

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

INCLUSÃO MOLECULAR DE METIL JASMONATO E CATEQUINA EM
CICLODEXTRINAS E CARACTERIZAÇÕES DOS COMPLEXOS

OSVALDO VALARINI JUNIOR

Eng.º Químico, UEM, 2012.

Orientador: Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin

Dissertação de Mestrado submetida à
Universidade Estadual de Maringá, como
parte dos requisitos necessários à obtenção do
Grau de Mestre, em Engenharia Química,
área de Desenvolvimento de Processos.

Maringá-PR-Brasil

Março/2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

V137i Valarini Junior, Osvaldo
Inclusão molecular de metil jasmonato e catequina em ciclodextrinas e caracterizações dos complexos / Osvaldo Valarini Junior. -- Maringá, 2016.
xi, 66 f. : il. figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2016.

1. Complexo de inclusão - Ciclodextrina. 2. Beta-Ciclodextrina - Catequina. 3. 2-Hidroxipropil-Beta-Ciclodextrina - Metil jasmonato. 4. Caracterizações dos complexos. I. Moraes, Flávio Faria de, orient. II. Zanin, Gisella Maria, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDD 23.ed. 660.63

AMMA-003352

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por Osvaldo Valarini Junior perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 11 de março de 2016.

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes
Orientador / Presidente




Prof^a Dr^a Gisella Maria Zanin
Coorientadora



Prof. Dr. Otavio Akira Sakai
Membro



Prof. Dr. Carlos Eduardo Barão
Membro



Dr. Daniel Mantovani
Membro

AGRADECIMENTOS

Dedico meus agradecimentos, acima de tudo, a Deus.

À minha família, pais e irmãs pelo seu apoio e amor incondicional, pois sempre me incentivaram e apoiaram constantemente a cada passo da minha vida. Na alegria e na tristeza, sempre estivemos juntos. Muito Obrigado, amo vocês.

A minha namorada, que nos últimos anos me deu total apoio para seguir na carreira acadêmica. Seu apoio para mim foi de fundamental importância para esta realização.

Ao professor, orientador Flávio Faria de Moraes, que sempre o vi como referência na pesquisa, e me apoiou incondicionalmente.

A minha coorientadora, Gisella, que sempre me ajudou.

Aos meus amigos de infância, principalmente ao Fernando e Vitor que sempre me ajudaram na relação pessoal-profissional, conversas relacionadas à pesquisa e conversas fiadas. Aos demais colegas da academia, especialmente ao Cláudio, João, Keren e Rafael pela convivência sempre tão agradável.

A todos os docentes, técnicos e funcionários do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, em especial, à Luiza, Lauro e Fernando que sempre estiveram de bom coração para contribuir nas análises.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, em especial aos seus coordenadores professora Dr.^a Gisella M. Zanin e professor Dr. Mauro A. S. S. Ravagnani, e sua secretária Dayane pelo auxílio e aconselhamento pessoal e profissional durante este período.

Aos membros da banca avaliadora, por terem aceitado o convite de participar da correção e avaliação deste trabalho. Obrigado pela enriquecedora contribuição.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo e pelo incentivo à pesquisa.

A todos que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

INCLUSÃO MOLECULAR DE METIL JASMONATO E CATEQUINA EM CICLODEXTRINAS E CARACTERIZAÇÕES DOS COMPLEXOS

AUTOR: OSVALDO VALARINI JUNIOR

ORIENTADOR: Prof. FLÁVIO FARIA DE MORAES, PhD

COORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a GISELLA MARIA ZANIN

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brasil, defendida em 11 de Março de 2016.

RESUMO

Nos últimos anos, a aplicação da biotecnologia vem crescendo consideravelmente em muitas áreas de engenharia e produção de fármacos, entre outras. Entre as novas tecnologias desenvolvidas ressalta-se a utilização das ciclodextrinas (CDs). Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a inclusão do metil jasmonato (MeJa) em 2-hidropropil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD) e a catequina (CAT) em beta-ciclodextrina (β -CD), a fim de se verificar a eficiência e melhor condição de inclusão. O complexo MeJa:HP- β -CD foi preparado utilizando os métodos de Mistura Física (MF), Liofilização (Lio), Coprecipitação mais Liofilização (Co+Lio) e Supercrítico (SSCO₂). Para a CAT: β -CD o complexo de inclusão foi preparado pelas metodologias de: MF, Ancoragem (ANCO) e SSCO₂. A verificação da viabilidade e eficiência da inclusão, em ambos os complexos, foram analisadas utilizando as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (H-RMN), Transformada de Fourier no Infravermelho com Reflectância Atenuada Total e Raman (FT-IR/ATR e FT-RAMAN), Análise Termogravimétrica e Calorimetria Diferencial de Varredura (TGA/DSC), Atividade Antioxidante (DPPH) e Difração por Raios-X (XRD, somente para o complexo CAT: β -CD). Os resultados obtidos para a eficiência de inclusão foram superiores com o uso da técnica SSCO₂, que também levou a maior estabilidade térmica e oxidativa, comparada com as outras metodologias de inclusão e com as moléculas puras (MeJa ou CAT). Entretanto, as demais técnicas de inclusão utilizadas obtiveram resultados satisfatórios na comparação com a técnica que usa o método supercrítico.

Palavras-chave: Complexo de Inclusão. Beta-Ciclodextrina. 2-Hidropropil-Beta-Ciclodextrina. Metodologias. Catequina. Metil Jasmonato

INCLUSION OF MOLECULAR AND METHYL JASMONATE CATECHIN IN CYCLODEXTRINS AND CHARACTERIZATIONS OF COMPLEX

AUTHOR: OSVALDO VALARINI JUNIOR

SUPERVISOR: Prof. FLAVIO FARIA DE MORAES

COSUPERVISOR: Prof. GISELLA MARIA ZANIN

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brazil, presented on March,11, 2016.

ABSTRACT

In recent years, the application of biotechnology has grown considerably in many areas of engineering and production of drugs, among others. Among the new technologies developed it is noteworthy the use of cyclodextrins (CDs). In this context, this study aimed to the inclusion of methyl jasmonate (MeJA) in 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP- β -CD) and catechin (CAT) in beta-cyclodextrin (β -CD) in order to verify the efficiency and better inclusion condition. The complex MeJA:HP- β -CD was prepared using the methods of physical mixture (FM), Lyophilization (Lyo), coprecipitation and Lyophilization (Co+Lyo) and Supercritical (SSCO₂). For CAT: β -CD the inclusion complex was prepared by the methodologies: FM, Anchoring (ANCO) and SSCO₂. The verification of the inclusion feasibility and efficiency in both complexes were analyzed using the techniques Nuclear Magnetic Resonance (H-NMR), Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance and Raman (FT-IR/ATR and FT-RAMAN), thermogravimetric analysis and differential scanning calorimetry (TGA /DSC), antioxidant activity (DPPH) and X-ray Diffraction (XRD, only for the CAT: β -CD complex). The results obtained for the inclusion efficiency were higher using the SSCO₂ technique, which also led to increased thermal and oxidative stability, compared to other methods of inclusion and the pure molecules (MeJA or CAT). However, inclusion of other techniques has obtained satisfactory results in comparison with the technique that uses supercritical method.

Keywords: Inclusion Complex. Beta-Cyclodextrins. 2-Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrins. Catechin. Methyl Jasmonate

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração da CD.	4
Figura 2 – Estrutura molecular do MEJA.....	7
Figura 3 – Fórmula estrutural da catequina.....	8
Figura 4 – Técnica de difratometria de Raio-X.....	11
Figura 5 – Diagrama de energia.	13
Figura 6 – Hidrogênios das CDs.	13
Figura 7 – Mudança de momento de dipolo de uma molécula diatômica.....	14
Figura 8 – Polarização de uma molécula diatômica.....	15
Figura 9 – Espectro de H-NMR (A) MEJA, (B) HP- β -CD, (C) MF, (D) LIO, (E) CO+LIO, (F) SSCO ₂	26
Figura 10 – FT-IR/ATR (A) HP- β -CD, (B) MEJA, (C) MF, (D) LIO, (E) CO+LIO, (F) SSCO ₂ . (Razão molar, 1:1).....	27
Figura 11 - FT-RAMAN (A) MEJA, (B) HP- β -CD, (C) MF, (D) LIO, (E) CO+LIO, (F) SSCO ₂ . (Razão molar, 1:1).....	29
Figura 12 – Curvas de TGA (A) HP- β -CD, (B) MF, (C) LIO, (D) CO+LIO, (E) SSCO ₂ . (Razão molar, 1:1).	31
Figura 13 – Curvas de DSC (A) HP- β -CD, (B) MF, (C) LIO, (D) CO+LIO, (E) SSCO ₂ (Razão molar, 1:1).	32
Figura 14 – Atividade antioxidante (Razão molar, 1:1).....	34
Figura 15 – Espectro de H-NMR OF (A) β -CD, (B)CAT, (C)MF, (D)ANCO E (E)SSCO ₂	36
Figura 16 – Espectro de Raio-X (A) β -CD, (B)CAT, (C)MF, (D)ANCO E (E)SSCO ₂	38
Figura 17 – FT-IR/ATR (A) β -CD, (B) CAT, (C) MF, (D) ANCO, (E) SSCO ₂ . (Razão molar, 1:1).	39
Figura 18 – Curvas de GAUSS na região de número de onda de 1560-1400 CM ⁻¹ FT-IR/ATR (A) B-CD, (B) CAT, (C) MF, (D) ANCO, (E) SSCO ₂ . (Razão molar, 1:1).	41
Figura 19 - FT-RAMAN (A) B-CD, (B) CAT, (C) MF, (D) ANCO, (E) SSCO ₂ . (RAZÃO MOLAR, 1:1).	42
Figura 20 – Curvas de TGA (A) β -CD, (B) CAT, (C) MF, (D) ANCO, (E) SSCO ₂ . (Razão molar, 1:1).	44
Figura 21 – Curvas de DSC (A) β -CD, (B) CAT, (C) MF, (D) ANCO, (E) SSCO ₂ . (Razão molar, 1:1).	45
Figura 22 – Atividade antioxidante (razão molar, 1:1).	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Vibrações de moléculas homo e heteronucleares.	16
Tabela 2 - Alteração química dos sinais da HP- β -CD.	25
Tabela 3 – Dados retirados da análise de TGA e DSC.	30
Tabela 4 – Parâmetros da Equação (19) para a análise antioxidante. u_k e u_{ace} são variáveis incertas, k a ac_e para um $\alpha=0.05$, respectivamente.	33
Tabela 5 – Alteração química (δ) for β -CD, CAT/ β -CD e alteração δ ($\Delta\delta_i=\delta_{\text{complexo}}-\delta_{\text{cat}}$).	35
Tabela 6 – Parâmetros da Equação (20) para a análise antioxidante. u_k e u_{ace} são variáveis incertas, k a ac_e para um $\alpha=0.05$, respectivamente.	47

NOMENCLATURA

A	Absorção de soluções de etanol + CAT em forma livre e complexada
A_c	Controle de Absorbância
AC	Atividade Antioxidante (%)
AC_e	Atividade antioxidante em equilíbrio (%)
ANCO	Ancoragem
β -CD	Beta-Ciclodextrina
CAT	Catequina
CAT: β -CD	Formação do Complexo de Inclusão
CDs	Ciclodextrinas
Co+Lio	Coprecipitação + Liofilização
COMCAP	Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil usado na determinação da Atividade Antioxidante
DRX	Difração de Raio-X
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
FT-IR-ATR	Transformada de Fourier-Infra Vermelho- Reflectância Atenuada Total
FT/RAMAN	Transformada de Fourier Raman
H-NMR	Ressonância Magnética Nuclear
HP- β -CD	2-Hidroxiopropil-Beta-Ciclodextrina
k	Taxa de atividade antioxidante ($\% \text{ min}^{-1}$)
Lio	Liofilização
MF	Mistura Física
MeJa	Metil Jasmonato
M. M.	Massa Molar
R^2	Coefficiente de Determinação
SSCO ₂	Supercrítico
t	Tempo (min)
TGA	Análise Termogravimétrica

UEM	Universidade Estadual de Maringá
U_{δ}	Incerteza nas medições de corrente de deslocamento químico (0,01 ppm)
U_k	Incerteza em k para $\alpha=0,05$ (% min ⁻¹)
U_k	Incerteza em AC_e para $\alpha=0,05$ (%)

Letras Gregas

δ (ppm)	Alteração química H-NMR dos espectros de CAT, β -CD e CAT/ β -CD
$\Delta\delta_i$	Alteração química definida como a diferença entre δ para CAT e para CAT: β -CD (ppm)
Δm_i	Variação de massa em análises de TGA
ν	Número de onda (cm ⁻¹)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABELAS	VII
NOMENCLATURA	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS.....	2
1.1.1. Objetivo Geral	2
1.1.2. Objetivos Específicos	2
1.2. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. CICLODEXTRINAS	4
2.2. METIL JASMONATO (MEJA).....	5
2.3. CATEQUINA (CAT).....	7
2.4. MÉTODOS DE FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO	9
2.5. CARACTERIZAÇÕES.....	10
2.5.1. DIFRAÇÃO POR RAIO-X (DRX)	10
2.5.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	12
2.5.3. ESPECTROSCOPIAS VIBRACIONAIS	14
2.5.4. ANÁLISES TÉRMICAS	17
2.5.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH)	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. MATERIAIS	20
3.2. METODOLOGIA DE PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO (MEJA:HP-B- CD E CAT:B-CD).....	20
3.2.1. Caracterizações do Complexo	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
4.1. COMPLEXO DE INCLUSÃO MEJA E HP-B-CD	24
4.1.1. RMN	24
4.1.2. FT-IR/ATR e FT-RAMAN	27
4.1.3. TGA e DSC	30
4.1.4. DPPH.....	33
4.2. COMPLEXO DE INCLUSÃO DA CAT E B-CD	35
4.2.1. RMN	35
4.2.2. DRX.....	37

4.2.3. FT-IR/ATR e FT-RAMAN	38
4.2.4. TGA e DSC	43
4.2.5. DPPH.....	46
4.3. Considerações Finais	49
5. CONCLUSÃO.....	50
5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo pesquisadores do mundo todo estudam diversos meios de otimizar os processos industriais de síntese verde. Desde a década de 90 tornou-se objetivo e necessidade produzir em escala industrial de modo a atender as necessidades criadas com o aquecimento global. Os setores das áreas biotecnológicas partiram para a valorização da pesquisa em busca de soluções e do desenvolvimento de um processo sustentável que visa ampliar a quantidade produzida de determinado produto sem se preocupar com as consequências geradas por este processo, pois a utilização de fontes naturais para a obtenção de produtos não gera resíduos prejudiciais ao meio ambiente. Assim, o desenvolvimento e otimização dos processos passam a ser exercidos pelos profissionais qualificados da área de produção biotecnológica: engenheiros químicos, engenheiros de alimentos e áreas afins. Estes profissionais qualificados buscam novas áreas voltadas à obtenção de compostos menos agressivos ao meio ambiente.

Definido que o foco do estudo é a comparação de metodologias de inclusão molecular para a aplicação em fármacos e alimentos, e que se deseja por meio deste estudo desenvolver um ou mais métodos de inclusão que padronizem os complexos de inclusão MeJa:HP: β -CD e CAT: β -CD, visando um melhor aproveitamento dos compostos complexados, será necessário previamente verificar quais são os métodos já existentes para as análises de inclusão molecular. Dentre as técnicas existentes, as suas vantagens e desvantagens devem ser ressaltadas e justificadas para melhor utilização dos complexos. Assim, os procedimentos voltados às análises tecnológicas são capazes de demonstrar os caminhos percorridos durante a obtenção de um composto molecular, bem como auxiliar na interpretação das propriedades físico-químicas dos objetos de estudo. Neste contexto, as pesquisas estão voltadas ao desenvolvimento científico e tecnológico buscando a melhoria na qualidade de vida da população mundial. Fazem parte deste contexto, a realização de análises voltadas ao perfil físico-químico, especialmente pela sua importância voltada ao desenvolvimento e conclusões sobre os resultados obtidos ao longo dos estudos.

Portanto, para melhoria do conhecimento voltado a biotecnologia e seus agregados, o presente estudo focou buscar novas alternativas para a inclusão da Ciclodextrinas (CDs) por tratar-se de uma molécula de grande utilização nas áreas farmacêutica e alimentícia (CHATTOPADHYAY ET AL., 1990; CRAMER ET AL., 1967; UEKAMA ET AL., 1998; YILMAZ ET AL., 1995). As CDs são compostos responsáveis pelo aumento da solubilidade, resistência térmica e estabilidade dos compostos incluídos em seus núcleos (CHATTOPADHYAY ET AL., 1990; VIEIRA ET AL., 2015.; WANG ET AL., 2007; WEISSIG ET AL., 1986).

O Metil Jasmonato (MeJa) e a Catequina (CAT) são as moléculas de interesse neste trabalho, por se agruparem de forma complexa em outros compostos a fim de garantir a manutenção de suas propriedades físico-químicas. O MeJa é um hormônio com ação sobre o sistema de defesa de plantas (REINBOTHE, 1994). A CAT é um antioxidante natural presente em plantas que contém flavonoides. Ela é aplicada em bebidas com a finalidade de contribuir para a saúde humana (DIAS et al., 2008; KRISHNASWAMY et al., 2012). Portanto, com a inclusão destes compostos por meio de técnicas e metodologias utilizadas neste trabalho, será possível observar alterações nas propriedades que envolvem os complexos por meio de caracterizações físico-químicas, e conclusão da técnica de maior eficiência padronizando a inclusão molecular destes compostos em ciclodextrinas.

1.1.Objetivos

1.1.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve o objetivo de testar diferentes métodos de preparação de complexos de inclusão do MeJa e CAT em CDs e fazer uma análise comparativa da eficiência de inclusão e da estabilidade térmica e oxidativa dos complexos, por meio de caracterizações físico-químicas.

1.1.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos das inclusões foram:

-
- Verificar o deslocamento químico das CDs devido à complexação, usando a técnica RMN;
 - Identificar as ligações químicas existentes nos complexos CAT: β -CD e MeJa:HP- β -CD por meio da análise dos espectros vibracionais, usando as técnicas FT-IR/ATR e FT-RAMAN;
 - Avaliar qual método de preparação dos complexos apresenta maior eficiência de inclusão molecular, levando em consideração as áreas das curvas de Gauss obtidas a partir dos espectros vibracionais;
 - Determinar a resistência térmica dos complexos e o potencial de Atividade Antioxidante, utilizando a técnica do DPPH.

1.2.Estrutura da Dissertação

A estrutura da presente dissertação foi dividida em seis capítulos. O primeiro é voltado à visão geral do problema e os objetivos a serem atingidos.

O segundo capítulo apresenta uma breve revisão bibliográfica, expondo as informações referentes às moléculas utilizadas, aos procedimentos de inclusão e as caracterizações físico-químicas.

A terceira parte é destinada a materiais e métodos, apresentando os principais materiais, equipamentos utilizados, bem como os procedimentos realizados para obtenção dos resultados propostos nos objetivos deste trabalho.

No quarto capítulo são explorados os resultados obtidos por meio das caracterizações físico-químicas, enfatizando-se a comparação das metodologias de inclusão. Além disso, cada caracterização foi descrita e comentada, dando embasamento para a discussão do trabalho.

O trabalho é concluído no quinto capítulo, no qual foram realizadas as considerações finais do estudo.

Por fim, no sexto capítulo encontram-se as principais referências que contribuíram para a concretização deste trabalho.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ciclodextrinas

As (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, com formato de cone truncado. Sua nomenclatura é estabelecida de acordo com o tamanho da cadeia, e conseqüentemente indicam o diâmetro da abertura interna. Assim, as CDs com seis unidades glicosídicas, são definidas como alfa-ciclodextrinas (α -CDs), já para aquelas que apresentam sete cadeias, são definidas como beta-ciclodextrina (β -CDs) e acima de oito gama-ciclodextrinas (γ -CDs) (CRAMER et al., 1967; SIIMER et al., 1990). A característica mais marcante das CDs é no interior de seu anel por conter propriedades hidrofóbicas, enquanto o exterior possui característica levemente hidrofílica. Esse caráter bifuncional, juntamente com sua abertura, permite por meio da inclusão das CDs aumentar a solubilidade de moléculas hidrofóbicas e por vezes mascarar sabores indesejáveis (CHADHA et al., 2007; CHATTOPADHYAY et al., 1990). Adicionalmente as CDs protegem a molécula de inclusão da degradação oxidativa e térmica, quando a molécula hóspede, ela é considerada sensível a alguma propriedade do meio a qual esta inserida (BOONYARATTANAKALIN et al., 2011; GALVÃO et al., 2015). A Figura 1 mostra-se a estrutura das CDs.

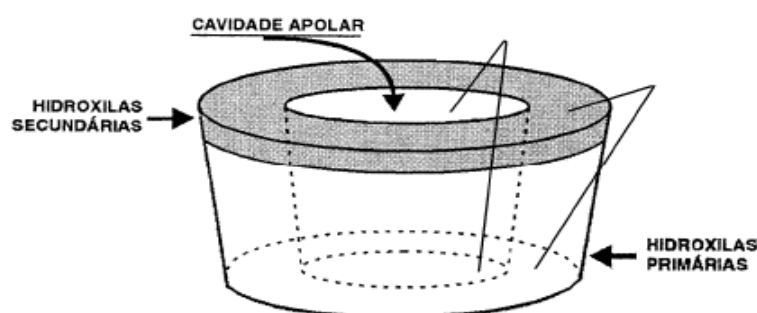


Figura 1 – Ilustração da CD.

Fonte: PESSINE et al., 1998.

Neste trabalho foi utilizada a β -ciclodextrina (β -CD) e o seu derivado a 2-hidroxi-propil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD) para a preparação dos complexos. A β -CD foi selecionada devido ao tamanho de sua cadeia e diâmetro de sua cavidade interna,

que é adequado para a inclusão da grande maioria dos compostos bioativos, além de que em comparação as outras CDs mais comuns (α e γ -CD), é a mais comumente produzida pela indústria (BOONYARATTANAKALIN et al., 2011; GALVÃO et al., 2015).

A HP- β -CD foi o derivado selecionado dada a sua vantagem de elevada solubilidade em água, que é cinquenta vezes maior em comparação com a da β -CD (BANCHERO; MANNA, 2012; BETTINETTI et al., 2002; GHARIBZAHEDI et al., 2014; WANG et al., 2007). Além disso, é importante obter conhecimento adicional sobre as propriedades de complexação desta CD que apresenta baixa toxicidade renal e atividade hemolítica, e por isso, é utilizada na complexação de drogas oculares e outras que poderiam atacar o revestimento do estômago, sendo inclusive aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration), órgão federal americano responsável pela proteção e promoção da saúde pública, por meio da regulação e supervisão de alimentos e remédios, etc. Durante as últimas décadas o uso das CDs modificadas foram direcionadas para a aplicação em escala industrial, atuando como um complexante que visa aumentar a estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade de moléculas hóspedes (LOFTSSON, 1999; UEKAMA et al., 1998; YAO et al., 2014).

2.2. Metil Jasmonato (MeJa)

Atualmente as plantas com caráter medicinal têm um importante papel na saúde mundial. Dados estatísticos apontam que 25 a 30% de todos os fármacos apresentam agentes terapêuticos derivados de produtos naturais (CAMPOS et al., 2004).

Na década de 80 e 90, diversos produtos naturais com importante atividade biológica vêm sendo testados no tratamento de doenças. Uma série desses produtos naturais, incluindo os jasmonatos, comprovaram que efeitos anti-inflamatórios geram uma ação de inibição da liberação de mediadores inflamatórios (DANG et al., 2008). O jasmonato é dividido nas seguintes famílias: cis-jasmonato (CJ), ácido jasmônico (AJ) e o metil jasmonato (SEMBDNER; PARTHIER, 1993), os quais são ácidos graxos ciclopentanonas, isolados de um óleo essencial *Jasminum grandiflorum* (DEMOLE et al., 1962), contudo, os jasmonatos são amplamente distribuídos em todo reino botânico e em alguns microorganismos (COHEN; FLESCHER, 2009). Estudos específicos de biossíntese sobre os jasmonatos foram realizadas por volta da década de 80, e os primeiros resultados mostraram que os jasmonatos têm grande aplicabilidade em

diversos tipos de plantas, exercendo efeito na parte fisiológica destas. No cenário atual, os jasmonatos são reconhecidos como um dos mais potentes e importantes sinalizadores para a regulação de genes relacionados com a defesa em diferentes espécies do reino vegetal (NOIR et al., 2013; ROBERT-SEILANIANZ; GRANT; JONES, 2011; WASTERNAK; HAUSE, 2013; WASTERNAK, 2014).

O foco dos jasmonatos neste estudo é o metil jasmonato (MeJa). O MeJa é o membro mais bem estudado da família dos jasmonatos, e foi relatada a sua atividade antiproliferativa (MILROT et al., 2012) e antioxidante (WANG; BOWMAN; DING, 2008), anticancerígena (COHEN; FLESCHER, 2009; FINGRUT et al., 2005; WANG et al., 2014; ZHENG et al., 2013) e antiparasitária (OFER et al., 2008). O MeJa é seletivamente tóxico para as células cancerígenas humanas, não afetando células normais, induzindo a apoptose por vários mecanismos (FAROOQI et al., 2012), uma propriedade que favorece o seu desenvolvimento na terapêutica tanto contra o câncer, quanto para outras doenças (FINGRUT et al., 2005). Além disso, este hormônio vegetal compartilha a mesma estrutura parcial com as prostaglandinas, o MeJa e seus análogos demonstraram inibir a formação de mediadores inflamatórios, sugerindo seu papel em condições de inflamação (DANG et al., 2008).

O MeJa é um composto orgânico volátil utilizado para a defesa da planta que engloba diversas vias de desenvolvimento, entre elas a germinação de sementes, crescimento das raízes, floração e o amadurecimento de frutos. O MeJa é um composto bioativo que pode ser encontrado em grande variedade de plantas superiores (BELCHINAVARRO et al., 2011; KESSLER; BALDWIN, 2002; WEILER et al., 1993). O composto MeJa é necessário no meio ambiente devido ao equilíbrio que causa nele (REINBOTHE, 1994). Entretanto, a sua aplicação exógena, em baixa concentração, pode afetar a biossíntese de importantes componentes de plantas e frutas, causando, por exemplo: a proteção dos sítios danificados, elevando o acúmulo de proteínas inter-relacionadas com a defesa de tecido saudável, e o aumento do rendimento de metabólitos secundários (ALMAGRO et al., 2012; ZHAO et al., 2005). Já para os compostos que fazem a defesa, como o MeJa, são compostos de baixo massa molar (MUELLER; BRODSCHELM, 1994; WILBERT et al., 1998).

Testes realizados com o MeJa revelaram respostas de redução nociceptivas associadas a condições inflamatórias em animais, a sua eficiência nestes estados estão relacionados com dolorosas inibições da liberação de mediadores inflamatórios, em

particular prostaglandinas, que sensibilizam nociceptores para causar dor (DANG et al., 2008).

A utilização do MeJa como modelo de prostaglandina sugere o potencial efeito anti-inflamatório, ou seja, inibe a produção e expressão gênica de mediadores de citocinas pró-inflamatórias (DANG et al., 2008; UMUKORO; OLUGBEMIDE, 2011). A Figura 2 exibe sua estrutura molecular.

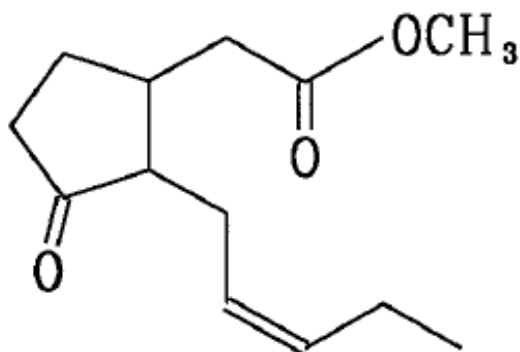


Figura 2 – Estrutura Molecular do MeJa.
Fonte: WILBERT et al., 1998.

2.3. Catequina (CAT)

O aumento da produção de alimentos foi correlacionado ao crescimento das doenças epidemiológicas, cujos estudos apoiam as conclusões de que dietas ricas em frutas e vegetais retardam o aparecimento de várias doenças, dentre elas, doenças cardiovasculares, crônico-degenerativas, entre outras (EFRAIM et al., 2006; RIMM, 2002). Os fundamentos destas conclusões provêm, em parte, da presença de substâncias bioativas, como os polifenóis, que estão presentes em uma variedade de alimentos (KRIS-ETHERTON; KEEN, 2002).

Alguns compostos de origem natural têm a atividade antioxidante, que é útil na medicina, pois ajudam na prevenção e tratamento de várias doenças, como o câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, diabetes e doenças reumáticas (WEISBURGER; WILLIAMS, 2000). Os compostos de natureza fenólica, mais especificamente os polifenóis, vêm sendo um dos mais adicionados aos alimentos. A atividade antioxidante dos polifenóis desempenha papel de grande importância no

organismo, tais como a prevenção da quebra do DNA, ação anti-inflamatória e anticarcinogênica (ARTS; HOLLMAN, 2005; SCALBERT et al., 2005).

As catequinas (CAT) são antioxidantes naturais extraídos de plantas pertencentes à classe dos flavonóides, com elevadas concentrações em plantas, frutas, legumes e bebidas naturais, entre elas, o chá verde e vinhos (DIAS et al., 2008; KRISHNASWAMY et al., 2012). A importância das propriedades químicas dessas substâncias é a sua aplicação na prevenção do câncer e doenças cardiovasculares (JULLIAN et al., 2007; STAVRIC, 1994; YANG; WANG, 1993). As CAT atuam na ligação com as moléculas reativas oxidantes, bloqueando as mesmas e agindo como um componente antioxidante, que desperta grande interesse industrial. Além disso, possuem propriedades antivirais de inibição podendo ser comercializadas no formato químico pelas indústrias farmacêutica e alimentícia (HERTOG et al., 1993; PIETTA, 2000). A grande desvantagem das CAT provém de suas características sensoriais desfavoráveis, cor indesejável e sensibilidade à temperatura, dificultando sua aplicação como aditivo em alimentos. Para abrandar estes fatores negativos, a inclusão da CAT em CD é uma alternativa viável financeiramente por ser de baixo custo e de grande benefício, bem como permitir aumentar a vida de prateleira (*shelf life*) dos alimentos (JULLIAN et al., 2007). A Figura 3 ilustra a estrutura da CAT.

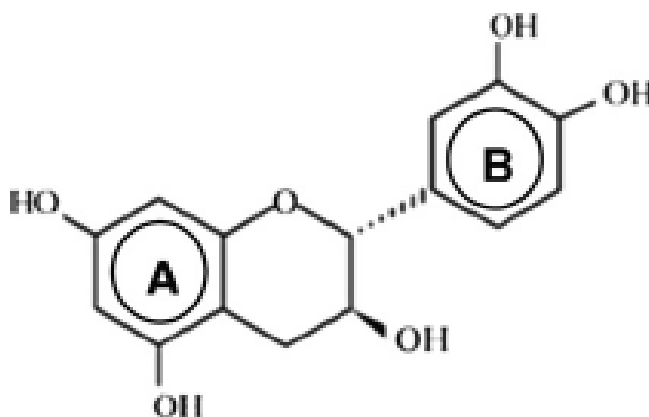


Figura 3 – Fórmula Estrutural da Catequina.

Fonte: KRISHNASWAMY et. al., 2012.

2.4. Métodos de Produção dos Complexos de Inclusão

Os procedimentos de produção de complexos de inclusão em CDs utilizados neste trabalho foram baseados em métodos tradicionais e eficientes, usando-se as seguintes condições:

- **Mistura Física (MF):** procedimento constituído por uma simples mistura da ciclodextrina com outra substância. A MF é mais adequada para óleos ou líquidos que poderão ser complexados. Já com relação ao tempo de mistura que é utilizado, isto depende das propriedades das moléculas presentes no meio, e a temperatura empregada para que ocorra a complexação é, normalmente, a ambiente (AIGNER et al., 2012; GARNERO et al., 2012; GRANDELLI et al., 2012; HU et al., 2012b; LIU et al., 2013; MENEZES et al., 2012, 2014).
- **Liofilização (Lio):** Na metodologia de liofilização faz-se inicialmente o congelamento de uma solução contendo a CD e a substância que se deseja complexar. Após, ocorre a retirada do solvente sem a passagem pelo estado líquido, ou seja, o solvente será sublimado por redução da pressão. As vantagens deste método são a obtenção de complexos de inclusão com elevado rendimento e baixo estresse térmico. Entre as desvantagens, ressalta-se o longo período, usualmente algumas horas, necessário para a obtenção do complexo (CORCIOVA et al., 2014; DA ROSA et al., 2013; LEWANDOWSKI et al., 2013; VAJNA et al., 2011).
- **Coprecipitação (Co):** Inicialmente obtém-se uma solução aquosa de CDs sob elevada temperatura, em torno de 65 a 75 °C, com posterior resfriamento gradativo até a temperatura ambiente, e em seguida, adiciona-se lentamente à solução a molécula hóspede e deixa-se em repouso para ocorrer a precipitação do complexo. Para aumento do rendimento do produto, o precipitado é lavado com um reagente inerte para evitar dano ao complexo. Entre as vantagens desta metodologia, destaca-se a obtenção de um complexo resistente à variação de temperatura. Entretanto, a sua desvantagem é que caso se deseje a ampliação da escala de piloto para industrial, a manipulação de resíduos líquidos aumenta o custo de produção do complexo (INÁCIO et al., 2013; MUTHUKUMARAN; GOPALAKRISHNAN, 2012; WANG et al., 2011a).
- **Ancoragem (ANCO):** A mudança das características superficiais por meio de grupos funcionais tornou-se uma abordagem popular para otimizar a interação

entre compostos, no qual podem ser encontrada nas literaturas (BAI et al., 2010; WANG; CARUSO, 2005). De acordo com Shu et al, (2011) o sucesso da complexação por este método baseia-se em várias fatores importantes. Dentre eles, destaca-se a razão molar de compostos a serem colocados em solução, pois um dos fatores é que os compostos não percam suas propriedades físico-químicas. Ele explica essa conclusão considerando a natureza hidrofóbica no interior de moléculas apolares, e garante que é muito mais simples e econômico complexar em meios hidrofóbicos (SHU et al., 2011). Desta forma, a modificação de superfície de um sistema é definido como ancoragem, ou seja, quanto maior a disponibilidade das ligações intermoleculares das moléculas com o meio maior a interação entre as ligações.

- **Supercrítico (SSCO₂):** técnica de inclusão molecular de grande abordagem na obtenção de compostos complexados. O processo do Sistema Antissolvente Supercrítico (SAS) acontece da seguinte forma: o composto e o CO₂ supercrítico entram juntos através de um válvula injetora. Durante o processo de formação de partículas, a variação de temperatura e pressão da solução e CO₂ podem afetar o tamanho de partícula e distribuição do tamanho das partículas do produto resultante (SANTOS et al., 2015). Trata-se da adição de partículas dentro de um leito, o qual é adicionado um gás, neste caso o gás carbônico (CO₂) que carregará as partículas provenientes da solução de CDs em condições supercrítica fora das Condições Normais de Temperatura e Pressão (CNTP). Percorrendo um caminho em estado supercrítico onde ocorre à impregnação da molécula hóspede (MeJa ou CAT) e hospedeira (HP-β-CD ou β-CD) a partir da interação do gás e moléculas auxiliam a impregnação, da molécula hospedeira com aumento de seus poros interiores fazendo com que a molécula hóspede permaneça estável no interior da molécula hospedeira (BANCHERO; MANNA, 2012; COSTA; SOUSA LOBO, 2001; GRANDELLI et al., 2012; HE, 2012; MURA et al., 1999; NEROME et al., 2013).

2.5. Caracterizações

2.5.1. Difração por Raio-X (DRX)

A difração por Raio X (DRX) é um técnica de caracterização estrutural de compostos cristalinos. Para Padilha (1997) a técnica de difração é perfeita para

identificar fases e parâmetros estruturais do material a ser analisado, bem como, detalhamento do tamanho e orientação dos cristais responsáveis pela estrutura física das amostras.

O princípio da técnica de difração de raio X consiste no fenômeno que resulta da interferência construtiva ou destrutiva das ondas que foram difratadas e estão defasadas, após a incidência do feixe de raio X sobre o cristal da amostra, devido a sua reflexão por diferentes camadas de átomos, situadas em diferentes profundidades no cristal. A interferência construtiva ou destrutiva é função do ângulo de incidência do feixe de raio X na superfície da amostra (PADILHA, 1997). A Figura 4 apresenta um diagrama de um difratômetro padrão.

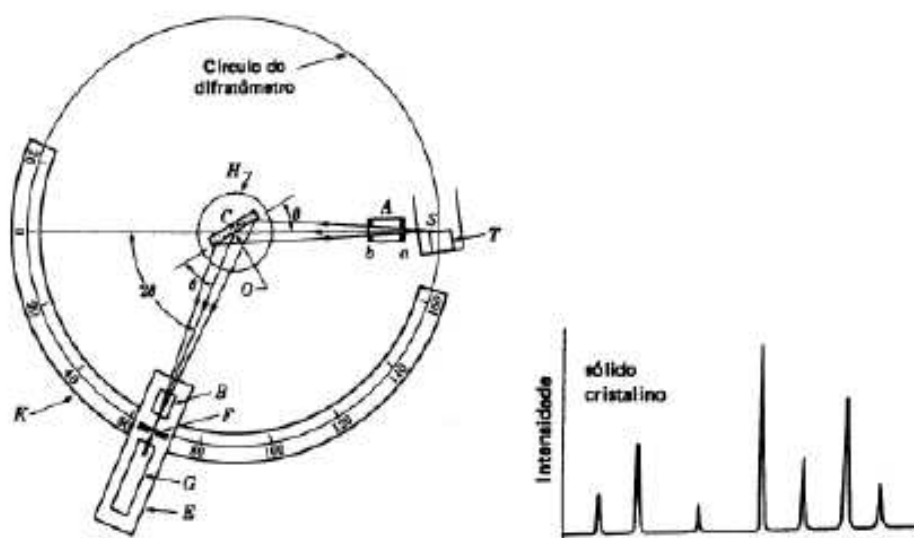


Figura 4 – Técnica de difratometria de Raio-X.

Fonte: DIAS et al., 2007.

No funcionamento do difratômetro o feixe de raios X é gerado por uma fonte (S), passa por um colimador (A), incide na amostra (C), que fica retida no suporte (H), e este gira em torno do eixo (O). O feixe incidente na superfície da amostra é difratado, passa pelos colimadores (B) e (F), e, finalmente, incide no detector (G), que tem um contador de raios X. Os suportes (E) e (H) acoplados movimentam-se de forma que a amostra seja girada 2 x graus do detector (eixo x do espectro). O contador varre toda a faixa angular com velocidade constante e posição adequada. A intensidade (eixo y de um espectro) é medida pelo contador (PADILHA, 1997).

Assim, nos artigos envolvendo a aplicação da técnica de DRX para a caracterização dos complexos com CDs, a existência da complexação é indicada pela alteração angular das estruturas cristalinas em relação às substâncias puras. O composto puro mostra uma série de linhas intensas, o que justifica sua cristalinidade, enquanto as CDs são amorfas em relação a este tipo de caracterização. Portanto, na comparação dos produtos dos procedimentos de inclusão, os espectros das amostras puras e complexadas terão picos com uma diferença referente aos ângulos de ocorrência e de intensidade dos picos, o que justifica a formação de uma nova fase cristalina conforme estudos realizados por (AIGNER et al., 2012; ANWER et al., 2014; GHARIBZAHEDI et al., 2014; HU et al., 2012a; KRISHNASWAMY et al., 2012; LIU et al., 2013; MENEZES et al., 2014; MENNINI et al., 2014; QIU et al., 2014; VAJNA et al., 2011; YAO et al., 2014).

2.5.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN é umas das principais ferramentas para a elucidação estrutural de compostos orgânicos, organometálicos e estruturas moleculares. No século 20 anterior Gutowsky e Hoffman observaram o deslocamento químico (δ) em diferentes compostos de flúor, esse foi o início do uso em grande escala da caracterização por RMN, na qual foi possível observar como as intensidades relativas de δ obedeciam à relação entre os números de hidrogênios presentes em cada grupo (KINNS; SANDERS, 1984). Neste sentido, com o conhecimento mais avançado e considerando os efeitos relacionados ao efeito nuclear Overshauer (NOE), definidos como a mudança de intensidade de um sinal de RMN havendo a alteração dos *spins* na camada eletrônica, onde com a definição dos *spins* ocorre a orientação das partículas subatômicas, ou seja, a geração do espectro de RMN (KINNS; SANDERS, 1984; NEUHAUS; WILLIAMSON, 1992). O mecanismo proposto atua com *spins* nucleares (I e S) conforme a Figura 5.

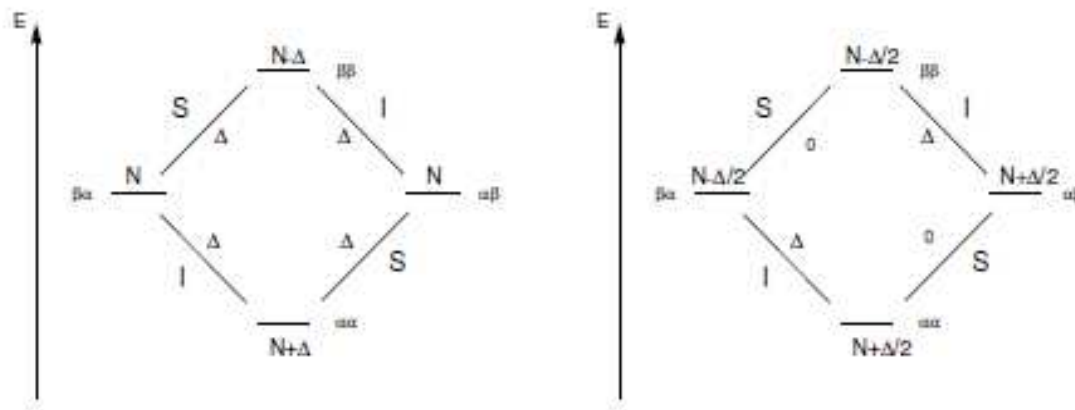


Figura 5 – Diagrama de energia.
Fonte: KINNS; SANDERS, 1984.

Assim, a diferença em um espectro de RMN é relativa ao estado fundamental (α) e excitado (β) do *spin* nuclear.

As análises referentes ao RMN em CDs apresentam importância na identificação de alterações em compostos que formam complexos de inclusão molecular em CDs, no estado sólido ou líquido. Assim, a técnica de RMN foi utilizada porque fornece informações sobre a orientação molecular dos hóspedes dentro da cavidade das CDs. Essa orientação está relacionada com os deslocamentos químicos (δ) dos H das CDs e das moléculas hóspedes, que podem ocorrer. A Figura 6 apresenta a localização dos hidrogênios nas moléculas de β -CD (ANWER et al., 2014; DATHE et al., 1981; JULLIAN et al., 2007; KRISHNASWAMY et al., 2012; LEWANDOWSKI et al., 2013; NISHIDA et al., 1985; PESSINE et al., 1998).

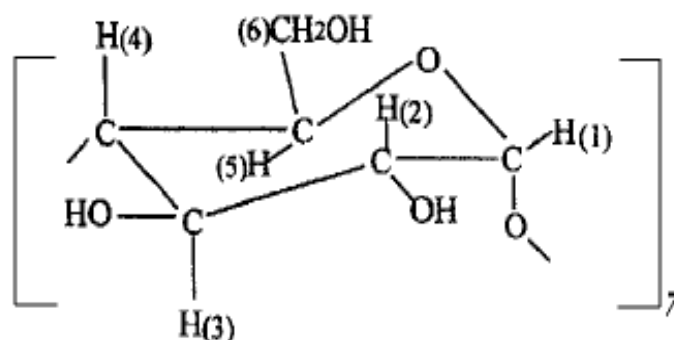


Figura 6 – Hidrogênios das CDs.
Fonte: LIMA et al., 2002.

2.5.3. Espectroscopias Vibracionais

Os espectros de Transformadas de Fourier no Infra-Vermelho (FT-IR/ATR) e Raman (FT-RAMAN) apresentam os níveis de energia e ocorrência de vibrações de moléculas sujeitas à incidência de uma radiação. Em seguida, serão apresentados alguns conceitos sobre estes espectros vibracionais.

2.5.3.1. Transformada de Fourier Infravermelho (FT-IR)

Os espectros geralmente são coletados pela emissão de radiação infravermelho da amostra, sendo as frequências das bandas de absorção relacionadas às diferenças de energias vibracionais das moléculas excitadas (SCHRADER, 1994). As faixas de absorção acontecem em um comprimento de onda de 2,5 a 1000 μm . Assim, para obtenção do espectro das amostras analisadas, é necessário que ocorra a vibração na faixa de amplitude descrita acima, que resulta das alterações vibracionais de um momento de dipolo elétrico da molécula, associado ao deslocamento dos átomos, uns em relação aos outros (CRUZ; NETO, 2006; FERRARO, NAKAMOTO, 1994; STUART, 1956). Se não ocorrer a vibração dos átomos a amostra ficará inativa no infravermelho, como é o caso das moléculas homonucleares (CRUZ; NETO, 2006; FERRARO, NAKAMOTO, 1994). A Figura 7 apresenta um diagrama ilustrativo da variação de momento de dipolo.

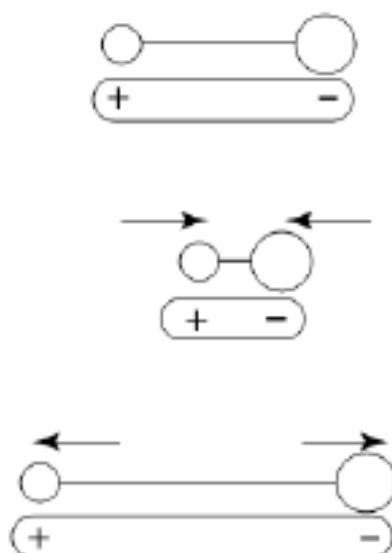


Figura 7 – Mudança de momento de dipolo de uma molécula diatômica.

Fonte: FERRARO, NAKAMOTO, 1994.

2.5.3.2. Transformada de Fourier Raman (FT-RAMAN)

A espectroscopia Raman se baseia no processo de espalhamento inelástico da radiação que incide sobre um átomo (SIDDHANTA; NARAYANA, 2012). O fenômeno físico existente neste método é diferente da técnica FT-IR, pois sua fundamentação está relacionada à absorção da radiação. Desta forma, as regras que definem as leis do FT-IR não irão satisfazer a Raman, pois a atividade da molécula agora está ligada a vibração do dipolo da molécula na presença de campo elétrico e radiação incidente, pois ao colocar a molécula em um campo elétrico, essa sofre distorção por uma forma de atração (FERRARO, NAKAMOTO, 1994; SCHRADER, 1994). A Figura 8 apresenta a formação para esse sistema:

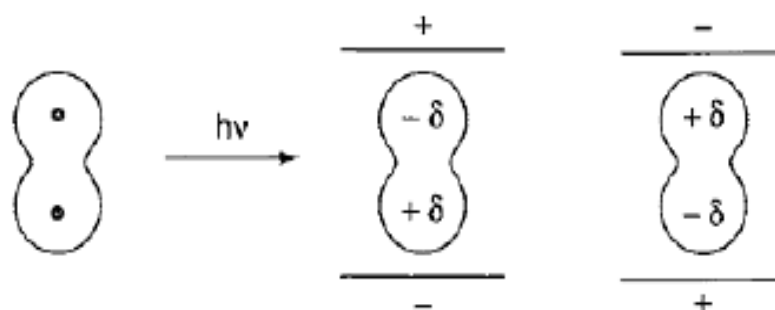


Figura 8 – Polarização de uma molécula diatômica.

Fonte: FERRARO, NAKAMOTO, 1994.

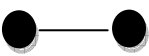

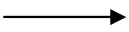


As diferenças entre FT-IR e FT-RAMAN são que estas espectroscopias fornecem análises sobre as vibrações das moléculas em análise, sendo FT-IR a partir da variação da energia vibracional das moléculas e FT-RAMAN por absorção da energia e o resultante espalhamento inelástico da radiação incidente na amostra. A seguir, foram listadas as vantagens e desvantagens das caracterizações realizadas com a técnica FT-RAMAN (FERRARO, NAKAMOTO, 1994).

1. Quando se reduz o feixe de laser a $1\mu\text{m}$, é necessário apenas uma pequena área da superfície da amostra para se obter o Raman.
2. O solvente universal água se dispersa na Raman sem afetar a amostra em análise, já no FT-IR causa interferência devido à alta absorção da água, ou seja, para estudos biológicos o mais aconselhável é a técnica Raman.

3. A técnica Raman consegue varrer uma maior faixa do que o FT-IR, por exemplo, no Raman consegue uma faixa de número de onda de 4000 a 50 cm^{-1} , enquanto no FT-IR a faixa é de 4000 a 400 cm^{-1} .
4. As vibrações são inertes e fracas no FT-IR, enquanto no Raman os espectros são fortes. Por exemplo, como nas vibrações das ligações $\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}=\text{C}$, $\text{P}=\text{S}$, $\text{S}-\text{S}$ e $\text{C}-\text{S}$. De maneira geral, na espectroscopia Raman, as ligações covalentes apresentam espectros com intensidades maiores, enquanto as iônicas apresentam intensidades maiores nas medidas FT-IR.
5. Lasers operam em regiões visíveis no espectro eletromagnético, porém alguns compostos se tornam luminescentes ao receber a incidência deste tipo de luz e isso pode mascarar o espectro Raman.
6. De modo geral o espectro Raman apresenta maior custo em relação aos infravermelhos convencionais, apesar de nos últimos anos existirem equipamentos Raman portáteis que reduzem o seu custo.

A Tabela 1 apresenta algumas regras gerais relativas ao comportamento das moléculas diatômicas utilizadas em análises FT-IR e Raman, lembrando que, em geral ocorre atividade nas análises com infravermelho e Raman, permitindo assim o uso de ambas as técnicas. Entretanto, para moléculas simétricas seu comportamento é de atividade em Raman.

Tabela 1 – Vibrações de moléculas homo e heteronucleares.

Parâmetros	Tipo de Molécula	
	X_2	$\text{X}-\text{Y}$
Momento normal de vibração	 X-X Estiramento	 X-Y Estiramento
Momento de Dipolo	0	
Atividade no Infravermelho	Não	Sim
Forma do Elipsoide de polarizabilidade		
Atividade Raman	Sim	Sim

Fonte: GRIFFITHS, 1995.

As técnicas FT-IR/ATR e FT-RAMAN são muito utilizadas regularmente nos laboratórios para identificar compostos químicos derivados das ciclodextrinas, e também, para reconhecer compostos existentes em amostras complexadas. Isso decorre do fato de que ambas apresentam resultados rápidos e precisos. Entretanto, melhorias importantes foram realizadas para aumentar a precisão e sensibilidade nos equipamentos mais modernos, com a utilização de modelos matemáticos e integração de bandas por equações gaussianas, obtendo-se resultados confiáveis para a conformação espacial dos complexos de inclusão (AIGNER et al., 2012; ANWER et al., 2014; GARNERO et al., 2012; LOPES; FASCIO, 2004; MENEZES et al., 2012, 2014).

2.5.4. Análises Térmicas

As análises térmicas são utilizadas para se prever o comportamento térmico de um material, e fornecem informações físico-químicas da substância analisada.

A análise térmica por TGA é capaz de quantificar (ISHIGURO et al., 1995) e interpretar (GARNERO et al., 2010; LOFTSSON; OLAFSSON, 1998; YANG et al., 2011) as perdas de massas das CDs em função da temperatura a que é submetida uma amostra. Assim, as CDs são geralmente caracterizadas por três fases de perda de massa, a primeira fase de perda ocorre à temperatura ao redor de 100 °C, e está relacionada à volatilização da molécula de H₂O. A segunda fase ocorre na faixa de 100 a 300 °C, que está relacionada com a evaporação da molécula hóspede. A terceira e última fase ocorre em temperaturas mais elevadas do que 300 °C, sendo atribuída a decomposição das CDs. Entretanto, espera-se que a substância incluída na cavidade da CD tenha um comportamento diferente do que a análise de TGA da substância livre, pois a sua inclusão no complexo deve aumentar a estabilidade da molécula hospedeira (GARNERO et al., 2014).

A técnica de análise térmica do tipo DSC foi desenvolvida com o objetivo de quantificar os processos termodinâmicos que acontecem no TGA. Existem dois tipos de DSC, um que determina a compensação de energia e outro o fluxo de calor. Neste trabalho foi usado o tipo de fluxo de calor, no qual uma amostra é aquecida pela mesma fonte de energia do TGA. O fluxo de calor transferido à amostra, pela fonte de energia durante a análise, é determinado com base na amostra de referência (inserida no equipamento) através de placa condutora, sendo medido pelos sensores térmicos

posicionados próximos à referência, obtendo-se um sinal proporcional à diferença de capacidade térmica entre elas. Em ambos os casos, fluxo de calor ou compensação de energia, os gráficos obtidos do DSC são comumente expressos em miliwatts por miligramas (mW/mg) em função da temperatura (GIORDANO et al., 2001). As áreas abaixo dos picos indicam a quantidade de energia envolvida nas transições térmicas que sofre a amostra analisada. Os equipamentos de DSC, quando bem calibrados, podem detectar transições de fase estrutural e magnéticas, entre outras. As transições estruturais são observadas através de picos de absorção ou emissão de calor. As transições magnéticas são observadas por meio de mudanças na linha de base das medidas. Essas transições magnéticas provocam mudanças na entropia das amostras, que por sua vez alteram o calor específico das mesmas, acarretando mudanças na linha de base (GIORDANO et al., 2001).

A técnica de DSC tornou-se uma ferramenta de excelente interpretação analítica para caracterizações no estado sólido, porque fornece informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas dos materiais em estudo (DODZIUK, 2006; GIRON, 2002). O método DSC é o método mais estudado para interações de sólidos com CDs (GIORDANO et al., 2001; MURA et al., 1999). As curvas das CDs são analisadas observando-se o alargamento dos picos, sua intensidade e se o processo é endotérmico na sua desidratação. Esta técnica é limitada para aquelas substâncias que têm ponto de fusão ou ebulição menor que a temperatura de decomposição da ciclodextrina, 300 °C, ou que é maior ou menor que a da água. As moléculas hóspedes são caracterizadas por um pico fino, endotérmico, o qual representa o processo de fusão. A curva térmica dos complexos pode ser uma simples soma de dois gráficos dos materiais puros, molécula hóspede e CD, proporcional à razão mássica destas substâncias na amostra, se não houver estabilização da molécula hóspede após a inclusão. Porém, se houve aumento de estabilidade da molécula hóspede devido à complexação, o gráfico de DSC resultante não é mais a simples soma e a fusão ou evaporação da molécula incluída ocorrerá em temperaturas maiores do que no DSC da substância pura.

As comparações de TGA e DSC de complexos encontrada nos artigos científicos estão relacionadas com a redução do tamanho do pico, diminuição do alargamento, e aumento da temperatura de fusão do pico da molécula hóspede, ou seja, indicando que houve uma quebra da estrutura cristalina da molécula ocorrendo assim interação entre os componentes (BETTINETTI et al., 2002; MURA et al., 1999; ZINGONE;

RUBESSA, 2005). Esses efeitos geralmente levam a afirmar que houve a formação do complexo (CORCIOVA et al., 2014; WANG et al., 2011b).

No entanto, em algumas vezes em que há o desaparecimento do pico de fusão da molécula hóspede na curva de DSC, isso pode ser causado por combinações binárias entre a molécula hóspede e as CDs, segundo alguns autores (LI et al., 2005; MA et al., 2012).

Quando se observam modificações da temperatura e do pico de desidratação das CDs, autores também interpretam estas constatações como confirmação de que houve a complexação (YANG et al., 2011, 2013), mas pelo contrário, essas alterações podem ocorrer por razoáveis alterações na energia de ativação necessária para a desidratação das CDs (LI et al., 2005; MA et al., 2012).

Em muitos casos se mede a entalpia de fusão da droga pura e complexada para verificar se houve diferença de entalpia, e se houver, isso significa que houve uma quebra da cristalinidade da amostra obtendo-se maior interação com as CDs, e também se observa essa diferença de entalpia nas diferentes técnicas de complexação (GIRON, 2002; LI et al., 2005; MENNINI et al., 2014).

2.5.5 Atividade Antioxidante (DPPH)

Os antioxidantes são usados na indústria de processamento para minimizar ou retardar o processo de oxidação (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992). Existem diferentes metodologias para realizar a quantificação dos antioxidantes. Neste sentido, o mecanismo de oxidação ocorre em um processo lento que procede por meio de uma reação em cadeia, incluindo reações de indução, propagação e etapas de término.

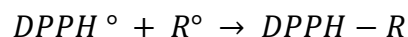
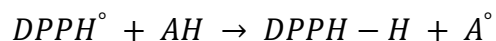
Durante o período de indução, radicais reativos são formados, ou seja, sofrem reação com as moléculas de oxigênio para formar hidroperóxidos e peróxidos. Os radicais reativos formados na reação de indução dão propagação à reação de oxidação em cadeia e são apenas consumidos nas reações de término. Na última etapa do mecanismo, os radicais reativos procedem na associação de dois radicais, de modo a formar um complexo estável. A maioria dos testes é realizada visando encurtar o período de indução da reação em cadeia, por meio de temperaturas mais elevadas, ou aumento da oferta de oxigênio.

As atividades antioxidantes de um grande número de compostos puros e extratos de plantas são determinadas em laboratório, pelo consumo de oxigênio, ou produção de hidroperóxidos, ou por produtos de degradação.

Um teste acelerado foi desenvolvido (JIMÉNEZ et al., 2011; KURECHI et al., 1980). Na atualidade, a metodologia utilizada foi alterada, sendo a reação de dosagem baseada num radical estável, o 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), que é dissolvido em uma solução alcoólica, e a atividade antioxidante é determinada pela mudança da absorbância do DPPH ao reagir com uma molécula antioxidante.

Na forma de radical, o DPPH absorve luz visível, no comprimento de onda de 517 nm, dando uma cor púrpura a sua solução, mas após redução por um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R°), a absorção desaparece nesta faixa e a solução se torna amarela (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; JIMÉNEZ et al., 2011; KURECHI et al., 1980; SHIMADA et al., 1992).

No teste com DPPH as reações que ocorrem são apresentadas abaixo.



Alguns trabalhos que determinaram da variação da capacidade antioxidante de moléculas hospedes, após sua complexação com CDs, têm utilizado o método do DPPH, devido a sua facilidade de aplicação e precisão dos resultados (FOLCH-CANO et al., 2010; GHARIBZAHEDI et al., 2014; STRAŽIŠAR et al., 2008; YAO et al., 2014)

CAPÍTULO III

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos voltados ao desenvolvimento deste trabalho foram realizados no Laboratório de Tecnologia Enzimática no Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em parceria com o Laboratório de Biotecnologia Enzimática do Departamento de Farmácia (DFA). Entretanto, os complexos foram analisados no Departamento de Química (DQI) e Departamento de Física (DFI). Apresenta-se nesta seção os materiais e métodos de inclusão realizados para a formação dos complexos MeJa:HP- β -CD e CAT: β -CD.

3.1. Materiais

Os materiais e reagentes utilizados no desenvolvimento deste estudo são a 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD - M.M. = 1,380 g), metil jasmonato (MeJa - M.M. = 0,164 g), β -ciclodextrina (β -CD - M.M. = 1,299 g), catequina (CAT - M.M. = 0,290 g) adquirido da (Wacker, Brasil). O 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) e 6-hidróxido-2,5,7,8-tetrametil 2-ácido carboxílico (Trolox) e hexano comprado da (Sigma-Aldrich Co.,USA). A água deuterada (D₂O) foi comprada da empresa Cambridge Isótopo Laboratório e o etanol com 98% de pureza da Anidrol (Brasil).

3.2. Metodologia de preparação dos complexos de Inclusão (MeJa:HP- β -CD e CAT: β -CD)

As metodologias de preparação dos complexos foram realizadas conforme as descrições a seguir:

A inclusão pelo processo de MF foi preparada para ambos os complexos propostos por esse estudo (MeJa:HP- β -CD e CAT: β -CD), com respectiva adição em cadinho da molécula hospedeira e molécula hóspede na razão molar para (1:1), realizando-se a maceração manual por um período de 15 min até observar a formação de uma mistura homogênea. Este procedimento foi adaptado de Hu et al., (2012a) e Menezes et al., (2014).

O procedimento da Lio, foi realizado na produção do complexo MeJa:HP- β -CD, com modificações conforme procedimento descrito por Da Rosa et al., (2013) e Vajna et al., (2011). Assim, preparou-se em um béquer o complexo HP- β -CD:MeJa na razão molar ou mássica igual a MF. Posteriormente adicionou-se 50 mL de água destilada sobre o complexo, seguido pela agitação por 30 min, em seguida congelou-se para então ser colocada a massa congelada no Liofilizador por 36 horas.

O procedimento Co+Lio foi realizado na preparação do complexo MeJa:HP- β -CD com a mesma razão molar e mássica que as demais metodologias (MANGOLIM et al., 2014; QIU et al., 2014), em solução de HP- β -CD diluída em água destilada na concentração 1 M e em temperatura controlada de 40 °C. Em seguida, o MeJa foi diluído em etanol 98% de pureza, com concentração de 1 M, utilizando-se as mesmas condições de temperatura e tempo utilizadas no caso da HP- β -CD. Assim, aguardou-se um período de 4 horas e posteriormente resfriou-se as soluções a 25 °C, misturou-se as duas soluções em um rota-evaporador em condição de agitação de 120 rpm, até obter como produto final o complexo MeJa:HP- β -CD. Em seguida, foi realizado o congelamento do complexo e finalizado com o processo de Liofilização por um período de 36 horas.

Baseado em Bai et al., (2010); Wang and Caruso, (2005) e Shu et al, (2011) para a ANCO usou-se a razão molar 1:1, de CAT e β -CD, mediante a pesagem de 0,290 g de CAT e 1,299 g de β -CD. A mistura destas substâncias ocorreu em hexano (10 mL) num erlenmeyer. Em seguida, foi realizada a agitação com pequena variação de pressão ($\Delta P \cong 0,2$ bar) sobre o erlenmeyer e acondicionou-se a mistura em um dessecador. Com a realização do controle de vácuo para forçar a evaporação do hexano foi retirado o este solvente, obtendo no erlenmeyer o complexo CAT: β -CD, que resultou no composto seco, e em seguida, o mesmo foi acondicionado em frasco fechado para futuras análises.

O procedimento de inclusão por SSCO₂ foi realizado para ambos os complexos (MeJa:HP- β -CD e CAT: β -CD) similarmente a metodologia de Banchemo et al., (2013); Grandelli et al., 2012 e Mura et al., (1999). Foi utilizada a pressão de 140 bar e temperatura de 40 °C, com razão molar 1:1 da CD e da molécula hóspede, em mistura com o fluido supercrítico, neste caso o CO₂. Assim, com a estabilização do sistema nas condições de pressão e temperatura ajustadas, realizou-se o fechamento das válvulas de entrada e saída do fluido, e após um período de 60 min, foi efetuada a despressurização

do sistema com a liberação do CO₂ presente no leito e obtenção do complexo MeJa:HP-β-CD.

3.2.1. Caracterizações do Complexo

Para o MeJa:HP-β-CD e CAT:β-CD foram feitas as seguintes caracterizações:

DSC/TGA: Massas de aproximadamente 2 mg dos complexos obtidos foram analisadas colocando-as em porta amostras de alumínio, mantidas sob um fluxo atmosférico de N₂ a 50 mL/min, e uma taxa de aquecimento constante de 10 °C/min na faixa de temperatura de 25°C a 600 °C. Os perfis da análise de DSC e TGA foram obtidos usando o analisador térmico Netzsch STA 409PC (Netzsch Corporation, Alemanha), disponível no laboratório de Análises Térmicas COMCAP/UEM.

FT-IR/RAMAN: Amostras em pó das substâncias puras e complexadas foram analisadas utilizando um espectrofotômetro (modelo Vertex 70v, Bruker, Alemanha) acoplado ao acessório de Reflectância Total Atenuada (FT-IR/ATR) (modelo Platinum, Bruker, Alemanha) com 128 scans e resolução espectral de 2 cm⁻¹. As bandas típicas foram registradas na faixa de 4000-400 cm⁻¹. Os espectros de FT-RAMAN foram obtidos utilizando um espectrofotômetro (vertex modelo 70v com módulo Ram II, Bruker, Alemanha), disponível no laboratório de Física da UEM e equipado com um sensor de germânio refrigerado com azoto líquido. Foi utilizado um laser de 1064 nm com potência nominal variando 5 até 200 mV para excitação. As bandas típicas foram registradas na faixa de 4000-400 cm⁻¹.

H-RMN: As amostras foram diluídas em água deuterada (D₂O), exceto para caso do MeJa no qual se usou clorofórmio deuterado (CDCl₃), e as amostras foram analisadas a 25 °C em um espectrofotômetro de RMN, modelo AVANCE III 500 MHz (Bruker, Suíça). Disponível do Laboratório de Química da UEM.

DPPH: O 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH •) foi usado para medir a atividade antioxidante da molécula hospedeira livre e complexada, que foi realizada com base em Alezandro, (2009); Brand-Willians et al., (1999) e Kfoury et al., (2015), com algumas modificações.

Os complexos de inclusão (MeJa:HP- β -CD e CAT: β -CD), obtidos com as respectivas metodologias de produção, foram diluídos em etanol na concentração de 3×10^{-3} M por se enquadrar na faixa de absorção de 0 a 2 abs em um feixe de luz de 517 nm. Em seguida, foram preparadas as soluções etanólicas de DPPH• a (0,004 mM) e a solução de Trolox (0,05 mM). No escuro foram preparadas as amostras para a leitura no espectrofotômetro UV-VIS. Para calcular a “Absorção de soluções de etanol + CAT em forma livre e complexada”, A, inicialmente diluiu-se 0,4 mL de etanol em 3,6 mL de DPPH etanólico, e logo em seguida transferiu-se 3,6 mL dessa solução em 0,4 mL de TROLOX. Já para determinar o “Controle de Absorbância”, Ac, foram feitas as amostras adicionando 3,6 mL de DPPH etanólico e 0,4 mL das amostras puras de MeJa e CAT e seus respectivos complexos, cada um em preparações separadas. A partir disso obteve-se os resultados de “Atividade Antioxidante em (%)”, %AC, com a Equação (1). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo que as análises foram feitas em cubetas de quartzo. O tempo de análise é instantâneo a partir do momento que se coloca a solução na cubeta e a cubeta no equipamento UV-VIS, pois caso se mudasse esse procedimento, poderiam ocorrer erros acumulativos devido a fácil degradação do DPPH quando exposto à luz.

$$\% AC = \frac{A - A_c}{A} \times 100 \quad (1)$$

E somente para o complexo CAT: β -CD, tem-se:

Raio-X: A difração de Raio-X foi realizada usando um difratômetro de Raios-X D8 Advance (Bruker, Suíça), disponível no laboratório de Engenharia Química da UEM. As amostras puras e complexadas foram colocadas no difratômetro e receberam radiação Cu, K α de 40 kV e 35 mA, a varredura foi obtida com ângulo 2θ entre 5 e 40° com um passo de 0,02° e uma velocidade de digitalização de 0,58° por min.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Complexo de Inclusão MeJa e HP- β -CD

4.1.1. RMN

A confiabilidade das medições de RMN do atual trabalho é um primeiro aspecto a ser considerado. Confirmou-se por meio da comparação entre o espectro de H-RMN da HP- β -CD, apresentado na Figura 9(a), e do MeJa, Figura 9(b), com os resultados de H-RMN dos mesmos compostos já estudados por (PESSINE et al., 1998; POSNER; ASIRVATHAM, 1985). Com uma incerteza de apenas 0,01 ppm ($\mu\text{g/mL}$), os sinais de RMN obtidos neste trabalho, para os átomos de hidrogênio da HP- β -CD, estão nas mesmas coordenadas δ nestes H dos espectros de RMN dos autores acima citados. Tal incerteza no deslocamento químico (δ), ppm, foi estimada com base em valores de δ em alguns átomos de hidrogênio particulares (H1, H2, H3, H5 e H6).

Na Tabela 2 são apresentados os dados dos deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios (H1 a H6) obtidos neste trabalho, com a espectroscopia de H-RMN aplicada à HP- β -CD pura, e aos complexos MeJa:HP- β -CD obtidos pelos diferentes métodos de complexação. Nesta Tabela, adicionalmente mostra-se os deslocamentos químicos dos hidrogênios (H1 a H6) dos complexos MeJa:HP- β -CD em relação à HP- β -CD pura, ou seja, $\Delta\delta_i = \Delta\delta_{\text{Complexo}} - \Delta\delta_{\text{Livre}}$.

Na Figura 9 os espectros de H-RMN das substâncias puras, MeJa e HP- β -CD, e dos complexos MeJa:HP- β -CD, obtidos pelos diferentes métodos de complexação, são apresentados. Nesta figura, tem particular interesse a observação das diferenças dos deslocamentos químicos dos hidrogênios do MeJa livre e MeJa complexado. Ainda na Figura 9, observa-se um sinal negativo na δ perto de 4,7 ppm o qual foi removido de todos os espectros, pois o removendo obtém-se uma figura com melhor resolução dos picos de H, sendo que, o pico 4,7 ppm indica o excesso de D₂O nas amostras estudadas.

Tabela 2- Sinais de H-RMN da HP- β -CD pura e no complexo com MeJa, e deslocamentos químicos resultantes da complexação.

Próton	HP- β - CD	MF	Lio	Co+Lio	SSCO ₂	$\Delta\delta_{MF}$	$\Delta\delta_{Lio}$	$\Delta\delta_{Co+Lio}$	$\Delta\delta_{SSCO}$
H-1	5,02	4,99	4,99	5,00	4,99	-0,03	-0,03	-0,03	0,02
H-2	3,48	3,52	3,52	3,52	3,54	0,04	0,04	0,04	0,06
H-3	3,88	3,92	3,92	3,92	3,92	0,04	0,04	0,04	0,04
H-4	3,43	3,43	3,43	3,43	3,43	0,00	0,00	0,00	0,00
H-5	3,80	3,75	3,75	3,75	3,75	0,05	0,05	0,05	0,05
H-6	3,66	3,68	3,68	3,68	3,68	0,02	0,02	0,02	0,02

$$\Delta\delta_i = \Delta\delta_{Complexo} - \Delta\delta_{Livre}$$

Os resultados de $\Delta\delta_i$ para i entre MF e SSCO₂ na Tabela 2 torna claro que todas as metodologias de complexação modificaram mais acentuadamente os valores δ dos prótons livre H1, H2, H3, H5 e H6 da HP- β -CD, enquanto não foram observadas alterações para H4. De qualquer forma, exceto para H4, $|\Delta\delta_i|$ por qualquer método (i de inclusão) foi sempre maior do que suas incertezas (ΔU_{δ_i}) (i.e., $|\Delta\delta_i| > \Delta U_{\delta_i}$), calculado como a raiz quadrada de $2 \times SU_{\delta}$ onde SU_{δ} é o quadrado da incerteza na medição de deslocamento químico (i.e., $U_{\delta} = 0,01$ ppm). Tal mudança de δ para a maioria dos átomos de hidrogênio sugere que o MeJa foi incluído fortemente na cavidade central da HP- β -CD, em todas as circunstâncias examinadas de complexação (ISHIZU et al., 1999; PESSINE et al., 1998). Além disso, como obtido neste trabalho, em todos estes casos acredita-se que a inclusão total acontece quando $|\Delta\delta_i|$ para H3 for sempre menor do que $|\Delta\delta_i|$ para H5 (GREATBANKS; PICKFORD, 1987).

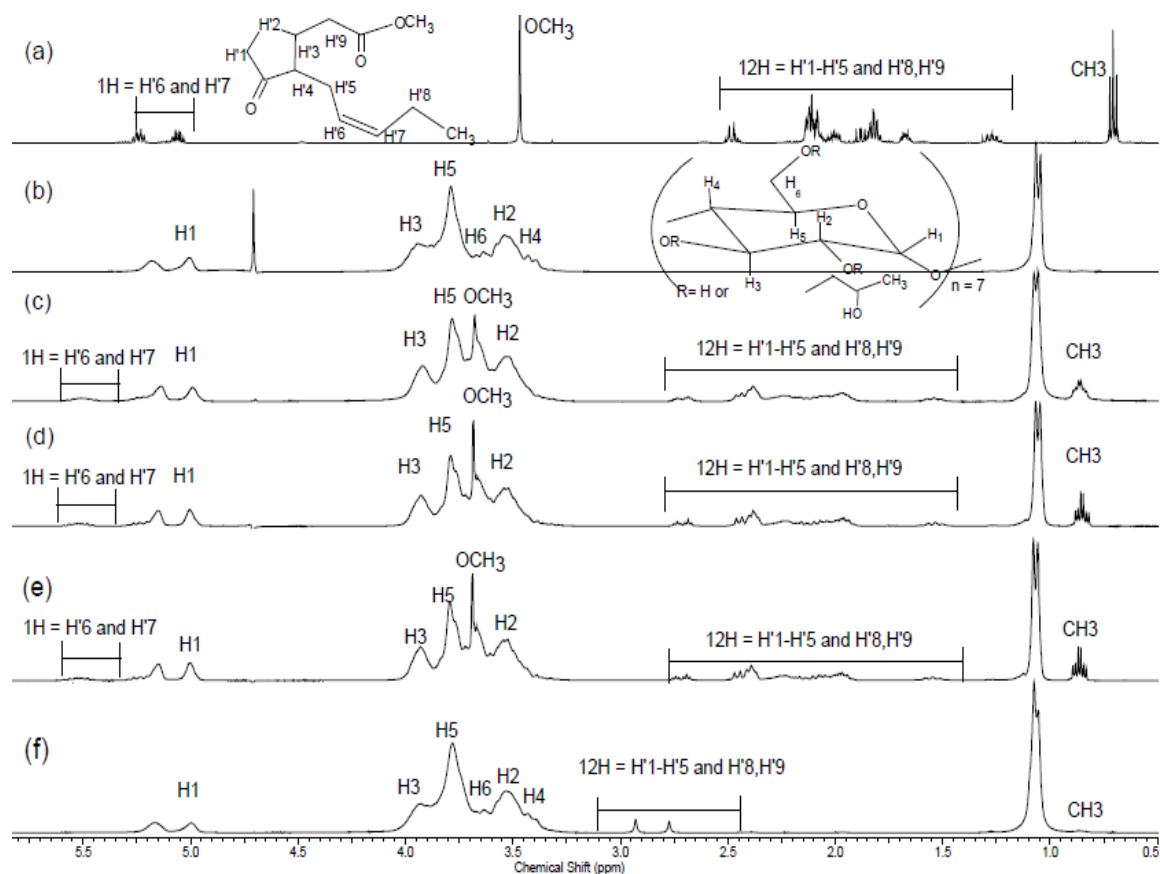


Figura 9 – Espectro de H-NMR (a) MeJa, (b) HP- β -CD, (c) MF, (d) Lio, (e) Co+Lio, (f) SSCO₂.

Na Figura 9(a), as linhas espectrais são observadas para os átomos de hidrogênio 1H ($\delta \approx 5,1$ ppm), OCH₃ ($\delta \approx 3,50$ ppm), 12H (δ de $\approx 1,3$ a $2,5$) e CH₃ (δ de $\approx 0,77$). Estes picos confirmam tais espectros de RMN análogos do MeJa nas literaturas (DATHE et al., 1981; POSNER; ASIRVATHAM, 1985). Para cada um desses prótons a diferença entre o deslocamento químico no MeJa livre (Figura 9(a)) e no complexo MeJa:HP- β -CD (Figura 9(c-f)) é perceptível visualmente. Pode-se observar ainda, que os complexos resultantes das metodologias de inclusão (Figura 9(c-f)) foram formados a partir do contato de MeJa livre com HP- β -CD, sendo relevante o deslocamento químico sob as condições das metodologias examinadas, pois o MeJa é uma substância oleaginosa, ou seja, de fácil inclusão molecular uma vez que o interior da HP- β -CD é apolar (CHATTOPADHYAY et al., 1990; WANG et al., 2007).

4.1.2. FT-IR/ATR e FT-RAMAN

Com a caracterização por meio das técnicas FT-IR/ATR e FT-RAMAN torna-se possível garantir qual metodologia de inclusão se tornou mais eficiente, pois é possível detalhar com clareza os números de onda das absorções e assinalá-los às bandas correspondentes. Em princípio, espera-se que em uma complexação ocorram deslocamentos de banda implicando em formação de novos cromóforos e alterações nas energias da ligação. Por isso, em geral o procedimento usado é o de normalização em uma banda de assinatura de um dado grupo funcional que não se altere no espectro, já que variações na intensidade dependem de condição experimental. A preocupação básica na Figura 10 foi olhar para o posicionamento dessas bandas e não para o fator de normalização, neste momento. Isto não invalida a análise e indicação de qual metodologia inclui a molécula hóspede com maior estabilidade. Assim, os picos de FT-IR/ATR são mostrados na Figura 10.

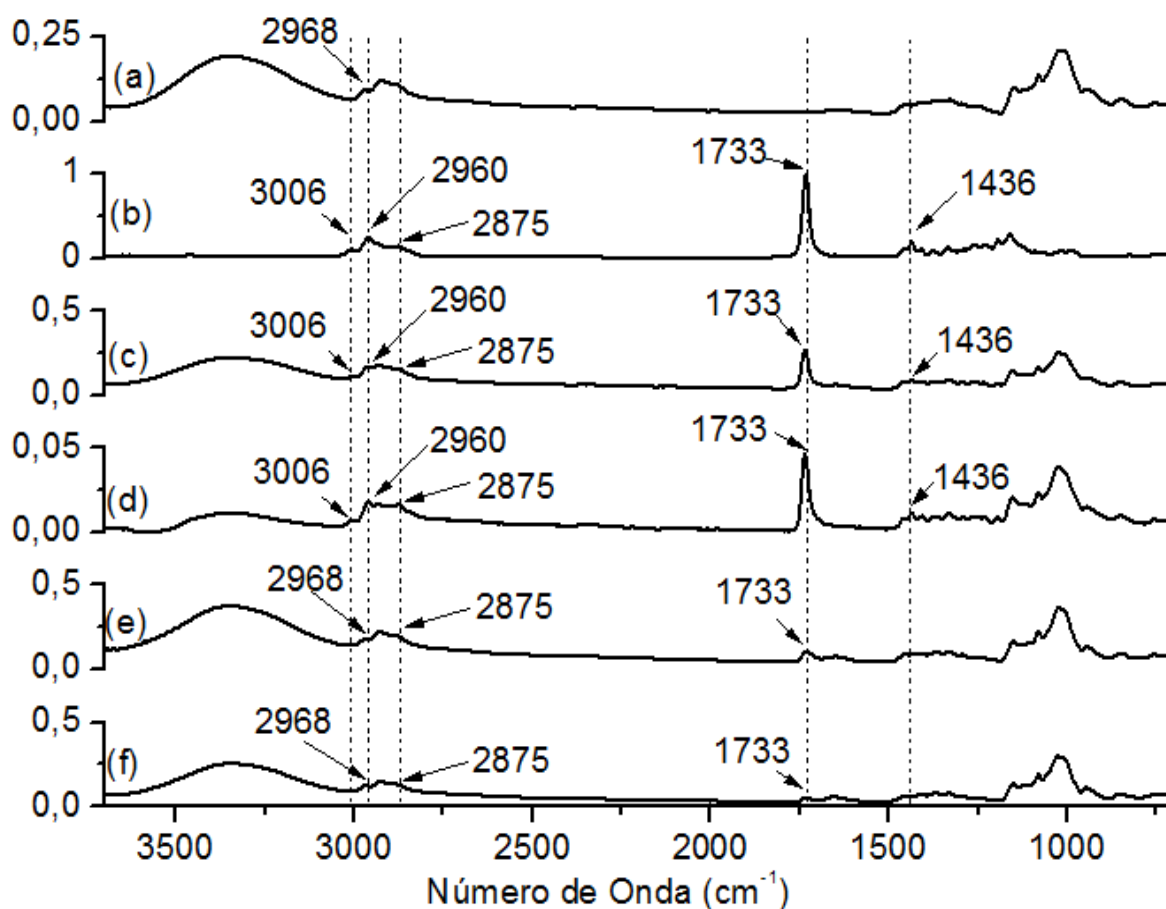


Figura 10 – FT-IR/ATR (a) HP- β -CD, (b) MeJa, (c) MF, (d) Lio, (e) Co+Lio, (f) SSCO₂. (razão molar, 1:1).

A Figura 10 mostra alguns picos que variaram o número de onda de acordo com a metodologia de inclusão. Com base em Lopes; Fascio, (2004), os número de onda mais importantes no espectro de MeJa puro foram:

- 3006 cm^{-1} , corresponde ao número de onda de uma ligação C-H ($\nu(\text{C-H})$), associada à dupla ligação $-\text{HC}=\text{CH}-$ do radical ligado ao ciclopentano do MeJa (Figura 2, Seção 2.2), e também aparentemente presente no produto da mistura física e liofilização, enquanto nas metodologias Co+Lio e SSCO_2 este pico está deslocado, em função da efetividade da ligação intermolecular.

- 2960 cm^{-1} , este pico é atribuído à ligação Alcano $\nu(\text{C-H})$, que está em todas as outras ligações C-H, e, pode-se observar na Figura 10 que este pico aparece nos produtos da MF e Lio, já em Co+Lio e SSCO_2 este número de onda não é encontrado, logo, pode-se inferir que as ligações intermoleculares dos complexos MF e Lio são diferentes daqueles obtidos com as técnicas Co+Lio e SSCO_2 .

- 1733 cm^{-1} , este pico comprova a presença de MeJa nos produtos obtidos pelas metodologias de inclusão, pois no espectro da HP- β -CD ele não é encontrado, além de que este número de onda é atribuído à ligação $\nu(\text{C=O})$ Alquil Cetona, que não faz parte da estrutura molecular da HP- β -CD.

- O pico quase imperceptível para o número de onda de 1650 cm^{-1} é interpretado como $\nu(\text{C=C})$ Alceno fora da cadeia principal do MeJa, e também não é encontrado na estrutura molecular da HP- β -CD.

Os Espectros de inclusão do MeJa:HP- β -CD mostram que os produtos das complexações com MF e a Lio aparentemente representam um espectro híbrido da HP- β -CD e do MeJa, enquanto para o produto da metodologia Co+Lio, alguns picos diminuem como é o caso do 1733 e 1436 cm^{-1} e outros desaparecem como é o caso de $1016, 987\text{ cm}^{-1}$.

Portanto a técnica FT-IR/ATR apresenta uma boa evidência para se verificar se houve a formação do complexo de inclusão e indicar qual metodologia é mais eficiente para a obtenção dos mesmos.

Pelo teste FT-IR/ATR, o espectro da HP- β -CD apresentou importantes bandas de formação. No entanto os espectros Raman têm regiões que podem ser usadas para monitorar variações vibracionais do MeJa, em regiões que talvez o FT-IR/ATR não interprete. A Figura 12 mostra o espectro FT-RAMAN.

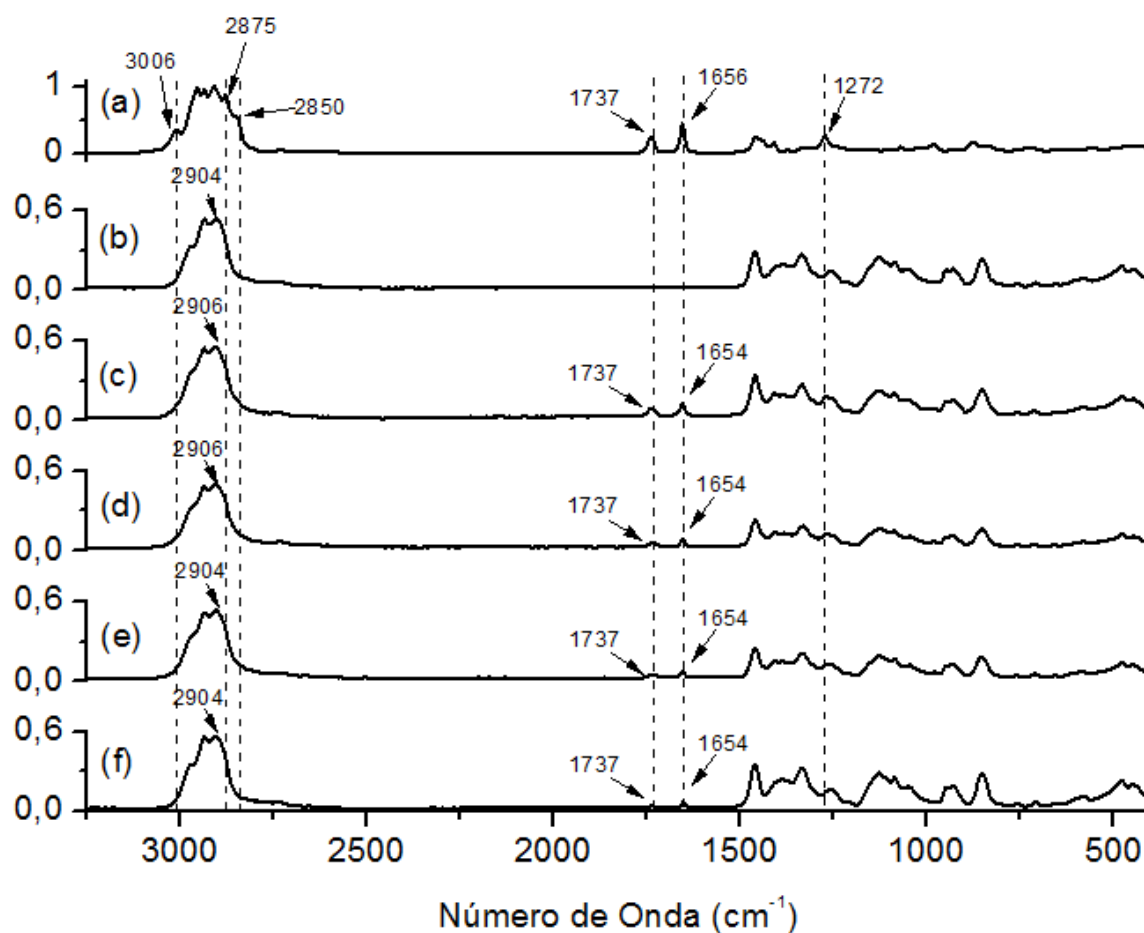


Figura 11 - FT-RAMAN (a) MeJa, (b) HP- β -CD, (c) MF, (d) Lio, (e) Co+Lio, (f) SSCO₂. (razão molar, 1:1).

Inferese-se da Figura 11, que os espectros dos complexos nas regiões entre 3000-2750 e 1500 – 500 sejam característicos da HP- β -CD, e entre 2000 - 1500, sejam característicos do MeJa, e conseqüentemente, na escala em que está a Figura 11 não seria possível identificar uma complexação, mas, existe algumas bandas características a cada composto, como pro exemplo a banda 1737 cm^{-1} (C=O), esta banda garante que existe MeJa nas metodologias de inclusão, pois identifica-se a intensidade do sinal na Figura 11(a), enquanto na Figura 11(b), não é identificado a intensidade desta banda, número de onda. Como a intensidade não é observada neste número de onda para a HP- β -CD, Figura 11(b), conclui-se que esta banda é característica do MeJa. Logo, observando a Figura 11(a) percebe-se que há um deslocamento do número de onda 1656 para 1654 nas Figuras 11(c-f), isso é um indício de que a complexação ocorreu, pois a ligação (C=O) teve menos espaço para vibrar, e reduziu sua energia de vibração,

indicando que existe outras moléculas ao seu redor (MANGOLIM et al., 2014; VALENTINI et al., 2015).

Comparando-se os complexos de MeJa:HP- β -CD pelos espectros FT-RAMAN e FT-IR/ATR, observou-se que para alguns deslocamentos do número de onda, a intensidade foi modificada em função da polarizabilidade da molécula incluída, que é polar, mas todos os números de onda expostos na Figura 10 estão em acordo com a Figura 11.

4.1.3. TGA e DSC

A tabela 3 apresenta a variação da massa (Δm_i) da amostra e do fluxo de calor (J/g) com o aumento gradativo da temperatura, nas análises de TGA e DSC, realizadas com a HP- β -CD e produtos obtidos com as metodologias de complexação.

Tabela 3 – Dados obtidos com as análises de TGA e DSC.

Amostra	$\Delta m_1/\%$ 20-110 °C ^a	$\Delta m_2/\%$ 110-200 °C ^b	$\Delta m_3/\%$ 200-400 °C ^c	J – T ^a J/g - °C	J – T ^b J/g - °C
HP- β -CD	8,542	0,573	81,903	56,55 – 75,60	_____
MF	8,540	8,617	74,622	54,82 – 76,16	21,87 – 197,71
Lio	8,137	9,243	75,567	61,04 – 55,20	18,63 – 244,64
Co+Lio	3,380	4,723	83,917	29,66 – 78,08	19,91 – 245,69
SSCO ₂	7,560	0,544	82,272	52,58 – 77,26	_____

^a Porcentagem de perda de massa, associada à perda de água da HP- β -CD ou dos produtos das metodologias de complexação

^b Porcentagem de perda de massa, associada à perda de MeJa, exceto na HP- β -CD pura

Pelos dados mostrados na Tabela 3 e de acordo com trabalhos de inclusão molecular (GARNERO et al., 2012; MENEZES et al., 2014; VIEIRA et al., 2015), conclui-se que no intervalo de 20 °C a 110 °C a perda de massa está relacionada à perda de água. O complexo formado pelo procedimento Co+Lio foi o que apresentou menor quantidade de água, principalmente devido à natureza das etapas desta metodologia. Esse fato pode ser constatado também pelo baixo fluxo de calor nesse intervalo. No processo de SSCO₂ também foi verificado uma segunda menor perda de água, em razão da utilização de fluido antissolvente, que foi o CO₂. As outras metodologias tem

aproximadamente a mesma porcentagem de perda de água justamente por não sofrer com variações térmicas no seu procedimento de inclusão.

No intervalo de 110 a 200 °C, os produtos das metodologias que mais perdem massa são aqueles obtidos pela Lio, MF e Co+Lio, essas perdas estão relacionadas á perda de MeJa, pois seu ponto de ebulição ocorre em torno desta faixa de temperatura. A metodologia $SSCO_2$ é a que mais consegue manter o MeJa no interior da cavidade da HP- β -CD, em razão do mecanismo de complexação do composto, MeJa: HP- β -CD, pois a pressão (140 bar) e temperatura (40 °C) supercrítica, o CO_2 auxilia a dilatação dos poros da HP- β -CD, e desta forma, o MeJa consegue-se configurar-se de maneira mais estável no interior da HP- β -CD. Na faixa de temperatura de 200 a 400 °C ocorre a maior degradação térmica das amostras, e em maior proporção nos produtos das metodologias Co+Lio e $SSCO_2$, devido à presença de MeJa até esta faixa de temperatura. A Figura 12 ilustra a perda de massa e a Figura 13 o fluxo de calor em relação ao aumento de temperatura.

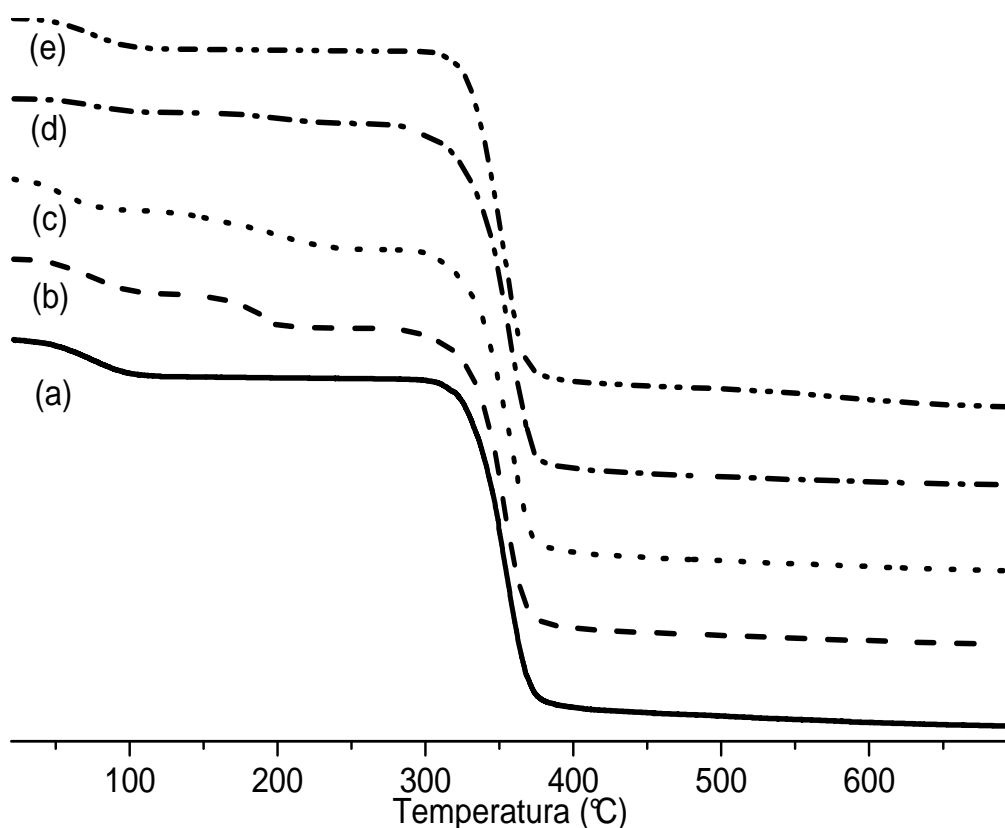


Figura 12 – Curvas de TGA (a) HP- β -CD, (b) MF, (c) Lio, (d) Co+Lio, (e) $SSCO_2$. (razão molar, 1:1).

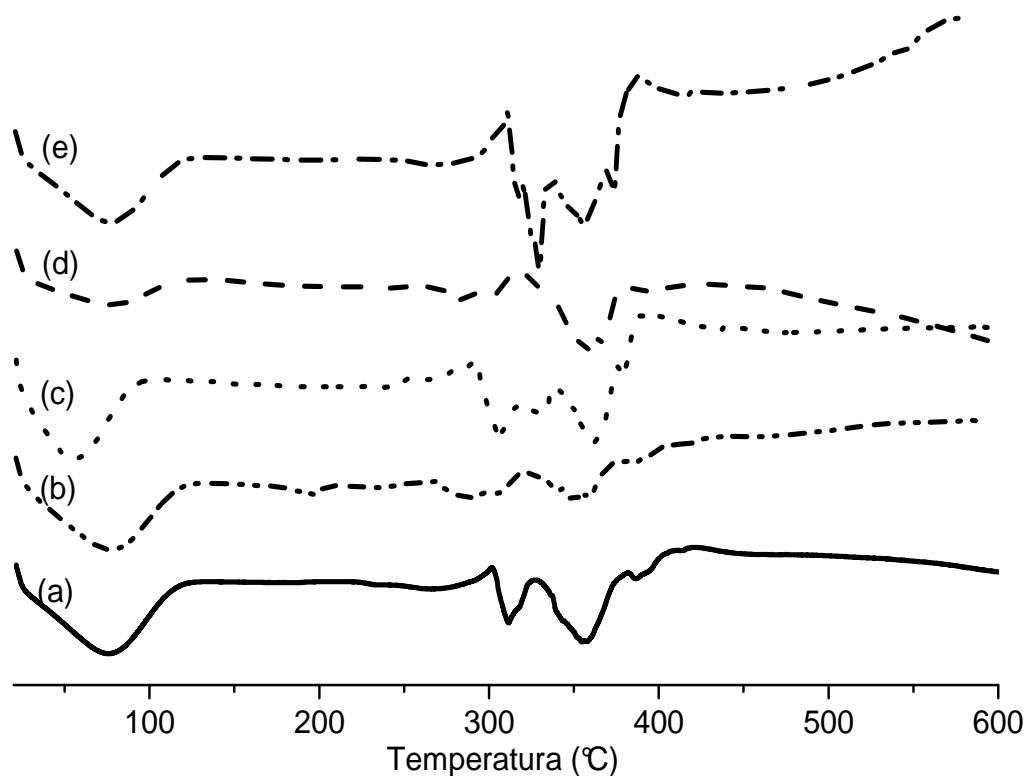


Figura 13– Curvas de DSC (a) HP- β -CD, (b) MF, (c) Lio, (d) Co+Lio, (e) SSCO₂ (razão molar, 1:1).

Analisando as Figuras 12 e 13, conclui-se que a metodologia que mostrou melhor inclusão do MeJa foi o Supercrítico, pois conforme (LOFTSSON; OLAFSSON, 1998) o melhor TGA é aquele que se assemelha a molécula hóspede, neste caso HP- β -CD (BETTINETTI et al., 2002; MURA et al., 1999; ZINGONE; RUBESSA, 2005). Em relação ao DSC quando houver redução do tamanho do pico, diminuição do alargamento da curva, diminuição da temperatura de fusão do pico, é indicativo que houve quebra da estrutura cristalina da molécula, ocorrendo interação entre os componentes. Também foi medida a entalpia de fusão da molécula complexada para verificar se houve diferença de entalpia, isso significa que houve uma quebra da cristalinidade da amostra obtendo maior interação da molécula hóspede com a HP- β -CD, essa diferença de entalpia é observada para as diferentes técnicas de complexação ilustradas na Tabela 3 e por outros autores (GIRON, 2002; LI et al., 2005; MENNINI et al., 2014). Vale lembrar que em muitos trabalhos a MF funciona como padrão para verificar a ocorrência ou não de inclusão, neste caso houve a inclusão com a MF, pois o MeJa é uma substância oleaginosa, sendo portanto, de fácil interação com as ligações de hidrogênio das HP- β -CD.

4.1.4. DPPH

A cinética da atividade antioxidante (AC) do MeJa sob a forma livre e complexada é apresentada na Tabela 4 e Figura 14. O modelo empírico da Equação (2) assume que a cinética de primeira ordem dada pela Equação (2) é capaz de descrever corretamente o decréscimo de AC experimental com o tempo.

$$AC = AC_e(1 - \exp(-kt)) \quad (2)$$

Tabela 4 – Parâmetros da Equação (2) para a análise antioxidante. U_k e U_{AC_e} são desvio padrão, k e AC_e para um $\alpha = 0,05$ (, respectivamente).

Amostra	R^2	$k \pm U_k$ (min^{-1})	$AC_e \pm U_{AC_e}$ (%)
MeJa livre	0,99	$0,09 \pm 0,01^a$	$28,47 \pm 1,88^b$
MeJa/HP- β -CD para MF	0,98	$0,08 \pm 0,01^a$	$30,56 \pm 2,57^b$
MeJa/HP- β -CD para Lio	0,96	$0,08 \pm 0,01^a$	$34,54 \pm 2,75^b$
MeJa/HP- β -CD para Co+Lio	0,99	$0,09 \pm 0,02^a$	$45,70 \pm 3,99^b$
MeJa/HP- β -CD para SSCO ₂	0,99	$0,10 \pm 0,02^a$	$46,10 \pm 4,33^b$

k ou AC_e seguido pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste (t) de $p > 0,05$.

No modelo empírico da Equação (2), AC_e e k são parâmetros à determinar, com um ajuste desta equação aos dados do teste de atividade antioxidante. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 4, e representam AC no estado de equilíbrio e a taxa de atividade dos antioxidantes examinadas, respectivamente. Os resultados experimentais foram ajustados à Equação (2) com a aplicação do método de otimização de Levenberg-Marquardt, e a função objetiva é definida pela soma dos quadrados das diferenças entre a AC medida e o seu valor calculado pelo ajuste. Em todos os casos obteve-se bom ajuste da Equação (2) aos dados ($R^2 \approx 0,99$ para MeJa livre; $R^2 \approx 0,96$ a $0,99$ para os complexos).

Como facilmente se pode inferir a partir da Tabela 4, existe uma diferença significativa entre a atividade antioxidante de equilíbrio (AC_e) do MeJa livre e complexado ($p\text{-value} \leq 0,05$), sendo esta atividade maior nos complexos, enquanto a influência dos métodos examinados de complexação em ambos os parâmetros k e AC_e foi insignificante (valor de $p > 0,05$).

Embora alguns estudos não demonstraram efeito da complexação sobre a atividade antioxidante (FOLCH-CANO et al., 2010; STRAŽIŠAR et al., 2008), o aumento observado neste trabalho para a atividade antioxidante (AC) dos compostos de inclusão em comparação à molécula hóspede livre, também foi evidenciado em outras pesquisas (DE SOUZA; DE GIOVANI, 2004; KFOURY et al., 2015; STRAŽIŠAR et al., 2008). Em conjunto, todas estas evidências levam a supor que a AC do composto complexado depende de muitos fatores, tais como, o tipo de hóspede, o método e condições de complexação, a solubilidade e a estabilidade térmica dos compostos de inclusão formados. Os resultados obtidos na Tabela 4 geraram a Figura 14.

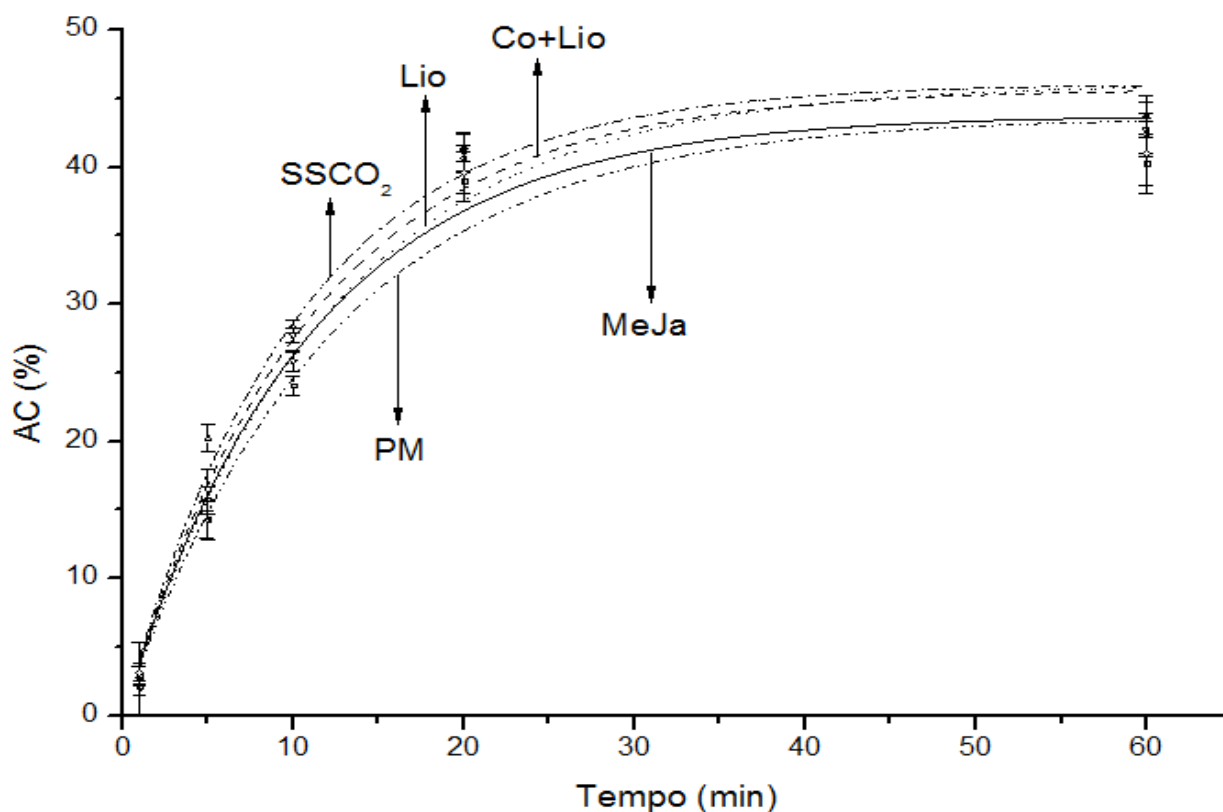


Figura 14 – Atividade Antioxidante (razão molar, 1:1).

A Figura 14 apresenta o modelo da Equação (1) obtido por dados experimentais realizados em triplicata. Observa-se que as técnicas de inclusão molecular aumentou aproximadamente 20% a atividade antioxidante do MeJa. Isto pode ser justificado por dois fatores. Estes resultados abordados levam a supor que a percentagem de AC dos complexos depende de muitos fatores, tais como, o tipo de metodologia empregada, as condições de complexação, a solubilidade e a estabilidade térmica dos compostos complexados, isto é, analisando a Figura 14 observa-se que Lio, Co+Lio e SSCO₂ são maiores que os demais, MF e MeJa livre (De Souza & De Giovani, 2004; Kfoury et al., 2015; Stražišar, Andrenšek, & Šmidovnik, 2008). Na metodologia MF não se observa nenhum efeito significativo de complexação na atividade antioxidante (Folch-Cano, Jullian, Speisky, & Olea-Azar, 2010; Stražišar et al., 2008).

4.2.Complexo de Inclusão da CAT e β -CD

4.2.1. RMN

Os espectros de RMN são interpretados por meio do deslocamento químico característico de cada composto. A partir disso pode-se comparar as amostras puras de CAT, β -CD com os espectros dos complexos de inclusão. A Tabela 5 e a Figura 15 resumem os deslocamentos químicos que ocorreram nas amostras analisadas.

Tabela 5 – Alteração química (δ) for β -CD, CAT/ β -CD e alteração δ ($\Delta\delta_i = \delta_{\text{Complexo}} - \delta_{\text{CAT}}$).

Próton	$\delta_{\beta\text{-CD}}$	δ para CAT/ β -CD			$\Delta\delta_{\text{MF}}$	$\Delta\delta_{\text{ANCO}}$	$\Delta\delta_{\text{SSCO}_2}$
		δ_{MF}	δ_{ANCO}	$\Delta\delta_{\text{SSCO}_2}$			
H2	3,58	3,56	3,56	3,55	-0,02	-0,02	-0,03
H3	3,99	3,81	3,82	3,80	-0,18	-0,17	-0,19
H4	3,51	3,50	3,50	3,50	-0,01	-0,01	-0,01
H5	3,80	3,65	3,67	3,64	-0,15	-0,13	-0,16
H6	3,78	3,62	3,64	3,62	-0,14	-0,12	-0,14

A Tabela 5 mostra que os sinais de prótons, H3, H5, e H6 foram deslocados significativamente, já os prótons H2 e H4 foram apenas ligeiramente afetados. Estes deslocamentos são fortes indícios de que houve complexação da CAT para todas as

metodologias analisadas. Basta observar os prótons H3 e H5 da Figura 15(a) estão voltados para o interior da β -CD, ou seja, podem se deslocar com a inclusão da CAT (JULLIAN et al., 2007).

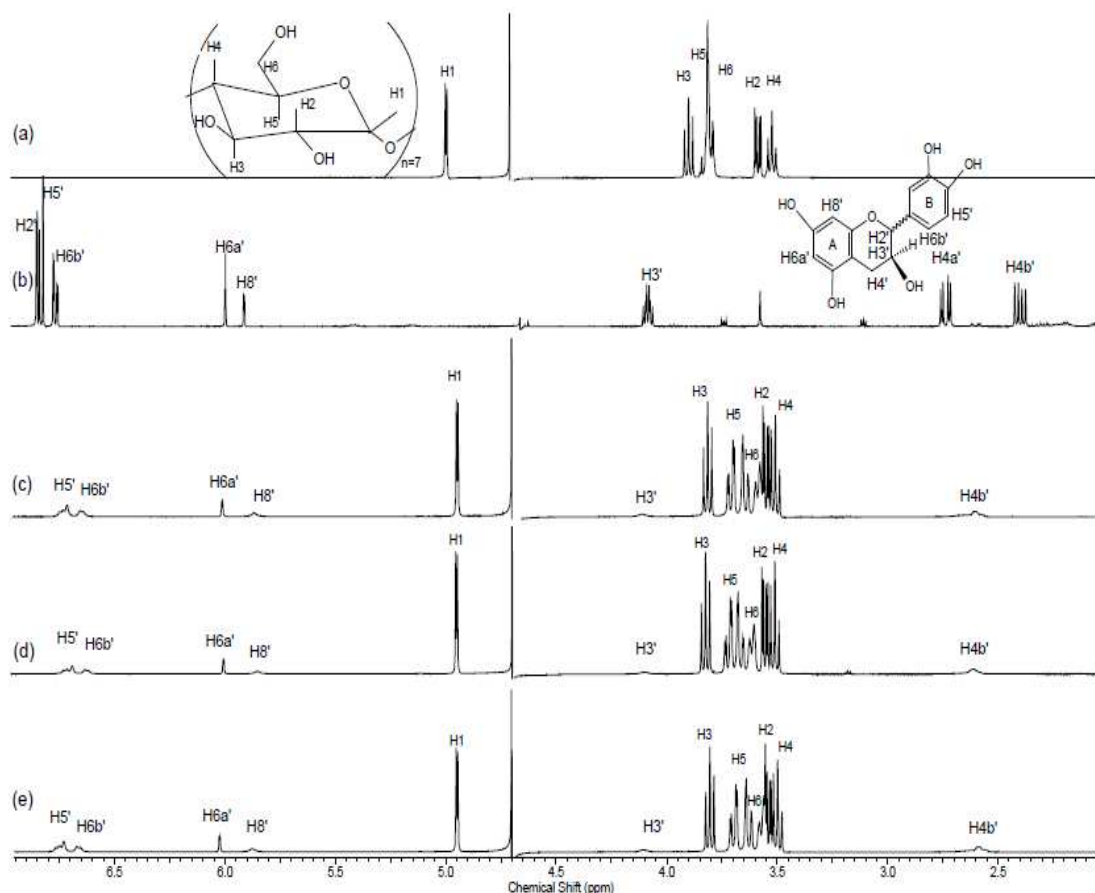


Figura 15 – Espectro de H-NMR of (a) β -CD, (b)CAT, (c)MF, (d)ANCO e (e)SSCO₂.

Além da análise da β -CD realizada na Tabela 5, pode-se analisar o deslocamento dos sinais de H na Figura 15 para a molécula hospedeira. Assim, visualizando a Figura 15(b), observa-se que houve inclusão molecular por meio do deslocamento dos sinais protônicos da CAT nas metodologias de inclusão, nos hidrogênios H4'b, H3', H5', H6'b, H6'a e H8'. Isso implica afirmar que os Anéis A, B e o anel de C – O como mostra a estrutura molecular da Figura 16(b) se rearranjaram no interior da β -CD, ou seja, os movimentos desses prótons estão indicando que a CAT está hermeticamente complexada na molécula hospedeira. Esse fato descrito é conhecido como anisotropia magnética, que significa presença de grupo aromático na molécula hóspede (ISHIZU et al., 1999).

Vale observar que o pico de 4,70 (D₂O) está negativo no eixo da ordenada, isto indica que houve um excesso de solvente na análise dos espectros (BAI et al., 2013). O pico foi removido para melhor resolução do espectro.

4.2.2. DRX

Outra técnica de caracterização a ser lembrada é o DRX (AIGNER et al., 2012). A Figura 16(a-b) mostra os padrões de difração, nesse contexto, o β -CD exibe picos finos e intensos em 8,97° e 12,47° (2 θ), e a CAT apresenta picos em 7,02° e 15,30° (2 θ), justificando assim a cristalinidade dos materiais.

Em seguida analisa-se o desaparecimento ou deslocamento desses cristais nas metodologias de inclusão. Assim, observam-se esses deslocamento e desaparecimento em 7,57°, 9,21°, 15,3°, 16,54°, 19,49°, 21,57°, 26,1°(2 θ), indicando uma possível inclusão molecular (BAI et al., 2013; KRISHNASWAMY et al., 2012; MENEZES et al., 2014). Estes resultados indicam a formação de novas fases cristalinas que podem corresponder à formação do complexo CAT: β -CD.

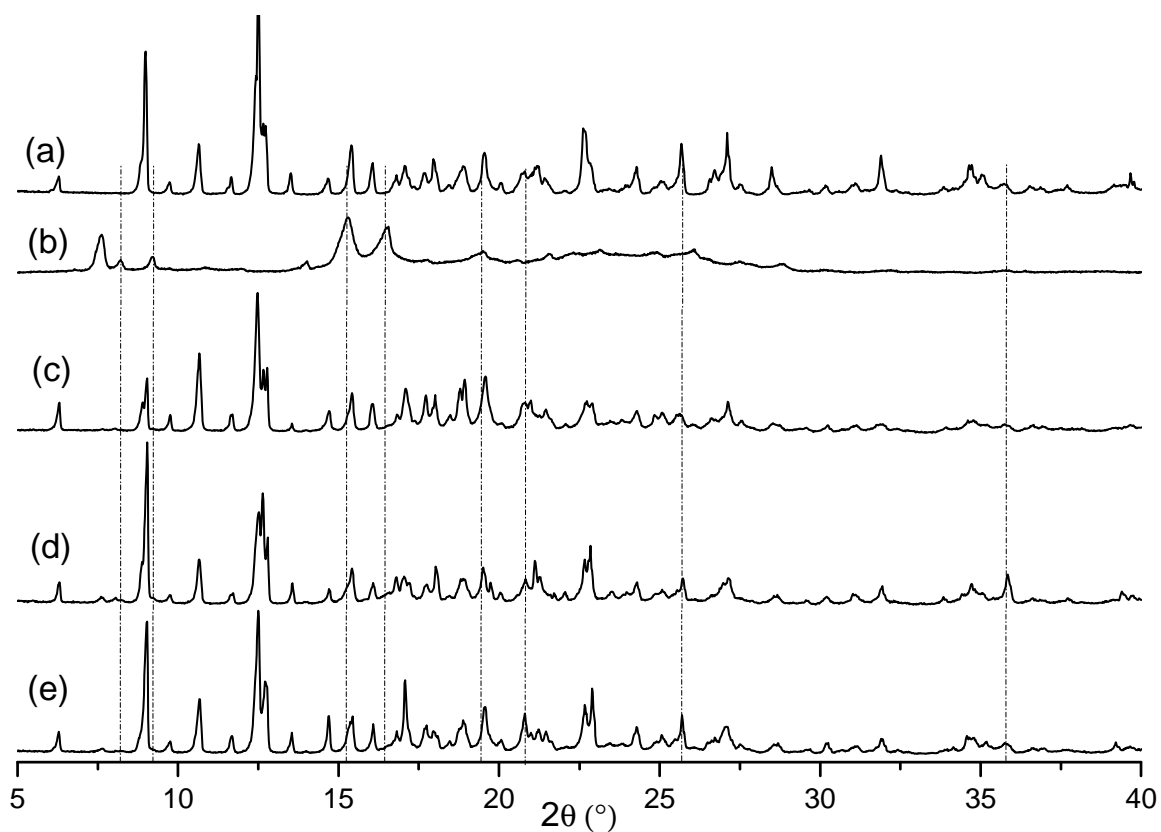


Figura 16 – Espectro de Raio-X (a) β -CD, (b)CAT, (c)MF, (d)ANCO e (e)SSCO₂.

4.2.3. FT-IR/ATR e FT-RAMAN

O FT-IR/ATR é uma técnica usada para confirmar a complexação e a eficiência das metodologias de inclusão (LIU et al., 2013; MENEZES et al., 2014; PALOMO et al., 2005). A Figura 17 mostra os espectros da β -CD, CAT, MF, ANCO e SSCO₂.

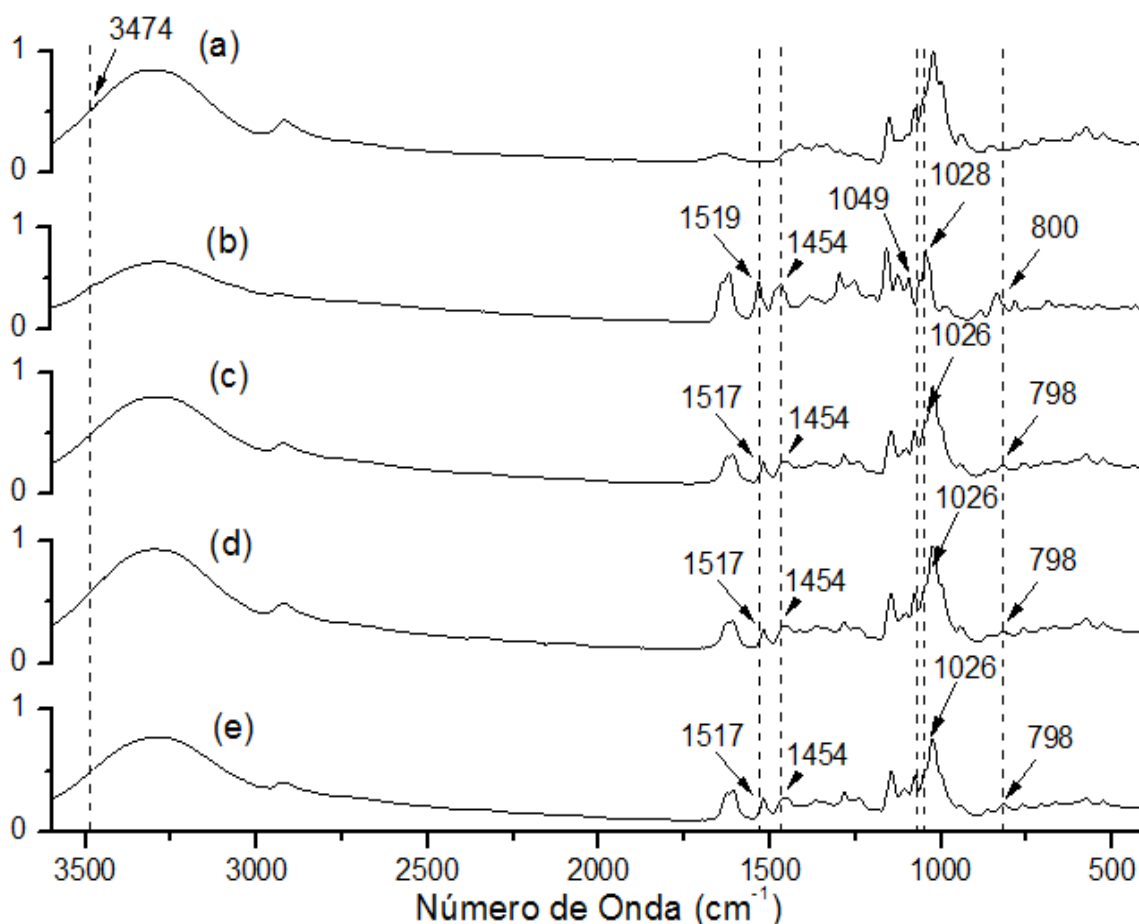


Figura 17 – FT-IR/ATR (a) β -CD, (b) CAT, (c) MF, (d) ANCO, (e) SSCO₂. (razão molar, 1:1).

Alguns espectros na Figura 17 sofrem variações tanto no número de onda como na intensidade quando há inclusão da molécula hóspede (BAI et al., 2013; LI; XU, 2010; LOPES; FASCIO, 2004). O pico de absorção de energia com número de onda em 3280 cm^{-1} na Figura 17(b) é característico dos grupos hidroxilas 1,3 no anel aromático A, 3 Aril-Aquil-Éter e 1,2 no anel B da CAT e hidroxilas dos anéis de dextrina da β -CD. Nesse número de onda, houve portanto uma sobreposição de intensidades de absorção que indicam a formação do complexo.

Os picos de absorção na região de 1600 a 1450 cm^{-1} na Figura 17 são característicos das ligações $\nu(\text{C}=\text{C})$ dos anéis aromáticos da CAT, comprovando neste contexto a existência da molécula hospedeira ligada a β -CD. A Figura 18(b) mostra a absorção no número de onda em 1519 cm^{-1} , mas nos espectros da MF, ANCO e SSCO₂ verificou-se um deslocamento desse número de onda para 1517 cm^{-1} . Isso indica que as

ligações intermoleculares nas metodologias de inclusão entre a β -CD e a CAT ficaram menos tencionadas, ou seja, os comprimentos de onda vibram numa intensidade menos energética do que na CAT pura.

O número de onda próximo a 1028 cm^{-1} na Figura 17(b) é característico de ligações fortes Aril-Aquil-Éter (C-O-C), encontradas tanto na estrutura molecular da β -CD quanto na CAT. No espectro da β -CD a vibração ocorre em 1030 cm^{-1} , já no espectro das metodologias de inclusão a absorção ocorre em 1026 cm^{-1} . Tal variação no número de onda pode ser decorrente dos diferentes radicais ligados ao grupo C-O-C dos analitos que se dispõem ou sequestram a nuvem eletrônica provavelmente devido à diferença de eletronegatividade.

Nas metodologias de inclusão na Figura 17 os picos em 1517 cm^{-1} e 1454 cm^{-1} foram interpretados como marcadores da CAT. Por meio da metodologia de ajuste por gaussianas como em (AIGNER et al., 2012; LIN et al., 2012; VALENTINI et al., 2015) foi possível comparar a área das bandas de absorção da CAT nas diferentes metodologias. Observando a Figura 18 chega-se à conclusão que quanto menor a área maior a eficiência de inclusão. Vale lembrar que a diminuição da área está associada à vibração da molécula, e caso essa molécula não vibre significa que a CAT foi incluída com maior estabilidade.

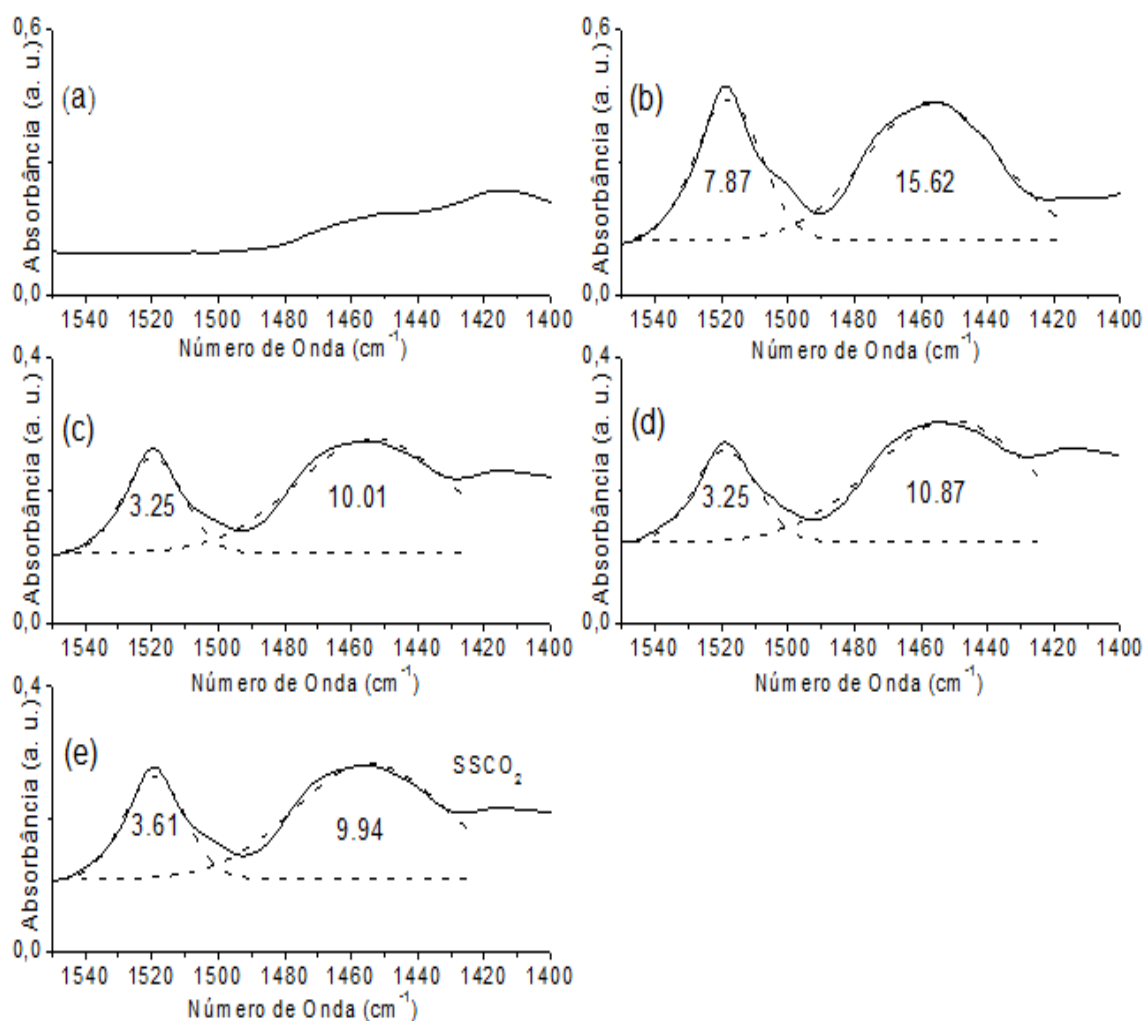


Figura 18 – Curvas de Gauss na região de número de onda de 1560-1400 cm⁻¹ FT-IR/ATR (a) β-CD, (b) CAT, (c) MF, (d) ANCO, (e) SSCO₂. (razão molar, 1:1).

A Figura 18 mostra que a MF, ANCO e SSCO₂ apresentaram uma boa inclusão da molécula hospedeira devido ao fato de que as somas das áreas foram reduzidas comparadas com a CAT pura.

A redução das áreas está associada à energia vibracional das moléculas, assim a CAT vibra com maior facilidade (maior área) do que metodologias de inclusão (menor área) as quais são interligadas com a β-CD.

A partir dos dados acima conclui-se que às interações entre a CAT e a β-CD a temperatura ambiente ficam mais estáveis na MF. Apesar da ANCO e SSCO₂ apresentar resultado muito próximo a MF.

As análises de FT-RAMAN são complementares as de FT-IR/ATR. Em alguns casos os grupos funcionais sofrem ressonância num intervalo muito pequeno. Na Figura 19 verificam-se bandas largas como na região de 1500 a 1000 cm^{-1} , não sendo possível apontar com precisão a qual grupo funcional pertencem. Afinal, podem estar associadas à sobreposição de bandas, o que seria interpretado como novas ligações intermoleculares.

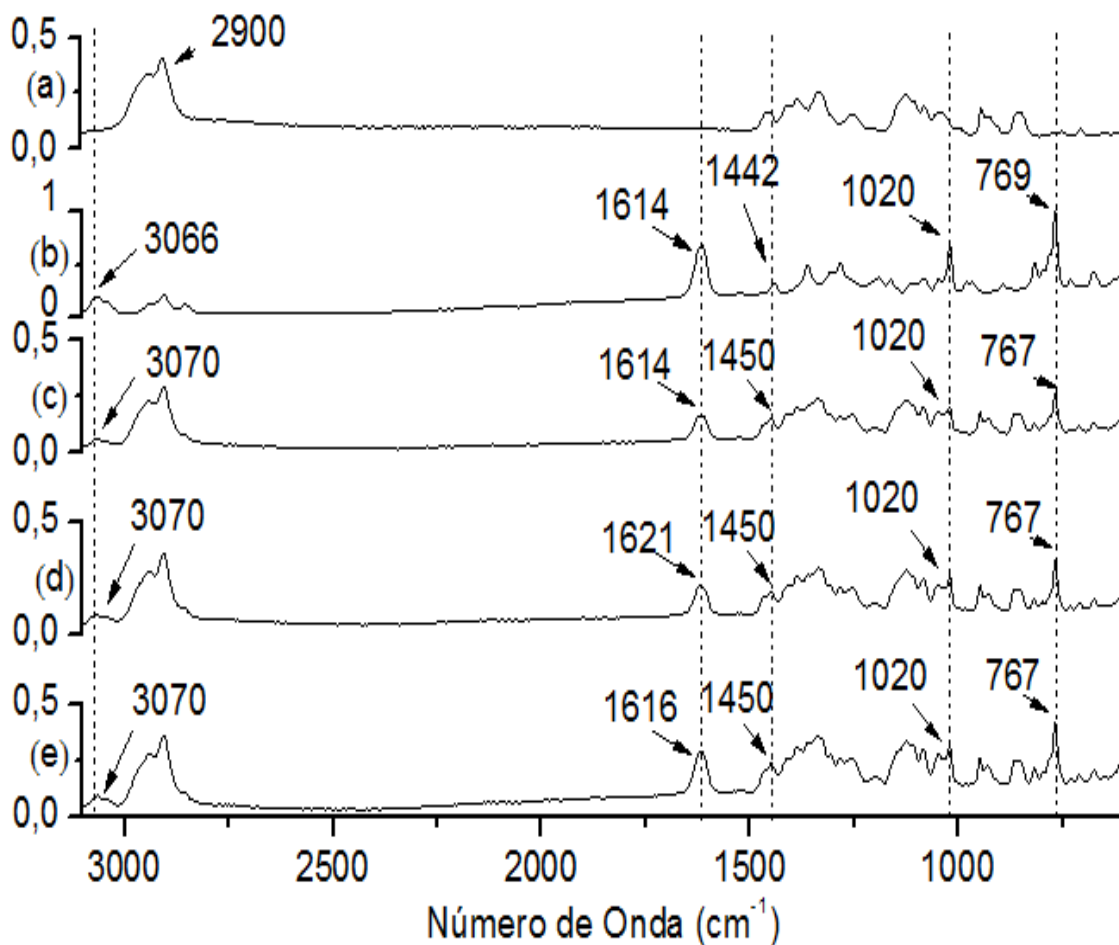


Figura 19 - FT-RAMAN (a) β -CD, (b) CAT, (c) MF, (d) ANCO, (e) SSCO₂. (razão molar, 1:1).

A vibração decorrente das hidroxilas encontradas no FT-IR/ATR não foram detectadas no Raman, porém o grupo CH₂ presente no anel aromático e não detectado na análise anterior aparece claramente no número de onda 3066 cm^{-1} Figura 19(b), geralmente deslocado nas metodologias de inclusão.

As ressonâncias na Figura 19(b) em 1614, 1442 e 1020 pertencem às respectivas ligações C=C do anel aromático A, C=C do anel aromático B e Aril-Alquil-Éter que também aparecem deslocados na MF, ANCO e SSCO₂. O número de onda 769 das ligações C-H dos anéis aromáticos, de forma semelhante à acima descrita, foram detectados no espectro de Raman, sendo deslocado nos espectros das metodologias de inclusão.

Vale lembrar a importância de picos da Figura 19(b) na MF, ANCO e SSCO₂, pois são característicos da CAT, ou seja, as metodologias de inclusão estão complexando a CAT. Desta forma pode-se afirmar que todas as metodologias de inclusão deslocaram picos indicando que houve inclusão. Tais metodologias deslocaram os picos para 3066 cm⁻¹, 1614 cm⁻¹, 767 cm⁻¹ mostrando que os complexos formaram estruturas mais estáveis, ou seja, com intensidades vibracionais reduzidas comparadas com a molécula hóspede (KRISHNASWAMY et al., 2012; MANGOLIM et al., 2014; VALENTINI et al., 2015).

4.2.4. TGA e DSC

As estruturas mais estáveis possivelmente são ligadas intermolecularmente por dipolo-dipolo ou Van der Waals, a depender de como se tornou a estrutura geométrica do complexo. Comparando-se os complexos CAT:β-CD Raman com o FT-IR/ATR, observou-se alguns deslocamentos do número de onda e intensidade, fato que pode ter ocorrido devido a polarizabilidade das moléculas puras.

Para verificar a resistência à degradação térmica das amostras e quantificá-las, foram realizadas análises de TGA e DSC como mostra as Figuras 20 e 21. As curvas termogravimétricas foram divididas em três faixas de temperatura.

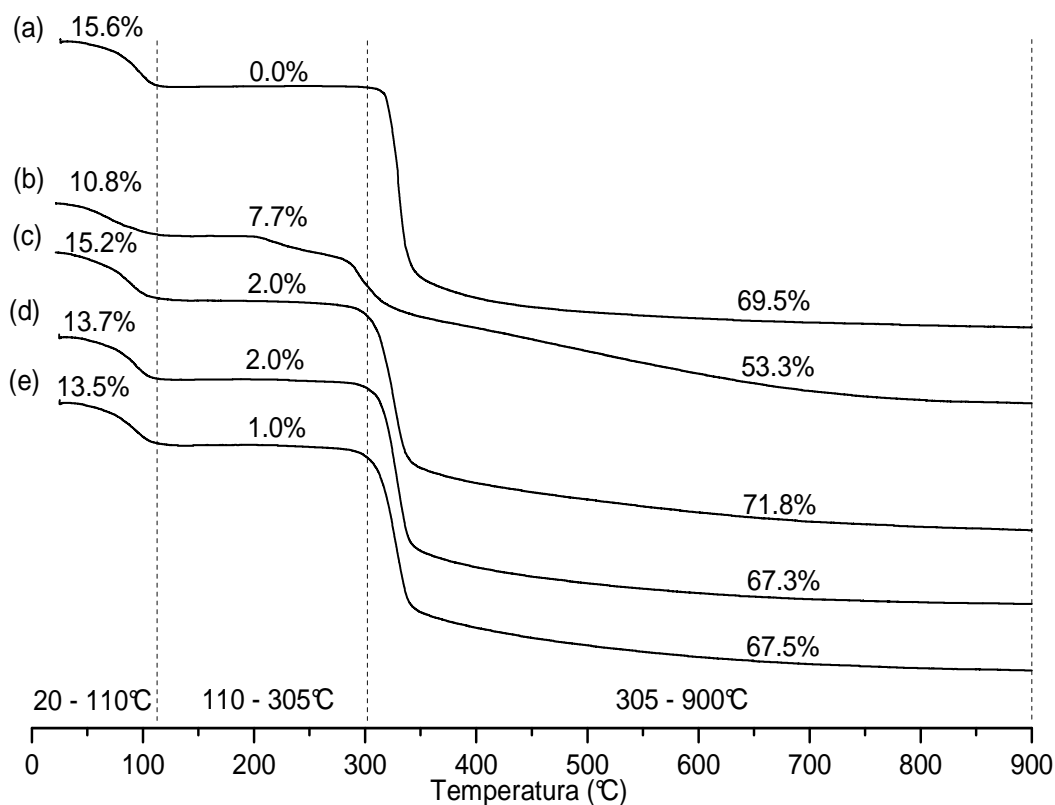


Figura 20 – Curvas de TGA (a) β -CD, (b) CAT, (c) MF, (d) ANCO, (e) SSCO₂. (razão molar, 1:1).

No intervalo de temperatura de 20 a 110°C como mostra a Figuras 20 verifica-se grande perda de massa para todas as amostras, esta perda de massa esta associada à vaporização de compostos com baixo ponto de ebulição, dentre eles a água. Já a amostra β -CD foi a que teve o maior percentual de perda de água.

Dentre as amostras complexadas, a metodologia MF foi a que causou maior percentual de perda de massa, a perda de massa da MF pode estar associada ao seu procedimento de inclusão, pois os métodos da ANCO e SSCO₂ estão relacionados a mudanças de fases e evaporação do solvente devido à variação da pressão e temperatura, arrastando parte da perda de massa que possa existir na amostra no preparo das metodologias de inclusão (BAI et al., 2013; DIAS; NIKOLAOU et al., 2008; XU et al., 2008).

A faixa de temperatura entre 110 a 305°C é associada à perda de massa da CAT, pois não se tem perda de β -CD nesta faixa. Assim, observando a Figura 20 nota-se que

a CAT perdeu maior percentual de massa, já dentre as metodologias de inclusão a MF e ANCO foram as que perderam maior percentual de massa. A maior perda da CAT pura pode ser justificada pela proteção da β -CD nas metodologias de inclusão.

A última faixa de temperatura 305 a 900°C é quando ocorre a degradação molecular das amostras. Quem mostrou maior degradação com o aumento da temperatura nesse período foi a MF, isto pode ser justificado pelo seu procedimento experimental, no qual deixam espaços para entrada de calor entre à β -CD e a CAT. Vale ressaltar que o melhor TGA é aquele que se assemelha a molécula hóspede (LOFTSSON; OLAFSSON, 1998). Na Figura 20 visualizamos que quem mais se assemelhou a β -CD foi o SSCO_2 , ou seja, seria o melhor TGA dentro desse aspecto.

A Figura 21 apresenta os picos de absorção de energia e temperatura de transições nas amostras puras e complexadas. Observa-se a faixa de temperatura de 20 a 125°, com a inclusão da CAT na β -CD as temperaturas de transições foram aumentadas comparadas com a CAT pura, isso se justifica pelo fato da molécula hospedeira ter a temperatura de transição maior do que todas as outras amostras.

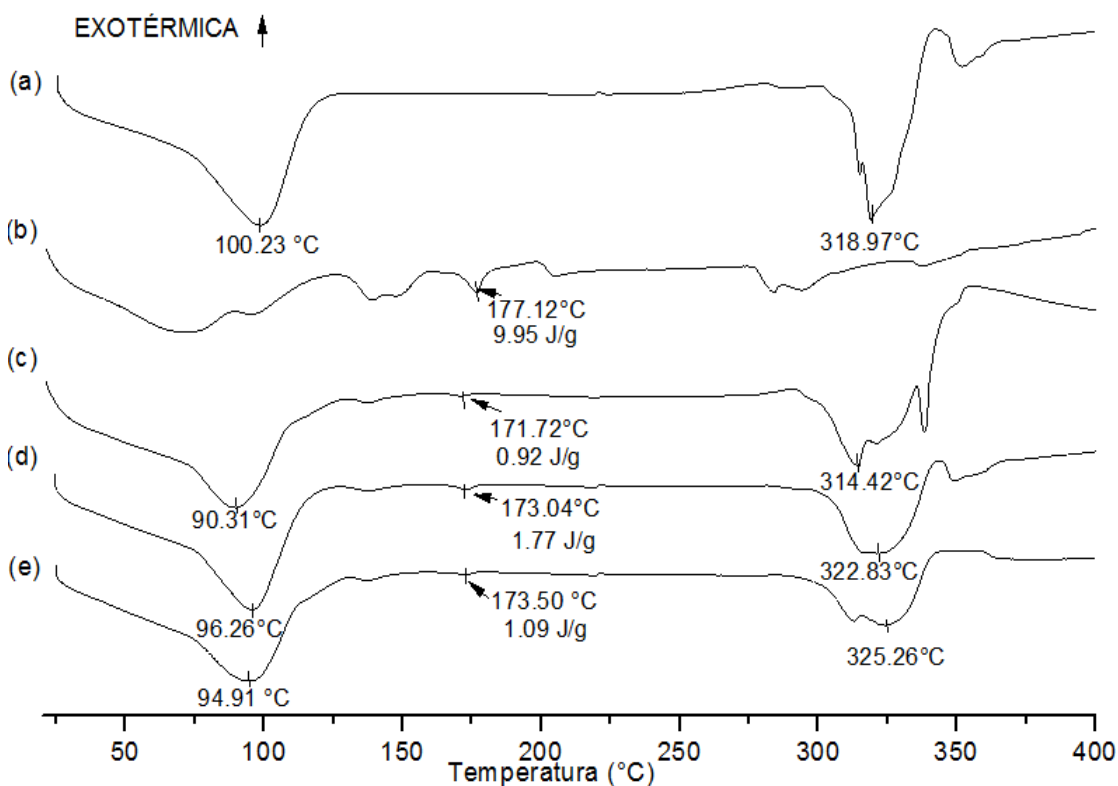


Figura 21 – Curvas de DSC (a) β -CD, (b) CAT, (c) MF, (d) ANCO, (e) SSCO_2 . (razão molar, 1:1).

Já na faixa de temperatura de 125 a 250°C como mostra a Figura 21, a metodologia SSCO_2 tem menor absorção de energia comparada com as metodologias MF e ANCO, isso ocorre porque seu processo de inclusão acontece em estado supercrítico, fazendo com que a molécula hospedeira se ligue com maior estabilidade à molécula hóspede. Ainda nesta faixa de temperatura os picos de temperatura das metodologias de inclusão são menores do que o da CAT porque a variação de suas temperaturas (alargamento da curva) dos complexos também é menor.

A faixa de 250 a 400°C apresentada na Figura 21 mostra que as amostras puras e complexadas perderam sua estrutura cristalina com a degradação térmica das macromoléculas. Também nota-se que os procedimentos de inclusão são mais resistentes do que a CAT, isso é justificado pela presença do anel β -CD. Nesse processo o anel β -CD encapsula a molécula hóspede tornando assim as metodologias de inclusão mais resistentes termicamente. A metodologia SSCO_2 foi a que apresentou maior resistência, pelo fato do complexo já ter passado por modificação de temperatura e pressão no procedimento de inclusão.

4.2.5. DPPH

A cinética da atividade antioxidante da CAT sob a forma livre e complexada é apresentada na Tabela 6 e na Figura 22. O modelo prontamente revela que a cinética de primeira ordem dada pela Equação (3) foi capaz de descrever corretamente a mudança de AC experimental com o tempo em todos os casos ($R^2 \approx 0,84$ para CAT livre; $R^2 \approx 0,94$ - $0,96$ para os complexos).

$$AC = AC_e(1 - \exp(-kt)) \quad (3)$$

Os parâmetros AC_e e k são um modelo empírico, tais estão resumidos na Tabela 6 que representam AC no estado de equilíbrio e a taxa de atividade dos antioxidantes examinadas, respectivamente. Os resultados experimentais foram ajustados nas cinéticas por aplicação do método de otimização de Levenberg-Marquardt, e a função objetiva é definida pela soma dos quadrados das diferenças entre AC e calculado experimental.

Tabela 6 – Parâmetros da Equação (20) para a análise antioxidante. U_k e U_{AC_e} são variáveis incertas, k a AC_e para um $\alpha=0,05$, respectivamente.

Amostra	R^2	$k \pm U_k$ (% min ⁻¹)	$AC_e \pm U_{AC_e}$ (%)
CAT livre	0,84	0,11±0,09 ^a	6,3±1,6 ^a
CAT/ β -CD para MF	0,94	0,08±0,04 ^a	24,5±3,8 ^b
CAT/ β -CD para ANCO	0,95	0,08±0,03 ^a	24,0±3,3 ^b
CAT/ β -CD para SSCO ₂	0,96	0,09±0,04 ^a	25,4±3,2 ^b

k ou AC_e seguido pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste (t) de $p>0,05$

Como facilmente se pode inferir a partir da Tabela 6, existe uma diferença significativa entre a atividade antioxidante de equilíbrio da CAT livre e complexado (p-valor $\leq 0,05$), enquanto a influência dos métodos examinados de complexação em ambos k e AC_e foi insignificante (valor de $p > 0,05$). Embora alguns estudos observaram nenhum efeito da complexação na atividade antioxidante (FOLCH-CANO et al., 2010; STRAŽIŠAR et al., 2008), o aumento observado atualmente de AC dos compostos de inclusão são comparados com a da molécula hóspede livre, tendo sido muitas vezes observada na literatura (DE SOUZA; DE GIOVANI, 2004; KFOURY et al., 2015; STRAŽIŠAR et al., 2008). Em conjunto, todas estas evidências levam a supor que o AC do composto complexado depende de muitos fatores, tais como, o tipo de hospedeira, o método e condições de complexação, a solubilidade e a estabilidade térmica dos compostos de inclusão formados. Os resultados obtidos na Tabela 6 geraram a Figura 22.

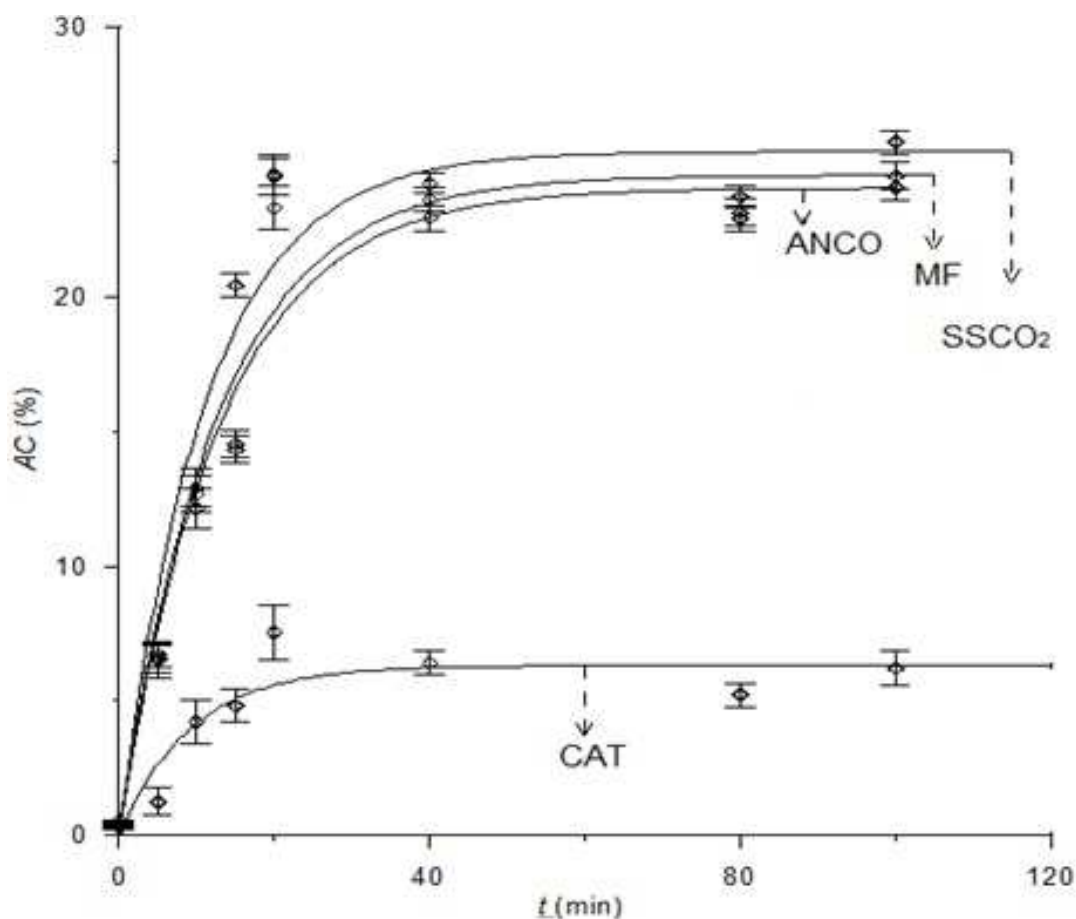


Figura 22 – Atividade Antioxidante (razão molar, 1:1).

A Figura 22 apresenta o modelo da Equação (3) obtido pelos dados experimentais realizados em triplicata. Observa-se que as técnicas de inclusão molecular aumentaram significativamente a atividade antioxidante da CAT. Houve um aumento em torno de 15% da atividade antioxidante em relação a CAT pura. Também observa-se na Figura 22 que a CAT pura reage totalmente nos primeiros 20 min de reação, já as metodologias de inclusão reagem totalmente próximo dos 60 min de reação, isso pode ser justificado pela alta oxidação da CAT livre no meio ambiente e pela proteção contra oxidação que a β -CD gera no complexo.

A metodologia que obteve melhor resultado foi a SSCO₂, a justificativa está no seu procedimento de inclusão (aumenta os poros da β -CD, ligando a CAT com maior estabilidade). Apesar das metodologias ANCO e MF apresentarem resultados muito próximos a SSCO₂.

4.3.Considerações Finais

A partir dos resultados obtidos do primeiro estudo MeJa:HP- β -CD, observamos que os resultados obtidos possibilitaram verificar a eficiência dos diferentes processos de inclusão voltados para a HP β -CD e o MeJa. Com destaque nas caracterizações realizadas para a metodologia utilizando o SSCO₂ por obter uma melhoria acentuada durante a inclusão molecular. O método consiste no uso estático da temperatura e pressão muito acima das condições utilizadas no ambiente (condições supercríticas), fazendo com que a molécula hóspede seja incluída na molécula hospedeira e estabilidade físico-química. O procedimento de Co+Lio foi eficiente em relação aos resultados obtidos, especialmente por aumentar o efeito voltado a conservação físico-química, especialmente pelo uso da temperatura a qual gerou uma complexação de forma contínua, estabilizando as ligações de forma acentuada com o aumento da temperatura. Assim, é possível diagnosticar que todas as metodologias aplicadas foram validas, no quesito inclusão molecular, e sua utilidade dependerá de fatores voltados a custos, e objetivos ligados a inclusões moleculares de outros compostos.

Agora para a segunda etapa deste estudo, foram destacadas as caracterizações sobre inclusão molecular as quais nos serviram de base para o uso da β -CD no aumento da estabilidade da CAT, e metodologia específica. Assim, o melhor rendimento foi baseado na inclusão molecular com uso do sistema SSCO₂, especialmente pela temperatura e pressão em condições supercríticas que auxiliaram a molécula a se hospedar e incluir-se com maior estabilidade físico-química e menor perda de qualidade. O procedimento de ANCO foi um método utilizado criado pelo grupo, obteve-se resultados satisfatórios em relação as demais metodologias, especialmente por ser rápido de realizá-lo. Entretanto, a ANCO e MF foram procedimentos valiosos, porém com menor aproveitamento voltado na inclusão da molécula hospede. A justificativa para essa disparidade ao relacionar as três metodologias provém das ligações entre a molécula hóspede e hospedeira, fazendo com que o complexante se fixe com ligações estáveis e resistentes a temperaturas.

Por fim, o presente trabalho buscou relacionar três formas distintas de procedimentos metodológicos, os quais obtiveram inclusão molecular, diferenciada e sua utilização dependerá de fatores voltados a estrutura, custos e finalidade científica, a qual poderá ser direcionada a indústria alimentícia ou produção de fármacos.

CAPÍTULO VI

5. CONCLUSÃO

Os principais objetivos deste trabalho foram a análise detalhada da obtenção da inclusão molecular nas diferentes metodologias utilizadas, e a escolha da melhor metodologia de inclusão por meio das caracterizações utilizadas, para os complexos MeJa:HP- β -CD e CAT: β -CD. Ao longo desse trabalho, foram encontradas algumas dificuldades, como a demora e os entraves para conseguir a liberação de análises em outros departamentos desta universidade.

No entanto, apesar dessas limitações e dificuldades, foi possível realizar um trabalho consistente com informações relevantes e ainda não disponíveis nos trabalhos referente ao assunto até então publicados, especialmente no tocante da comparação de metodologias.

Conforme apresentado no capítulo 4, a análise entre as metodologias de inclusão dos complexos MeJa:HP- β -CD e CAT: β -CD, mostrou que houve inclusão total em todas as metodologias estudadas. Os resultados de inclusão total são compatíveis com Pessine et al., 1998, no qual $\Delta\delta H_5 \geq \Delta\delta H_3$.

Também ficou evidente na Seção 4.1, que as metodologias Co+Lio e SSCO₂ foram as que apresentaram maior eficiência: de inclusão, térmica e oxidativa. Justificando para trabalhos futuros a utilização destas metodologias para aplicação em fármaco ou alimentos.

Na Seção 4.2, as três metodologias obtiveram excelente complexação comparada com a CAT pura, a metodologia SSCO₂ apresentou maior resistência térmica e oxidativa em relação as demais devido ao seu procedimento de inclusão molecular.

Por fim, destaca-se que os objetivos principais desse trabalho foram concluídos com êxito, pois através da inclusão molecular e das técnicas de caracterização para a comparação das metodologias de inclusão, foi possível identificar as melhores metodologias e condições de temperatura e oxidação para futuras aplicações.

Tal fato reforça as análises e conclusões discutidas na Seção 4.3 deste trabalho, pois sua utilização dependerá de fatores voltados a estrutura, custos e finalidade científica, a qual poderá ser direcionada a indústria alimentícia ou produção de fármacos.

5.1. Sugestões para Trabalhos Futuros

A seguir são apresentadas algumas sugestões que poderão ser estudadas dando continuidade a esse trabalho:

- Aplicar os complexos inclusos em algum alimento ou remédio;
- Avaliar o tempo de prateleira dos produtos que contém os complexos;
- Projetar uma planta piloto para processar os complexos;
- Utilizar o Software de Modelagem Estrutural para simular como as moléculas se encaixam;

CAPÍTULO VII

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIGNER, Z.; BERKESI, O.; FARKAS, G.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. DSC, X-ray and FTIR studies of a gemfibrozil/dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex produced by co-grinding. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 57, p. 62–67, 2012.

ALEZANDRO, M.R. Determinação de isoflavonas e capacidade antioxidante de alimentos industrializados à base de soja e / ou produtos derivados consumidos no Brasil p. 113, 2009.

ALMAGRO, L.; SABATER-JARA, A. B; CALDERÓN, A. A. B. Enhancement of phytosterols , taraxasterol and induction of extracellular pathogenesis-related proteins in cell cultures of *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. v. 169, p. 1050–1058, 2012.

ANWER, M. K.; JAMIL, S. A.; MOHAMMAD J. A.; RAMADAN A.; BAHAA E. G.; MAJID, A. A.; MAGED S. S. F. Water soluble binary and ternary complexes of diosmin with β -cyclodextrin: Spectroscopic characterization, release studies and antioxidant activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 199, p. 35–41, 2014.

ARTS, I. C.; HOLLMAN, P. C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1 Suppl, 2005.

BAI, R.; YANG J.; BASHARI M. Pulmonary responses to printer toner particles in mice after intratracheal instillation. **Toxicology Letters**, v. 199, n. 3, p. 288–300, 2010.

BAI, Y.; YANG J.; BASHARI M. Thermal analysis of β -cyclodextrin/Berberine chloride inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 499, n. 1–2, p. 62–69, 20 maio 2013.

BANCHERO, M.; MANNA, L. The use of lysine to enhance the supercritical complexation of ketoprofen and cyclodextrins. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 67,

p. 76–83, 2012.

BANCHERO, M.; RONCHETTI, S.; MANNA, L. Characterization of ketoprofen / methyl- β - cyclodextrin complexes prepared using supercritical carbon dioxide. v. 2013, 2013.

BELCHI-NAVARRO, S.; PEDREÑO, M. A.; CORCHETE, P. Methyl jasmonate increases silymarin production in *silybum marianum* (L.) Gaernt cell cultures treated with β -cyclodextrins. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 1, p. 179–184, 2011.

BETTINETTI, G. P. et al. Assessment of solid-state interactions of naproxen with amorphous cyclodextrin derivatives by DSC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 4, p. 1173–1179, 2002.

BOONYARATTANAKALIN, K. S.; WOLSCHANN, P.; LAWTRAKUL, L. Molecular dynamics of β -CD in water/co-solvent mixtures. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 70, n. 3-4, p. 279–290, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

CAMPOS, M.; FERNANDES E.; FERREIRA J. et al. Pharmacological and neurochemical evidence for antidepressant-like effects of the herbal product Catuama. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 4, p. 757–764, 2004.

CHADHA, R. et al. Binding constants of inclusion complexes of nitroimidazoles with β -cyclodextrins in the absence and presence of PVP. **Thermochimica Acta**, v. 459, n. 1–2, p. 111–115, 1 jul. 2007.

CHATTOPADHYAY, N. et al. Effect of inclusion of cyclodextrin on excited state proton transfer: Carbazole— γ -cyclodextrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 199–204, maio 1990.

COHEN, S.; FLESCHER, E. Methyl jasmonate: A plant stress hormone as an anti-cancer drug. **Phytochemistry**, v. 70, n. 13-14, p. 1600–1609, 2009.

CORCIOVA, A. et al. Antibacterial and antioxidant properties of hesperidin:β-cyclodextrin complexes obtained by different techniques. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 81, n. 1-2, p. 71–84, 2014.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123–133, 2001.

CRAMER, F.; SAENGER, W.; SPATZ, H.-C. Inclusion compounds. xix. 1a the formation of inclusion compounds of α-cyclodextrin in aqueous solutions. thermodynamics and kinetics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 1, p. 14–20, jan. 1967.

CRUZ, B.; NETO, V. Propriedades estruturais e vibracionais de nanocristais de TiO₂ dispersos em matriz vítrea porosa. Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará. 2006.

DA ROSA, C. G. et al. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β-cyclodextrin and xanthan. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 138–146, 2013.

DANG, H.; LEE H.; YOO H. New jasmonate analogues as potential anti-inflammatory agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 24, p. 10228–10235, 2008.

DATHE, W. et al. Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L.(-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. **Planta**, v. 153, n. 6, p. 530–535, 1981.

DE SOUZA, R. F. V; DE GIOVANI, W. F. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. **Redox Report**, v. 9, n. 2, p. 97–104, 2004.

DEMOLE, E.; LEDERER, E.; MERCIER, D. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin.

Helvetica Chimica Acta, v. 45, n. 2, p. 675–685, 1962.

DIAS, F.; BRANCO J.; CECATO U. Composição química do capim-Mombaça adubado com diferentes fontes de fósforo sob pastejo. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 29, n. 1, 2007.

DIAS, K.; NIKOLAOU, S.; DE GIOVANI, W. F. Synthesis and spectral investigation of Al(III) catechin/ β -cyclodextrin and Al(III) quercetin/ β -cyclodextrin inclusion compounds. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 70, n. 1, p. 154–161, 2008.

DODZIUK, H. Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications. **Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications**, p. 1–489, 2006.

EFRAIM, P.; TUCCI M.; PEZOA-GARCÍA N. Teores de compostos fenólicos de sementes de cacauero de diferentes genótipos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 229–236, 2006.

FAROOQI, A. A.; BUTT, G.; RAZZAQ, Z. Algae extracts and methyl jasmonate anti-cancer activities in prostate cancer: choreographers of “the dance macabre”. **Cancer cell international**, v. 12, n. 1, p. 50, 2012.

FINGRUT, O.; REISCHER D.; ROTEM R. et al. Jasmonates induce nonapoptotic death in high-resistance mutant p53-expressing B-lymphoma cells. **British journal of pharmacology**, v. 146, n. 6, p. 800–808, 2005.

FOLCH-CANO, C. et al. Antioxidant activity of inclusion complexes of tea catechins with β -cyclodextrins by ORAC assays. **Food Research International**, v. 43, n. 8, p. 2039–2044, 2010.

GALVÃO, J. G. et al. β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae.

Thermochimica Acta, v. 608, p. 14–19, 20 maio 2015.

GARNERO, C. et al. Studies on trimethoprim:hydroxypropyl- β -cyclodextrin: aggregate and complex formation. **Carbohydrate research**, v. 345, n. 17, p. 2550–2556, 2010.

GARNERO, C.; AIASSA, V.; LONGHI, M. Sulfamethoxazole:hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex: preparation and characterization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 63, p. 74–79, 2012.

GARNERO, C.; CHATTAH, A. K.; LONGHI, M. Improving furosemide polymorphs properties through supramolecular complexes of β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 95, p. 139–145, 2014.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, M. Characterizing the natural canthaxanthin/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 0, p. 1147–1153, 30 jan. 2014.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 380, n. 2, p. 123–151, 2001.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, n. 2, p. 335–357, 2002.

GRANDELLI, H. E. et al. Melting point depression of Piroxicam in carbon dioxide + co-solvent mixtures and inclusion complex formation with β -cyclodextrin. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 19–25, 2012.

GREATBANKS, D.; PICKFORD, R. Cyclodextrins as chiral complexing agents in water, and their application to optical purity measurements. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 208–215, 1987.

GRIFFITHS, D. J. **Introduction to Quantum Mechanics** Physics Today, 1995.

HE, J. Effects of several inter-molecular interactions on the inclusion between methyl substituted β -cyclodextrin and some linear macromolecule in supercritical carbon dioxide medium. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 73, n. 1-4, p. 237–246, 2012.

HERTOG, M. G. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **Lancet**, v. 342, n. 8878, p. 1007–1011, 1993.

HU, L. et al. Investigation of inclusion complex of cilnidipine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1719–1724, 6 nov. 2012a.

HU, X. et al. Preparation of the beta-cyclodextrin-vitamin C (beta-CD-Vc) inclusion complex under high hydrostatic pressure (HHP). **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 1193–1196, 2012b.

INÁCIO, F. D. et al. Produção de Protease e Lacase por Basidiomicetos. **Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, p. 359–362, 2013.

ISHIGURO, T.; ADACHI, S.; MATSUNO, R. Thermogravimetric analysis of cyclodextrin-fatty acid complex formation and its use for predicting suppressed autoxidation of fatty acids. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 51–54, 1995.

ISHIZU, T.; KINTSU, K.; YAMAMOTO, H. NMR Study of the solution structures of the inclusion complexes of β -cyclodextrin with (+)-Catechin and (–)-Epicatechin. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, p. 8992–8997, 1999.

FERRARO J., NAKAMOTO K., C. B. **Introductory Raman Spectroscopy**, 1994.

JIMÉNEZ, J. et al. Thymus zygis oil: its effects on CI4-induced hepatotoxicity and free radical scavenger activity. **Journal of Essential Oil Research**, 2011.

JULLIAN, C. et al. Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin

with (+)catechin by NMR and molecular modeling. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3217–3224, 2007.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. P. The Emerging Molecular Analysis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, n. 1, p. 299–328, jun. 2002.

KFOURY, M. et al. Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, n. 0, p. 156–164, 15 mar. 2015.

KINNS, M.; SANDERS, J. K. M. Improved frequency selectivity in nuclear Overhauser effect difference spectroscopy. **J.Magn.Reson.**, v. 56, p. 518–520, 1984.

KRIS-ETHERTON, P. M.; KEEN, C. L. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. **Current opinion in lipidology**, v. 13, n. 1, p. 41–49, 2002.

KRISHNASWAMY, K.; ORSAT, V.; THANGAVEL, K. Synthesis and characterization of nano-encapsulated catechin by molecular inclusion with beta-cyclodextrin. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 2, p. 255–264, 2012.

KURECHI, T.; KIKUGAWA, K.; KATO, T. Studies on the antioxidants. XIII. hydrogen donating capability of antioxidants to 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 7, p. 2089–2093, 1980.

LEWANDOWSKI, C. M. et al. Chiral discrimination of sibutramine enantiomers by capillary electrophoresis and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Archives of pharmacal research**, v. 3, n. 3, p. 3932–3940, 2013.

LI, N. et al. Inclusion complex of trimethoprim with β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3-4, p. 824–829, 2005.

LI, N.; XU, L. Thermal analysis of β -cyclodextrin/Berberine chloride inclusion

compounds. **Thermochimica Acta**, v. 499, n. 1–2, p. 166–170, 20 fev. 2010.

LIMA, U. DE A. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2002. Cap. 5. v. 3.

LIN, H.-L. et al. Mechanical grinding effect on thermodynamics and inclusion efficiency of loratadine–cyclodextrin inclusion complex formation. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 512–517, 4 jan. 2012.

LIU, B. et al. Preparation and physicochemical characterization of the supramolecular inclusion complex of naringin dihydrochalcone and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **FRIN**, v. 54, n. 1, p. 691–696, 2013.

LOFTSSON, T.; OLAFSSON, J. H. Cyclodextrins: new drug delivery systems in dermatology. **International Journal of Dermatology**, v. 37, n. 4, p. 241–246, 1998.

LOFTSSON, T. Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 59–79, 1 mar. 1999.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.

MA, S. X. et al. Alpinetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 67-68, p. 193–200, 2012.

MANGOLIM, C. S. et al. Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. **Food Chemistry**, v. 153, p. 361–370, 2014.

MENEZES, P. P. et al. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochimica Acta**, v. 548, p. 45–50, 2012.

MENEZES, P. P. et al. Inclusion complex of (–)-linalool and β -cyclodextrin. **Journal**

of **Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2429–2437, 2014.

MENNINI, N. et al. Physico-chemical characterization in solution and in the solid state of clonazepam complexes with native and chemically-modified cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 89, p. 142–149, 2014.

MILROT, E. et al. Methyl jasmonate reduces the survival of cervical cancer cells and downregulates HPV E6 and E7, and survivin. **Cancer Letters**, v. 319, n. 1, p. 31–38, 2012.

MUELLER, M. J.; BRODSCHELM, W. Quantification of jasmonic acid by capillary gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 425–435, maio 1994.

MURA, P. et al. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of ketoprofen-cyclodextrin binary systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, n. 1, p. 117–128, 1999.

MUTHUKUMARAN, S.; GOPALAKRISHNAN, R. Structural, FTIR and photoluminescence studies of Cu doped ZnO nanopowders by co-precipitation method. **Optical Materials**, v. 34, n. 11, p. 1946–1953, 2012.

NEROME, H. et al. Nanoparticle formation of lycopene/ β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent precipitation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 83, p. 97–103, 2013.

NEUHAUS, D.; WILLIAMSON, M. P. The nuclear overhauser effect in structural and conformational analysis. **Journal of Magnetic Resonance (1969)**, v. 97, n. 1, p. 224, 1992.

NISHIDA, R.; ACREE, T. E.; KUKAMI, H. Optical resolution of methyl jasmonate and methyl epijasmonate. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 769–772, 1985.

NOIR, S. et al. Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode. **Plant physiology**, v. 161, n. 4, p. 1930–51, 2013.

OFER, K.; GOLD, D.; FLESCHER, E. Methyl jasmonate induces cell cycle block and cell death in the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 8-9, p. 959–968, 2008.

PADILHA, A. F. Materiais de engenharia. p. 349, 1997.

PALOMO, J. M. et al. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 447–454, 2005.

PESSINE, F.; CALDERINI, A.; ALEXANDRINO, G. Cyclodextrin Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques. **Researchgate.Net**, v. 1, 1998.

PIETTA, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.

POSNER, G. H.; ASIRVATHAM, E. A short, asymmetric synthesis of natural (-)-methyl jasmonate. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 2589–2591, 1985.

QIU, N. et al. Inclusion complex of barbigerone with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation and in vitro evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 0, p. 623–630, 30 jan. 2014.

REINBOTHE, S. JIPs and RIPs: The regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. **The Plant Cell Online**, v. 6, n. 9, p. 1197–1209, 1 set. 1994.

RIMM, E. B. Fruit and vegetables-building a solid foundation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 1, p. 1–2, 2002.

ROBERT-SEILANIANZ, A.; GRANT, M.; JONES, J. D. G. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 317–343, 2011.

SANTOS, K. A. et al. Extraction of crambe seed oil using subcritical propane: Kinetics, characterization and modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 104, n. June, p. 54–61, 2015.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1 Suppl, 2005.

SCHRADER, B. **Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications**. Edited by Bernhard Schrader. p. 765. 1994.

SEMBDNER, G.; PARTHIER, B. The Biochemistry and the Physiological and Molecular Actions of Jasmonates. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, n. 1, p. 569–589, 1993.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J. P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67–103, 1992.

SHIMADA, K. et al. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal Agric. Food Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 945–948, 1992.

SHU, C. et al. Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized *Candida rugosa* lipase on cotton cloth. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 139–144, 2011.

SIDDHANTA, S.; NARAYANA, C. Surface Enhanced raman spectroscopy of proteins : implications for drug designing. **Nanomaterials and Nanotechnology**, v. 2, p. 1–13, 2012.

SIIMER, E.; KÖBU, M.; KURVITS, M. Thermochemical study of cyclodextrin

inclusion complexes. **Thermochimica Acta**, v. 170, p. 89–95, 12 nov. 1990.

STAVRIC, B. Role of chemopreventers in human diet. **Clinical Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 319–332, 1994.

STRAŽIŠAR, M.; ANDRENŠEK, S.; ŠMIDOVNIK, A. Effect of β -cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 636–642, 2008.

STUART H. **Wiley: Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications - Barbara H. Stuart**. 1956.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2045–2076, jul. 1998.

UMUKORO, S.; OLUGBEMIDE, A. S. Antinociceptive effects of methyl jasmonate in experimental animals. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, n. 3-4, p. 466–470, 2011.

VAJNA, B. et al. Characterization of drug-cyclodextrin formulations using Raman mapping and multivariate curve resolution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 1, p. 38–44, 2011.

VALENTINI, S. R. et al. Insulin complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: Spectroscopic evaluation of molecular inclusion and use of the complex in gel for healing of pressure ulcers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1-2, p. 229–239, 2015.

VIEIRA, A. C. C. et al. Multicomponent systems with cyclodextrins and hydrophilic polymers for the delivery of Efavirenz. **Carbohydrate Polymers**, n. 20, 2015.

WANG, J. et al. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1680–1685, 2011a.

WANG, J. et al. Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and

hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1069–1075, 2011b.

WANG, S. Y.; BOWMAN, L.; DING, M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries *Rubus sp.* and promotes antiproliferation of human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1261–1269, 2008.

WANG, Y. et al. Methyl jasmonate sensitizes human bladder cancer cells to gambogic acid-induced apoptosis through down-regulation of EZH2 expression by miR-101. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 3, p. 618–635, 2014.

WANG, Y.; CARUSO, F. Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 5, p. 953–961, 2005.

WANG, Z. et al. Complexation of hydrophobic drugs with hydroxypropyl- β -cyclodextrin by lyophilization using a tertiary butyl alcohol system. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 57, n. 1-4, p. 349–354. 2007.

WASTERNAK, C. Action of jasmonates in plant stress responses and development - Applied aspects. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 31–39, 2014.

WASTERNAK, C.; HAUSE, B. Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. **Annals of Botany**, v. 111, n. 6, p. 1021–1058, 2013.

WEILER, E. W. et al. Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendril coiling response of *Bryonia dioica*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 3, p. 591–600, fev. 1993.

WEISBURGER, J. H.; WILLIAMS, G. M. The distinction between genotoxic and epigenetic carcinogens and implication for cancer risk. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 57, n. 1, p. 4–5, 2000.

WEISSIG, V. et al. A new hydrophobic anchor for the attachment of proteins to liposomal membranes. **FEBS Letters**, v. 202, n. 1, p. 86–90, 1986.

WILBERT, S. M.; ERICSSON, L. H.; GORDON, M. P. Quantification of jasmonic acid, methyl jasmonate, and salicylic acid in plants by capillary liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 257, n. 2, p. 186–194, 15 mar. 1998.

XU, P.; SONG, L. X.; WANG, H. M. Study on thermal decomposition behavior of survived β -cyclodextrin in its inclusion complex of clove oil by nonisothermal thermogravimetry and gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry analyses. **Thermochimica Acta**, v. 469, n. 1–2, p. 36–42. 2008.

YANG, C. S.; WANG, Z. Y. Tea and Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 13, p. 1038–1049, 1993.

YANG, L. J. et al. Host-guest system of taxifolin and native cyclodextrin or its derivative: Preparation, characterization, inclusion mode, and solubilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 629–637, 2011.

YANG, L. J. et al. Preparation and characterization of inclusion complexes of naringenin with β -cyclodextrin or its derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 861–869, 2013.

YAO, Y. et al. Development of a myricetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: Preparation, characterization, and evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, n. 0, p. 329–337. 2014.

YILMAZ, V. T.; KARADAĞ, A.; İÇBUDAK, H. Thermal decomposition of β -cyclodextrin inclusion complexes of ferrocene and their derivatives. **Thermochimica Acta**, v. 261, p. 107–118, 1995.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to

production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 4, p. 283–333, jun. 2005.

ZHENG, L. et al. Methyl jasmonate abolishes the migration, invasion and angiogenesis of gastric cancer cells through down-regulation of matrix metalloproteinase 14. **BMC cancer**, v. 13, p. 74, 2013.

ZINGONE, G.; RUBESSA, F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin- β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 291, n. 1-2, p. 3–10, 2005.