo de inclusão em β -CD, utilizando abordagens que vão desde o desenvolvimento tecnológico até a avaliação de suas propriedades biológicas e citotoxicidade. O objetivo foi explorar novas moléculas e insumos biologicamente ativos.

Palavras-chave: Óleo essencial, *Chrysopogon zizanioides*, β -Ciclodextrina, antibiótico, Citotoxicidade, Bioensaios.

ABSTRACT

In plant metabolism, primary metabolites are involved in vital processes that are essential for the life of the organism, such as photosynthesis and respiration. On the other hand, components of secondary metabolism, such as terpenes, flavonoids, and alkaloids, act by conferring advantages for the perpetuation and survival of species in their ecosystems, and are fundamental in the interactions between plants and the environment. Many of these secondary metabolites have biological properties that make them valuable therapeutic resources.

The plant *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty, formerly known as *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash and popularly called vetiver grass, is used in ethnopharmacological medicine to treat various conditions, including rheumatism, sprains and infections. The essential oil extracted from the roots of *C. zizanioides* is widely recognized in traditional medicine for its antibiotic, antifungal, antimalarial, anti-inflammatory, antacid, carminative, stimulant and antidiabetic properties.

However, the use of essential oils may present limitations due to their volatility, chemical instability and low solubility in water. In this context, modified release systems, such as encapsulation of substances in β -cyclodextrin (β -CD), emerge as technological alternatives to overcome these challenges. The main objective of this study was to prepare the inclusion complex of the essential oil from the roots of *C. zizanioides* in β -CD, characterize its chemical constituents and evaluate the biological activities (antibacterial and cytotoxicity) of both the essential oil and the complex. The inclusion complex was prepared using the spray-dryer atomization drying technique, resulting in an inclusion percentage of 45.17% for cedr-8-en-13-ol and a yield of 19.24% for the powder of the complex. Physicochemical analyses performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) showed the selective transport of some constituents of the essential oil in the complex with β -CD, including delta-Selinene and gamma-Gurjunene epoxide, with Cedr-8-en-13-ol as the major component, recognized in the literature for its antimicrobial activity.

The chemical composition of the oil allowed, through *in silico* analyses, the prediction of biological activities (antineoplastic, antitumor, antibacterial, antifungal and anti-inflammatory) and their mechanisms of action, such as the inhibition of cholesterol synthesis, cell wall biosynthesis and MMP9 expression. The antibacterial activity was evaluated in vitro against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315 (MRSA), in addition to analyses on cell viability in tumor cell lines (SK-MEL-103, melanoma and PC-3, prostate) and non-tumor cell lines in fibroblast (3T3) and keratinocyte (HaCat) cell cultures, comparing the effects of the pure essential oil and that encapsulated in β -CD.

In general, the essential oil of *C. zizanioides* and its inclusion complex in β -CD showed low toxicity for the non-tumor cell lines 3T3 with IC₅₀ values greater than 250 μ g/mL and the inclusion complex of the essential oil in β -CD showed a reduction in viability for SK-MEL-103 (IC₅₀=73.74 μ g/mL). Both the essential oil and its complex showed antibacterial action at 200 μ g/mL against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (N315). The data obtained indicate that the essential oil from the roots of *C. zizanioides* and its inclusion complex in β -cyclodextrin have potential as a source of bioactive substances. Therefore, a study was conducted involving the essential oil of *C. zizanioides* in an inclusion complex in β -CD, using approaches ranging from technological development to the evaluation of its biological properties and cytotoxicity. The objective was to explore new molecules and biologically active inputs.

Keywords: Essential oil, *Chrysopogon zizanioides*, β -Cyclodextrin, antibiotic, Cytotoxicity, Bioassays.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografias da planta total e das partes aéreas e raízes de <i>Chrysopogon zizanioides</i>	17
Figura 2: Estrutura geral da beta-ciclodextrina.....	26
Figura 3. Cromatograma CG-EM da análise do óleo essencial das raízes de <i>Chrysopogon zizanioides</i> (sem extração, análise da injeção de solução contendo 1mg do óleo essencial em 100µl de diclorometano). UA, unidades arbitrárias.....	38
Figura 4: Cromatogramas CG-EM obtidos após injeção da fase hexânica da etapa de extração de amostra de óleo essencial das raízes de <i>Chrysopogon zizanioides</i> (A) e do complexo de inclusão do óleo essencial de <i>Chrysopogon zizanioides</i> em β -CD (B).....	41
Figura 5: Imagem do ensaio antibacteriano técnica da gota para amostra de óleo essencial das raízes de <i>Chrysopogon zizanioides</i> (A) e do complexo de inclusão do óleo essencial de <i>Chrysopogon zizanioides</i> em β -CD (B) na concentração de 200µg/mL.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de artigos encontrados nos cruzamentos de palavras Web of Science.....	18
Tabela 2. Número de artigos encontrados nos cruzamentos de palavras no Scopus.....	18
Tabela 3: Informações dos constituintes químicos reportados para o óleo essencial de <i>Chrysopogon zizanioides</i>	21
Tabela 4. Condições de secagem da suspensão resultante no <i>Spray Dryer</i>	34
Tabela 5. Análise <i>in silico</i> usando o programa PASS online para predição de atividades biológicas e mecanismos de ação de substâncias detectadas no óleo essencial de <i>Chrysopogon zizanioides</i>	38
Tabela 6: Resultados obtidos na análise química (CG-EM) do óleo essencial das raízes de <i>Chrysopogon zizanioides</i> (sem extração, análise da injeção de solução contendo 1mg do óleo essencial em 100µl de diclorometano).....	40
Tabela 7: Resultados obtidos na análise química (CG-EM) obtidos após injeção da fase hexânica da etapa de extração de amostra de óleo essencial das raízes de <i>Chrysopogon zizanioides</i>	43
Tabela 8: Resultados obtidos na análise química (CG-EM) obtidos após injeção da fase hexânica da etapa de extração de amostra do complexo de inclusão do óleo essencial de <i>Chrysopogon zizanioides</i> em β -CD.....	44
Tabela 9. Efeito antimicrobiano do óleo essencial de <i>Chrysopogon zizanioides</i> e do seu complexo de inclusão em β -ciclodextrina.....	45
Tabela 10. Resultados do efeito na viabilidade celular para o óleo essencial de <i>Chrysopogon zizanioides</i> e seus complexos de inclusão em β -ciclodextrina.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD: Ciclodextrina

α -CD: alfa-ciclodextrina

β -CD: beta-ciclodextrina

γ -CD: gamma-ciclodextrina

HP- β CD: hidroxipropil-beta-ciclodextrina

OE: Óleo essencial

CG-EM: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CIM: Concentração inibitória mínima

CBM: Concentração bactericida mínima

μ g/mL: microgramas por mililitro

mm: milímetro

μ m: micrometro

nm: nanômetro

mg: miligrama

mL: mililitro

μ L: microlitro

$^{\circ}$ C: graus Celsius

mL/min: mililitro por minuto

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

mg/mL: miligramas por mililitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
	2.1 considerações gerais sobre <i>Chrysopogon zizanioides</i> : possíveis aplicações terapêuticas e diversidade de constituintes voláteis	14
	2.1.1 Composição química	17
	2.1.2 Propriedades biológicas do óleo essencial de <i>C. zizanioides</i>	21
	2.1.2.1 Antimicrobiana	21
	2.1.2.2 Repelente	22
	2.1.2.3 Sedativa e hipnótica	22
	2.1.2.3 Métodos extrativos	22
	2.2 Considerações gerais sobre ciclodextrinas	23
3.	JUSTIFICATIVA	26
4.	OBJETIVOS	27
5.	METODOLOGIA	29
	5.1. Análise <i>in silico</i> de atividades biológicas e mecanismos de ação de constituintes previamente reportados em literatura para o óleo essencial de <i>Chrysopogon zizanioides</i>	29
	5.6. Avaliação do efeito sobre a viabilidade celular utilizando linhagens de células tumorais humanas e frente a linhagens de células não tumorais.....	32
	5.7. Análise estatística	33
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
	6.1 Análise <i>in silico</i> Pass Online	34
	6.2. Análise por CG-EM do óleo essencial das raízes de <i>Chrysopogon zizanioides</i> ,.....	36
	6.3 Preparação do complexo de inclusão do óleo essencial de <i>Chrysopogon zizanioides</i> em β -ciclodextrina,	38
	6.4 Caracterização físico-química do complexo de inclusão em β -CD do óleo essencial das raízes de <i>Chrysopogon zizanioides</i>	41
	6.5 Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>Chrysopogon zizanioides</i> e do seu complexo de inclusão em β -ciclodextrina	41
	6.6 Avaliação do efeito do óleo essencial de <i>Chrysopogon zizanioides</i> e do seu complexo de inclusão em β -ciclodextrina na viabilidade celular e citotoxicidade	44
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	46
8.	REFERÊNCIAS	48
9.	ANEXOS.....	52

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais com fins terapêuticos tem raízes históricas em diversas culturas e é importante recurso para a preservação da saúde. Nos últimos anos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem promovido o aprofundamento de estudos científicos sobre plantas medicinais visando compreender melhor os benefícios que seus constituintes bioativos podem oferecer à saúde humana. Fatores como o baixo custo e a facilidade de uso têm impulsionado a integração das plantas medicinais em práticas de saúde contemporâneas (Molina et al., 2008; Newman et al., 2016).

Conhecimentos populares sobre o uso de plantas medicinais são frequentemente transmitidos de geração em geração, contribuindo para a difusão de suas propriedades terapêuticas. Mesmo que muitos desses compostos ainda não tenham sido completamente caracterizados quimicamente, suas aplicações na cura e prevenção de doenças datam de práticas medicinais antigas (Veiga Jr. et al., 2005; Simões et al., 2007).

Nos organismos vegetais, os metabólitos são divididos em primários, que essenciais para a vida da planta, como proteínas e açúcares, e secundários, que desempenham papéis cruciais nas interações com o ambiente como terpenos e alcaloides. Metabólitos secundários, por exemplo, auxiliam na defesa contra predadores e patógenos, além de atrair polinizadores, conferindo vantagens adaptativas às plantas (Souza et al., 2002; Simões et al., 2007). Muitos desses compostos secundários têm despertado grande interesse no campo farmacêutico devido aos seus potenciais propriedades terapêuticas.

Entre 1981 e 2010, uma significativa proporção dos medicamentos lançados no mercado continha princípios ativos derivados de produtos naturais. Aproximadamente 4,72% dos fármacos tinham compostos naturais como base, e 41,86% eram moléculas semissintéticas, derivadas de substâncias naturais (Newman et al., 2016). Além disso, os metabólitos secundários são frequentemente usados como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos, que possuem segurança e eficácia comprovadas ANVISA. (2014).

Os óleos essenciais (OEs), compostos voláteis derivados do metabolismo secundário das plantas, são amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. Esses óleos consistem em uma complexa mistura de compostos, como terpenos e fenóis, e são conhecidos por suas propriedades terapêuticas, sendo frequentemente extraídos por métodos

como o arraste a vapor Morais. (2009). Um exemplo notável é o anti-inflamatório Acheflan®, que utiliza o óleo essencial da erva-baleeira, *Cordia verbenacea*, como seu principal ativo, um terpeno padronizado em 2,3-2,9% de α -humuleno Aché. (2015).

Os OEs apresentam solubilidade limitada em água e são propensos à instabilidade química, fatores que podem afetar sua bioatividade. No entanto, a encapsulação desses compostos em ciclodextrinas tem sido investigada como uma solução eficaz para aumentar sua solubilidade e estabilidade, melhorando seu potencial terapêutico (Morais, 2009). Este método permite que substâncias bioativas voláteis, como monoterpenos, sejam protegidas contra a degradação e volatilização, promovendo maior eficácia terapêutica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 considerações gerais sobre *Chrysopogon zizanioides*: possíveis aplicações terapêuticas e diversidade de constituintes voláteis

Chrysopogon zizanioides (L.) Roberty (CZ), nome atualmente aceito de sinonímia anteriormente conhecida como *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash e comumente chamado de grama de vetiver é uma planta pertencente à família Poaceae (Figura 1). É perene e densamente adornada, os colmos são eretos e sua aparência é semelhante à do capim-limão. As raízes da CZ (CZR) são fortes, esponjosas e aromáticas e sua distribuição é massiva e compacta. As condições ideais de crescimento de *C. zizanioides* em seu habitat natural envolvem solos arenosos profundos com uma faixa de pH de 3-11, uma altitude de até 2000 m., uma faixa de temperatura entre 18 e 25 ° C, chuvas de 700 mm e exposição ao sol. No que diz respeito à sua distribuição geográfica, a maioria dos textos botânicos relata que a CZ é nativa das regiões tropicais do norte da Índia. Atualmente, é distribuído em todo o mundo onde quer que as condições ambientais sejam adequadas para o seu desenvolvimento (Chou et al., 2016).

A parte mais interessante da CZ é sua raiz, que é usada para diversos fins. Um dos usos mais conhecidos é o controle da erosão de sedimentos, mas também é usado para conservação do solo e da água, manejo agroflorestal, tratamento de águas residuais, mitigação da poluição, controle de inundações, entre outros. A remoção de metais e xenobióticos de solos poluídos são características da CZ muito exploradas nas últimas décadas. Estudos demonstraram a capacidade de remoção de substâncias como fenol, brometo de etídio, benzo [α] pireno, atrazina

e explosivos como TNT em condições aquosas. Altas porcentagens de absorção de metais pesados foram relatadas em estudos anteriores, como Pb (98%), Cu (54%), Zn (41%) e Cd (88%) (Chen et al., 2004; Srivastava et al., 2008).



Figura 1. Fotografias da planta total e das partes aéreas e raízes de *Chrysopogon zizanioides* (Fonte: autor)

Diferentes partes da CZ são usadas no tratamento etnofarmacológico de doenças. Por exemplo, suas folhas são usadas para tratar lumbago, reumatismo, entorses e como anti-helmíntico. A decocção do caule é empregada para aliviar a infecção do trato urinário. No entanto, a raiz é a parte mais utilizada, não apenas na etnofarmacologia, mas em muitas outras áreas, como as indústrias de cosméticos e alimentos. (Pareek et al., 2013; Chia., 2016; Chou et al., 2016; Ramirez-Rueda et al., 2019).

A complexidade da composição química do óleo essencial das raízes de CZ é responsável por várias atividades biológicas. Existem vários relatos de atividade antimicrobiana de OE e extratos de CZR, tendo atividade em um amplo espectro de microrganismos. Os microrganismos suscetíveis a EO's e extratos de CZ são bactérias como *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*, *M. tuberculosis*; e fungos como *A. fumigatus*, *M. canis*, *T. rubrum* e *C. albicans*. A atividade anti-biofilme foi bem-sucedida contra *S. aureus* resistente à meticilina (Kannappan, et al., 2017). Frações e compostos isolados de CZR também têm atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos como *M. smegmatis*, *T. mentagrophytes*, *M. gypsum*, *A. niger*, entre outros (Gupta et al., 2012; Santos et al., 2014; Prajna et al., 2013).

A principal razão para investigar compostos antibacterianos da CZR-EO é a deficiência de substâncias/insumos ativos para o tratamento da resistência antimicrobiana (Moloney, 1988). Segundo Ramirez-Rueda et al. (2019), com base em análise empregando bioautografia por CCD/análise por CG-MS, foi relatada a atividade antimicrobiana da CZR-EO e suas frações contra dois modelos de bactérias multirresistentes (MDR), com indicações desses compostos

que podem ter um papel importante. Constituintes do óleo essencial das raízes de CZ como Cedr-8-en-13-ol, 6-isopropenil-4,8a-dimetil- 1,2,3,5,6,7,8,8a-octa-hidro-naftalen-2-ol, Sel-Selineno, Gurjunenepoxide-(2) e solavetivona são as substâncias com maior relevância na atividade antibacteriana contra os modelos de bactérias multi-droga resistentes (MDR) utilizados Ramirez-Rueda et al. (2019) (vide Figura 2).

O trabalho escrito por Chahal et al. (2015) aborda o emprego do óleo essencial de *vetiveria* em seus variados usos biológicos até o período de 2015.

Na realização desta revisão de literatura a maioria das publicações denominava esta planta como *Vetiveria zizanioides*, mas no trabalho mais recente de Ramírez-Rueda et al. (2019) nomeia como *C. zizanioides* mostrando que houve uma renomeação taxonômica, fato podendo ser observado nas tabelas abaixo com os resultados das pesquisas utilizando o cruzamento de palavras chaves e também alguns descritores.

Tabela 1. Número de artigos encontrados nos cruzamentos de palavras Web of Science

Web of Science	essential oils	antibacterial activity	chemical components	biological activity
<i>Vetiveria</i>	23	10	5	7
<i>Vetiver</i>	48	7	8	6
<i>Vetiveria zizanioides</i>	23	9	5	7
<i>Chrysopogon</i>	16	1	2	5
<i>Chrysopogon zizanioides</i>	15	1	2	4

Tabela 2. Número de artigos encontrados nos cruzamentos de palavras no Scopus.

Scopus	essential oils	antibacterial activity	chemical components	biological activity
<i>Vetiveria</i>	50	15	23	12
<i>Vetiver</i>	65	4	17	9
<i>vetiveria zizanioides</i>	37	8	9	12
<i>Chrysopogon</i>	29	5	7	8
<i>Chrysopogon zizanioides</i>	24	4	7	7

A *C. zizanioides* é uma planta pertencente à família Poaceae, uma planta alta com sistema radicular forte e raízes profundas podendo atingir até 3 metros de profundidade carregando em suas raízes óleo essencial, importantes substâncias responsáveis por

propriedades medicinais e aromáticas. Podem ser encontradas no Sul da Ásia, Bangladesh, ilha do Ceilão, Birmanês e África tropical, onde provavelmente é originário da Índia.

A *C. zizanioides* apresenta resistência a vários estímulos ambientais sejam eles, temperaturas elevadas, enchentes, secas, metais pesados, doenças e pragas. E pode ser aplicada em diversos ramos de segmentos como, fragrâncias, óleos essenciais, medicina e alimentos, isso justifica seu plantio em mais de 120 países. Com amplas propriedades e usos que esta planta carrega, é necessário caracterizar os compostos explorando as estruturas químicas da raiz, nos compostos do metabolismo primário estão presentes, sesquiterpenos e seus descendentes sesquiterpenos álcoois, cetonas e hidrocarbonetos. Já no metabolismo secundário é encontrado esteróides, fenóis, flavonóides, saponinas, sesquiterpenos, taninos, terpenóides e triterpenos.

As ferramentas para a realização do artigo foram sites de fontes bibliográficas como Web of Sciences e Scopus. Grande parte dos artigos publicados nos últimos 5 anos remetem a fitorremediação, onde as plantas são utilizadas para remoção de substâncias presentes no solo como metais pesados.

2.1.1 Composição química

As formas de cultivo, condições de clima e solo podem interferir nas concentrações das substâncias presentes na planta tendo conhecimento disto foram observadas as substâncias de maior concentração.

O trabalho liderado por Cheaha et al. (2016) cujo objetivo foi investigar seu uso terapêutico melhorar o estado de alerta e a execução de tarefas das pessoas identificaram em suas análises por CG-EM do óleo obtido da Tailândia the Doi Kham shop os seguintes compostos majoritários: β -vetivenene, Khusimol, vetivenic acid e α -vetivone.

Em busca de agentes com propriedades protetoras de frutos na agricultura os óleos essenciais podem ser utilizados como biopesticidas, assim com a ampla aplicação de óleos essenciais em diversas áreas este foi investigado, e identificado as substâncias de maiores concentrações, a planta foi obtida Western Ghats, Tirunelveli, Sul da Asia, Cedr-8-en-13-op (14.5 %), β -Guaiene e 3,8-Dimethyl-4-(1-methylethylidene)-2,4,6,7,8,8a-Hexahydro-(7.72 %) Atif et al. (2020).

No estudo de Andreea David et al. (2019) investigando diferentes métodos extrativos foram detectados os seguintes compostos de maior concentração analisados através da

cromatografia gasosa e espectrometria de massa, valerenol (18.48%), valerenal (10.21%), and β -Cadinene (6.23%).

Em outro estudo, Kansiree Jindapunnapat et al. (2018), as substâncias identificadas em maiores concentrações foram o sesquiterpeno ácido 3,3,8,8-tetramethyltricyclo[5.1.0.0(2,4)]oct5-ene-5-propanoico e o álcool 6-isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-ol no óleo essencial de planta originaria da Tailândia (vide Figura 2).

Estudo em busca de agentes com atividade antimicrobiana para microrganismos que afetam o sistema reprodutivo, os autores reportaram a composição química do óleo descrevendo os seguintes constituintes químicos, β -vetivenene (7.42%) and khusenol (5.24%) Kačániová et al. (2020).

Um estudo realizando apenas a planta a Chou et al. (2016), identificou cedr-8-en-13-ol (12.4%), α -amorphene (7.80%), β -vatirenene (β -vetivenene, 5.94%), and cc (5.91%)

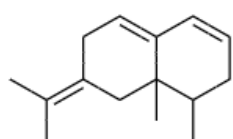
Em um outro estudo realizado na UNICAMP Ramirez-Rueda et al. (2019) ao investigar substâncias com atividade antimicrobiana, realizaram a análise do óleo por CG-EM onde foram identificados 37 constituintes químicos com um total de 51 picos e foi possível observar que as substâncias majoritárias foram Cedr-8-en-13-ol e β -Vatirenene.

Os dados mostram que dependendo da forma de cultivo e da região de origem da planta *C. zizanioides* os constituintes químicos de seu óleo essencial podem variar, com isso podendo mudar a atividade biológica e suas aplicações.

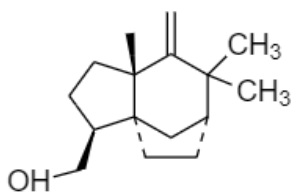
Na Tabela 3 são apresentadas informações dos constituintes reportados para o óleo essencial de *C. zizanioides* e na Figura 2 suas estruturas químicas.

Tabela 3: Informações dos constituintes químicos reportados para o óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides*

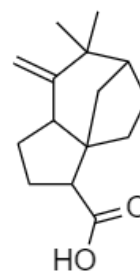
Diversidades de constituintes	Referência	nome da espécie	Origem da planta	parte trabalhada	Aplicações terapêuticas	Método de extração/ produto orgânico volátil
β -vetivenene, Khusimol, vetivenic acid, α -vetivone	Cheaha et al., 2016	<i>Vetiveria zizanioides</i>	Tailândia	Não mencionado	Melhorar o estado de alerta e a execução de tarefas.	Realizado a compra do óleo
Cadr-8-en-13-ol, β -Guaiene, 3,8-Dimethyl-4-(1-methylethylidene)-2,4,6,7,8,8a-Hexahydro	Atif et al., 2020	<i>Vetiveria zizanioides</i>	Sul da Asia	Raiz	Proteção das frutas pós colheita contra bactérias.	Método de hidrodestilação
valerenol, valerenal, β -Cadinene	David et al., 2019	<i>Vetiveria zizanioides</i>	China	Raiz	Avaliar atividade contra gram-positivas como <i>Staphylococcus aureus</i> .	Solvente ecológico, etanol pressurizado com CO ₂ ou etanol expandido com dióxido de carbono (CXE)
3,3,8,8-tetramethyltricyclo[5.1.0.0(2,4)]oct-5-ene-5-propanoic acid	Jindapunnapat et al., 2018b	<i>Vetiveria zizanioides</i>	Porto Rico	Raiz	Investigação de compostos ativos contra <i>Meloidogyne incognita</i> .	Extração aquosos e etanólico
6-isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-o						
β -vetivenene, khuseno	Kačániová et al., 2020	<i>Vetiveria zizanioides</i>	Nitra	Raiz	avaliar as propriedades químicas e antibacterianas contra <i>Staphylococcus spp.</i>	Destilação a vapor de raízes secas
cedr-8-en-13-ol, α -amorphene, β -vetivenene, α -gurjunene	Chou et al., 2016	<i>Vetiveria zizanioides</i>	Não mencionado	Não mencionado	uma revisão bibliográfica	Não mencionado



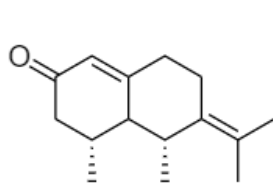
β -vetivenene



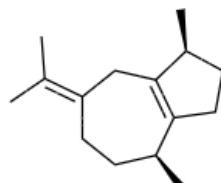
Khusimol



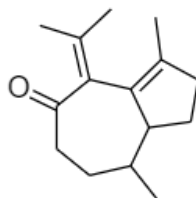
vetivenic acid



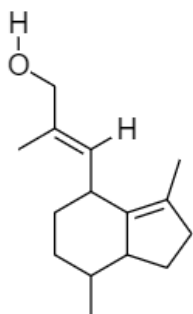
α- vetivone



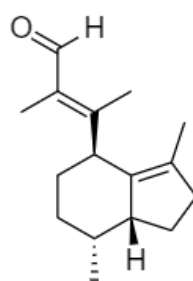
β-Guaiene



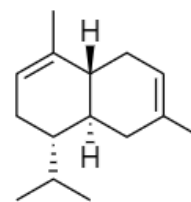
3,8-Dimethyl-4-(1-methylethylidene)-2,4,6,7,8,8a-Hexahydro



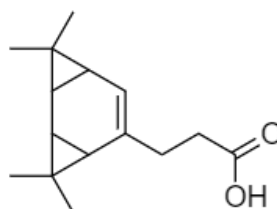
valerenol



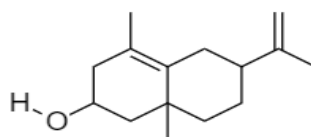
valerenal



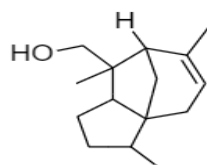
β-Cadinene



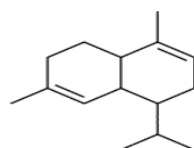
3,3,8,8-tetramethyltricyclo[5.1.0.0(2,4)]oct5-ene-5-propanoic acid



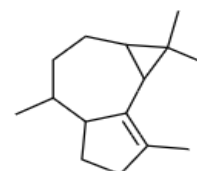
6-isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol



cedr-8-en-13-ol



α-amorphene



α-gurjunene

Figura 2. Estrutura química de alguns dos constituintes voláteis relatados para o óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides*

2.1.2 Propriedades biológicas do óleo essencial de *C. zizanioides*

2.1.2.1 Antimicrobiana

Estudos mais recentes têm avaliado o efeito antibacteriano do óleo essencial de *C. zizanioides* e os resultados de um trabalho conduzido por Efe (2019) mostraram atividade antibacteriana do óleo essencial para as cepas indicadoras *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, com valor de concentração inibitória mínima de 500µg/mL.

O óleo essencial de *C. zizanioides* quando associado ao óleo essencial *Pogostemon patchouli* mostrou atividade contra bactérias resistentes a antimicrobianos, como *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 43300) e MRSA (ATCC 33592) resistente à gentamicina, com valores de concentração inibitória mínima variaram de 0,06- 0,25 mg/mL Efe (2019).

Segundo Ramirez-Rueda et al. (2019), com base em análise empregando ensaios de bioautografia por CCD/análise por CG-EM, reportaram atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. zizanioides* e das frações deste óleo essencial frente bactérias multirresistentes a antibióticos (MDR), com indicações de que substâncias como cedr-8-en-13-ol, 6-isopropenil-4,8a-dimetil- 1,2,3,5,6,7,8,8a-octa-hidro-naftalen-2-ol, Sel-Selineno, Gurjunenepoxide-(2) e solavetivona estão dentre os constituintes do óleo essencial com maior relevância em termos de atividade antibacteriana.

Os resultados sobre o uso do óleo essencial extraído das raízes de *C. zizanioides* na atividade antimicrobiana contra cepas resistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA), foram investigados utilizando extratos de etanol, hexano e água. Foi realizado o ensaio de difusão em disco para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Entre os extratos testados, a água não apresentou atividade inibitória. O extrato de hexano demonstrou a menor concentração inibitória, variando de 0,003 a 0,032 mg/mL, indicando que os compostos ativos de baixa polaridade presentes no extrato de hexano podem estar relacionados à sua atividade antimicrobiana. O extrato de etanol apresentou uma CIM de 0,009 a 0,48 mg/mL Kannappan et al. (2017).

Swain et al. (2017) investigaram a síntese verde de nanopartículas de ouro usando extratos de raiz e folha de *Vetiveria zizanioides* e *Cannabis sativa*, além de suas atividades antifúngicas. Essa metodologia se destaca por seu baixo custo, fácil execução e caráter ecologicamente amigável. Os resultados mostraram uma zona de inibição significativa quando

comparada à síntese química de nanopartículas de prata. Os testes foram realizados em fungos como *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*. Esses achados indicam um potencial uso das nanopartículas verdes na produção de medicamentos para a indústria farmacêutica, além das vantagens ambientais dessa abordagem.

Jindapunnapat et al. (2018) avaliaram a atividade dos extratos e do óleo essencial de vetiver contra *Meloidogyne incognita*. Submetido a análise cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa as duas substâncias encontradas em maior concentração foram ácido: sesquiterpênico 3,3,8,8- tetrametiltriciclo [5.1.0.0 (2,4)] oct5-eno-5-propanóico ácido e o álcool sesquiterpeno 6-isopropenil- 4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-2-ol.

Apesar destes componentes serem os de maior concentração, os extratos aquosos foram os responsáveis por matar 70% em comparação com os extratos de etanol que fora apenas de 40% Jindapunnapat et al. (2018).

2.1.2.2 Repelente

A atividade repelente de quatro compostos isolados do óleo essencial de *C. zizanioides* foi avaliada. Entre eles, o isolongifolene e o vetiverol apresentaram resultados promissores, conforme demonstrado no estudo de Tisgratog et al. (2016). Os ensaios de irritação por contato e de repelência espacial indicaram que essas substâncias possuem potencial repelente, embora seja necessária a realização de mais pesquisas para confirmar esses resultados.

2.1.2.3 Sedativa e hipnótica

Outro estudo que explorou o uso do óleo essencial de *Vetiveria zizanioides* focou na caracterização de polímeros encapsulados com o óleo essencial para a avaliação da atividade sedativa e hipnótica. Nesse trabalho, foi utilizado um sistema polimérico biocompatível, composto por alginato de sódio associado a goma gelana ou goma Karaya. Os resultados mostraram que as microcápsulas poliméricas encapsuladas reduziram a motilidade em relação ao grupo controle, sugerindo um potencial uso terapêutico. Essa tecnologia é relevante, pois um sistema de liberação prolongada proporciona um maior tempo de ação do fármaco no organismo, reduzindo a quantidade necessária e estabilizando os níveis terapêuticos. Isso, por sua vez, diminui os riscos de efeitos adversos e melhora a adesão do paciente ao tratamento Ali et al. (2020).

2.1.2.3 Métodos extrativos

Com a crescente preocupação com o meio ambiente, métodos extrativos sustentáveis em química verde têm sido investigados para substituir os métodos tradicionais, David et al.

(2019) analisaram a utilização de etanol pressurizado com CO₂ e etanol expandido com dióxido de carbono para a extração e isolamento do óleo essencial de *Vetiveria zizanioides*. O estudo incluiu uma avaliação comparativa com a hidrodestilação convencional. Por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa, foram identificados três compostos majoritários: valerenol (18,48%), valerenal (10,21%) e beta-Cadinene (6,23%). Notavelmente, o método alternativo resultou na identificação de 48 compostos a menos em comparação com a hidrodestilação. Nos testes antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus*, ambos os métodos apresentaram eficácias semelhantes contra bactérias Gram-positivas.

2.2 Considerações gerais sobre ciclodextrinas

Sistemas de liberação modificada são amplamente utilizados para otimizar a eficácia e o perfil terapêutico de substâncias bioativas, incluindo os óleos essenciais. Nos anos recentes, verificou-se um crescimento considerável no interesse por produtos desenvolvidos a partir de ingredientes naturais, incluindo cosméticos e medicamentos, devido ao seu potencial terapêutico e valor estratégico em diversos setores industriais e econômicos.

Entre esses sistemas, os complexos de inclusão com ciclodextrinas (CDs) destacam-se pela capacidade de estabilizar e proteger uma ampla gama de substâncias. Estudos demonstram que a inclusão de moléculas bioativas em CDs pode melhorar suas propriedades farmacológicas, proporcionando maior segurança e eficácia. As ciclodextrinas são particularmente eficazes em melhorar a solubilidade em água de compostos de baixa solubilidade, além de melhorar sua absorção e durabilidade. Dado que, são frequentemente empregadas para reduzir efeitos adversos, como irritações gastrointestinais causadas por certos fármacos, transformar líquidos em microcristais ou pós não cristalinos, e evitar interações indesejadas entre substâncias ativas e excipientes (Dollo et al., 1998; Loftsson et al., 2001; Loftsson et al., 2005; Loftsson et al., 2007).

As CDs são macrocíclicos derivados de açúcares e resultam da degradação enzimática da ciclodextrina-glicosiltransferase. Essas moléculas formam uma família de oligossacarídeos composta por seis (alfa-CD), sete (beta-CD) ou oito (gama-CD) unidades de glicose, conectados por ligações α -(1,4). As CDs possuem um espaço interno hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica, o que facilita a inclusão de uma ampla variedade de moléculas em sua estrutura Ruktanonchai et al. (2011). A disposição dessas unidades de glicose cria uma estrutura adequada para criar complexos de inclusão com compostos bioativos, como mostrado em estudos prévios Mourtzinou et al. (2008).

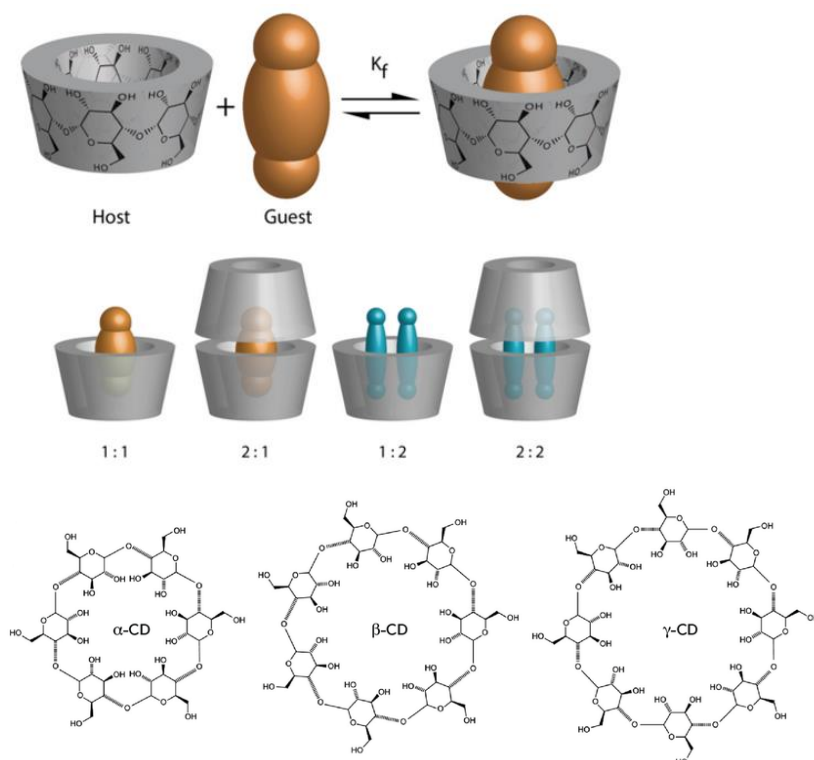


Figura 2: Estrutura geral da ciclodextrina.

As ciclodextrinas (CDs) têm a capacidade de criar complexos de inclusão com uma vasta gama de substâncias, o que tem atraído a atenção da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos produtos. A criação desses complexos tem demonstrado resultados positivos, melhorando as propriedades farmacológicas de diversos compostos bioativos, como aumento da eficácia terapêutica e maior segurança no uso de fármacos.

As moléculas encapsuladas se ligam à cavidade interna das CDs por meio de interações dipolo-dipolo e de forças de Van der Waals (Li et al., 2007; Marreto et al., 2008). Esses complexos são mantidos por meio de interações não covalentes, resultando em uma estabilidade dinâmico em que a molécula convidada alterna entre associar-se e dissociar-se da cavidade da ciclodextrina. Naturalmente, as CDs (α , β e γ) em meio aquoso contêm partículas de água em seus espaços apolares, mas essas moléculas podem ser substituídas por outras menos polares, proporcionando a encapsulação de substâncias ativas. A relação estequiométrica mais comum é de 1:1, embora outras proporções também possam ocorrer, como 2:1 ou 1:2 (ligante: β -CD) De Jesus. (2006).

A inclusão de moléculas em ciclodextrinas pode ser verificada através de várias técnicas analíticas, como fluorescência, espectroscopia de UV-Vis, ressonância magnética nucleônica e espectroscopia no infravermelho. A reatividade dos compostos encapsulados tende a ser reduzida, conferindo-lhes maior estabilidade química De Jesus. (2006). Além disso, o complexo formado geralmente apresenta maior resistência à volatilização e à sublimação, com uma significativa melhora na solubilidade das substâncias encapsuladas.

Cerca de 40% dos insucessos no desenvolvimento de novos medicamentos estão relacionados a problemas de dissolução e permeabilidade, fatores que podem ser mitigados com o uso de CDs Davis e Brewster. (2004). No caso de óleos essenciais, que são frequentemente instáveis e pouco solúveis em água, a encapsulação com CDs é especialmente eficaz para melhorar sua solubilidade e estabilidade. Técnicas de encapsulação com CDs têm mostrado bons resultados na proteção de compostos voláteis, como os monoterpenos, que são os principais componentes dos óleos essenciais (Shiga et al., 2003; Szenté et al., 2004; Li et al., 2007; Ruktanonchai et al., 2011).

No campo da terapia, a oferta de agentes quimioterápicos eficazes é limitada, sobretudo devido à baixa solubilidade, toxicidade elevada e necessidade de tratamentos prolongados. A encapsulação de fármacos em CDs apresenta-se como uma estratégia promissora para superar essas limitações, otimizando a eficácia e segurança desses compostos (Soares & Cury, 2001; Bisignano et al., 1999).

Até o presente momento não foram identificados na literatura pesquisas tecnológicas com o óleo essencial de *C. zizanioides* visando sistemas de liberação modificada deste óleo essencial como bioativo em complexo de encapsulação em β -ciclodextrina (β -CD). Assim, com o estudo proposto pretende-se investigar novas fontes de agentes antimicrobianos de fonte natural em estudo com uma abordagem interdisciplinar, inovadora e contemporânea, utilizando bioensaios laboratoriais, pesquisa em tecnologia farmacêutica e técnicas analíticas para conduzir a investigação química e biológico com óleo essencial de *C. zizanioides*.

3. JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, o interesse por produtos derivados de substâncias naturais, como cosméticos e medicamentos, tem crescido significativamente. Esses produtos não apenas oferecem novas opções terapêuticas, mas também agregam valor econômico devido ao seu potencial industrial diversificado.

Sistemas de liberação controlada têm sido amplamente investigados para otimizar a eficácia de moléculas bioativas, especialmente no que se refere a óleos essenciais e outros compostos voláteis. Entre esses sistemas, as ciclodextrinas (CDs) se destacam pela sua capacidade de criar complexos de inclusão com diversos compostos, proporcionando maior estabilidade e proteção a compostos sensíveis. Estudos têm demonstrado que a formação desses complexos melhora as características farmacológicas dos medicamentos, elevando sua segurança e eficácia.

A principal vantagem do uso de CDs está na sua capacidade de aumentar a solubilidade aquosa de compostos que, de outra forma, teriam baixa biodisponibilidade, além de estabilizar moléculas bioativas. Elas podem, por exemplo, reduzir efeitos colaterais, como irritação gastrointestinal, e melhorar a manipulação de substâncias ao transformá-las em microcristais ou pós amorfos. Além disso, as CDs também ajudam a evitar interações indesejadas entre distintos medicamentos ou entre medicamentos e excipientes (Dollo et al., 1998; Loftsson et al., 2001; Loftsson et al., 2005; Loftsson et al., 2007).

Dada a crescente demanda por soluções que melhorem a eficiência e a estabilidade de moléculas bioativas, o estudo das CDs como veículos para liberação sustentada representa uma relevante contribuição para a elaboração de novas abordagens terapêuticas.

Diferentes partes de *C. zizanioides* são usadas no tratamento etnofarmacológico de doenças. Por exemplo, suas folhas são usadas para tratar lumbago, reumatismo, entorses e como anti-helmíntico. A decocção do caule é empregada para aliviar a infecção do trato urinário. No entanto, a raiz é a parte mais utilizada, não apenas na etnofarmacologia, mas em muitas outras áreas, como as indústrias de cosméticos e alimentos. O óleo essencial das raízes de *C. zizanioides* é utilizado na medicina tradicional como medicamento antibiótico, antifúngico, antimalárico, anti-inflamatório, antiácido, carminativo, diaforético, estimulante e antidiabético (Chou et al., 2016; Ramirez-Rueda et al., 2019). Existem vários relatos de atividade antimicrobiana de OE e extratos de CZR, tendo atividade em um amplo espectro de microrganismos. Os microrganismos suscetíveis a EOs e extratos de CZ são bactérias como *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*, *M. tuberculosis*; e fungos como *A. fumigatus*,

M. canis, *T. rubrum* e *C. albicans*. A atividade anti-biofilme foi bem-sucedida contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina Kannappan, et al. (2017). Frações e compostos isolados de CZR também têm atividade antimicrobiana contra diferentes microorganismos como *M. smegmatis*, *T. mentagrophytes*, *M. gypsum*, *A. niger*, entre outros (Gupta et al., 2012; Santos et al., 2014; Prajana et al., 2013).

A principal razão para investigar compostos antibacterianos da CZR-EO é a deficiência de substâncias/ingredientes ativos no tratamento da resistência antimicrobiana e de buscar maior sistemas drug-delivery que melhorem a eficácia e aumentando a segurança deste bioativo Moloney. (2016). Segundo Ramirez-Rueda et al. (2019), com base em análise empregando bioautografia por CCD/análise por GC-MS, foi relatada a atividade antimicrobiana da CZR-EO e suas frações contra dois modelos de bactérias multirresistências (MDR), com indicações desses compostos que podem ter um papel importante. Constituintes do óleo essencial das raízes de CZ como Cedr-8-en-13-ol, 6-isopropenil-4,8a-dimetil- 1,2,3,5,6,7,8,8a-octa-hidro-naftalen-2-ol, Sel-Selineno, Gurjunenepoxide-(2) e solavetivona são as substâncias com maior relevância na atividade antibacteriana contra os modelos de bactérias multi droga resistentes (MDR) utilizados Ramirez-Rueda et al. (2019).

Assim, o estudo atual tem como finalidade explorar novas fontes de agentes antimicrobianos e citotóxicos de origem natural, utilizando uma abordagem multidisciplinar, inovadora e contemporânea. Serão conduzidos bioensaios laboratoriais, estudos de tecnologia farmacêutica e métodos analíticos, a fim de executar uma investigação química e biológica do óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides*, além de contribuir para a formação e capacitação de recursos humanos altamente qualificados.

4. OBJETIVOS

A meta principal desta pesquisa foi criar o complexo de inclusão do óleo essencial extraído das raízes de *Chrysopogon zizanioides* com β -ciclodextrina, realizando a caracterização detalhada dos seus constituintes químicos. Além disso, buscou-se avaliar as ações biológicas do óleo essencial e do complexo encapsulado, com foco nas suas propriedades antimicrobianas e citotóxicas. Foram objetivos específicos:

- Realizar análise *in silico* dirigida a partir de constituintes químicos anteriormente reportados em literatura para o óleo essencial das raízes de *C. zizanioides*, para a predição de substâncias biologicamente ativas;
- Análise de seus componentes químicos por meio de cromatografia gasosa ligada à espectrometria de massas (CG-EM);

- Preparar o complexo de inclusão do óleo essencial com β -ciclodextrina;
- Investigar a atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial e de seu complexo de encapsulação com β -ciclodextrina;
- Avaliar os efeitos do óleo essencial e de seu complexo de inclusão na viabilidade celular de linhagens não tumorais (fibroblastos e queratinócitos) e tumorais (melanoma e próstata).

5. METODOLOGIA

5.1. Análise *in silico* de atividades biológicas e mecanismos de ação de constituintes previamente reportados em literatura para o óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides*

Esta parte do trabalho teve como objetivo avaliar o painel biológico dos constituintes químicos, reportados em literatura para o óleo essencial de *C. zizanioides* e analisar *in silico* predições de potenciais atividades biológicas empregando o software *Prediction Activity Spectrum of Substances (PASS online)*, a partir dos códigos SMILES.

Foram utilizados, além de informações de revisão de literatura, dados obtidos junto ao grupo de pesquisa sobre as possíveis substâncias encontradas por meio de análise em GC-EM. Para tanto, foram catalogados os principais constituintes com estrutura química elucidada e cada substância descrita foi pesquisada no site Pubchem para a obtenção do canonical SMILES. O programa *PASS online* possibilita realizar análises através da estrutura química de substâncias, realizando uma predição de valores de compatibilidade de substâncias ativas (Pa) ou inativas (Pi) para determinadas atividades biológicas e mecanismos de ação.

Nas predições das propriedades farmacológicas *in silico* dessas substâncias, empregando a ferramenta PASS, foi possível estimar os índices Pa (probabilidade de ser ativo) ou Pi (probabilidade de ser inativo). Os resultados da predição foram expressos pela diferença entre os valores de Pa e Pi, onde os valores de $Pa - Pi < 0,2$ são classificados como baixo potencial, valores de $Pa - Pi > 0,2$ e $< 0,5$ são indicativos de potencial moderado e para $Pa - Pi \geq 0,5$ são considerados de alto potencial Amparo et al. (2020).

Para a validação da predição e das análises *in silico* realizadas foram aplicadas as mesmas análises em substâncias controle, com efeito farmacológico e mecanismo de ação já estabelecidos, sendo elas Meticilina, Doxorrubicina e Vancomicina (vide Tabela 5).

5.2. Obtenção do óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides*

O óleo essencial (Lote 227, 100 mL) das raízes de *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty foi adquirido comercialmente da empresa Ferquima (SP-Brasil). De acordo com o fabricante a origem geográfica da planta é a Indonésia.

5.3. Análise dos constituintes químicos por CG-EM

A análise dos compostos voláteis presentes no óleo essencial e no seu complexo de inclusão com β -ciclodextrina foi executada por meio de cromatografia gasosa ligada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando o equipamento Shimadzu GC-2010, seguindo os procedimentos descritos por Takayama et al. (2011). Para a separação, foi empregada uma coluna capilar de sílica fundida com fase fixa (DB-5; 5,30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m), com as seguintes condições: temperatura do injetor ajustada para 250 °C, razão de split 1:30 (v/v), temperatura do detector fixada em 250 °C e hélio como gás de arraste, com um fluxo de 1,52 mL/min (gás de pureza 99,9% da White Martins). O volume injetado foi de 1 μ L de amostra diluída em clorofórmio (1:100, v/v). O programa de temperatura da coluna foi iniciado em 60 °C por 3 minutos, aumentando 3 °C/min até 220 °C, com um tempo total de análise de 40 minutos. Os espectros de massas foram adquiridos no intervalo de 40 a 600 unidades de massa atômica (u.m.a.).

A identificação dos compostos presentes no óleo essencial foi feita com base em dois critérios: os índices de retenção, calculados utilizando o Índice de Kovats, comparados com a corrida de padrões de n-alcenos (C8 a C20, Sigma-Aldrich), e a análise dos espectros de massas, comparados com dados de referência disponíveis na literatura Adams. (1995) e no banco de dados NIST de 1998.

5.4. Preparação do complexo de inclusão do óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides* em β -ciclodextrina e caracterização físico-química do complexo de inclusão

A preparação dos complexos sólidos seguiu a metodologia de Weisheimer et al. (2010), com algumas alterações. Primeiramente, 2 g de β -ciclodextrina foram dissolvidos em 20 mL de água destilada, obtendo-se uma concentração final de 10% (m/v). A solução foi aquecida a 55°C e mantida sob agitação constante por 15 minutos até a completa dissolução da β -CD. Em seguida, o óleo essencial foi adicionado por gotejamento, mantendo-se a proporção molar de 1:1 entre o óleo essencial (com base no teor de cedr-8-en-13-ol) e a β -ciclodextrina. A combinação resultante foi submetida a movimentação contínua por 4 horas. Após esse período, a suspensão foi submetida ao método de secagem por pulverização utilizando um mini spray dryer, seguindo os parâmetros estabelecidos por Weisheimer et al. (2010). As condições específicas de secagem no spray dryer estão descritas na Tabela 4, conforme ajustadas por Ramos (2015).

Tabela 4. Condições de secagem da suspensão resultante no *Spray Dryer*

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

O material seco obtido foi armazenado em um dessecador a vácuo para futura análise por cromatografia gasosa unida à espectrometria de massas (CG-EM). A avaliação da porcentagem de inclusão do óleo essencial no espaço da ciclodextrina foi realizada por meio de CG-EM, utilizando as mesmas condições analíticas empregadas para o óleo essencial não encapsulado, conforme descrito anteriormente. Para o pó do complexo de inclusão na ciclodextrina, foi efetuada uma extração prévia antes da análise para determinar a porcentagem de inclusão. O mesmo procedimento foi aplicado a uma alíquota do óleo essencial não complexado, para comparação e validação da técnica de extração.

Para esse propósito, cerca de 20 mg do complexo de inclusão e do óleo essencial não encapsulado foram pesados em um tubo de vidro com tampa e dissolvidos em 2 mL de água deionizada. À mistura obtida, foi adicionado 1 mL de hexano, e o tubo foi mantido em banho-maria a 85 °C por 20 minutos. A fase hexânica foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL contendo 50 µL de solução padrão interna de octadecano a 2,5 mg/mL, e o volume foi completado com hexano. A solução obtida foi então analisada por CG-EM. Este procedimento foi repetido quatro vezes (n=4) para garantir a precisão dos resultados.

5.5. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana

A ação antibacteriana do óleo essencial e do seu complexo de inclusão em β -CD foi determinada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços, técnica da gota CLSI. (2018), seguindo a adequação de metodologia como descrita por Salvador et al. (2002) e Naghili et al.

(2013). Para a execução do ensaio foi utilizada cepa padrão de *Staphylococcus aureus* N315 (MRSA) resistente à metilicina; cultivada por 24 horas a 37°C em Müller Hinton (Difco)-MH.

Em cada poço foram pipetados 100 µL de meio de cultura líquido Müller Hinton (Difco)-MHb adicionado do inóculo de microrganismo indicador (5×10^6 UFC/poço para bactérias) mais 100µL das amostras-teste a uma concentração de 1000 µg/mL e de 200 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado cloranfenicol (200 µg/mL) para as bactérias e como controle negativo DMSO/água destilada esterilizada (5:95, v/v). A incubação foi a 37°C ± 2 por 48 horas.

Seguindo metodologia descrita por Naghili et al. (2013) com adequações, decorrido o período de incubação foram realizadas diluições seriadas 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , empregando 10 uL de amostra-teste e 90uL de tampão fosfato (PBS) e uma gota de 20 µL de cada uma destas diluições para cada amostra-teste (duplicata) foi aplicado em placas de petri contendo Müller Hinton (Difco)-MH, seguido de incubação a 37°C ± 2 por 48 horas. Os resultados foram expressos em termos de ufc/mL (% de crescimento) e quando for o caso CIM em µg/mL. Os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata para cada cepa indicadora utilizada.

5.6. Avaliação do efeito sobre a viabilidade celular utilizando linhagens de células tumorais humanas e frente a linhagens de células não tumorais

As linhagens celulares aplicadas no presente estudo foram HaCat (queratinócitos), 3T3 (fibroblastos), SK-MEL-103 (melanoma) e PC-3 (câncer de próstata). As linhagens celulares foram obtidas dos seguintes professores aos quais agradecemos: à Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira (IB-UNICAMP), que gentilmente doou a linhagem celular SK-MEL-103 e HaCat, à Dra. Sandra Martha Gomes Dias (LNBio-CNPq), que gentilmente doou a linhagem celular 3T3 e a Profa. Dra. Valeria Quitete (IB-UNICAMP) que doou a linhagem PC-3, cujos estoques são mantidos em nitrogênio líquido.

O teste da viabilidade celular foi realizado através da avaliação da redução do MTT Mosmann. (1983). O ensaio se baseia na redução do MTT, cuja cor anteriormente amarela é convertida a roxo quando reduzido, sinalizando a formação dos cristais de formazan, e consequentemente indicando proporcionalmente o número de células viáveis. Para isso, o foram plaqueadas separadamente em microplacas de 96 poços (200µL/poço), as quatro linhagens celulares, com densidade de inoculação ente $2,5 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^4$ células/mL, com seus respectivos meios de cultura. Após 24 h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, é trocado o meio e adicionadas as amostras a serem avaliadas em concentrações finais de

250, 25, 2.5 e 0.25 $\mu\text{g/mL}$. Como controle positivo é utilizado o quimioterápico Doxorrubicina nas seguintes concentrações finais: 62, 6.2, 0.62 e 0.062 $\mu\text{g/mL}$, como controle negativo o diluente DMSO/RPMI-1640 (0,1%) e como controle do inóculo um branco da suspensão celular. Após as 24 horas de tratamento, foram removidos os meios de cultura e adicionados 100 μL do MTT (0,5 mg/mL), em cada poço. Após incubação de 4 horas em estufa, o MTT foi removido e adicionado 100 μL de DMSO em cada poço e as placas retornaram por mais 15 minutos para a estufa. Subsequentemente, a absorbância foi averiguada, no comprimento de onda de 570 nm, através do leitor de microplacas (BioTek_Synergy_HT_Multi-Mode_Microplate_Read), sendo os valores de densidade óptica correspondentes à redução enzimática do MTT expressos em percentagens em relação ao controle não tratado (controle do inóculo). A viabilidade celular e citotoxicidade foram demonstradas através do cálculo do IC_{50} (concentração de amostra-teste capaz de inibir 50% da população de células avaliadas) em $\mu\text{g/mL}$. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5.7. Análise estatística

Através do software GraphPad Prism 9, foram aplicadas análises estatísticas apropriadas para cada experimento, como ANOVA, Teste de Tukey, Sidak, entre outros. Para todos, foram estabelecidos o nível de significância de $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise *in silico* Pass Online

Foi avaliado, em análise *in silico*, o painel biológico dos constituintes químicos, reportados em literatura para o óleo essencial de *C. zizanioides* visando analisar predições de potenciais atividades biológicas empregando o software *Prediction Activity Spectrum of Substances* (PASS online), a partir dos códigos SMILES.

Para comparação dos valores, utilizaram-se dados de Amparo et al. (2020), onde os resultados expressos pelo valor de Pa-Pi foram classificados da seguinte forma: Pa-Pi < 0,2 como potencial baixo (low potential); Pa-Pi > 0,2 e < 0,5 como potencial moderado (moderate potential); Pa-Pi ≥ 0,5 como potencial alto (high potential). Após analisar as tabelas fornecidas, foi possível observar que os compostos majoritários encontrados em diferentes óleos essenciais exibem uma variedade de atividades biológicas. Essas atividades são classificadas com base nos valores de Pa-Pi, onde valores mais altos indicam um potencial terapêutico mais elevado.

Foram investigadas as propriedades terapêuticas de 19 constituintes específicos reportados em literatura para o óleo essencial das raízes de *C. zizanioides*. Os resultados estão apresentados na tabela 5. Dentre os aspectos estudados, dois pontos merecem destaque: as propriedades antimicrobianas, que confirmam achados prévios na literatura científica, e as propriedades anticancerígenas, bem como outras propriedades relevantes para o tratamento de diversas enfermidades. Foram identificados possíveis atividades biológicas a partir de um banco de dados composto por informações internas e comerciais. O procedimento envolveu uma triagem criteriosa para a seleção dos compostos de maior interesse. No caso do óleo essencial de *C. zizanioides*, o cedr-8-en-13-ol mostrou potencial antineoplásico (Pa=0,579), antibacteriano (Pa=0,418) e antifúngico (Pa=0,460).

Por meio desta abordagem, foi possível prever complexos efeitos farmacológicos, além de mecanismos fisiológicos e bioquímicos, incluindo informações sobre toxicidade intrínseca. Este método se assemelha ao utilizado por químicos medicinais, que comparam o espectro de atividade de substâncias conhecidas para estipular suas propriedades. Estes resultados podem contribuir para o avanço do conhecimento sobre as propriedades terapêuticas de certos constituintes do óleo, fornecendo informações valiosas para o desenvolvimento de novos tratamentos e terapias.

Os resultados das análises *in silico* sugerem que algumas substâncias encontradas no óleo essencial das raízes de *vetiver* apresentam uma diversidade de atividades biológicas, com potencial terapêutico relevante em termos das predições de hipótese de ação. Esses achados destacam a importância dos óleos essenciais como fontes de bioativos.

Tabela 5. Análise *in silico* usando o programa PASS online para predição de atividades biológicas e mecanismos de ação de substâncias detectadas no óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides*

Atividade biológica	Valores de Pa - Pi para substâncias detectadas no óleo essencial de <i>Chrysopogon zizanioides</i>																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Antileucêmico	-	-	-	0,250	0,441	0,300	-	0,149	0,436	0,250	-	-	0,256	-	-	-	0,273	0,625	0,070	-	0,462	NA
Antineoplásico	0,402	0,258	-	0,884	0,918	0,447	0,219	0,812	0,742	0,884	0,587	0,185	0,526	-	0,492	0,334	0,622	0,579	0,763	-	0,956	NA
Antifúngico	0,165	0,089	0,215	0,457	0,630	0,341	0,141	0,436	0,467	0,457	0,240	-	0,336	0,251	0,497	0,349	0,488	0,460	0,415	0,073	0,610	NA
Antibacteriano	0,075	0,085	0,073	0,425	0,387	0,209	0,087	0,429	0,306	0,425	0,145	0,282	0,249	0,167	0,119	0,009	0,229	0,418	0,395	0,666	0,701	NA
Antiinflamatório	0,901	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
Mecanismo de ação																						
Inibidor da síntese de proteínas	-	-	-	0,219	0,214	0,323	-	0,244	0,306	0,219	0,024	0,144	0,134	0,170	0,267	-	0,188	0,204	0,031	0,215	0,479	NA
Inibidor da biossíntese da parede celular	0,272	0,262	0,128	-	-	0,193	0,247	-	0,195	-	0,341	0,055	0,195	0,049	0,188	0,126	-	0,070	-	-	-	NA
Agente oxidante	0,472	-	0,127	0,063	-	0,070	0,524	0,161	0,206	0,063	0,296	0,064	0,012	0,098	0,191	0,246	0,160	0,240	-	-	-	NA
Inibidor da proteína-tirosina fosfatase 2C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,056	-	0,106	0,112	-	-	-	-	-	NA
Inibidor da síntese de colesterol	-	0,144	0,236	0,334	-	0,247	0,156	0,350	0,229	0,334	0,236	0,099	0,389	0,261	0,248	0,178	0,307	0,243	0,070	-	-	NA
Inibidor da expressão MMP9	0,654	0,605	0,236	0,482	0,344	0,435	0,622	0,402	0,714	0,482	0,548	0,243	0,480	0,316	0,728	0,489	0,219	0,253	0,298	-	-	NA
Agonista da interleucina 2	-	-	0,009	-	-	0,211	-	-	-	-	-	0,252	-	0,099	0,086	-	-	0,161	-	-	-	NA

Pa: potencial de ser ativo; Pi: potencial de ser inativo.

Pa-Pi < 0,2: Baixo potencial; Pa-Pi entre >0,2 e < 0,5: Moderado potencial; Pa-Pi ≥ 0,5: Alto potencial.

(1) Cycloocta-1,3,6-triene, 2,3,5,5,8,8-hexamethyl-; (2) (+)-sativene; (3) Patchoulene; (4) gamma.-Muuroolene; (5) Bicyclo[5.3.0]decane, 2-methylene-5-(1-methylvinyl)-8-methyl-; (6) Tricyclo[6.3.0.0(1,5)]undec-2-en-4-one, 5,9-dimethyl-; (7) Biphenylene, 1,2,3,6,7,8,8a,8b-octahydro-4,5-dimethyl-; (8) alpha.-Amorphene; (9) gamma.-Himachalene; (10) gamma.-Muuroolene; (11) naphthalenone, (12) beta.-Vatirenene; (13) 2-(4a,8-Dimethyl-1,2,3,4,4a,8a-hexahydro-2-naphthalenyl)-2-propanol; (14) Cadina-1(10),6,8-triene; (15) Widdrol; (16) delta.-Selinene; (17) gamma.-Gurjunenepoxide; (18) Cedr-8-en-13-ol; (19) Solavetivone; (20) Meticilina; (21) Doxorubicina; (22) Vancomicina.

6.2. Análise por CG-EM do óleo essencial das raízes de *Chrysopogon zizanioides*,

A análise química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) do óleo essencial extraído das raízes de *Chrysopogon zizanioides* revelou que os principais constituintes incluem substâncias como Cedr-8-en-13-ol, 6-isopropenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octa-hidro-naftalen-2-ol, Sel-Selineno, Gurjunenepoxide-(2) e solavetivona. Esses achados estão em conformidade com os resultados já relatados na literatura para este óleo essencial (Ramirez-Rueda et al., 2019; Jindapunnapat et al., 2018; Chou et al., 2016), como ilustrado na figura 4 e na tabela 6.

Os resultados da análise por CG-EM revelaram a presença majoritária de cedr-8-en-13-ol do óleo essencial das raízes de *C. zizanioides* de planta originária da Indonésia, segundo o fabricante Ferquima corroborando os achados de Chou et al. (2016) e Ramirez-Rueda et al. (2019), que também identificaram essa substância como o principal constituinte do óleo essencial. Além disso, a presença de β -vetivenene e γ -gurjuneno epóxido, observada nos resultados deste estudo, é consistente com os relatos de Jindapunnapat et al. (2018), que destacam esses compostos como responsáveis pela atividade antibacteriana do óleo. A variação na concentração de alguns constituintes, como β -vatirenene, pode ser atribuída às diferenças nas condições de cultivo e nas metodologias extrativas, conforme apontado por David et al. (2019), que evidenciaram variações significativas na composição química do óleo essencial devido à influência ambiental e às técnicas de extração utilizadas. Esses resultados reforçam o potencial do óleo essencial de *C. zizanioides* como fonte de substâncias bioativas com propriedades antimicrobianas e farmacológicas, de acordo com a informações da literatura.

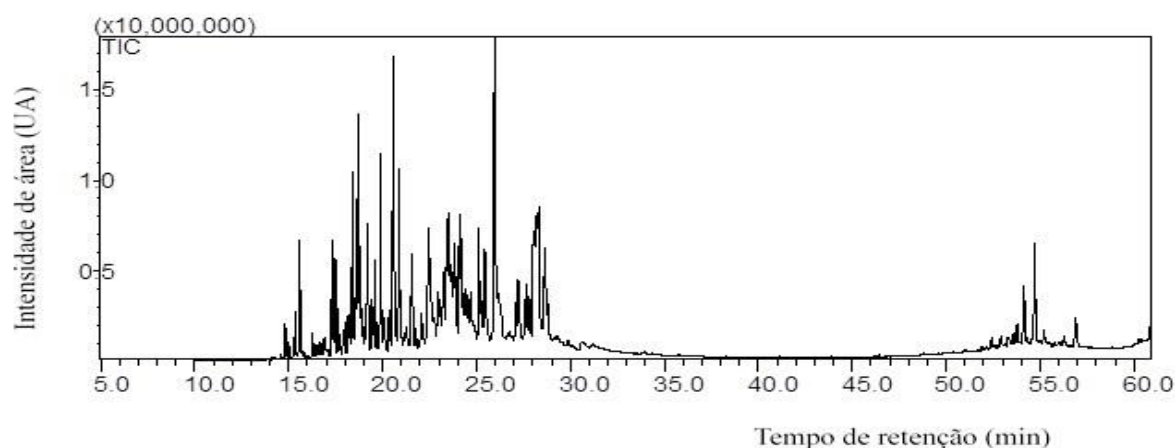


Figura 3: Cromatograma CG-EM da análise do óleo essencial das raízes de *Chrysopogon zizanioides* (sem extração, análise da injeção de solução contendo 1mg do óleo essencial em 100ul de diclorometano). UA, unidades arbitrárias.

Tabela 6: Resultados obtidos na análise química (CG-EM) do óleo essencial das raízes de *Chrysopogon zizanioides* (sem extração, análise da injeção de solução contendo 1mg do óleo essencial em 100ul de diclorometano).

Tempo de retenção (min)	Substância	RI ^a (calc.)	RI ^b (lit.)	Área relativa (%)
14.816	Cycloocta-1,3,6-triene, 2,3,5,5,8,8-hexamethyl-	1354	1354	1,79
15.356	1,5,9,9-Tetramethyl-2-methylene-spiro[3.5]non-5-ene	1328	1328	1,43
16.275	(+)-sativene	1339	1339	1,16
17.320	Patchoulene	1432	1432	5,33
17.477	gamma.-Murolene	1435	1435	3,76
17.646	Bicyclo[5.3.0]decane, 2-methylene-5-(1-methylvinyl)-8-methyl-	1456	1456	1,43
17.909	Tricyclo[6.3.0.0(1,5)]undec-2-en-4-one, 5,9-dimethyl-	1424	1424	0,5
18.178	Biphenylene, 1,2,3,6,7,8,8a,8b-octahydro-4,5-dimethyl-	1443	1443	1,59
18.406	alpha.-Amorphene	1440	1440	7,78
18.734	gamma.-Himachalene	1499	1499	8,59
18.841	gamma.-Murolene	1435	1435	1,17
20.218	Bicyclo[5.3.0]decane, 2-methylene-5-(1-methylvinyl)-8-methyl-	1456	1456	0,15
20.594	7-Ethynyl-1,4a-dimethyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydro-2(1H)-naphthalenone	1548	1548	16,74
20.684	Laurene	1549	1549	0,09
20.885	beta.-Vatirenene	1489	1489	9,32
21.555	2-(4a,8-Dimethyl-1,2,3,4,4a,8a-hexahydro-2-naphthalenyl)-2-propanol	1580	1580	5,97
22.442	Cadina-1(10),6,8-triene	1589	1589	1,54
24.203	Widdrol	1651	1651	1,92
24.963	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol	1690	1690	0,07
25.253	delta.-Selinene	1481	1481	0,61
25.448	gamma.-Gurjunenepoxide	1558	1558	6,66
25.982	Cedr-8-en-13-ol	1646	1646	19,52
26.747	2-(4a,8-Dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-naphthalen-2-yl)-prop-2-en-1-ol	1745	1745	0,21
28.046	Solavetivone	1645	1645	2,67

Os constituintes foram identificados com base no índice de retenção e no padrão de fragmentação observado nos espectros de massas em CG-EM (NIST, 2005), sendo organizados de acordo com a ordem de eluição na coluna Durabond-DB5 (30 m). O índice de retenção de Kovats, calculado a partir de uma série homóloga de n-alcenos (C8 a C20), foi determinado para cada substância utilizando a metodologia de van Den Dool & Kratz (1963) e comparado com os valores disponíveis na literatura (ADAMS, 2007).

A área total corresponde a 100%. RIa (calc.): índice de retenção calculado. RIb (lit.): índice de retenção conforme descrito na literatura (ADAMS, 2007). -: substância não detectada. O coeficiente de variação foi inferior a 5% (n=3).

6.3 Preparação do complexo de inclusão do óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides* em β -ciclodextrina,

O complexo de inclusão do óleo essencial de *C. zizanioides* em β -CD foi preparado e apresentou percentagem de inclusão do óleo essencial referente a cedr-8-en-13-ol relativo.

O complexo de inclusão do óleo essencial de *C. zizanioides* foi preparado em β -CD em termos de Cedr-8-en-13-ol relativo e a secagem foi por atomização empregando *spray-dryer*. A análise da eficiência de encapsulação foi realizada por GC-MS, sendo possível observar na figura 5 e tabelas 7 e 8 os constituintes químicos detectados na amostra analisada da fase hexânica da etapa de extração de amostra de óleo essencial das raízes de *C. zizanioides* não complexado e da amostra do complexo de inclusão do óleo essencial de *C. zizanioides* em β -CD.

A Figura 4 mostra os cromatogramas obtidos por GC-EM da amostra de óleo essencial de *C. zizanioides*, bem como do complexo de inclusão desse óleo essencial em β -ciclodextrina. Os dados indicam que ocorreu um carregamento seletivo de certos constituintes presentes no óleo essencial para o complexo de inclusão. Além disso, houve uma alteração nas proporções desses constituintes, sendo o cedr-8-en-13-ol identificado como o composto predominante tanto no óleo essencial quanto no complexo encapsulado.

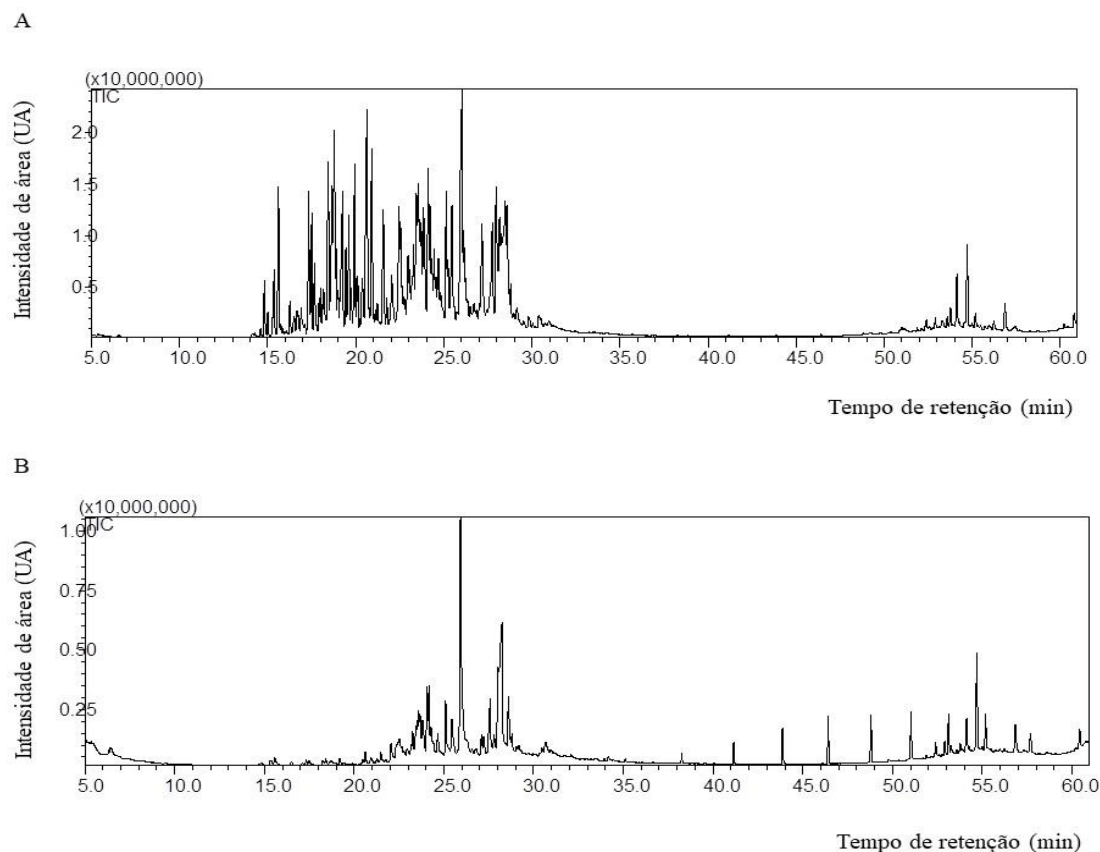


Figura 4: Cromatogramas CG-EM obtidos após injeção da fase hexânica da etapa de extração de amostra de óleo essencial das raízes de *Chrysopogon zizanioides* (A) e do complexo de inclusão do óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides* em β -CD (B).

As análises por CG-EM (Tabelas 7 e 8) mostraram o carreamento seletivo de alguns constituintes do óleo essencial no complexo com β -CD, incluindo o delta-selineno, gamma-gurjuneno epoxido-(2) e o cedr-8-en-13-ol como componente majoritário, estando este último constituinte dentre as substâncias apontadas na literatura como um dos responsáveis pela atividade antimicrobiana do óleo essencial de *vetiver* Ramirez-Rueda et al. (2019).

A preparação do complexo de inclusão do óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides* em β -ciclodextrina resultou em uma porcentagem de inclusão de 45,17% para o cedr-8-en-13-ol, principal constituinte do óleo essencial. Este resultado é consistente com estudos anteriores que destacam a eficácia da β -ciclodextrina em encapsular compostos voláteis e aumentar sua estabilidade, como demonstrado por Shiga et al. (2003) e Li et al. (2007), que relataram o aumento na solubilidade e na proteção contra a volatilização dos compostos encapsulados. No presente estudo, a encapsulação também foi eficaz em melhorar a solubilidade em água, um benefício reconhecido pela literatura ao utilizar β -ciclodextrina como encapsulante de óleos essenciais Ruktanonchai et al. (2011). A eficiência de encapsulação e o rendimento obtido no processo de secagem por atomização em spray-dryer corroboram os achados de Weisheimer et

al. (2010), que também utilizaram essa metodologia para encapsular compostos bioativos. Dessa forma, a inclusão do óleo essencial em β -ciclodextrina não apenas manteve a integridade dos principais constituintes, mas também oferece um sistema de liberação controlada, o que pode potencializar suas aplicações terapêuticas.

Tabela 7: Resultados obtidos na análise química (CG-EM) obtidos após injeção da fase hexânica da etapa de extração de amostra de óleo essencial das raízes de *Chrysopogon zizanioides*.

Tempo de retenção (min)	Substância	RI ^a (calc.)	RI ^b (lit.)	Área relativa (%)
14.815	Cycloocta-1,3,6-triene,2,3,5,5,8,8-hexamethyl-	1354	1354	2,08
15.363	1,5,9,9-Tetramethyl-2-methylene-spiro[3.5]non-5-ene	1328	1328	1,83
16.272	(+)-Sativene	1339	1339	1,28
17.334	beta.-Patchoulene	1432	1432	5,87
17.500	gamma.-Muurokene	1435	1435	4,15
17.651	Bicyclo[5.3.0]decane, 2-methylene-5-(1-methylvinyl)-8-methyl-	1456	1456	1,68
17.907	Tricyclo[6.3.0.0(1,5)]undec-2-en-4-one, 5,9-dimethyl-	1424	1424	0,54
18.175	Biphenylene, 1,2,3,6,7,8,8a,8b-octahydro-4,5-dimethyl-	1443	1443	0,63
18.439	alpha.-Amorphene	1440	1440	7,70
18.783	gamma.-Himachalene	1499	1499	5,43
18.873	gamma.-Muurokene	1435	1435	1,51
20.236	Bicyclo[5.3.0]decane, 2-methylene-5-(1-methylvinyl)-8-methyl-	1456	1456	0,13
20.652	7-Ethynyl-1,4a-dimethyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydro-2(1H)-naphthalenone (70) (1549) Laurene	1548	1548	13,95
20.923	beta.-Vatirenene	1489	1489	9,23
21.559	2-(4a,8-Dimethyl-1,2,3,4,4a,8a-hexahydro-2-naphthalenyl)-2-propanol	1580	1580	6,69
22.459	Cadina-1(10),6,8-triene	1589	1589	2,24
24.231	Widdrol	1651	1651	1,99
25.135	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol	1481	1481	4,70
25.229	delta.-Selinene	1481	1481	0,78
25.455	gamma.-Gurjunenepoxide-(2)	1558	1558	6,00
26.040	Cedr-8-en-13-ol	1646	1646	15,47
26.718	2-(4a,8-Dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-naphthalen-2-yl)-prop-2-en-1-ol	1745	1745	0,51
27.973	Solavetivone	1645	1645	5,61

Os constituintes foram identificados com base no índice de retenção e no padrão de fragmentação dos espectros de massas em CG-EM (NIST, 2005), sendo listados conforme a ordem de eluição na coluna Durabond-DB5 (30 m). O índice de retenção de Kovats, derivado de uma série homóloga de n-alcenos (C8 a C20), foi calculado para cada composto seguindo a metodologia de van Den Dool & Kratz (1963) e comparado com valores reportados na literatura (ADAMS, 2007). A área total analisada corresponde

a 100%. RIa (calc.): índice de retenção calculado. RIb (lit.): índice de retenção conforme os dados literários (ADAMS, 2007). -: substância não detectada. O coeficiente de variação foi inferior a 5% (n=3).

Tabela 8: Resultados obtidos da análise química (CG-EM) após injeção da fase hexânica da extração da amostra do complexo de inclusão do óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides* em β -ciclodextrina.

Tempo de retenção (min)	Substância	Ria (Calc.)	RIb (lit.)	Area relativa (%)
25.095	delta.-Selinene	1481	1481	10,41
25.441	gamma.-Gurjunenepoxide-(2)	1558	1558	11,92
25.926	Cedr-8-en-13-ol	1646	1646	77,67

Os constituintes foram determinados com base no índice de retenção e no padrão de fragmentação obtido nos espectros de massas por CG-EM (NIST, 2005) e organizados conforme a ordem de eluição na coluna Durabond-DB5 (30 m). O índice de retenção de Kovats, calculado a partir de uma série homóloga de n-alcenos (C8 a C20), foi determinado para cada composto utilizando a metodologia de van Den Dool & Kratz (1963) e comparado com os valores disponíveis na literatura (ADAMS, 2007). A área total corresponde a 100%. RIa (calc.): índice de retenção calculado. RIb (lit.): índice de retenção conforme descrito na literatura (ADAMS, 2007). -: composto não detectado. O coeficiente de variação foi inferior a 5% (n=3).

6.4 Caracterização físico-química do complexo de inclusão em β -CD do óleo essencial das raízes de *Chrysopogon zizanioides*

Na caracterização do complexo de inclusão calculou-se por CG-EM a proporção de inclusão do óleo essencial em β -CD em relação a de Cedr-8-en-13-ol relativo e avaliou-se o teor de Cedr-8-en-13-ol presente nos complexos de encapsulação em β -CD derivados do óleo essencial de *C. zizanioides*, estimando-se a eficiência de encapsulação do óleo essencial. O rendimento calculado para o pó do complexo de encapsulação do óleo essencial de *C. zizanioides* em β -CD foi de aproximadamente 19,24% e a estimativa da eficiência de encapsulação pela percentagem de inclusão do óleo essencial referente a cedr-8-en-13-ol relativo foi de 45,17%.

6.5 Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides* e do seu complexo de inclusão em β -ciclodextrina

O óleo volátil estudado de *C. zizanioides* isoladamente e seu complexo de encapsulação em β -ciclodextrina demonstraram atividade antimicrobiana contra a bactéria *S. aureus* (N315) resistente a meticilina nas condições experimentais avaliadas (Figura 6, Tabela 9).

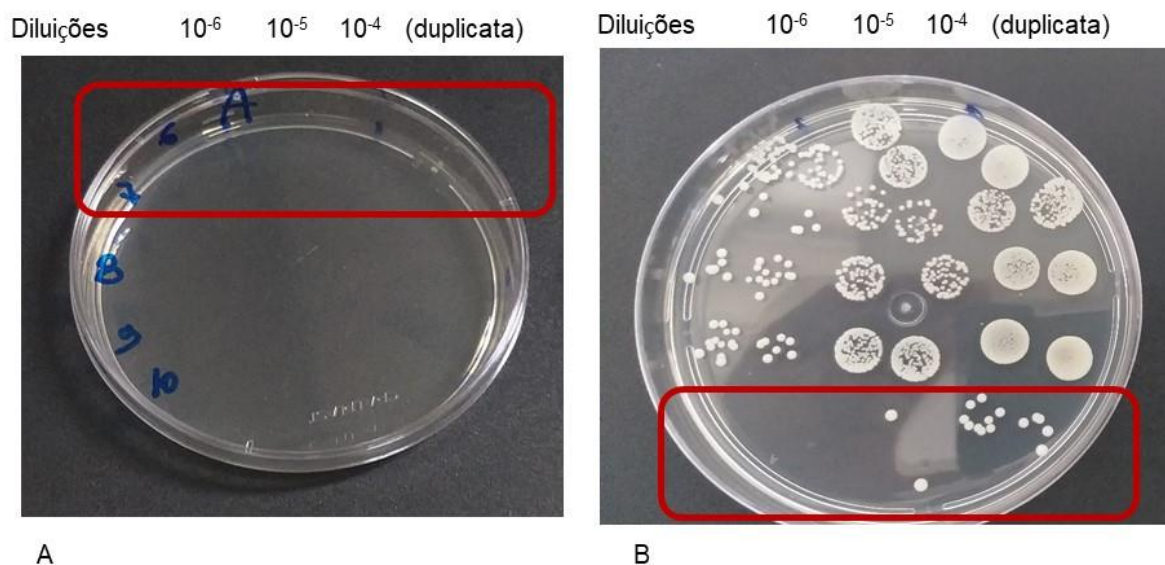


Figura 5: Imagem do ensaio antibacteriano técnica da gota para amostra de óleo essencial das raízes de *Chrysopogon zizanioides* (A) e do complexo de inclusão do óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides* em β -CD (B) na concentração de 200ug/mL.

Tabela 9. Efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides* e do seu complexo de inclusão em β -ciclodextrina

Amostras-teste	<i>S. aureus</i> N315 (ufc/mL)	
	1000 μ g/mL	200 μ g/mL
Óleo essencial vetiver	0	0
Complexo de inclusão óleo essencial vetiver/ β -CD - Spray Dryer	0	10^1
DMSO 5%	$>10^9$	$>10^9$
Cloranfenicol	NA	0

Os resultados indicam que o complexo de encapsulação do óleo essencial em β -ciclodextrina apresentou uma atividade antibacteriana inferior em comparação com o óleo não encapsulado, o que pode ser atribuído à quantidade reduzida de compostos ativos no complexo. No entanto, houve uma melhora significativa na solubilidade aquosa durante o bioensaio. No ensaio antibacteriano, utilizando o método de microdiluição em caldo, foi observada uma turvação no meio de cultura nos poços contendo o óleo essencial puro antes da adição do inóculo, enquanto o meio permaneceu límpido nos poços com o complexo de inclusão, indicando uma ausência de dispersão. A melhora na atividade antimicrobiana do óleo encapsulado pode ser explicada pela melhor dissolução e maior durabilidade química proporcionada pela β -ciclodextrina. Esses achados são consistentes com investigações anteriores que investigam a encapsulação de óleos essenciais em ciclodextrinas (Shiga et al.,

2003; Szente et al., 2004; De Jesus, 2006; Li et al., 2007; Marreto et al., 2008; Ruktanonchai et al., 2011).

Os dados obtidos a respeito da atividade antimicrobiana do óleo volátil de *C. zizanioides* são coerentes com os resultados descritos na literatura para essa espécie e outras plantas da família Poaceae Ramirez-Rueda et al. (2019). Entretanto, até agora, não foram identificadas pesquisas envolvendo a encapsulação do óleo essencial das raízes de *C. zizanioides* em ciclodextrina, o que torna esse trabalho inovador no campo da tecnologia farmacêutica aplicada a sistemas de liberação modificada. Esses resultados encorajam futuras pesquisas para validar e detalhar os efeitos observados, tanto no comportamento do complexo de inclusão quanto na atividade antibacteriana seletiva de seus constituintes.

Os resultados da avaliação antibacteriana do óleo essencial de *C. zizanioides* e do seu complexo de encapsulação em β -CD mostraram uma ação significativa contra *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), com concentrações inibitórias mínimas (CIM) de 200 $\mu\text{g/mL}$. Esse efeito antibacteriano está em concordância com estudos anteriores, como os de Kannappan et al. (2017) e Ramirez-Rueda et al. (2019), que demonstraram a eficácia do óleo essencial de *C. zizanioides* contra cepas multirresistentes. A inclusão do óleo essencial em β -ciclodextrina não apenas manteve sua atividade antibacteriana, mas também potencializou sua eficácia, como relatado por Li et al. (2007), que mostraram que a encapsulação em β -CD aumenta a estabilidade e solubilidade dos compostos ativos, melhorando sua biodisponibilidade. Além disso, a redução da volatilidade e a proteção química proporcionadas pela β -CD, conforme indicado por Shiga et al. (2003), também contribuíram para a manutenção da atividade antimicrobiana após o encapsulamento. Estes resultados corroboram a ideia de que a encapsulação do óleo essencial em β -CD é uma estratégia promissora para otimizar suas propriedades antibacterianas, tornando-o mais eficaz no combate á cepas resistentes a antibióticos.

Os achados da análise antibacteriana do complexo de inclusão do óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides* em β -ciclodextrina, na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ frente a *Staphylococcus aureus*, demonstraram atividade moderada, contudo, observa-se que o período de análise foi limitado a 24 horas. Considerando que a β -ciclodextrina é um sistema de liberação modificada, capaz de promover a liberação controlada e prolongada do ativo encapsulado, é possível que a extensão do tempo de avaliação para 48 ou 72 horas revele um aumento na eficácia antibacteriana. Estudos adicionais utilizando períodos mais longos poderiam esclarecer se o complexo apresenta desempenho aprimorado em função do efeito sustentado

proporcionado pela β -ciclodextrina, evidenciando seu potencial para aplicações terapêuticas mais eficazes.

6.6 Avaliação do efeito do óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides* e do seu complexo de inclusão em β -ciclodextrina na viabilidade celular e citotoxicidade

A partir da avaliação do efeito na viabilidade celular utilizando o ensaio MTT, foi possível averiguar a citotoxicidade dos extratos para as linhagens de célula tumoral (SK-MEL-103 e PC-3) e não tumorais (3T3 e HaCat) e como resultado obteve-se os valores de IC_{50} , isto é, a concentração de extrato capaz de inibir 50% da população de células Silva et al. (2011). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras, o DMSO a 0,1% e os resultados mostraram que a concentração final de DMSO inferior a 0,1% (v/v) não afetou o crescimento das linhagens celulares avaliadas. Os resultados estão sumarizados na **Tabela 10**.

Os resultados da avaliação de viabilidade celular e citotoxicidade indicaram que tanto o óleo essencial de *C. zizanioides* quanto o seu complexo de encapsulação em β -CD apresentaram baixa toxicidade em células não tumorais (fibroblastos 3T3), com valores de IC_{50} superiores a 250 μ g/mL. Em contraste, uma redução significativa na viabilidade celular foi observada nas linhagens tumorais de melanoma (SK-MEL-103) e próstata (PC-3), particularmente para o complexo de inclusão em β -CD, com IC_{50} de 73,74 μ g/mL. Esses resultados estão em conformidade com os achados de Prajna et al. (2013), que relataram a eficácia do óleo essencial de *C. zizanioides* em inibir o crescimento de células tumorais. Além disso, a encapsulação em β -CD demonstrou um efeito superior em relação ao óleo essencial puro, o que pode ser explicado pela melhoria na estabilidade e biodisponibilidade do composto ativo, conforme observado por Loftsson et al (2007). A redução da citotoxicidade em células não tumorais e o aumento da ação contra células tumorais destacam o potencial terapêutico do complexo de inclusão, em linha com os resultados de Salvador et al. (2002), que também relataram a eficácia de β -CD na potencialização de substâncias bioativas para uso terapêutico, incluindo ações antitumorais.

Tabela 10. Resultados do efeito na viabilidade celular para o óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides* e seus complexos de inclusão em β -ciclodextrina

Amostras-teste	Valores de IC ₅₀ (ug/mL)			
	3T3	HaCat	SK-MEL-103	PC-3
Óleo essencial <i>Vetiver</i>	>250	127,34± 0,014	132,96 ±0,020	125,25±0,031
Complexo de inclusão óleo essencial de <i>Vetiver</i>/β-CD -Spray Dryer	>250	167,95±0,270	73,74±0,02	>250
β-CD	>250	>250	>250	>250
Doxorrubicina^b	0,65 ± 0,018	1,62 ± 0,010	4,56 ± 0,025	0,25 ± 0,012

Legenda: ^aDiluyente, controle negativo; ^bDoxorrubicina = controle positivo. Os dados são valores médios ± desvio padrão de ensaios em triplicata. Os resultados estão expressos em valos de IC₅₀ (μg/mL), isto é, a concentração de amostra-teste capaz de inibir 50% da população de células.

Esses achados do efeito na viabilidade celular são consistentes com os de David et al. (2019), que relataram a eficácia de óleos essenciais encapsulados na inibição do crescimento de células tumorais sem afetar gravemente as células saudáveis. A utilização de β-ciclodextrina como encapsulante parece ter aumentado a eficácia do óleo essencial, protegendo seus compostos ativos e melhorando sua liberação gradual, o que está de acordo com os estudos de Ruktanonchai et al. (2011), que demonstraram a eficácia de ciclodextrinas na melhora da estabilidade e biodisponibilidade de compostos bioativos. Além disso, o padrão de citotoxicidade diferencial entre células tumorais e não tumorais reflete a potencial seletividade terapêutica do complexo de inclusão, o que reforça as observações de Loftsson et al. (2007) sobre o uso de ciclodextrinas em sistemas de liberação controlada de fármacos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho procedeu-se o estudo com o óleo essencial de *C. zizanioides* em complexo de inclusão em β -CD com abordagens que incluíram o desenvolvimento tecnológico de preparo do complexo de inclusão do óleo essencial em β -CD à avaliação do efeito biológico e citotoxicidade visando avaliar a capacidade de aumento ou não dessas atividades do óleo essencial complexado em β -CD como sistema de carregamento e liberação modificada de bioativos para a busca de novos insumos e moléculas biologicamente ativos.

Este estudo envolveu o preparo do complexo de inclusão do óleo essencial das raízes de *C. zizanioides* em β -CD, a caracterização dos constituintes químicos e a avaliação das atividades biológicas (antibacteriana e citotoxicidade) do óleo essencial e do seu complexo de inclusão em β -CD. Os dados obtidos apontam para a possibilidade de uso do óleo essencial das raízes de *C. zizanioides* e de seu complexo de inclusão em β -CD como fonte de substâncias bioativas.

A escolha da β -ciclodextrina como matriz de encapsulação neste estudo foi fundamentada em duas principais razões. Primeiramente, a alta viscosidade do óleo essencial analisado representa um desafio para sua manipulação e aplicação em formas puras, sendo a encapsulação uma estratégia eficiente para superar essa limitação, permitindo uma melhor dispersão do composto. Além disso, a β -ciclodextrina é comercialmente mais acessível em comparação às suas formas α e γ , apresentando um custo-benefício mais favorável para aplicações em larga escala. Assim, sua seleção reforça tanto a viabilidade técnica quanto a econômica das estratégias de encapsulação propostas neste trabalho.

O complexo de inclusão do óleo essencial de *C. zizanioides* em β -CD foi preparado empregando secagem por atomização em *spray-dryer* e apresentou percentagem de inclusão do óleo essencial referente a cedr-8-en-13-ol relativo de 45,17% e o rendimento calculado para o pó do complexo foi de 19,24%.

Quanto a caracterização físico-química dos complexos, as análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) mostraram o carregamento seletivo de alguns constituintes do óleo essencial no complexo com β -CD, incluindo o delta-Selineno, gamma-Gurjuneno epoxido-(2), e como componente majoritário o Cedr-8-en-13-ol, substância apontada na literatura como um dos responsáveis pela atividade antimicrobiana do óleo essencial de vetiver.

A composição química do óleo permitiu em análise *in silico* a predição de atividades biológicas (antineoplásica, antitumoral, antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória) e

mecanismos de ação (inibição da síntese de colesterol, inibição da biossíntese da parede celular e da expressão MMP9) para os principais constituintes do óleo essencial de *vetiver*.

Procedeu-se a avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (N315) (MRSA) resistente à metilicina e análise do efeito na viabilidade celular de linhagens tumorais (SK-MEL-103, melanoma e PC-3, próstata) e não tumorais em culturas de células de fibroblasto (3T3) e queratinócitos (HaCat) comparando a ação do óleo sozinho e encapsulado em β -CD. De modo geral, o óleo essencial de *C. zizanioides* e seu complexo de inclusão em β -CD apresentaram baixa toxicidade para as linhagens não tumoral 3T3 com valores de IC_{50} maiores que 250 μ g/mL e o complexo de inclusão do óleo essencial em β -CD mostrou uma redução da viabilidade para SK-MEL-103 ($IC_{50}=73,74$ μ g/mL). Tanto o óleo essencial como seu complexo apresentaram ação antibacteriana a 200 μ g/mL frente a *Staphylococcus aureus* (N315), resistente à metilicina (MRSA).

Estudos adicionais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, devem ser conduzidos para avaliar mais detalhadamente o óleo essencial e seu complexo de inclusão em ciclodextrina, com o objetivo de aprimorar a estabilidade química dos componentes do óleo, melhorar sua solubilidade, eficácia, índice terapêutico e biodisponibilidade, tornando-o mais adequado para uso terapêutico. As seguintes considerações são propostas:

- Este estudo alcançou sucesso no preparo do complexo de inclusão do óleo essencial de *C. zizanioides* em β -ciclodextrina, e os resultados preliminares mostraram que a atividade antimicrobiana do óleo encapsulado foi satisfatória em doses menores quando comparado ao óleo essencial puro. Assim, uma formulação contendo o óleo essencial e seu complexo de inclusão poderia ser desenvolvida em maior escala.
- Pesquisas mais aprofundadas são necessárias para explorar o mecanismo de ação da atividade antibacteriana do óleo essencial e do complexo de inclusão, tanto em relação ao melanoma quanto a outros modelos, por meio de experimentos **in vitro** e **in vivo**.
- A toxicidade do óleo essencial e do complexo de inclusão deve ser avaliada em modelos animais para determinar sua segurança.
- As formulações de óleo essencial com β -CD foram avaliadas logo após o preparo. Seria importante realizar estudos de estabilidade a longo prazo para monitorar a concentração dos componentes ativos do óleo e seus efeitos na bioatividade ao longo do tempo.
- Investigações farmacotécnicas mais detalhadas e o desenvolvimento de tecnologias farmacêuticas poderiam ser realizados, incluindo o uso de outras ciclodextrinas e sistemas de liberação controlada para otimizar a formulação.
- A análise estrutural dos complexos de inclusão poderia ser aprofundada com o uso de técnicas como microscopia eletrônica de varredura (MEV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia no infravermelho, com o intuito de melhor estudar e elucidar os mecanismos de interação entre os componentes do óleo essencial e as ciclodextrinas nos complexos de inclusão.

8. REFERÊNCIAS

- Aché, Acheflan® Aerosol: da natureza vem o mais novo tratamento para traumas esportivos, disponível em <http://www.ache.com.br/PressRoom/News.aspx?NewsId=156>, acesso em 28 de abril de 2015.
- Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Carol Stream: Allured Publish Corporation, 1995.
- Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. 4. ed. Carol Stream: Allured Publ. Corp., 2007.
- Ali, Syed Ansar et al. Preparation and characterization of vetiver oil encapsulated polymeric microcapsules for sedative and hypnotic activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 55, p. 101463, 2020.
- Amparo, T.R. et al. Antibacterial substances from leaves of *Protium spruceanum* (Burseraceae): In vitro and in silico evaluation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 56, 2020.
- ANVISA, Medicamentos Fitoterápicos, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>, acesso em 28 de maio de 2014.
- Atif, M.; Ilavenil, Soundarrajan; Devanesan, Sandhanasamy; AlSalhi, Mohamad S.; Choi, Ki Choon; Vijayaraghavan, Ponnuswamy; Alfuraydi, Akram A.; Alanazi, Naif Fahad. *Essential oils of two medicinal plants and protective properties of jack fruits against the spoilage bacteria and fungi*. *Industrial Crops and Products*, v. 147, p. 112239, fev. 2020.
- Bisignano, G. et al. The in vitro antimicrobial activity of oleuropeinan-dihydroxytyrosol. *J. Pharmacy Pharmacol.*, v. 51, p. 971-974, 1999.
- Chahl, Khushminder Kaur; Bhardwaj, Urvashi; Kaushal, Sonia; Sandhu, Amanpal Kaur. *Chemical composition and biological properties of Chrysopogon zizanioides (L.) Roberty syn. Vetiveria zizanioides (L.) Nash - A Review*. Ludhiana: Department of Chemistry, Punjab Agricultural University, 2015.
- Cheaha, Dania; Issuriya, Acharaporn; Manor, Rodiya; Kwangjai, Jackapun; Rujiralai, Thitima; Kumarnsit, Ekkasit. *Modification of sleep-waking and electroencephalogram induced by vetiver essential oil inhalation*. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, v. 5, n. 1, p. 72-78, 2016.
- Chen Y, Shen Z, Li X. The use of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Appl. Geochem.* 19(10), 1553-1565 (2004).
- Chia N. Ethnopharmacology and Pharmacological Properties of *Vetiveria Zizanioides*. In: *Vetiveria: The Genus Vetiveria*, Maffei M (Ed.^(Eds). Taylor & Francis Italy (2003). Chou S-T, Shih Y, Lin C-C. Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides*) Oils. In: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety.*, Preedy VR (Ed.^(Eds). Academic Press. San Diego. 843-848 (2016).

Chou S-T, Shih Y, Lin C-C. Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides*) Oils. In: Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety., Preedy VR (Ed.^(Eds).Academic Press. San Diego. 843-848 (2016).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *M23: Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters*. 5th ed. Wayne, PA: CLSI, 2018.

David, A. et al. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash essential oil extracted by carbon dioxide expanded ethanol. *Molecules*, v. 24, n. 16, p. 2964, 2019.

Davis, M.E.; Brewster, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 3, p. 1023-1035, 2004.

De Jesus, M.B. Preparação, caracterização e avaliação da formulação anti-helmíntica de praziquantel em beta-ciclodextrina. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2006. 84 p. Dissertação (mestrado).

Dollo, G. et al. Complexation between local anaesthetics and β -cyclodextrin derivatives-relationship between stability constants and in vitro membrane permeability of bupivacaine and lidocaine from their complexes. *STP Pharma Sci.*, v. 8, p. 189-195, 1998.

Efe, Derya. *The evaluation of the antibacterial activity of Vetiveria zizanioides* (L.) Nash grown in Giresun. *Alinteri Ziraat Bilimler Dergisi*, v. 34, p. 21-24, 2019.

Gupta S, Dwivedi GR, Darokar MP, Srivastava SK. Antimycobacterial activity of fractions and isolated compounds from *Vetiveria zizanioides*. *Med. Chem. Res.* 21(7), 1283-1289 (2012).

Jindapunnapat, Kansiree et al. Activity of vetiver extracts and essential oil against *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, v. 35, n. 3, p. 362-369, 2018.

Kačániová, Miroslava; Terentjeva, Margarita; Štefániková, Jana; Žiarovská, Jana; Savitskaya, Tatsiana; Grinshpan, Dmitrij; Kowalczewski, Przemysław Łukasz; Vukovic, Nenad; Tvrdá, Eva. *Chemical composition and antimicrobial activity of selected essential oils against staphylococcus spp. isolated from human semen*. *Antibiotics*, v. 9, n. 11, p. 1-21, 2020.

Kannappan, A. et al. Antibiofilm activity of *Vetiveria zizanioides* root extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infection and Public Health*, v. 13, n. 5, p. 788-795, 2017.

Li, X. et al. Complexation of allylthiocyanate by α - and β -cyclodextrin and its controlled release characteristics. *Food Chem.*, v. 103, p. 461-466, 2007.

Loftsson, T.; Duchêne, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Intl J. Pharm.*, v. 329, p. 1-11, 2007.

Loftsson, T.; Masson, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.*, v. 25, p. 15-30, 2001.

Loftsson, T. et al. Cyclodextrins in drug delivery. *Exp. Opin. Drug Deliv.*, v. 2, p. 335-351, 2005.

- Marreto, R.N. et al. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. *Thermochim. Acta*, v. 47, p. 53-58, 2008.
- Molina, F.P. Própolis, sálvia, calêndula e mamona – atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. *Cien. Odontol. Bras.*, v. 11, p. 86-93, 2008.
- Moloney MG. Natural Products as a Source for Novel Antibiotics. *Trends Pharmacol. Sci.* 37(8), 689-701 (2016). Harley, R.M. Revision of generic limits in *Hyptis* Jacq. and its allies. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 98: 87–95, 1988
- Morais, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Hortic. Bras.*, v. 27, p. 4050-4063, 2009.
- Mourtzinis, I. et al. Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in beta-cyclodextrin and modified starch. *J. Food Sci.*, v. 73, p. 89-94, 2008.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Razavi Rouhani, S. M., Ehsani, A., & Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary Research Forum*, 4(3), 179-183.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79: 629–661, 2016.
- Pareek A, Kumar A. Ethnobotanical and pharmaceutical uses of *Vetiveria zizanioides* (linn) Nash: a medicinal plant of Rajasthan. *Int J Life Sci Pharm Res* 3(4), (2013).
- Prajna J, Richa J, Dipjyoti C. HPLC Quantification of Phenolic Acids from *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash and Its Antioxidant and Antimicrobial Activity. *J Pharm* 2013, 6 (2013).
- Ramirez-Rueda, R. Y.; MARINHO, J.; SALVADOR, M. J. Bioguided identification of antimicrobial compounds from *Chrisopogon zizanioides* (L.) Roberty root essential oil. *Future Microbiology*, 14: 1179-1189, 2019.
- Ramos, Máisa Alineri. Constituintes químicos e avaliação das atividades biológicas do óleo essencial de *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) e do seu complexo de inclusão em β -ciclodextrina. 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.
- Ruktanonchai, U. R.; Srinuanhai, 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.
- Salvador, M.J.; Ferreira, E.O.; Pral, E.M.F.; Alfieri, S.C.; Albuquerque, S.; Ito, I.Y.; Dias, D.A.; Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae). *Phytomedicine*, 9: 566-571, 2002.
- Santos DSD, Oberger JV, Niero R et al. Seasonal phytochemical study and antimicrobial potential of *Vetiveria zizanioides* roots. *Acta. Pharm.* 64(4), 495 (2014).

- 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, D.F. et al. In vitro schistosomicidal activity of *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) essential oil on *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.*, v. 109, p. 1671-1677, 2011.
- Simões, C.M.O., et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.
- Soares, M.M.S.R.; Cury, A.E. In vitro activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with Tinea pedis. *Braz. J. Microbiol.*, 32: 130-134, 2001.
- Souza, L.K.H.; Oliveira, C.M.A.; Ferri, P.H.; Santos, S.C.; Oliveira Junior, J.G.; Miranda, A.T.B.; Lião, L.M.; Silva, M.R.R. Antifungal properties of Brazilian Cerrado plants. *Braz. J. Microbiol.*, 33: 247-249, 2002.
- Srivastava J, Kayastha S, Jamil S, Srivastava V. Environmental perspectives of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash. *Acta Physiol Plant* 30(4): 413-417 (2008).
- Swain, S. et al. Green synthesis of gold nanoparticles using root and leaf extracts of *Vetiveria zizanioides* and *Cannabis sativa* and its antifungal activities. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 45, n. 2, p. 372-379, 2017.
- Szente, L.; Szejtli, J.; Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Tech.* 15, 137-142, 2004.
- Takayama, C.; Faria, F.M.; Almeida, A.C.A.; Valim-Araújo, D.A.O.; Rehen, C.S.; Dunder, R.J.; Socca, E.A.R.; Manzo, L.P.; Rozza, A.L.; Salvador, M.J.; Pellizzon, C.H.; Hiruma-Lima, C.A.; Ferreira, A.L.; Rito, A.R.M.S. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae) *J. Ethnopharmacol.*, 135: 147-155, 2011.
- Tisgratog, Rungarun et al. Evaluation of the constituents of vetiver oil against *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae), a malaria vector in Thailand. *Journal of Medical Entomology*, v. 53, n. 1, p. 168-176, 2016.
- Veiga Jr, V.F.; Pinto, A.C.; Maciel, M.A.M. Plantas Medicinais, Cura Segura? *Quimica Nova*, 28: 519-528, 2005.
- Weisheimer, V.; Miron, D.; Silva, C.B.; Guterres, S.S.; Schapoval, E.E. Micro particles containing lemon Grass volatile oil preparation, characterization and thermal stability. *Pharmazie*, 65: 885-890, 2010.

9. ANEXOS



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpqib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada **"ÓLEO ESSENCIAL DAS RAÍZES DE CHRYSOPOGON ZIZANIODES (L.) ROBERTY (POACEAE) E SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO EM β -CICLODEXTRINA COMO FONTE DE MOLÉCULAS/BIOATIVAS"**, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Morfofuncional do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Vinicius Paes Azevedo
Nome do(a) aluno(a): Vinicius Paes Azevedo

Assinatura: [Assinatura]
Nome do(a) orientador(a): Marcos José Salvador

Data: 12 de dezembro de 2024

Declaração

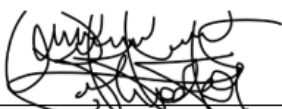
As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **ÓLEO ESSENCIAL DAS RAÍZES DE CHRYSOPOGON ZIZANIODES (L.) ROBERTY (POACEAE) E SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO EM β -CICLODEXTRINA COMO FONTE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 12 de dezembro de 2024

Assinatura :  _____

Nome do(a) autor(a): **Vinicius Paes Azevedo**

RG n.º 37.425.419-9

Assinatura :  _____

Nome do(a) orientador(a): **Marcos José Salavador**

RG n.º 21878723