

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CAMPUS GOVERNADOR VALADARES
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR

Tiago Marcel Oliveira

COMPOSIÇÕES NANOESTRUTURADAS DE CLORETO DE
BENZALCÔNIO COM β -CICLODEXTRINA e HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO COM *Staphylococcus aureus*.

Governador Valadares

2026

Tiago Marcel Oliveira

**COMPOSIÇÕES NANOESTRUTURADAS DE CLORETO DE
BENZALCÔNIO COM β -CICLODEXTRINA e HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO COM *Staphylococcus aureus*.**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora – *campus* Governador Valadares, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai

Governador Valadares

2026

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Tiago Marcel .

Composições nanoestruturadas de cloreto de benzalcônio com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e avaliação da interação com *Staphylococcus aureus* / Tiago Marcel Oliveira. -- 2026.
131 p.

Orientador: Ângelo Márcio Leite Denadai

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2026.

1. Cloreto de benzalcônio. 2. β -ciclodextrina. 3. Hidroxipropil- β -ciclodextrina. 4. Sistema de liberação controlada de fármaco. 5. *Staphylococcus aureus*. I. Denadai, Ângelo Márcio Leite, orient. II. Título.

Tiago Marcel Oliveira

Composições nanoestruturadas de cloreto de benzalcônio com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e avaliação da interação com staphylococcus aureus

Tese apresentada Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor(a) em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Aprovado em 03 de agosto de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Karen Luise Lang

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Pedro Pôssa de Castro

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Alessandro Sobreira Galdino

Universidade Federal de São João Del-Rei

Tiago Antônio da Silva Brandão

Universidade Federal de Minas Gerais

Juiz de Fora, 10/06/2026.



Documento assinado eletronicamente por **Ângelo Márcio Leite Denadai, Professor(a)**, em 04/08/2026, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Pôssa de Castro, Professor(a)**, em 04/08/2026, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karen Luise Lang, Professor(a)**, em 05/08/2026, às 14:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandro Sobreira Galdino, Usuário Externo**, em 06/08/2026, às 12:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Antônio da Silva Brandão, Usuário Externo**, em 06/08/2026, às 14:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-UFJF (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **3022594** e o código CRC **F1AAEB88**.

Dedico este trabalho a Deus, à minha mãe Natália, à minha esposa Barbara Bueno Patry Oliveira, ao meu filho Luís Alberto e a todos aqueles que contribuíram para que esse trabalho fosse possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado condição de existência e capacidade intelectual para chegar até aqui.

À minha mãe, Raimunda Natalício de Oliveira, que sempre me estimulou desde o início de tudo, incentivando-me a solucionar minhas primeiras curiosidades, além, é claro, da labuta cotidiana para garantir meus estudos iniciais.

À minha esposa, Barbara Bueno Patry Oliveira, que com carinho e parceria sempre me incentivou a evoluir, dando força durante todo o doutorado, inclusive nos momentos mais difíceis.

Ao meu filho Luís Alberto Bueno Oliveira, que, após seu nascimento prematuro (próximo à minha qualificação), me fez ver o mundo de uma outra ótica e com mais amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai, que me incentivou desde o processo de seleção até o final do doutorado, cujo apoio foi fundamental para desenvolver todo o trabalho. Além da amizade, fica a gratidão pela oportunidade.

À colega de Doutorado, Dra. Katia Maria de Oliveira Almeida, colaboradora na realização dos testes microbiológicos, que de forma espontânea e voluntária sempre foi solícita para contribuir com os seus conhecimentos, enriquecendo este trabalho.

Ao Prof. Dr. Jeferson Gomes da Silva, pela colaboração na execução de experimentos e por estar sempre disposto a contribuir com seus conhecimentos, em todas as vezes que precisei. Além de professor de disciplinas, tornou-se um grande amigo e profissional que levo para a vida.

Ao Prof. Dr. Cleber Paulo Andrada Anconi, da UFLA, por suas contribuições durante a realização do estudo.

Ao Prof. Dr. Luís Claudio Nascimento da Silva, da UNICEUMA, por suas contribuições durante a realização do estudo.

Ao Lucas dos Santos Silva, aluno de doutorado da UNICEUMA, pelos bate-papos e auxílios sobre resultados microbiológicos, debates sobre fontes da literatura científica e publicações conjuntas em congressos.

Ao Prof. Dr. Maurício, que durante suas disciplinas sempre foi incentivador do meu trabalho de pesquisa.

Aos colegas doutorandos que, por um longo período, mantiveram a parceria e a cumplicidade.

À UFJF de Governador Valadares, que, devido à existência do programa em uma cidade próxima à minha residência, possibilitou a realização de um sonho de um trabalhador e pai de família.

De uma forma carinhosa, agradeço a todos que, em algum momento, me ajudaram nessa trajetória. Deixo meu muito obrigado!

“O objetivo da ciência não é abrir a porta para a sabedoria infinita, mas estabelecer um limite para o erro infinito” (Bertolt Brecht).

RESUMO

O Cloreto de Benzalcônio (CBZ) é um composto pertencente à classe dos sais de amônio quaternário, amplamente utilizado como agente antimicrobiano, desinfetante e conservante em formulações farmacêuticas, cosméticas e hospitalares. Apesar de sua elevada atividade microbiológica, limitações relacionadas à toxicidade, à estabilidade e ao potencial desenvolvimento de resistência bacteriana estimulam a busca por estratégias capazes de otimizar seu desempenho terapêutico. Nesse contexto, a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas representa uma abordagem promissora para modificar propriedades físico-químicas e biológicas desse composto. Esta tese teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar complexos de inclusão entre o cloreto de benzalcônio e as ciclodextrinas β -ciclodextrina (β CD) e Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), investigando suas propriedades estruturais, termodinâmicas, coloidais, computacionais e microbiológicas, bem como seu potencial para aplicações antimicrobianas. Os complexos foram preparados por complexação seguida de liofilização e caracterizados por espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Análises Termogravimétrica e Térmica Diferencial (TGA/DTA), Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) e experimentos bidimensionais ^1H - ^1H NOESY, Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC), espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta, Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIS) e modelagem molecular. Adicionalmente, foram realizados ensaios microbiológicos para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), avaliação da erradicação de biofilmes pré-formados e estudos da interação dos sistemas com membranas bacterianas de *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos evidenciaram a formação dos complexos de inclusão, confirmada pelas alterações espectroscópicas, térmicas, estruturais e termodinâmicas observadas nas diferentes técnicas empregadas. As análises calorimétricas demonstraram que a complexação ocorreu de forma espontânea e foi predominantemente dirigida por contribuição entrópica, enquanto os estudos computacionais permitiram elucidar os principais modos de encapsulamento molecular. A caracterização coloidal revelou a formação de nanoagregados supramoleculares estáveis em solução aquosa. Nos ensaios biológicos, os sistemas complexados apresentaram atividade antimicrobiana frente às linhagens de *Staphylococcus aureus*, além de potencial para reduzir biofilmes bacterianos e modificar a interação do cloreto de benzalcônio com a membrana celular. Em conjunto, os resultados demonstram que a complexação do cloreto de benzalcônio com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina constitui uma estratégia promissora para o

desenvolvimento de sistemas nanoestruturados com potencial aplicação no controle de infecções bacterianas e no aprimoramento de formulações antimicrobianas.

Palavras-chave: cloreto de benzalcônio; β -ciclodextrina; hidroxipropil- β -ciclodextrina; complexos de inclusão; sistemas nanoestruturados; atividade antimicrobiana; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Benzalkonium chloride (BAC) is a quaternary ammonium compound widely used as an antimicrobial agent, disinfectant, and preservative in pharmaceutical, cosmetic, and hospital formulations. Despite its well-established antimicrobial activity, limitations associated with toxicity, stability, and the potential development of bacterial resistance have encouraged the search for strategies to improve its therapeutic performance. In this context, the formation of inclusion complexes with cyclodextrins has emerged as a promising approach to modify the physicochemical and biological properties of this compound. The present study aimed to develop, characterize, and evaluate inclusion complexes formed between benzalkonium chloride and β -cyclodextrin (β CD) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD), investigating their structural, thermodynamic, colloidal, computational, and microbiological properties, as well as their potential antimicrobial applications. The inclusion complexes were prepared by complexation followed by lyophilization and characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric and differential thermal analyses (TGA/DTA), proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR), two-dimensional NOESY experiments, isothermal titration calorimetry (ITC), dynamic light scattering (DLS), zeta potential, electrical impedance spectroscopy (EIS), and molecular modeling. In addition, microbiological assays were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), evaluate the eradication of preformed biofilms, and investigate the interaction of the systems with *Staphylococcus aureus* bacterial membranes. The results provided consistent evidence for the formation of inclusion complexes, as confirmed by the spectroscopic, thermal, structural, and thermodynamic changes observed using the different analytical techniques. Calorimetric analyses demonstrated that complex formation occurred spontaneously and was predominantly entropy-driven, while molecular modeling confirmed the stability of the complexes and elucidated the main molecular encapsulation mechanisms. Colloidal characterization revealed the formation of stable supramolecular nanoaggregates in aqueous solution. In the biological assays, the complexed systems exhibited antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, as well as the potential to reduce bacterial biofilms and modify the interaction between benzalkonium chloride and the bacterial cell membrane. Overall, the findings demonstrate that the complexation of benzalkonium chloride with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin represents a promising strategy for the development of nanostructured systems

with potential applications in the control of bacterial infections and the improvement of antimicrobial formulations.

Keywords: benzalkonium chloride; β -cyclodextrin; hydroxypropyl- β -cyclodextrin; inclusion complexes; nanostructured systems; antimicrobial activity; *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática dos perfis farmacocinéticos de sistemas de liberação imediata (IR), sustentada (SR), controlada (CR) e pulsátil (PR), evidenciando as diferenças na concentração plasmática ao longo do tempo.....	25
Figura 2 - Íon benzalcônio ($C_{21}H_{38}N^+$): (A) conformação no vácuo e (B) conformação em meio aquoso.....	30
Figura 3 - Fluxograma de desenvolvimento da pesquisa	37
Figura 4 - Espectrometro de Infravermelho da Perkin Elmer, modelo Spectrum Two TM , com transformada de Fourier.....	39
Figura 5 - Módulo termogravimétrico TGA/DTA STA 7200RV da Hitachi.....	40
Figura 6 – Representação do Microcalorímetro VP-ITC da Microcal	43
Figura 7 - ZetaSizer Nano ZS90.....	45
Figura 8 - Isômeros de HP β CD investigados neste estudo. As unidades de glicose com as substituições O2 ou O6 foram indicadas em azul.....	46
Figura 9 - Representação esquemática. Placa de microdiluição de concentração inibitória mínima e de dose letal mediana de CBZ puro e das formas complexadas.....	51
Figura 10 – Zetasizer Nano ZS90 da Malvern.	53
Figura 11 - Espectros na região do infravermelho do CBZ, β CD, CBZ/ β CD e MM, em pastilhas de KBr.	55
Figura 12 - Espectros na região do infravermelho do CBZ, HP β CD, CBZ/HP β CD e MM, em pastilhas de KBr.	55
Figura 13 - Curva termogravimétrica (a) e Curva térmica diferencial (b) do CBZ, β CD, CBZ/ β CD e MM.....	58
Figura 14 - Curva termogravimétrica (a) e Curva térmica diferencial (b) do CBZ, HP β CD, CBZ/HP β CD e MM	61
Figura 15 - Comparação dos espectros de RMN de 1H do cloreto de benzalcônio, das ciclodextrinas e dos respectivos complexos de inclusão: (a) sistema CBZ/ β CD; (b) sistema CBZ/HP β CD.....	64
Figura 16 - (a) experimentos bidimensionais NOESY CBZ/ β CD, (b) experimentos bidimensionais NOESY CBZ/HP β CD	69
Figura 17 – Variação do diâmetro hidrodinâmico de soluções de CBZ 1mM em função da concentração de β CD (a) e de HP β CD (b), com ângulo de espalhamento a 90° à 25 °C.	72

Figura 18 - (a) Variação do potencial zeta da solução de CBZ a 1 mM em função das concentrações de β CD e (b) do potencial zeta da solução de CBZ a 1 mM em função das concentrações de HP β CD, com ângulo de espalhamento de 173°, a 25 °C	74
Figura 19 - (a) Variação da condutividade elétrica da solução de CBZ a 1 mM em função das concentrações de β CD (b) da condutividade elétrica da solução de CBZ a 1 mM em função das concentrações de HP β CD, com ângulo de espalhamento de 173°, a 25 °C ...	75
Figura 20 - (a) Titulação da β CD 15,0 mM em água pura e em solução de CBZ 1,0 mM e (b) curva de titulação final após a subtração do branco	80
Figura 21 - (a) Titulação da HP β CD 30,0 mM em água pura e em solução de CBZ 1,0 mM e (b) curva de titulação final após a subtração do branco	83
Figura 22 - Espectros de ($[Z^*]$) e ($[Y]$) em função da frequência com a variação da razão molar $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$	86
Figura 23 - dados da parte $\text{Re}[Z^*]$ e $\text{Im}[Z^*]$ da impedância em função da frequência com a variação da razão molar de $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$	87
Figura 24 - Gráfico do limite tangencial parte $\text{Re}[Z^*]$ e $\text{Im}[Z^*]$ da frequência em função da razão molar de $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$	89
Figura 25 - Representação do diagrama de Nyquist em função da frequência com a variação da razão molar de $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$	90
Figura 26 - espectros de ($[Z^*]$) e ($[Y^*]$) em função da frequência com a variação da razão molar $[\text{HP}\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$	91
Figura 27 - dados da parte $\text{Re}[Z^*]$ e $\text{Im}[Z^*]$ da impedância em função da frequência com a variação da razão molar de $[\text{HP}\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$	92
Figura 28 - Gráfico do limite tangencial parte $\text{Re}[Z^*]$ e $\text{Im}[Z^*]$ da frequência em função da razão molar de $[\text{HP}\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$	94
Figura 29 - Representação do diagrama de Nyquist em função da frequência com a variação da razão molar de $[\text{HP}\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$	95
Figura 30 Arranjo espacial do sistema mais estável (A na Tabela 9) para o composto de inclusão $\text{BZ}^+@ \beta\text{CD}$. Os sistemas mais representativos obtidos a partir do estudo de 26.208 sistemas iniciais (7 x 3.744) no nível de teoria GFN2-xTB (ALPB) são representados.	100
Figura 31 - Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração inibitória mediana, contra linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, do CBZ (curva vermelha) e dos sistemas: CBZ/ β CD (curva lilás), CBZ/HP β CD (curva verde)	102

Figura 32 - Determinação da concentração inibitória mínima e concentração inibitória mediana, contra a cepa clínica <i>Staphylococcus aureus</i> 170, do CBZ (curva vermelha) e dos sistemas: CBZ/ β CD (curva lilás), CBZ/HP β CD (curva verde)	102
Figura 33 - Determinação da concentração inibitória mínima e concentração inibitória mediana, contra a cepa clínica <i>Staphylococcus aureus</i> 15, do CBZ (curva vermelha) e dos sistemas: CBZ/ β CD (curva lilás), CBZ/HP β CD (curva verde)	103
Figura 34 - Determinação da concentração inibitória mínima e concentração inibitória mediana, contra a cepa clínica <i>Staphylococcus aureus</i> 1369061, do CBZ (curva vermelha) e dos sistemas: CBZ/ β CD (curva lilás), CBZ/HP β CD (curva verde)	103
Figura 35 - Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração inibitória mediana, contra a cepa clínica <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538, do CBZ (curva vermelha) e dos sistemas: CBZ/ β CD (curva lilás), CBZ/HP β CD (curva verde)	104
Figura 36 - Atividade dos sistemas CBZ, CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD sobre biofilme pré-formado de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538. A) Biomassa residual do biofilme após tratamento na concentração correspondente a $1 \times$ a concentração inibitória mínima (CIM); B) biomassa residual do biofilme após tratamento na concentração correspondente a $2 \times$ CIM; C) biomassa residual do biofilme após tratamento na concentração correspondente a $4 \times$ CIM. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,0001$	108
Figura 37 - a) Medidas de diâmetros hidrodinâmicos (D_h) em função do [CBZ]/CFU dos compostos CBZ, β CD, HP β CD, CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD, b) Medidas de potencial zeta (ZP) em função do [CBZ]/CFU dos compostos CBZ, β CD, HP β CD, CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Entrada UD-APARM adotada no presente trabalho para sistemas supramoleculares 1:1 construídos com Benzalcônio (CBZ), 2HP β CD (isômeros 00, 01 e 02) e β CD natural. Este conjunto de parâmetros definiu 3.744 sistemas supramoleculares iniciais.	47
Tabela 2 - Principais eventos térmicos atribuídos ao CBZ, β CD, CBZ/ β CD e MM	60
Tabela 3 - Principais eventos térmicos atribuídos ao CBZ, HP β CD, CBZ/HP β CD e MM.....	62
Tabela 4 - Deslocamentos químicos (δ) e variações de deslocamento químico ($\Delta\delta$) dos prótons do cloreto de benzalcônio na ausência e na presença de β -ciclodextrina.....	65
Tabela 5 - Deslocamentos químicos (δ) e variações de deslocamento químico ($\Delta\delta$) dos prótons do cloreto de benzalcônio na ausência e na presença de hidroxipropil- β -ciclodextrina. .	66
Tabela 6 – Parâmetros termodinâmicos da interação de β CD 15,0 mM titulado em CBZ 1,0 mM	80
Tabela 7 – Parâmetros termodinâmicos da interação de HP β CD 30,0 mM titulado em CBZ 1,0 mM	83
Tabela 8 - Constantes de ligação ITC e dados da abordagem multi-equilíbrio quântico GFN2-xTB. Um total de 26.208 sistemas iniciais (7×3.744) foram investigados através do método GFN2-xTB.....	97
Tabela 9 - Energias livres de associação em água ($\Delta_w G$), de solvatação ($\Delta_{solv} G$) energias de interação determinados computacionalmente ($\Delta_c G^o$, $\Delta_c H^o$ e $T\Delta_c S^o$), contribuições correspondentes e os parâmetros geométricos de associação obtidos a partir do APARM (r , α , β e γ). Dados para os sistemas empregados para calcular o log K teórico, a $T = 298$ K, após o estudo de 3.744 sistemas iniciais no nível de teoria GFN2-xTB (ALPB).	97
Tabela 10 - Energias livres de associação em água ($\Delta_w G$), de solvatação ($\Delta_{solv} G$) energias de interação determinados computacionalmente ($\Delta_c G^o$, $\Delta_c H^o$ e $T\Delta_c S^o$), contribuições correspondentes e os parâmetros geométricos de associação obtidos a partir do APARM (r , α , β e γ). Dados para os sistemas empregados para calcular o log K teórico, a $T = 298$ K, após o estudo de 11.232 sistemas iniciais, 3.744 para cada isômero de HP β CD (2) no nível de teoria GFN2-xTB (ALPB).	98
Tabela 11 - Energias livres de associação em água ($\Delta_w G$), de solvatação ($\Delta_{solv} G$) energias de interação determinados computacionalmente ($\Delta_c G^o$, $\Delta_c H^o$ e $T\Delta_c S^o$) e os parâmetros geométricos de associação obtidos a partir do APARM (r , α , β e γ). Dados para os sistemas empregados para calcular o log K teórico, a $T = 298$ K, após o estudo de 11.232	

sistemas iniciais (3.744 para cada isômero de HP β CD (6)) no nível de teoria GFN2-xTB (ALPB).	99
Tabela 12 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do CBZ puro e complexado contra as quatro linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923, 170, 15 e 1369061).	104
Tabela 13 - Determinação da concentração inibitória mediana (IC ₅₀) do CBZ puro e complexado contra as quatro linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923, 170, 15 e 1369061) empregando a equação 6 de 4PL.	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
ACS	American Chemical Society
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BAC	Cloreto de Benzalcônio (<i>Benzalkonium Chloride</i>)
β CD	β -ciclodextrina
CBZ	Cloreto de Benzalcônio
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPC	Cloreto de Cetilpiridínio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DOI	Digital Object Identifier
DRT	Distribuição dos Tempos de Relaxação (<i>Distribution of Relaxation Times</i>)
EC ₅₀	Concentração Efetiva Média
EIS	Espectroscopia de Impedância Elétrica (<i>Electrical Impedance Spectroscopy</i>)
GFN2-xTB	Geometries, Frequencies and Noncovalent interactions-Extended TightBinding
HP β CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MBC	Concentração Bactericida Mínima (<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>)
MIC	Concentração Inibitória Mínima (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
NMR	Ressonância Magnética Nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	Protein Data Bank
PDI	Índice de Polidispersidade (<i>Polydispersity Index</i>)
QELS	Espectroscopia Quase Elástica da Luz (<i>Quasi-Elastic Light Scattering</i>)
QC	Química Quântica (<i>Quantum Chemistry</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Desvio Quadrático Médio (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
RSC	Royal Society of Chemistry
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	<i>Grau Celsius</i>
ΔG	<i>Energia livre de Gibbs</i>
ΔH	<i>Variação de entalpia</i>
ΔS	<i>Variação de entropia</i>
ε	<i>Constante dielétrica</i>
η	<i>Viscosidade</i>
K	<i>Constante de associação</i>
K_d	<i>Constante de dissociação</i>
kHz	<i>Quilohertz</i>
L	<i>Litro</i>
mL	<i>Mililitro</i>
μL	<i>Microlitro</i>
mg	<i>Miligrama</i>
MHz	<i>Megahertz</i>
mmol	<i>Milimol</i>
mmol L^{-1}	<i>Milimol por litro</i>
mol L^{-1}	<i>Mol por litro</i>
n	<i>Número de sítios de ligação</i>
nm	<i>Nanômetro</i>
Ω	<i>Ohm</i>
p	<i>Nível de significância estatística</i>
pH	<i>Potencial hidrogeniônico</i>
R	<i>Constante universal dos gases</i>
R^2	<i>Coeficiente de determinação</i>
$\text{Re}(Z)$	<i>Parte real da impedância</i>
$\text{Im}(Z)$	<i>Parte imaginária da impedância</i>
rpm	<i>Rotações por minuto</i>
T	<i>Temperatura absoluta</i>
Z	<i>Impedância elétrica</i>
$ Z $	<i>Módulo da impedância</i>
Y	<i>Admitância elétrica</i>
$ Y $	<i>Módulo da admitância</i>
β	<i>Beta</i>
γ	<i>Gama</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	Sistemas de Liberação Controlada	24
2.2	Ciclodextrinas	27
2.3	Cloreto de benzalcônio	30
2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos Específicos	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Materiais E Reagentes Utilizados	36
4.2	Delineamento Experimental	36
	4.2.1 Preparo do Complexo de Inclusão e Mistura Mecânica	38
4.3	Caracterização Estrutural	38
	4.3.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	38
	4.3.2 Análise Térmica: termogravimetria (TGA), análise térmica diferencial (DTA)	39
	4.3.3 Ressonância Magnética Nuclear	40
4.4	Caracterização Termodinâmica	41
	4.4.1 Titulações calorimétricas isotérmicas (ITC)	41
4.5	Caracterização Coloidal	43
	4.5.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	43
	4.5.2 Determinação do Potencial Zeta (ZP)	44
	4.5.3 Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIS)	45
4.6	Estudo Computacional	45
	4.6.1 Construção das Estruturas Moleculares	46
	4.6.2 Construção dos Sistemas Supramoleculares	47
	4.6.3 Otimização Geométrica	47
	4.6.4 Avaliação Termodinâmica	48
4.7	Estudo de Interações dos Compostos com Microrganismos	48
	4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Inibitória Mediana (IC50)	49
	4.7.2 Determinação da Avaliação da erradicação de biofilme pré-formado	51
	4.7.3 Avaliação da interação fármaco-membrana	52
5	Resultados e Discussão	54
5.1	Caracterizações Dos Complexos	54
	5.1.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	54

5.1.2	<i>Análise térmica: termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA)</i>	57
5.1.3	<i>Caracterização estrutural dos complexos de inclusão CBZ/βCD e CBZ/HPβCD por RMN de ^1H e NOESY</i>	63
5.1.4	<i>Caracterização coloidal dos sistemas CBZ/βCD e CBZ/HPβCD</i>	70
5.1.5	<i>Titulações por calorimetria de titulação isotérmica</i>	78
5.1.6	<i>Caracterização por Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIS) dos Sistemas CBZ/βCD e CBZ/HPβCD</i>	85
5.2	Estudo Teórico Computacional	96
5.3	Ensaio Biológico	100
5.3.1	<i>Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração inibitória mediana</i>	100
5.3.2	<i>Avaliação da erradicação de biofilme pré-formado</i>	107
5.3.3	<i>Avaliação da interação fármaco-membrana</i>	110
6	CONCLUSÃO	116
	REFERÊNCIAS	119

1 INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos constitui um dos maiores desafios da saúde pública mundial no século XXI. O aumento contínuo da incidência de bactérias multirresistentes compromete significativamente a eficácia dos tratamentos disponíveis, elevando os índices de morbidade, mortalidade e custos relacionados à assistência em saúde. A disseminação desses microrganismos ocorre tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade, sendo favorecida pelo uso inadequado de agentes antimicrobianos, pela elevada capacidade adaptativa das bactérias e pela intensa circulação de genes de resistência entre diferentes espécies microbianas. Nesse cenário, hospitais e demais serviços de saúde representam ambientes críticos para a seleção e propagação desses patógenos, tornando a resistência bacteriana uma preocupação permanente para pesquisadores, profissionais da saúde e órgãos reguladores (Gontijo Filho *et al.*, 2016; Maamar *et al.*, 2019).

Entre os fatores que contribuem para o agravamento desse problema, destaca-se o uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana, medicina veterinária e produção agropecuária. A utilização inadequada desses medicamentos favorece processos de seleção natural que culminam no surgimento de cepas progressivamente mais resistentes, reduzindo as opções terapêuticas disponíveis e comprometendo o tratamento de infecções anteriormente consideradas facilmente controláveis. Em decorrência desse cenário, organismos internacionais têm alertado para o risco da denominada era "pós-antibiótico", caracterizada pela possibilidade de infecções comuns voltarem a representar importantes causas de mortalidade devido à perda da eficácia dos antimicrobianos atualmente disponíveis (Pincus *et al.*, 2015; Switzerland, 2014).

Diante dessa realidade, a comunidade científica tem direcionado esforços para o desenvolvimento de novas estratégias capazes de aumentar a eficácia terapêutica dos antimicrobianos existentes e, simultaneamente, reduzir o surgimento de resistência bacteriana. Além da descoberta de novos agentes antimicrobianos, destaca-se o aprimoramento das formas farmacêuticas, visando otimizar a biodisponibilidade, prolongar o tempo de ação, reduzir a frequência de administração e minimizar efeitos adversos associados ao tratamento. Essas estratégias contribuem para melhorar a adesão do paciente à terapia e manter concentrações plasmáticas adequadas por períodos prolongados, reduzindo oscilações terapêuticas que favorecem a seleção de microrganismos resistentes.

Nesse contexto, os Sistemas de Liberação Controlada (SLCs) representam uma das principais inovações da tecnologia farmacêutica moderna. Esses sistemas consistem em

plataformas desenvolvidas para controlar espacial e temporalmente a liberação do princípio ativo, promovendo maior eficiência terapêutica quando comparados às formulações convencionais. Entre suas principais vantagens destacam-se a melhoria da estabilidade química do fármaco, o aumento da biodisponibilidade, a redução da toxicidade sistêmica, a diminuição da frequência de administração e o direcionamento mais eficiente aos tecidos-alvo (Sousa, 2020; Tibbitt; Langdon, 2016).

A evolução dos SLCs teve início na década de 1950 com o desenvolvimento da formulação comercial Spanule®, considerada um marco na farmacotécnica por possibilitar a liberação prolongada da dextroanfetamina durante aproximadamente doze horas. Desde então, sucessivos avanços tecnológicos impulsionaram o desenvolvimento de diferentes plataformas de administração de fármacos, incluindo sistemas orais, transdérmicos, injetáveis e implantáveis, ampliando significativamente as possibilidades terapêuticas (Park; Otte; Park, 2022).

O avanço da nanotecnologia promoveu uma profunda transformação na área de liberação controlada de fármacos. Inicialmente, sistemas microparticulados apresentavam limitações relacionadas à célere eliminação pelo sistema fagocitário mononuclear, reduzindo o tempo de permanência na circulação sistêmica. A redução do tamanho das partículas para a escala nanométrica, associada à modificação superficial com polímeros biocompatíveis, como o poli(etilenoglicol), possibilitou o desenvolvimento de nanocarreadores com maior estabilidade, maior tempo de circulação sanguínea e maior capacidade de direcionamento terapêutico. Esses avanços consolidaram a nanomedicina como uma importante ferramenta para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras (Hrkach; Langer, 2020).

Nas últimas décadas, a evolução dos nanocarreadores expandiu-se consideravelmente, incorporando sistemas multifuncionais capazes de responder a estímulos físicos, químicos e biológicos específicos do microambiente de interesse terapêutico. Atualmente, plataformas avançadas baseadas em nanopartículas poliméricas, lipossomas, micelas, dendrímeros, hidrogéis e sistemas supramoleculares vêm sendo amplamente investigadas para promover maior especificidade de liberação, reduzir efeitos adversos e potencializar a eficácia clínica de diferentes fármacos. Paralelamente, derivados de ciclodextrinas têm recebido crescente atenção devido à elevada capacidade de formar complexos de inclusão, aumentando significativamente a solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade e direcionamento terapêutico de compostos bioativos (Ji *et al.*, 2024; Kali; Haddadzadegan; Bernkop-Schnurch, 2024; Topuz; Uyar, 2024).

A escolha da matriz empregada em um Sistema de Liberação Controlada depende de diferentes fatores, incluindo custo de produção, perfil de liberação desejado, propriedades físico-químicas do fármaco, estabilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e interação com os tecidos biológicos. Dessa forma, torna-se fundamental selecionar materiais capazes de incorporar eficientemente o princípio ativo, protegê-lo contra processos de degradação e promover sua liberação de forma controlada no sítio terapêutico (Rissi *et al.*, 2014).

Entre as diversas matrizes empregadas para encapsulamento molecular, destacam-se as ciclodextrinas (CDs), oligossacarídeos cíclicos obtidos pela conversão enzimática do amido. As CDs apresentam cavidade interna hidrofóbica e superfície externa hidrofílica, característica que permite a formação espontânea de complexos de inclusão com diferentes moléculas bioativas. As formas naturais de maior interesse tecnológico correspondem à α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina, constituídas respectivamente por seis, sete e oito unidades de glicopirranose. Essas estruturas apresentam elevada estabilidade química, baixa toxicidade e ampla aplicabilidade farmacêutica, sendo utilizadas para melhorar propriedades como solubilidade, estabilidade físico-química, permeabilidade e biodisponibilidade de diversos fármacos (Santos; Silva, 2022; Irie; Uekama, 1997; Uekama; Hirayama; Irie, 1998).

Surfactantes são moléculas anfífilas constituídas por uma região hidrofílica e outra hidrofóbica. Essa característica estrutural favorece interações intermoleculares com diferentes ambientes, possibilitando modificações importantes em suas propriedades físico-químicas e farmacológicas. Dentre os surfactantes catiônicos de maior interesse, destaca-se o cloreto de benzalcônio (CBZ), composto pertencente à classe dos sais quaternários de amônio, amplamente empregado como antisséptico, desinfetante e conservante em formulações farmacêuticas e produtos de higiene. Desde sua introdução na década de 1930, o CBZ demonstrou elevada atividade microbida contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e vírus envelopados, atuando principalmente por meio da desorganização da membrana citoplasmática dos microrganismos. Apesar de sua ampla utilização, limitações relacionadas à toxicidade, estabilidade e ao potencial desenvolvimento de resistência bacteriana estimulam a busca por novas estratégias capazes de otimizar seu desempenho terapêutico.

Nesse contexto, a complexação molecular do cloreto de benzalcônio com ciclodextrinas representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos sistemas supramoleculares com potencial aplicação antimicrobiana. A formação de complexos de inclusão pode modificar propriedades importantes do fármaco, como solubilidade, estabilidade,

perfil de liberação e interação com membranas biológicas, contribuindo para aumentar sua eficácia e reduzir possíveis efeitos adversos.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar complexos de inclusão entre o cloreto de benzalcônio com duas ciclodextrinas, β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD). Inicialmente, os sistemas foram avaliados quanto às suas propriedades físico-químicas, estruturais, termodinâmicas e coloidais, buscando compreender os mecanismos de interação entre o fármaco e as ciclodextrinas. Posteriormente, foi investigada a atividade antimicrobiana dos complexos frente a *Staphylococcus aureus*, por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Complementarmente, foram realizados estudos de interação com a membrana bacteriana, bem como ensaios biológicos destinados à avaliação do potencial terapêutico dos sistemas desenvolvidos, visando contribuir para o avanço de estratégias nanotecnológicas aplicadas ao combate da resistência antimicrobiana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção, discutiremos aspectos teóricos presentes na literatura científica, que embasam a parte experimental da pesquisa.

2.1 Sistemas de Liberação Controlada

Os Sistemas de Liberação Controlada (SLCs) representam uma das principais estratégias desenvolvidas pela tecnologia farmacêutica para otimizar a administração de medicamentos e superar limitações associadas às formulações convencionais. O principal objetivo desses sistemas consiste em controlar a velocidade, o local e o tempo de liberação do princípio ativo, permitindo a manutenção de concentrações terapêuticas por períodos prolongados, reduzindo oscilações plasmáticas e minimizando efeitos adversos. Como consequência, observa-se melhora da eficácia terapêutica, maior adesão do paciente ao tratamento e redução da frequência de administração dos medicamentos (Patel; Biswas; Maiti, 2016).

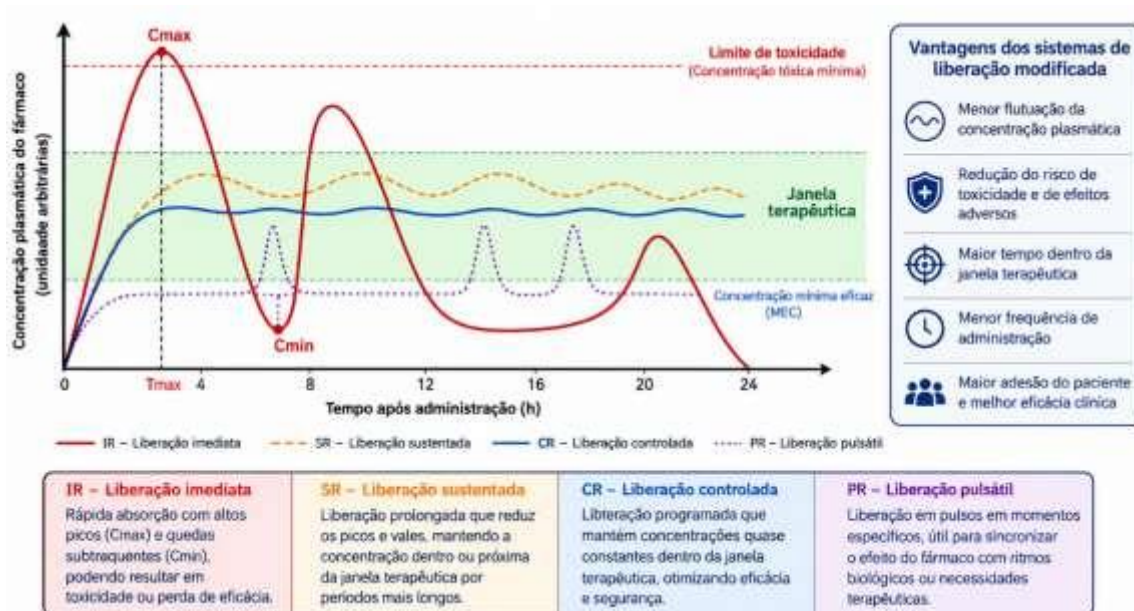
Entre as décadas de 1990 e 2010, os avanços nessa área concentraram-se principalmente no desenvolvimento de novas matrizes poliméricas, sistemas microencapsulados e plataformas capazes de modular a cinética de liberação dos fármacos. Entretanto, nas últimas décadas, a evolução da nanotecnologia farmacêutica ampliou significativamente esse campo de pesquisa. Atualmente, a literatura científica demonstra um crescimento expressivo no desenvolvimento de nanocarreadores multifuncionais, sistemas responsivos a estímulos físicos, químicos e biológicos e plataformas supramoleculares capazes de melhorar propriedades fundamentais dos princípios ativos, como solubilidade, estabilidade química, biodisponibilidade, permeabilidade e direcionamento terapêutico. Entre essas estratégias destacam-se os sistemas baseados em ciclodextrinas, cuja elevada capacidade de formar complexos de inclusão tem ampliado suas possibilidades de aplicação clínica em diferentes áreas da terapêutica (Kali; Haddadzadegan; Bernkop-Schnurch, 2024; Topuz; Uyar, 2024; Ji *et al.*, 2024).

Além do aumento da eficácia terapêutica, os SLCs desempenham importante papel na proteção do princípio ativo contra processos de degradação provocados por fatores físicos, químicos e biológicos. A encapsulação ou complexação molecular pode reduzir a degradação ocasionada pela luz, temperatura, umidade, oxidação e ação enzimática, contribuindo para aumentar a estabilidade das formulações farmacêuticas e prolongar seu tempo de

armazenamento. Paralelamente, esses sistemas favorecem a manutenção de níveis plasmáticos mais constantes, reduzindo picos de concentração associados à toxicidade e concentrações subterapêuticas relacionadas à perda da eficácia clínica (Patel; Biswas; Maiti, 2016).

A Figura 1 apresenta uma comparação esquemática entre os perfis farmacocinéticos obtidos por medicamentos convencionais e aqueles proporcionados por sistemas de liberação controlada.

Figura 1 - Representação esquemática dos perfis farmacocinéticos de sistemas de liberação imediata (IR), sustentada (SR), controlada (CR) e pulsátil (PR), evidenciando as diferenças na concentração plasmática ao longo do tempo.



Fonte: Elaboração própria com uso de IA, baseada em Drapińska et al. (2025) e Uzakova et al. (2026).

Nos sistemas convencionais, a administração repetida de doses resulta em sucessivos picos e vales de concentração plasmática. Em determinados momentos, os níveis do fármaco podem ultrapassar a janela terapêutica, aumentando o risco de efeitos tóxicos, enquanto em outros permanecem abaixo da concentração mínima eficaz, comprometendo a resposta clínica. Em contraste, os Sistemas de Liberação Controlada são projetados para modular a velocidade de liberação do princípio ativo, proporcionando concentrações plasmáticas mais estáveis e próximas da faixa terapêutica durante intervalos mais prolongados. Esse comportamento

farmacocinético contribui para aumentar a eficácia do tratamento e reduzir a ocorrência de efeitos adversos (Denadai; Oliveira, 2021).

Diversas plataformas tecnológicas têm sido empregadas para o desenvolvimento desses sistemas. De maneira geral, os SLCs podem ser classificados de acordo com o mecanismo predominante responsável pela retenção e posterior liberação do princípio ativo. Entre os principais grupos destacam-se os sistemas baseados em difusão, degradação da matriz, osmose, estímulos externos e dissociação de estruturas supramoleculares. Cada estratégia apresenta características específicas que determinam o perfil cinético de liberação, sendo selecionada de acordo com as propriedades físico-químicas do fármaco e a aplicação terapêutica pretendida.

Os sistemas baseados em difusão caracterizam-se pela incorporação do princípio ativo em matrizes micro ou nanoparticuladas constituídas por polímeros orgânicos, biomateriais ou materiais inorgânicos. Nesses sistemas, a liberação ocorre predominantemente pela difusão gradual do fármaco através da matriz encapsulante, sendo influenciada pela porosidade, grau de reticulação, hidrofiliicidade e degradação do material. Para aplicações biomédicas, é desejável que essas matrizes apresentem elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, permitindo sua eliminação segura pelo organismo após o término da ação terapêutica (Denadai; Oliveira, 2021).

Outra importante classe corresponde aos sistemas supramoleculares de liberação controlada, nos quais o princípio ativo permanece retido no interior de uma estrutura hospedeira por meio de interações intermoleculares reversíveis, como ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e interações eletrostáticas. A liberação do composto ocorre em decorrência do deslocamento do equilíbrio químico provocado, principalmente, pela diluição em fluidos fisiológicos ou por alterações das condições do meio, favorecendo a dissociação do complexo formado. Entre os principais representantes dessa classe destacam-se os complexos de inclusão com ciclodextrinas, calixarenos, cucurbiturilas, sistemas micelares, pares iônicos e diferentes arquiteturas supramoleculares descritas na literatura (Yuksel; Köse; Fellah, 2021).

Nos últimos anos, especial atenção tem sido direcionada às micelas poliméricas inteligentes e aos nanocarreadores responsivos a estímulos, capazes de modificar seu comportamento em resposta a alterações de pH, temperatura, força iônica, potencial redox, luz, campos magnéticos ou enzimas específicas presentes no microambiente patológico. Essas plataformas permitem maior especificidade na liberação dos fármacos, reduzindo a exposição de tecidos saudáveis e aumentando a eficiência terapêutica, sobretudo em aplicações oncológicas,

anti-infecciosas e na medicina de precisão (Cao *et al.*, 2013; Kali; Haddadzadegan; Bernkop-Schnürch, 2024).

Dentro desse contexto, os sistemas baseados em ciclodextrinas destacam-se como uma das plataformas supramoleculares mais promissoras da atualidade. Sua elevada capacidade de formar complexos de inclusão com moléculas hidrofóbicas possibilita melhorar simultaneamente a solubilidade aquosa, estabilidade química, biodisponibilidade e perfil farmacocinético de diversos princípios ativos, justificando o crescente interesse científico e tecnológico por essas matrizes. Em virtude dessas características, as ciclodextrinas constituem atualmente uma das principais estratégias para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas inovadoras, sendo discutidas em maior profundidade na seção seguinte.

2.2 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) constituem uma importante classe de oligossacarídeos cíclicos amplamente empregada na tecnologia farmacêutica, química supramolecular e desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para liberação controlada de fármacos. Essas moléculas são formadas por unidades de D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas α -(1 $\rightarrow$ 4), originando estruturas macrocíclicas rígidas com formato semelhante ao de um cone truncado. Dependendo do número de unidades de glicose presentes na molécula, as ciclodextrinas naturais são classificadas em α -ciclodextrina (α CD), composta por seis unidades; β -ciclodextrina (β CD), formada por sete unidades; e γ -ciclodextrina (γ CD), constituída por oito unidades glicopiranosídicas (Saokham; Loftsson, 2017).

A história das ciclodextrinas teve início em 1891, quando Antoine Villiers isolou pela primeira vez oligossacarídeos cíclicos produzidos pela degradação enzimática do amido. Posteriormente, Franz Schardinger aprofundou os estudos sobre esses compostos ao identificar a bactéria *Bacillus macerans*, produtora da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), responsável pela conversão do amido em ciclodextrinas. Em reconhecimento às suas contribuições, durante muitos anos esses compostos ficaram conhecidos como "dextrinas de Schardinger". Entretanto, apesar de sua descoberta ocorrer ainda no final do século XIX, somente a partir das décadas de 1970 e 1980 o desenvolvimento de processos industriais economicamente viáveis possibilitou sua produção em larga escala e consequente aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética e biotecnológica (Kurkov; Loftsson, 2013;

Carneiro *et al.*, 2019). A primeira patente envolvendo ciclodextrinas foi registrada em 1953, marcando o início da exploração tecnológica dessas moléculas (Jambhekar; Breen, 2016).

O crescente interesse pelas CDs decorre principalmente de sua arquitetura molecular singular. A disposição espacial das unidades glicopiranosídicas confere às ciclodextrinas uma cavidade interna predominantemente hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica, característica que favorece a inclusão de diferentes moléculas apolares ou parcialmente hidrofóbicas sem a formação de ligações covalentes. Estruturalmente, a abertura mais larga da cavidade é delimitada pelas hidroxilas secundárias localizadas nos carbonos C-2 e C-3, enquanto a abertura menor é formada pelas hidroxilas primárias ligadas ao carbono C-6. Essa organização molecular permite que as ciclodextrinas atuem como hospedeiros supramoleculares capazes de estabilizar moléculas hóspedes por meio de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e outras interações intermoleculares reversíveis (Miranda *et al.*, 2020; Saha; Rafe, 2023).

Entre as ciclodextrinas naturais, a β -ciclodextrina destaca-se como a mais utilizada em aplicações farmacêuticas devido ao diâmetro de sua cavidade, compatível com uma ampla variedade de fármacos de interesse terapêutico. Suas propriedades físico-químicas favorecem a formação de complexos de inclusão estáveis, tornando-a uma das matrizes supramoleculares mais investigadas para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e nanocarreadores farmacêuticos (Saha; Rafe, 2023; Saokham; Loftsson, 2017).

A capacidade de formar complexos de inclusão resulta diretamente da substituição das moléculas de água originalmente presentes na cavidade hidrofóbica por moléculas hóspedes de maior afinidade energética. Esse processo ocorre espontaneamente em solução aquosa e é conduzido por interações intermoleculares reversíveis, sem formação ou ruptura de ligações covalentes. Como consequência, ocorre alteração de importantes propriedades físico-químicas da molécula encapsulada, incluindo aumento da solubilidade aquosa, maior estabilidade química, proteção contra degradação oxidativa e fotolítica, melhoria da biodisponibilidade e redução da irritabilidade local de diversos fármacos (Szejtli, 1998; Thompson, 1997; Denadai *et al.*, 2006).

Além das ciclodextrinas naturais, diversas modificações químicas foram desenvolvidas visando ampliar suas aplicações farmacêuticas. Entre os derivados mais empregados, destacam-se a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), a metil- β -ciclodextrina (M β CD), as ciclodextrinas catiônicas e diferentes derivados funcionalizados com carboidratos e grupos poliméricos. Essas modificações alteram propriedades como solubilidade, estabilidade, afinidade molecular e

comportamento farmacocinético, permitindo adequar a matriz às características específicas de cada princípio ativo (Souza, 2007).

Dentre esses derivados, a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) destaca-se por apresentar elevada solubilidade em água, excelente perfil de biocompatibilidade e baixa toxicidade, características que justificam seu amplo emprego em formulações farmacêuticas e sistemas nanoestruturados. Sua obtenção ocorre pela reação entre β -ciclodextrina e óxido de propileno, promovendo a substituição parcial dos grupos hidroxila por grupos 2-hidroxipropil. Essa modificação reduz significativamente a tendência à cristalização da molécula e aumenta sua solubilidade, favorecendo a formação de complexos de inclusão mais eficientes com compostos hidrofóbicos (Jansook; Ogawa; Loftsson, 2018).

Nas últimas décadas, numerosos estudos demonstraram que derivados de β -ciclodextrina podem melhorar significativamente o desempenho farmacêutico de antibióticos, antifúngicos, antivirais e diversos outros agentes terapêuticos. Entre os principais benefícios observados destacam-se o aumento da solubilidade, da velocidade de dissolução, da estabilidade físico-química, da permeabilidade através de membranas biológicas e da biodisponibilidade, além da possibilidade de obtenção de sistemas de liberação sustentada capazes de manter concentrações terapêuticas constantes por períodos prolongados. Esses avanços têm consolidado as ciclodextrinas como uma das principais plataformas supramoleculares empregadas no desenvolvimento de sistemas inteligentes de liberação controlada (Saha; Rafe, 2023; Ji *et al.*, 2024; Topuz; Uyar, 2024).

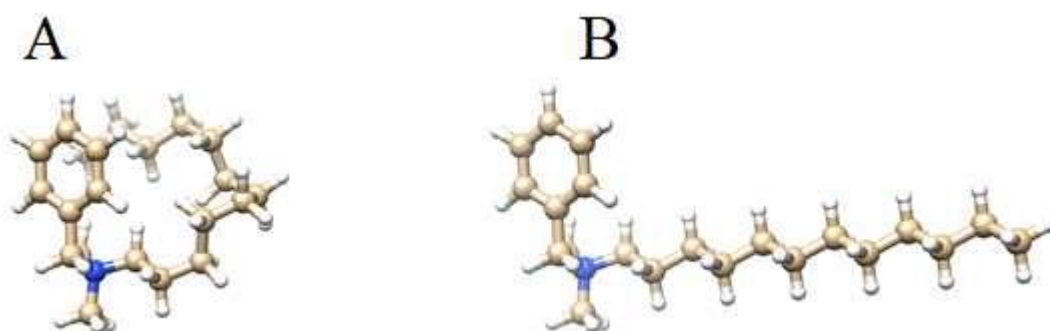
No presente estudo foram selecionadas a β -ciclodextrina e a hidroxipropil- β -ciclodextrina como matrizes hospedeiras para a formação de complexos de inclusão com o cloreto de benzalcônio (CBZ). A escolha dessas moléculas fundamenta-se em sua elevada capacidade de encapsular compostos anfífilos e modificar propriedades relevantes para a atividade biológica, incluindo estabilidade, solubilidade, interação com membranas celulares e perfil de liberação. Dessa forma, espera-se que a formação dos complexos CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD contribua para otimizar o desempenho antimicrobiano do cloreto de benzalcônio, reduzindo simultaneamente limitações relacionadas à toxicidade e à disponibilidade do composto em meio biológico.

2.3 Cloreto de benzalcônio

O cloreto de benzalcônio (CBZ) é um composto pertencente à classe dos sais de amônio quaternário, amplamente utilizado como agente antimicrobiano, conservante e desinfetante em aplicações farmacêuticas, hospitalares, industriais e domésticas. Quimicamente, trata-se de uma mistura de alquilbenzyl dimetilamônios clorados, cuja atividade biológica está diretamente relacionada à sua natureza anfifílica e à presença do grupamento de amônio quaternário permanentemente carregado positivamente. Essa característica estrutural favorece a interação eletrostática com componentes aniônicos presentes na superfície das membranas celulares microbianas, constituindo a base de seu mecanismo de ação antimicrobiano (Sorensen *et al.*, 2020).

A estrutura molecular do íon benzalcônio está representada na Figura 2. Sua conformação apresenta diferenças quando analisada no vácuo e em meio aquoso, refletindo a influência do ambiente sobre a organização espacial da molécula e sobre suas possíveis interações com biomembranas e sistemas supramoleculares.

Figura 2 - Íon benzalcônio ($C_{21}H_{38}N^+$): (A) conformação no vácuo e (B) conformação em meio aquoso.



Fonte: O autor (2026).

O mecanismo de ação do cloreto de benzalcônio está relacionado principalmente à sua elevada afinidade pelas membranas celulares dos microrganismos. Inicialmente, a região catiônica da molécula interage com grupos aniônicos presentes na superfície celular, promovendo sua adsorção à parede bacteriana. Em seguida, a cadeia hidrofóbica do surfactante penetra na bicamada lipídica, desorganizando sua estrutura, aumentando a permeabilidade da membrana e comprometendo sua integridade funcional. Como consequência, ocorre

extravasamento de constituintes intracelulares, desregulação do metabolismo celular e perda da homeostase, culminando na morte da célula microbiana (Sorensen *et al.*, 2020).

O modelo clássico proposto por Salton (1968) descreve esse processo como uma sequência progressiva de eventos celulares. Inicialmente ocorre a adsorção do surfactante à superfície da célula e sua difusão através da parede celular, quando presente. Posteriormente, verifica-se intensa interação com a membrana citoplasmática, promovendo desorganização estrutural e aumento da permeabilidade. Essa alteração favorece a perda de metabólitos essenciais de baixa massa molecular, incluindo aminoácidos, nucleotídeos, purinas, pirimidinas e íons inorgânicos. Em estágios mais avançados, ocorre desnaturação de proteínas, degradação de ácidos nucleicos e ativação de enzimas autolíticas responsáveis pela lise celular. O conjunto desses eventos compromete irreversivelmente o metabolismo bacteriano, levando ao extravasamento do conteúdo intracelular e, conseqüentemente, à morte do microrganismo (Salton, 1968; Alves *et al.*, 2012).

Além da ação direta sobre a membrana plasmática, estudos recentes indicam que o CBZ pode interferir em diferentes processos metabólicos celulares, incluindo a atividade de enzimas essenciais, alterações no potencial de membrana, inibição de sistemas de transporte e comprometimento da produção energética bacteriana. Esses mecanismos complementares ampliam seu espectro de ação e explicam sua elevada eficácia frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, leveduras e vírus envelopados (Sorensen *et al.*, 2020).

Em razão dessas propriedades, o cloreto de benzalcônio é amplamente empregado como conservante em formulações farmacêuticas e cosméticas, incluindo colírios, soluções oftálmicas, soluções para lentes de contato, enxaguatórios bucais, produtos dermatológicos, antissépticos e desinfetantes de uso hospitalar. Sua utilização contribui para garantir a estabilidade microbiológica das formulações durante o armazenamento e o uso, reduzindo o risco de contaminação por microrganismos potencialmente patogênicos (Yazar *et al.*, 2013).

Apesar de sua ampla aplicação, o emprego do CBZ apresenta limitações importantes. A exposição prolongada ou a utilização em concentrações elevadas pode provocar irritação de pele e mucosas, alterações da superfície ocular, citotoxicidade em determinadas linhagens celulares e reações de hipersensibilidade em indivíduos susceptíveis. Além disso, o uso indiscriminado de compostos quaternários de amônio tem sido associado ao desenvolvimento de mecanismos adaptativos de resistência bacteriana, incluindo alterações da permeabilidade celular, modificação da composição da membrana e superexpressão de bombas de efluxo. Esses fenômenos representam um importante desafio para a manutenção da eficácia clínica desses

compostos e reforçam a necessidade de estratégias capazes de otimizar sua atividade antimicrobiana (Gilbert; Mcbain, 2003; Kampf, 2018).

Nesse contexto, a incorporação do cloreto de benzalcônio em sistemas supramoleculares baseados em ciclodextrinas surge como uma alternativa promissora para modificar seu perfil farmacêutico. A formação de complexos de inclusão pode promover aumento da estabilidade química, melhoria da solubilidade, maior controle da liberação, redução da toxicidade e potencial modulação da interação entre o fármaco e as membranas bacterianas. Dessa forma, espera-se que a complexação molecular do CBZ com β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) contribua para ampliar sua eficácia antimicrobiana e favorecer o desenvolvimento de novas formulações nanoestruturadas destinadas ao controle de infecções causadas por microrganismos resistentes.

2.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva pertencente à microbiota comensal de seres humanos, colonizando principalmente a pele, a mucosa nasal e outras superfícies epiteliais. Embora sua presença seja frequentemente assintomática, essa espécie apresenta elevado potencial patogênico e constitui um dos principais agentes etiológicos de infecções adquiridas tanto na comunidade quanto em ambientes hospitalares. A capacidade de adaptação a diferentes nichos biológicos, associada à produção de numerosos fatores de virulência, permite que *Staphylococcus aureus* cause desde infecções superficiais e localizadas até quadros sistêmicos graves, caracterizando-se como um dos microrganismos de maior relevância clínica na atualidade (Tong *et al.*, 2015).

Entre as manifestações clínicas mais frequentemente associadas à infecção por *Staphylococcus aureus* destacam-se bacteremia, sepse, endocardite infecciosa, pneumonia, osteomielite, artrite séptica, infecções de pele e tecidos moles, meningite, além de infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos invasivos, como cateteres vasculares, próteses ortopédicas e implantes biomédicos. A elevada capacidade de formação de biofilmes sobre superfícies bióticas e abióticas contribui significativamente para a persistência dessas infecções, dificultando a ação do sistema imunológico e reduzindo a eficácia dos tratamentos antimicrobianos convencionais (Tong *et al.*, 2015).

A suscetibilidade às infecções invasivas é particularmente elevada em indivíduos imunocomprometidos ou portadores de doenças crônicas, incluindo diabetes mellitus

descompensado, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), neoplasias, insuficiência renal crônica, distúrbios hematológicos e alterações na função de neutrófilos. Entretanto, infecções por *Staphylococcus aureus* também podem ocorrer em indivíduos previamente saudáveis, refletindo a elevada capacidade adaptativa e o amplo potencial de disseminação desse microrganismo na população (Tong *et al.*, 2015).

Nas últimas décadas, a crescente utilização de agentes antimicrobianos exerceu intensa pressão seletiva sobre populações bacterianas, favorecendo o surgimento e a disseminação de linhagens resistentes. Entre essas, destaca-se o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), considerado atualmente um dos principais patógenos associados às infecções relacionadas à assistência à saúde. A aquisição do gene *mecA*, responsável pela produção da proteína ligadora de penicilina PBP2a, reduz significativamente a afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos, conferindo resistência à meticilina, penicilinas, cefalosporinas e, conseqüentemente, à maior parte dessa classe terapêutica (Zhang *et al.*, 2017).

Além da resistência aos β -lactâmicos, diferentes linhagens de *Staphylococcus aureus* passaram a apresentar sensibilidade reduzida ou resistência a outros antimicrobianos amplamente utilizados na prática clínica, incluindo glicopeptídeos, macrolídeos, lincosamidas, tetraciclina e fluoroquinolonas. Particular preocupação tem sido direcionada ao surgimento de isolados com sensibilidade reduzida ou resistência à vancomicina, antibiótico considerado durante muitos anos uma das principais opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por MRSA. Esse cenário evidencia a contínua evolução dos mecanismos de resistência bacteriana e reforça a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas seja qual for o mecanismo de ação do antimicrobiano (Zhang *et al.*, 2017).

Os mecanismos responsáveis pela resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* envolvem processos complexos que incluem aquisição horizontal de genes de resistência por plasmídeos, transposons e cassetes cromossômicos, além de mutações espontâneas favorecidas pela pressão seletiva decorrente do uso inadequado de antimicrobianos. Alterações na permeabilidade da membrana celular, superexpressão de bombas de efluxo, modificação dos alvos moleculares dos antibióticos, produção de enzimas inativadoras e formação de biofilmes constituem importantes estratégias adaptativas que dificultam significativamente o tratamento dessas infecções (Guo *et al.*, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina como um dos principais patógenos prioritários para o desenvolvimento de novos antimicrobianos e estratégias terapêuticas inovadoras, em razão de seu elevado impacto clínico

e epidemiológico. O aumento da incidência de infecções por cepas multirresistentes representa um importante desafio para os sistemas de saúde em escala global, contribuindo para prolongamento das internações hospitalares, aumento dos custos assistenciais e elevação das taxas de morbidade e mortalidade.

Nesse contexto, estratégias capazes de potencializar a atividade de antimicrobianos já disponíveis tornam-se particularmente relevantes. Entre essas abordagens destacam-se os sistemas de liberação controlada e os complexos de inclusão baseados em ciclodextrinas, capazes de modificar propriedades físico-químicas dos fármacos, aumentar sua estabilidade, controlar sua liberação e potencialmente favorecer sua interação com as membranas bacterianas. Considerando a elevada relevância clínica de *Staphylococcus aureus* e o crescente desafio representado pela resistência antimicrobiana, esta espécie foi selecionada como modelo biológico para avaliação da atividade antimicrobiana dos complexos de inclusão entre o cloreto de benzalcônio (CBZ), a β -ciclodextrina (β CD) e a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), desenvolvidos no presente estudo.

3 OBJETIVOS

Nesta seção, apresentaremos os objetivos delineados da pesquisa, no intuito de elucidar o processo de síntese dos complexos, a caracterização química estrutural e os mecanismos de ação microbiológica dos complexos avaliados.

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial antimicrobiano de complexos de inclusão formados entre o cloreto de benzalcônio (CBZ) e as ciclodextrinas β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), investigando suas propriedades físico-químicas, termodinâmicas, estruturais e sua atividade frente a *Staphylococcus aureus*.

3.2 Objetivos Específicos

- Preparar os complexos de inclusão entre o cloreto de benzalcônio (CBZ) e as ciclodextrinas β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD);
- Caracterizar os complexos de inclusão em fase sólida por meio de análises termogravimétricas (TGA), análise térmica diferencial (DTA) e espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);

- Investigar as interações intermoleculares em solução (D₂O) por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H-RMN), avaliando os deslocamentos químicos decorrentes da formação dos complexos;
- Determinar a proximidade espacial entre os grupos moleculares do cloreto de benzalcônio e das ciclodextrinas por meio da técnica de Efeito Nuclear Overhauser (¹H-¹H NOESY-RMN), visando confirmar a geometria de inclusão molecular;
- Determinar os parâmetros termodinâmicos da interação entre o CBZ e as ciclodextrinas, incluindo entalpia de interação ($\Delta_{int}H^\circ$), energia livre de Gibbs ($\Delta_{int}G^\circ$), contribuição entrópica ($T\Delta_{int}S^\circ$), constante de equilíbrio (K) e estequiometria de ligação (N), utilizando Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC);
- Avaliar as propriedades coloidais dos complexos de inclusão por meio de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), potencial zeta (ZP), condutividade elétrica (κ) e espectroscopia de impedância elétrica, investigando a formação de agregados supramoleculares;
- Realizar estudos computacionais visando elucidar as possíveis geometrias de inclusão molecular do cloreto de benzalcônio nas cavidades da β CD e da HP β CD;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos complexos de inclusão frente a *Staphylococcus aureus*, determinando a concentração inibitória mínima (CIM);
- Avaliar a capacidade dos complexos de inclusão em promover a erradicação de biofilmes pré-formados de *Staphylococcus aureus*, comparando o efeito do CBZ livre com os sistemas complexados;
- Investigar a interação entre o cloreto de benzalcônio e a membrana celular de *Staphylococcus aureus*, na ausência e na presença das ciclodextrinas, utilizando as técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (ZP), buscando compreender os mecanismos físico-químicos envolvidos na atividade antimicrobiana.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção, apresentaremos todos os recursos materiais e metodológico presentes na literatura científica, que foram empregados na pesquisa no intuito de atingir os objetivos propostos na seção anterior.

4.1 Materiais E Reagentes Utilizados

Os experimentos foram conduzidos utilizando reagentes de grau analítico (P.A.) e água ultrapura obtida em sistema de purificação tipo I. Os principais materiais e reagentes empregados neste estudo estão descritos a seguir:

- Água ultrapura Tipo I (Merck Millipore, Burlington, MA, EUA);
- β -Ciclodextrina (β CD) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA);
- Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA);
- Cloreto de benzalcônio (CBZ) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA);
- Solução salina estéril (NaCl 0,9%);
- Caldo Mueller-Hinton e Ágar Mueller-Hinton (Ionlab Equipamentos para Laboratórios e Hospitais Ltda., Brasil);
- Dimetilsulfóxido (DMSO), grau analítico (Bio Scie Indústria e Comércio Ltda., Brasil);
- 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA);
- Tampão fosfato salino (Phosphate Buffered Saline – PBS), grau P.A.;
- Metanol, grau P.A.;
- Solução de cristal violeta a 0,1% (m/v);
- Etanol 95% (v/v).

Para os ensaios microbiológicos foram utilizadas cinco cepas de *Staphylococcus aureus*, incluindo a cepa de referência ATCC 25923, a cepa de referência ATCC 6538 e os isolados clínicos 170, 15 e 1369061, empregados nas avaliações da atividade antimicrobiana, formação de biofilme e interação com membranas celulares.

4.2 Delineamento Experimental

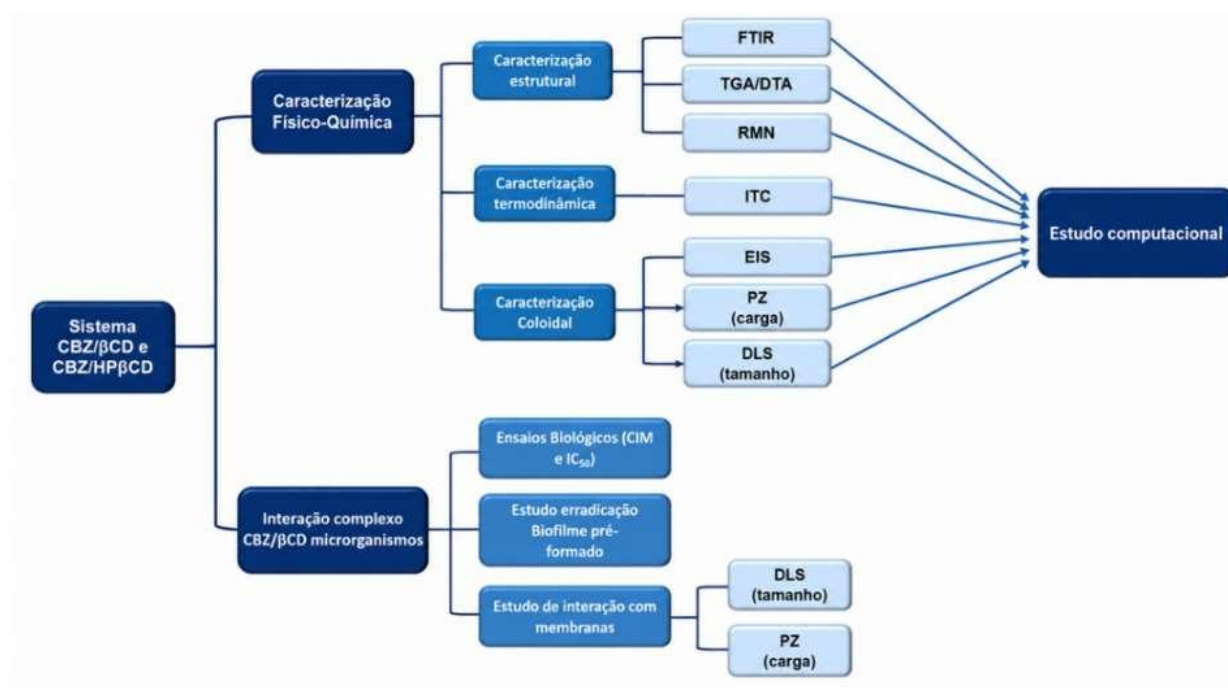
Com o objetivo de facilitar a compreensão das etapas experimentais desenvolvidas neste estudo, foi elaborado um fluxograma representando a sequência metodológica adotada (Figura 3). O delineamento experimental foi organizado em duas etapas principais: **(i)** caracterização

físico-química dos complexos de inclusão e **(ii)** avaliação biológica de sua atividade antimicrobiana.

Na primeira etapa, foram realizados os procedimentos de síntese dos complexos de inclusão entre o cloreto de benzalcônio (CBZ) e as ciclodextrinas β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), seguidos pelas caracterizações estruturais, espectroscópicas, térmicas, termodinâmicas e coloidais. Para melhor organização da investigação, as técnicas analíticas foram agrupadas de acordo com o estado físico das amostras, contemplando análises em fase sólida e em solução.

Na segunda etapa, foram conduzidos os ensaios microbiológicos destinados à avaliação da atividade antimicrobiana dos complexos de inclusão frente a *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, foram realizados estudos envolvendo a erradicação de biofilmes e a investigação das alterações físico-químicas promovidas pela interação do cloreto de benzalcônio com a membrana bacteriana, tanto na ausência quanto na presença das ciclodextrinas.

Figura 3 - Fluxograma de desenvolvimento da pesquisa



Fonte: O autor, elaborada com auxílio de IA (2026).

4.2.1 *Preparo do Complexo de Inclusão e Mistura Mecânica*

Os complexos de inclusão entre o cloreto de benzalcônio (CBZ) e as ciclodextrinas β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) foram preparados empregando razão molar de 1:1 (hóspede), utilizando a metodologia de complexação seguida de liofilização, conforme adaptações de protocolos descritos na literatura (Cao; Guo; Ping, 2005; Chowdary; Shankar; Tanniru, 2014; Lula *et al.*, 2012).

Inicialmente, soluções aquosas individuais de CBZ, β CD e HP β CD foram preparadas em concentrações equimolares, utilizando água ultrapura Tipo I como solvente. Após completa dissolução dos componentes, as soluções contendo o fármaco e a respectiva ciclodextrina foram misturadas e mantidas sob agitação magnética contínua durante 24 horas, à temperatura ambiente, visando favorecer o equilíbrio de complexação molecular entre as espécies.

Ao término do período de incubação, as soluções foram submetidas ao processo de congelamento e, posteriormente, à liofilização para obtenção dos complexos de inclusão na forma sólida, preservando as características estruturais dos sistemas supramoleculares formados.

Como controle experimental, foram preparadas misturas mecânicas (MM) de CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD, também na razão molar de 1:1, para uso nas caracterizações no estado sólido. Para isso, quantidades estequiométricas dos componentes sólidos foram pesadas e homogeneizadas mecanicamente em tubos de polipropileno (Eppendorf®), sem a utilização de solventes, obtendo-se sistemas físicos de referência destinados à comparação com os complexos de inclusão produzidos por complexação molecular.

4.3 Caracterização Estrutural

Segue em sequência, as técnicas experimentais, empregadas para a caracterização estrutural dos complexos.

4.3.1 *Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)*

A caracterização estrutural do cloreto de benzalcônio (CBZ), das ciclodextrinas β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), das misturas mecânicas (MM) e dos complexos de inclusão CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD foi realizada por espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

Os espectros foram obtidos na região do infravermelho médio, compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} , utilizando um espectrômetro PerkinElmer Spectrum Two™ (Figura 4), operando no modo de transmitância, com amostras preparadas na forma de pastilhas de brometo de potássio (KBr).

Para cada amostra foram realizadas 16 varreduras consecutivas, empregando resolução espectral de 2 cm^{-1} . Os espectros foram adquiridos utilizando o software PerkinElmer Spectrum ES (versão 10.03.08.0133) e posteriormente exportados para o programa OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA), onde foram processados e utilizados para análise comparativa das bandas vibracionais.

A técnica foi empregada com o objetivo de identificar alterações nos modos vibracionais característicos do CBZ e das ciclodextrinas decorrentes da formação dos complexos de inclusão, permitindo avaliar possíveis interações intermoleculares entre as espécies estudadas.

Figura 4 - Espectrômetro de Infravermelho da Perkin Elmer, modelo Spectrum Two™, com transformada de Fourier



Fonte: O autor (2026).

4.3.2 *Análise Térmica: termogravimetria (TGA), análise térmica diferencial (DTA)*

A estabilidade térmica e o comportamento de decomposição do cloreto de benzalcônio (CBZ), da β -ciclodextrina (β CD), da hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), das misturas mecânicas e dos complexos de inclusão foram avaliados por análises termogravimétricas (TGA) e análise térmica diferencial (DTA).

As análises foram realizadas em um módulo termogravimétrico STA 7200 RV (Hitachi High-Tech Corporation, Japão), ilustrado na Figura 5.

As amostras, com massa aproximada de 3,0 mg, foram acondicionadas em cadinhos de platina, utilizando-se um cadinho vazio como referência. As análises foram conduzidas sob atmosfera dinâmica de ar sintético, com fluxo de 300 mL min⁻¹, empregando rampa de aquecimento de 35 °C até 1000 °C, à taxa de 20 °C min⁻¹.

Os termogramas obtidos permitiram avaliar os eventos de perda de massa e as transformações térmicas dos materiais, possibilitando comparar os perfis de decomposição dos componentes isolados, das misturas mecânicas e dos complexos de inclusão, fornecendo evidências complementares da interação supramolecular entre o CBZ e as ciclodextrinas.

Figura 5 - Módulo termogravimétrico TGA/DTA STA 7200RV da Hitachi



Fonte: O autor (2026).

4.3.3 Ressonância Magnética Nuclear

Os estudos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em colaboração com pesquisadores da instituição.

Foram obtidos espectros de RMN de hidrogênio (^1H -RMN) para o cloreto de benzalcônio (CBZ), β -ciclodextrina (βCD), hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP βCD) e para os respectivos complexos de inclusão CBZ/ βCD e CBZ/HP βCD . Adicionalmente, foram realizados experimentos bidimensionais do tipo ^1H - ^1H NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), visando investigar a proximidade espacial entre os grupos funcionais das moléculas envolvidas na complexação.

Os espectros foram adquiridos em um espectrômetro Bruker DRX-400 AVANCE, operando à frequência de 400 MHz para o núcleo de ^1H . As amostras foram preparadas utilizando água deuterada (D_2O) como solvente, e os espectros foram processados e analisados por meio do software MestReNova®.

Os experimentos realizados compreenderam:

RMN de Hidrogênio (^1H -RMN): utilizada para a caracterização estrutural dos compostos estudados e para a avaliação das alterações nos deslocamentos químicos (δ) decorrentes da formação dos complexos de inclusão.

RMN bidimensional (^1H - ^1H NOESY): empregada para investigar correlações espaciais entre prótons do cloreto de benzalcônio e das ciclodextrinas, permitindo confirmar a formação dos complexos de inclusão e propor a orientação espacial do hóspede no interior da cavidade das matrizes hospedeiras por meio do Efeito Nuclear Overhauser (NOE). Experimentos realizados com tempo de mistura de 300 ms.

4.4 Caracterização Termodinâmica

Segue em sequência, a técnica experimental, empregada para a caracterização termodinâmica dos complexos.

4.4.1 Titulações calorimétricas isotérmicas (ITC)

As propriedades termodinâmicas da interação entre o cloreto de benzalcônio (CBZ) e as ciclodextrinas β -ciclodextrina (βCD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP βCD) foram determinadas por Calorimetria de Titulação Isotérmica (Isothermal Titration Calorimetry – ITC), utilizando um microcalorímetro VP-ITC (MicroCal®, Malvern Panalytical), ilustrado na Figura 6.

Os experimentos foram conduzidos a 25 °C, empregando uma célula de amostra com volume de 1,5 mL, contendo solução aquosa de cloreto de benzalcônio (CBZ) na concentração de 1,0 mmol L⁻¹.

Para os experimentos envolvendo a β -ciclodextrina, foi utilizada uma solução titulante de 15,0 mmol L⁻¹, enquanto para a hidroxipropil- β -ciclodextrina empregou-se uma solução de 30,0 mmol L⁻¹. Em ambos os casos, foram realizadas 51 injeções automáticas, sendo a primeira de 1,0 μ L, descartada durante o tratamento dos dados por apresentar influência da difusão entre a seringa e a cela calorimétrica, seguida por 50 injeções sucessivas de 5,0 μ L.

Após cada experimento, as curvas calorimétricas obtidas foram corrigidas mediante subtração dos respectivos experimentos em branco, eliminando-se os efeitos térmicos decorrentes da diluição dos reagentes e das interações com o solvente. Esse procedimento permitiu isolar exclusivamente o calor associado ao processo de complexação molecular entre o CBZ e as ciclodextrinas.

Todas as titulações foram realizadas em duplicata para garantir a reprodutibilidade dos resultados experimentais. Os dados calorimétricos foram processados utilizando o software MicroCal Origin® versão 6.0, por meio do ajuste dos isothermas experimentais aos modelos matemáticos de ligação disponíveis no programa.

A partir do ajuste das curvas experimentais foram determinados os principais parâmetros termodinâmicos da interação molecular, incluindo a constante de equilíbrio (K), a estequiometria de ligação (N), a variação de entalpia de interação ($\Delta_{int}H^\circ$), a variação da energia livre de Gibbs ($\Delta_{int}G^\circ$) e a contribuição entrópica ($T\Delta_{int}S^\circ$). Esses parâmetros permitiram caracterizar o processo de formação dos complexos de inclusão e avaliar as forças intermoleculares predominantes envolvidas na associação entre o cloreto de benzalcônio e as ciclodextrinas.

Figura 6 – Representação do Microcalorímetro VP-ITC da Microcal



Fonte: Autor (2026).

4.5. Caracterização Coloidal

A caracterização coloidal dos sistemas formados entre o cloreto de benzalcônio (CBZ) e as ciclodextrinas β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) foi realizada por meio das técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering – DLS), Potencial Zeta (Zeta Potential – ZP), e Espectroscopia de Impedância Elétrica (Electrical Impedance Spectroscopy – EIS). Essas análises permitiram investigar a formação de agregados supramoleculares, avaliar a estabilidade coloidal dos sistemas e caracterizar suas propriedades elétricas em solução aquosa.

4.5.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As medidas do diâmetro hidrodinâmico (D_h) foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido), ilustrado na Figura 7.

Os experimentos foram conduzidos a 25 °C, utilizando sistema de termostatização por efeito Peltier, após período de equilíbrio térmico de 30 segundos. As soluções contendo β CD (15 mmol L⁻¹) e HP β CD (30 mmol L⁻¹) foram transferidas para cubetas de poliestireno com caminho óptico de 1 cm e analisadas utilizando laser He-Ne de 633 nm (4 mW), com detecção da luz espalhada a 90°.

Para avaliar a influência da concentração do fármaco sobre o comportamento coloidal das ciclodextrinas, foram realizadas titulações sucessivas com solução aquosa de CBZ (1,0

mmol L⁻¹). Em cada experimento foram efetuadas 50 adições consecutivas de 5,0 µL da solução titulante em 1,5 mL da suspensão contendo a respectiva ciclodextrina.

Cada ponto experimental correspondeu à média de cinco medidas independentes, sendo cada medida obtida a partir da média de cinco aquisições consecutivas. Os dados experimentais foram tratados utilizando o software OriginPro® 9.0 (OriginLab Corporation, EUA).

4.5.2 Determinação do Potencial Zeta (ZP)

As determinações do potencial zeta foram realizadas no mesmo equipamento (Zetasizer Nano ZS90), empregando o módulo de microeletroforese por efeito Laser Doppler (MELD).

As amostras foram preparadas de forma semelhante às utilizadas nos experimentos de DLS. As suspensões contendo βCD (15 mmol L⁻¹) e HPβCD (30 mmol L⁻¹) foram acondicionadas em cubetas de vidro equipadas com célula eletroforética do tipo Dip Cell.

As medidas foram realizadas com ângulo de detecção de 173°, utilizando diferença de potencial alternada de 10 V. Os valores de potencial zeta foram obtidos a partir da mobilidade eletroforética, empregando o modelo de Smoluchowski.

Durante os experimentos foram realizadas 50 adições sucessivas de 10 µL da solução de CBZ (1,0 mmol L⁻¹) em 3,0 mL das suspensões de βCD e HPβCD em um béquer. Após cada adição, as amostras foram transferidas para a cubeta e submetidas às análises. Após cada análise, as soluções foram devolvidas para o béquer e submetida à nova injeção de titulante até o fim do experimento. As determinações foram iniciadas antes da primeira adição do titulante e repetidas após cada etapa de titulação.

Os resultados correspondem à média de cinco determinações independentes, sendo cada uma obtida a partir da média de cinco aquisições consecutivas. O tratamento dos dados foi realizado utilizando o software OriginPro® 9.0.

Figura 7 - ZetaSizer Nano ZS90



Fonte: o autor (2026).

4.5.3 Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIS)

As propriedades elétricas dos sistemas supramoleculares foram avaliadas por Espectroscopia de Impedância Elétrica (Electrical Impedance Spectroscopy – EIS).

Os sistemas CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD foram preparados utilizando 15 mL de solução aquosa de cloreto de benzalcônio ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), sendo posteriormente submetidos à titulação com soluções de β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD). Para cada sistema foram realizadas 25 adições sucessivas de $100 \mu\text{L}$ da solução de ciclodextrina, seguidas de homogeneização e repouso até a estabilização do sinal elétrico antes da aquisição dos espectros.

As medidas de impedância foram obtidas utilizando um analisador operando em corrente alternada e frequências superiores a 1 kHz , condição que minimiza os efeitos de polarização interfacial e adsorção nos eletrodos, permitindo avaliar predominantemente as propriedades elétricas intrínsecas dos sistemas estudados (Lima et al., 2022).

Foram analisados o módulo da impedância ($|Z^*|$), a componente real ($\text{Re}[Z^*]$) e imaginária ($\text{Im}[Z^*]$) da impedância complexa, o módulo da admitância ($|Y^*|$) e os diagramas de Nyquist. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, sendo os dados tratados e analisados no software MicroCal Origin® versão 6.0.

4.6 Estudo Computacional

Os estudos de modelagem molecular foram realizados em colaboração com o Laboratório de Química Fundamental (LQF), vinculado ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Naturais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas

Gerais, Brasil. Toda a infraestrutura computacional e o suporte técnico-científico necessários ao desenvolvimento das simulações foram disponibilizados pela instituição parceira.

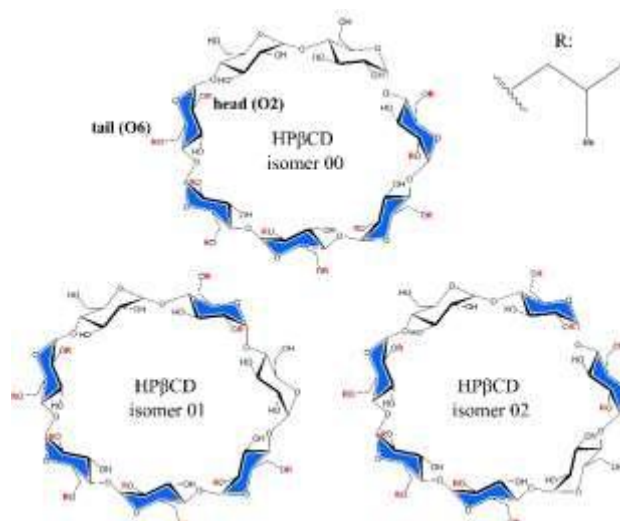
4.6.1 Construção das Estruturas Moleculares

A estrutura inicial da β -ciclodextrina (β CD) foi obtida a partir de dados cristalográficos disponíveis na literatura (Seidel; Koleva, 2009). Antes da construção dos sistemas supramoleculares, essa estrutura foi submetida à otimização geométrica utilizando o método semiempírico de mecânica quântica GFN2-xTB, desenvolvido por Grimme, Bannwarth e Shushkov (2017).

A estrutura do íon benzalcônio (CBZ^+), correspondente ao composto Benzododecínio (CID 8754), foi obtida na base de dados PubChem (Kim *et al.*, 2021). Posteriormente, realizou-se uma busca conformacional utilizando o programa CREST (Conformer-Rotamer Ensemble Sampling Tool), tanto em fase gasosa quanto empregando o modelo contínuo de solvatação ALPB para água (Pracht; Bohle; Grimme, 2020; Ehlert *et al.*, 2021).

Além da β CD natural, foram investigados três isômeros da hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD). Os isômeros 01 e 02 foram construídos com base nas estruturas propostas por He *et al.* (2024), enquanto o isômero 00 foi adotado conforme descrição recente de Dos Santos e Anconi (2024). As estruturas empregadas encontram-se ilustradas na Figura 8.

Figura 8 - Isômeros de HP β CD investigados neste estudo. As unidades de glicose com as substituições O2 ou O6 foram indicadas em azul.



Fonte: O autor (2026)

4.6.2 Construção dos Sistemas Supramoleculares

Após a otimização das estruturas individuais, foram gerados automaticamente os sistemas supramoleculares utilizando o software UD-APARM, desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Anconi e disponibilizado em repositório público (<https://github.com/anconi-lab>).

O algoritmo utiliza os eixos principais de inércia da molécula hospedeira (β CD ou HP β CD) e da molécula hóspede (CBZ⁺), promovendo diferentes orientações espaciais por meio de deslocamentos translacionais e rotações sucessivas do hóspede ao longo do eixo de inclusão da cavidade da ciclodextrina.

Para cada combinação entre hóspede e hospedeiro foram gerados 3.744 arranjos supramoleculares iniciais, definidos pelos parâmetros geométricos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Entrada UD-APARM adotada no presente trabalho para sistemas supramoleculares 1:1 construídos com Benzalcônio (CBZ), 2HP β CD (isômeros 00, 01 e 02) e β CD natural. Este conjunto de parâmetros definiu 3.744 sistemas supramoleculares iniciais.

3744 starting systems			
Parameter	Starting Value	Final value	Number of Steps
r	2.0	8.0	12
θ	0	180	1
φ	0	0	1
Euler α	0	330	11
Euler β	30	210	1
Euler γ	0	300	5

Fonte: O autor (2026).

4.6.3 Otimização Geométrica

Todos os arranjos supramoleculares gerados automaticamente foram inicialmente otimizados em fase gasosa utilizando o método semiempírico GFN2-xTB.

Posteriormente, as estruturas convergidas foram submetidas a nova otimização empregando o modelo contínuo de solvatação ALPB, considerando água como solvente, conforme implementado no programa xTB versão 6.41.

Foram avaliados sistemas contendo a β CD natural e três diferentes isômeros de HP β CD. Dessa forma, considerando as quatro matrizes supramoleculares estudadas (β CD, HP β CD-00, HP β CD-01 e HP β CD-02), foram investigados 14.976 complexos supramoleculares, correspondentes a quatro conjuntos independentes de 3.744 geometrias iniciais.

4.6.4 Avaliação Termodinâmica

Após a otimização geométrica, foram calculadas as propriedades termodinâmicas dos complexos supramoleculares, permitindo avaliar a estabilidade relativa dos diferentes modos de inclusão do íon benzalcônio nas cavidades das ciclodextrinas.

A análise contemplou a comparação das energias de interação entre os diferentes complexos, possibilitando identificar as geometrias energeticamente mais favoráveis e compreender os principais fatores estruturais responsáveis pela estabilização dos sistemas supramoleculares.

A interpretação dos resultados foi realizada conforme a metodologia descrita por Anconi e Souza (2022), permitindo correlacionar os dados teóricos com os resultados experimentais obtidos pelas técnicas espectroscópicas, calorimétricas e microbiológicas.

4.7 Estudo de Interações dos Compostos com Microrganismos

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas desenvolvidos foram empregadas cepas de referência e isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. Inicialmente, utilizaram-se as cepas de referência ATCC 25923 e ATCC 6538, além dos isolados clínicos 15, 170 e 1369061, com o objetivo de investigar se a resposta aos complexos de inclusão apresentava dependência da linhagem bacteriana.

Após a etapa inicial de triagem, os ensaios biológicos mais específicos foram conduzidos utilizando apenas cepas de referência (ATCC), em razão de sua ampla utilização em protocolos padronizados de avaliação microbiológica.

A cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi selecionada para os ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e para os estudos de interação entre os complexos de inclusão e a membrana bacteriana, avaliados por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (ZP). Essa escolha fundamenta-se no fato de essa linhagem constituir uma cepa de referência internacionalmente empregada em ensaios de suscetibilidade antimicrobiana e em procedimentos de controle de qualidade microbiológico, sendo amplamente recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2024).

Por outro lado, os experimentos destinados à avaliação da erradicação de biofilmes pré-formados foram realizados utilizando a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, reconhecida como modelo experimental para estudos relacionados à formação, maturação e controle de biofilmes bacterianos. Segundo Marchesani et al. (2025), essa linhagem apresenta elevada

capacidade de formação de biofilmes estáveis, sendo amplamente utilizada na investigação da adesão bacteriana, da arquitetura estrutural dos biofilmes e da avaliação de compostos com potencial atividade antibiofilme. Dessa forma, sua utilização permitiu uma avaliação mais robusta do desempenho dos complexos CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD frente a biofilmes de *Staphylococcus aureus*.

4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Inibitória Mediana (IC50)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada utilizando o método de microdiluição em caldo em placas estéreis de 96 poços, conforme as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023), com adaptações.

Foram avaliados o cloreto de benzalcônio (CBZ), o complexo de inclusão CBZ/ β CD e o complexo CBZ/HP β CD.

Inicialmente foi preparada uma solução estoque de CBZ na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, previamente esterilizada por filtração em membrana de $0,22 \mu\text{m}$. Em seguida, realizou-se diluição seriada na razão de 1:2 em caldo Mueller-Hinton (MH), obtendo-se concentrações variando entre $20,0$ e $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para os complexos de inclusão, as massas foram calculadas considerando a quantidade de material necessária para fornecer a mesma concentração molar de CBZ presente na solução do fármaco livre. Foram utilizados devido a precisão da balança em laboratório 100 vezes mais, sendo pesado então $173,52 \text{ mg}$ do complexo CBZ/ β CD e $204,70 \text{ mg}$ do complexo CBZ/HP β CD, os quais foram dissolvidos separadamente em 100 mL de água ultrapura, depois foi retirado 1 mL da solução estoque e diluído em 10 mL de água ultrapura. As etapas de diluição foram conduzidas de maneira idêntica às empregadas para o CBZ livre.

Os ensaios foram realizados em duplicata para cada linhagem bacteriana. Em cada poço da placa de microdiluição foram adicionados $100 \mu\text{L}$ das diferentes concentrações do composto em estudo.

As cepas bacterianas foram previamente reativadas em caldo Mueller-Hinton e incubadas por 24 horas a 37°C . Posteriormente, as suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina estéril ($0,9\% \text{ NaCl}$), ajustando-se a turbidez ao padrão 0,5 da escala de McFarland, correspondente aproximadamente a $1,5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$. Em seguida, realizou-se diluição decimal da suspensão, obtendo-se concentração final de aproximadamente $1,5 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$, sendo adicionados $5 \mu\text{L}$ do inóculo a cada poço experimental.

Para cada composto foram utilizadas placas independentes. As linhas A e B foram destinadas à cepa ATCC 25923, as linhas C e D ao isolado clínico 170, as linhas E e F ao isolado clínico 15 e as linhas G e H ao isolado clínico 1369061. O mesmo procedimento experimental foi posteriormente repetido utilizando a cepa ATCC 6538.

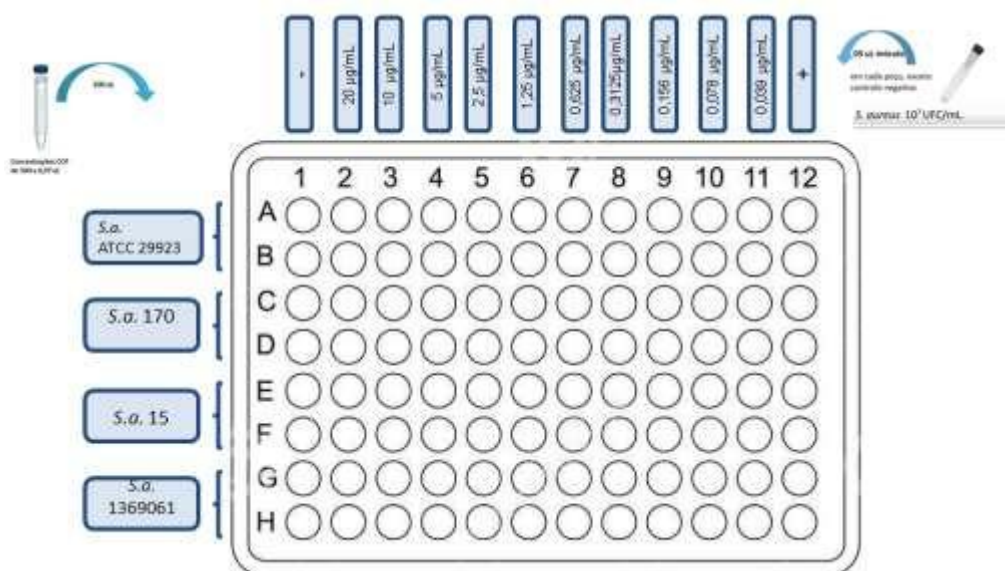
Como controle positivo de crescimento empregou-se meio Mueller-Hinton contendo apenas o inóculo bacteriano. O controle negativo de esterilidade foi constituído exclusivamente pelo meio de cultura.

Após incubação por 24 horas a 37 °C, adicionaram-se 20 µL da solução de MTT (2,5 mg mL⁻¹ em PBS) a cada poço. As placas permaneceram incubadas por mais 2 horas, protegidas da luz com papel alumínio. Em seguida foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização do formazan produzido, sendo a absorbância determinada em leitor de microplacas Thermo Scientific Multiskan Sky, utilizando comprimento de onda de 570 nm.

Neste estudo, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de promover inibição entre 90 e 100% da atividade metabólica bacteriana em relação ao controle positivo de crescimento.

A Concentração Inibitória Mediana (IC₅₀) foi determinada como a concentração capaz de reduzir 50% da atividade metabólica das células bacterianas. O percentual de atividade metabólica foi calculado utilizando-se a relação entre a absorbância de cada tratamento e a absorbância média do controle positivo, expressa em porcentagem.

Figura 9 - Representação esquemática. Placa de microdiluição de concentração inibitória mínima e de dose letal mediana de CBZ puro e das formas complexadas



Fonte: o autor (2026).

4.7.2 Determinação da Avaliação da erradicação de biofilme pré-formado

Os ensaios para determinação da erradicação de biofilme pré-formado foram realizados em colaboração com Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade CEUMA, Maranhão, Brasil.

A atividade dos compostos frente a biofilmes bacterianos pré-formados foi avaliada pelo ensaio de erradicação de biofilme em microplacas de 96 poços, conforme metodologia descrita por Amorim et al. (2020), com adaptações. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo Mueller-Hinton (MH) em cada poço da microplaca esterilizada, seguidos da adição de 100 µL da suspensão bacteriana contendo aproximadamente 1×10^8 UFC/mL, exceto nos poços destinados ao controle negativo. Para esses experimentos foi empregada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, amplamente reconhecida como modelo experimental para estudos de formação e erradicação de biofilmes, conforme descrito por Marchesani et al. (2025).

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para permitir a adesão bacteriana e o desenvolvimento do biofilme. Após esse período, o conteúdo dos poços foi cuidadosamente removido, e cada poço foi lavado com tampão fosfato-salino (PBS) para eliminar as células planctônicas. Em seguida, adicionaram-se 200 µL de caldo MH fresco contendo os compostos

avaliados (CBZ, CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD), nas concentrações correspondentes a 1 $\times$, 2 $\times$ e 4 $\times$ da concentração inibitória mínima (CIM).

Após nova incubação por 24 horas a 37 °C, o meio de cultura foi removido e os biofilmes foram novamente lavados com PBS. A fixação foi realizada mediante adição de 200 μ L de metanol por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e corados com solução de cristal violeta, permanecendo incubados por mais 15 min. O excesso de corante foi removido por lavagem em água corrente, e as placas permaneceram em temperatura ambiente até completa secagem.

Posteriormente, o corante retido foi solubilizado pela adição de 250 μ L de etanol, sendo a solução transferida para uma nova microplaca de 96 poços. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (ELISA) no comprimento de onda de 550 nm. Os valores de densidade óptica (DO) obtidos foram utilizados como medida indireta da biomassa residual do biofilme, sendo diretamente proporcionais à quantidade de biofilme remanescente após o tratamento.

4.7.3 Avaliação da interação fármaco-membrana

A interação entre os compostos e a membrana celular de *Staphylococcus aureus* foi investigada por meio da determinação do diâmetro hidrodinâmico (Dh) e do potencial zeta (PZ) das células bacterianas, na ausência e na presença do CBZ livre e dos respectivos complexos de inclusão (CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD), conforme metodologias descritas por Monteiro et al. (2011) e Suárez et al. (2014).

As análises foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments) (Figura 10), operando a 25 °C, com controle de temperatura por sistema Peltier. As suspensões bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram preparadas em solução salina estéril, ajustadas à escala 1 de McFarland e posteriormente diluídas na proporção de 1:3, obtendo-se aproximadamente 10⁸ células bacterianas por mL.

Cada suspensão foi transferida para cubetas de polietileno com caminho óptico de 1 cm e submetida à incidência de um laser He-Ne de 4 mW (λ = 633 nm), com detecção da luz espalhada a 90°. O diâmetro hidrodinâmico foi determinado pela média de cinco medidas independentes, sendo cada medida composta por cinco contagens consecutivas.

Para os experimentos, foram preparadas soluções aquosas contendo CBZ, β CD, HP β CD, CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD na concentração de 5,0 mM. Em seguida, foram realizadas 51 injeções sucessivas de 10,0 μ L dessas soluções em 1,5 mL da suspensão bacteriana,

permitindo o acompanhamento da interação entre os compostos e a superfície celular ao longo do processo de titulação.

Figura 10 – Zetasizer Nano ZS90 da Malvern.



Fonte: Almeida (2018).

A concentração dos sistemas foi calculada de modo que, após a metade das injeções (250 μ L adicionados), a concentração final de CBZ na cubeta correspondesse à concentração inibitória mínima (CIM) previamente determinada para *Staphylococcus aureus* (5 μ g/mL). As suspensões bacterianas foram preparadas a partir de colônias recém-repicadas (24 h), sendo todos os experimentos realizados no mesmo dia e utilizando a mesma suspensão de origem, a fim de minimizar variações relacionadas à concentração celular. Os dados obtidos foram tratados no software Microcal Origin® 9.0.

O potencial zeta foi determinado utilizando suspensões preparadas nas mesmas condições descritas para as medidas de diâmetro hidrodinâmico. As amostras foram transferidas para cubetas de vidro contendo a célula de medida (Dip Cell) e analisadas pelo módulo Zetasizer Nano ZS90 por meio da técnica de microeletroforese laser-Doppler (MELD), empregando ângulo de espalhamento de 173° e diferença de potencial alternada de 10 V. Os valores de potencial zeta foram calculados a partir da mobilidade eletroforética segundo o modelo de Smoluchowski. Para cada condição experimental foram realizadas cinco determinações independentes, cada uma composta por cinco contagens, sendo os resultados posteriormente tratados no software Microcal Origin® 9.0.

5 Resultados e Discussão

Nesta seção, discutiremos os resultados obtidos a partir dos ensaios realizados por meio das metodologias elencadas, demonstrando assim, o que esses dados significam quando comparados com a literatura científica da área.

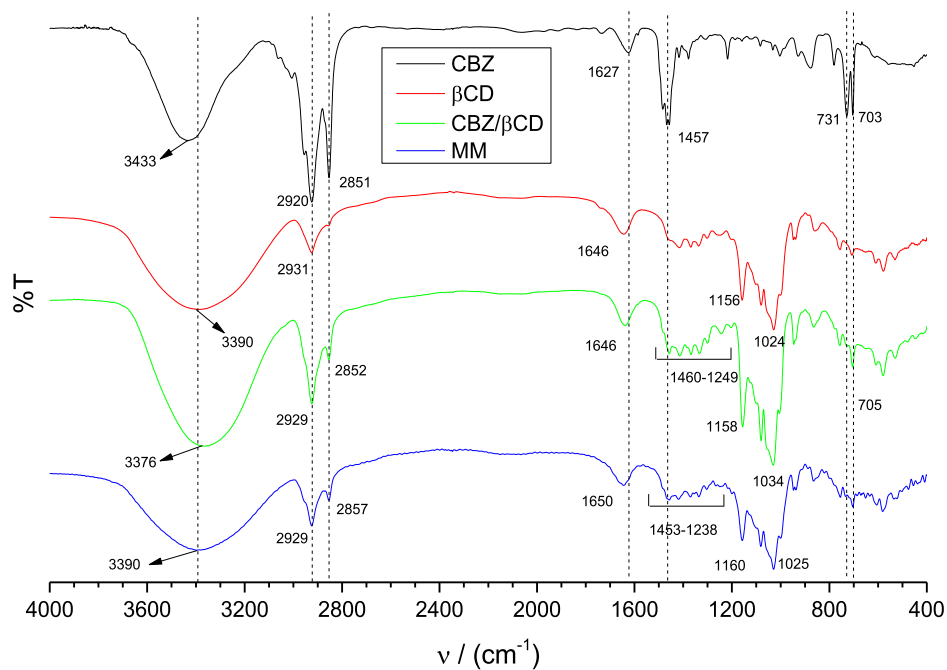
5.1 Caracterizações Dos Complexos

5.1.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) constitui uma das principais técnicas empregadas na caracterização estrutural de compostos orgânicos e sistemas supramoleculares, permitindo identificar grupos funcionais por meio dos seus modos vibracionais característicos (Farias *et al.*, 2019). Em sistemas de inclusão, as interações intermoleculares estabelecidas entre a molécula hóspede e a matriz hospedeira promovem alterações na distribuição eletrônica e no momento de dipolo das ligações químicas, ocasionando deslocamentos de frequência, modificações de intensidade e alterações no perfil das bandas espectrais. Dessa forma, a FTIR representa uma ferramenta importante para investigar evidências da formação de complexos de inclusão no estado sólido (Denadai *et al.*, 2006).

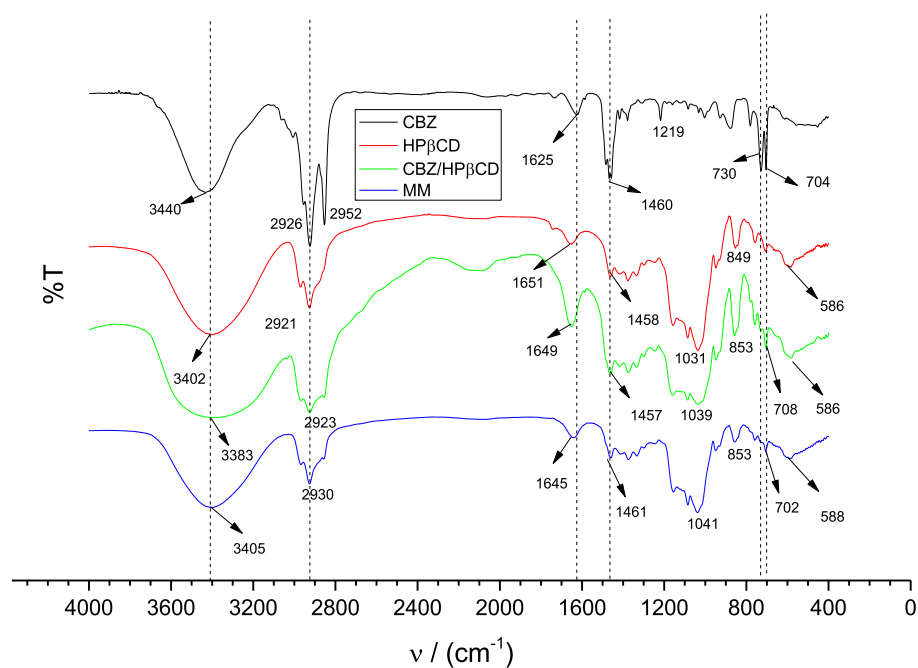
Neste estudo, a formação dos complexos entre o cloreto de benzalcônio (CBZ) e as ciclodextrinas foram investigadas por meio da comparação dos espectros de FTIR obtidos para os compostos puros, misturas mecânicas (MM) e complexos de inclusão (CI), na região espectral entre 4000 e 400 cm^{-1} . Os espectros correspondentes aos sistemas CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 - Espectros na região do infravermelho do CBZ, β CD, CBZ/ β CD e MM, em pastilhas de KBr.



Fonte: o autor (2026).

Figura 12 - Espectros na região do infravermelho do CBZ, HP β CD, CBZ/HP β CD e MM, em pastilhas de KBr.



Fonte: o autor (2026).

O espectro do CBZ apresentou bandas intensas em 2920 e 2851 cm^{-1} , atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico das ligações C–H dos grupos alifáticos (CH_2 e CH_3). Também foram observadas bandas em 1457 cm^{-1} , associadas à deformação angular do grupo metileno, e em 731 e 703 cm^{-1} , relacionadas às vibrações fora do plano dos anéis aromáticos monossustituídos. Além disso, verificaram-se bandas em 3433 e 1627 cm^{-1} atribuídas, respectivamente, ao estiramento e à deformação angular das ligações O–H provenientes de moléculas de água adsorvidas, comportamento compatível com a natureza higroscópica do composto.

O espectro da β CD apresentou as bandas características descritas na literatura, destacando-se uma larga banda centrada em aproximadamente 3390 cm^{-1} , atribuída aos estiramentos das ligações O–H das hidroxilas e das moléculas de água de hidratação. A banda observada em 2931 cm^{-1} corresponde aos estiramentos C–H da estrutura glicídica. Na região de menor número de onda, as bandas em aproximadamente 1156 e 1024 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos das ligações C–O e C–O–C, enquanto as absorções entre 950 e 650 cm^{-1} correspondem às vibrações do anel de piranose e das ligações glicosídicas características das ciclodextrinas (Neacsu *et al.*, 2013; Rizzi *et al.*, 2016).

Ao comparar os espectros da β CD e do complexo CBZ/ β CD, observa-se que o perfil espectral do complexo permanece predominantemente governado pelas bandas da ciclodextrina, comportamento frequentemente descrito para sistemas de inclusão devido à maior proporção molar da matriz hospedeira em relação ao composto encapsulado (Miranda *et al.*, 2020; Almeida, 2024). Entretanto, modificações importantes podem ser observadas. Houve aumento da intensidade das bandas na região entre 3100 e 2800 cm^{-1} , além do aparecimento das bandas em aproximadamente 1640 e 705 cm^{-1} , características do CBZ. Paralelamente, a banda atribuída aos estiramentos das ligações O–H deslocou-se de 3390 para 3376 cm^{-1} , indicando alterações no ambiente químico das hidroxilas da ciclodextrina, provavelmente decorrentes do estabelecimento de ligações de hidrogênio entre o hospedeiro e a molécula convidada. Também foram observados pequenos deslocamentos das bandas localizadas entre 1300 e 1100 cm^{-1} , associadas aos grupos C–O–C da estrutura glicídica, sugerindo modificações conformacionais induzidas pela complexação.

Resultados semelhantes foram observados para o sistema CBZ/HP β CD. O aumento da intensidade da banda entre 3100 e 2800 cm^{-1} , bem como o aparecimento das absorções em aproximadamente 1640 e 705 cm^{-1} , demonstram a presença do CBZ no sistema complexo.

Além disso, alterações nas bandas relacionadas às hidroxilas da HP β CD indicam que a interação entre o fármaco e a cavidade da ciclodextrina modificada também promove reorganização das ligações de hidrogênio presentes na matriz hospedeira, comportamento compatível com a formação de complexos de inclusão.

A comparação entre os espectros das misturas mecânicas e dos complexos obtidos por complexação/liofilização evidencia diferenças importantes. Embora pequenas alterações espectrais também sejam observadas nas misturas mecânicas, consequência do contato físico entre os componentes sólidos, essas modificações apresentam menor intensidade quando comparadas às verificadas nos complexos de inclusão. Esse resultado sugere que a síntese em meio aquoso favorece um contato molecular mais efetivo entre o CBZ e as ciclodextrinas, aumentando a probabilidade de inclusão parcial da cadeia hidrofóbica do surfactante na cavidade das CDs.

Em conjunto, os resultados obtidos por FTIR fornecem evidências consistentes da ocorrência de interações intermoleculares entre o cloreto de benzalcônio e as ciclodextrinas estudadas. Os deslocamentos de frequência, as alterações de intensidade e o aparecimento de novas bandas espectrais são compatíveis com a formação de complexos de inclusão, indicando modificações no ambiente químico tanto da molécula hóspede quanto da matriz hospedeira. Esses resultados corroboram os mecanismos supramoleculares descritos para sistemas baseados em ciclodextrinas e justificam a continuidade da caracterização por técnicas complementares, como análises térmicas, ressonância magnética nuclear e calorimetria isotérmica de titulação, capazes de fornecer informações adicionais sobre a estabilidade e a geometria dos complexos formados.

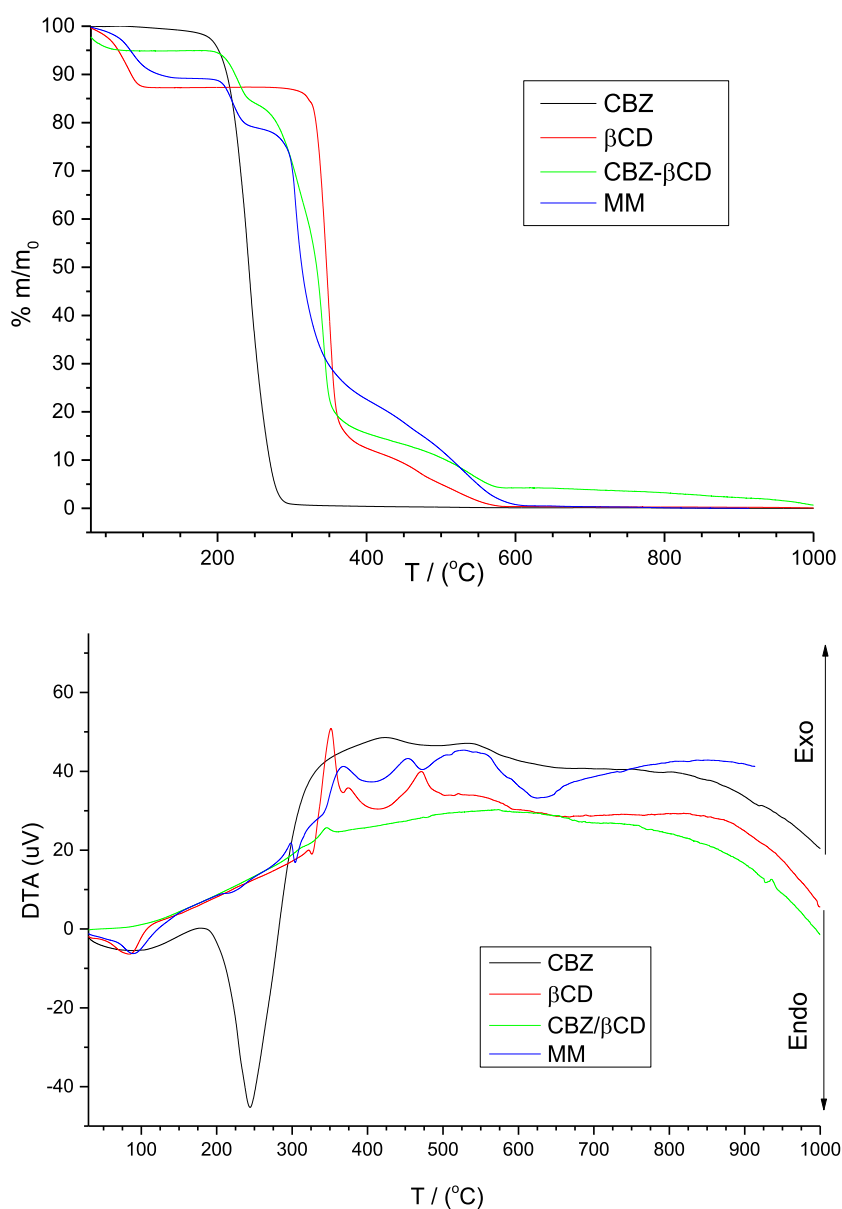
5.1.2 Análise térmica: termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA)

A Análise térmica pode ser realizada por dois métodos sendo eles a TGA (termogravimetria) e DTA (análise diferencial térmica). Consiste em métodos analíticos que objetivam comparar alterações nas propriedades térmicas dos complexos de inclusão e das respectivas misturas mecânicas em relação aos seus derivados puros. Existindo formação de complexos de inclusão (CI), São alteradas as propriedades térmicas intrínsecas dos respectivos compostos, sendo elas, alteração nas temperaturas de decomposição, que ocorre em função das novas interações intermoleculares estabelecidas (Yao *et al.*, 2014). Dessa forma, a análise térmica consiste em avaliar algumas importantes propriedades do sistema formado

fármaco/matriz, sendo a reação de decomposição, o conteúdo de umidade absorvida e estabilidade térmica (Sara *et al.*, 2020).

Nas Figuras 13 e 14 estão apresentadas as curvas TGA (a) e DTA (b) do CBZ, β CD, HP β CD, CBZ/ β CD, CBZ/ β CD e MM. Na Figura 13 estão apresentadas as curvas TGA (a) e DTA (b) do CBZ, β CD, CBZ/ β CD e MM.

Figura 13 - Curva termogravimétrica (a) e Curva térmica diferencial (b) do CBZ, β CD, CBZ/ β CD e MM



Fonte: o autor (2026).

Ao observar na figura 13(a), o CBZ apresentou um único evento de perda de massa, atribuído à decomposição, o qual ocorre em temperatura maior que 140 °C, tendo iniciado na faixa de 157 à 292°C. Na curva DTA, foi observado que esse evento é endotérmico com máxima absorção de energia na temperatura de 242 °C, o que pode ser associado ao processo de fusão do CBZ seguido da sua decomposição.

Como pode ser observada na Figura 13(a), o primeiro evento de perda de massa da β CD foi de 12,5% da massa total, que ocorreu na faixa de 34 a 100 °C, sendo atribuído à desidratação. O segundo evento de perda de massa, referente ao pico exotérmico em 350 °C na curva da DTA, Já na curva da TGA ocorre na faixa de 301 a 364 °C, o que corresponde a 69,5% de perda de massa total, atribuída à primeira decomposição, o intervalo de 364 à 567 °C atribuído à calcinação.

Como já mencionado, a curva TGA da β CD pura exibe intensa etapa de desidratação na faixa de 34 °C a 99,7 °C, enquanto CBZ/ β CD apresenta padrão térmico diferente nessa mesma etapa, perdendo apenas 5% da massa ao invés de 12,5% (β CD pura) em uma nova faixa de 34°C à 61,6°C. Essas diferenças mostram que a complexação afetou as interações entre a água e o oligossacarídeo. O complexo ficou estável sem variação na massa na faixa de 61,6 °C até a temperatura 192,9 °C, demonstrando comportamento térmico distinto do oligossacarídeo na forma pura já que sua faixa de estabilidade foi de 104 à 300 °C e do CBZ puro que apresentou na faixa de 34 °C à 170 °C demonstrando provavelmente novas interações intermoleculares novas do CBZ com a β CD, sugerindo que a presença da porção alifática hidrofóbica do CBZ no complexo, reduziu a interação de água por ligações de hidrogênio entre os grupamentos polares da cavidade da β CD, especialmente os grupos O-H.

Quando analisamos as curvas de TGA e DTA da MM são observados fenômenos relacionados à β CD e ao CBZ, com algumas diferenças no perfil térmico. Inclusive, a curva de DTA demonstra picos endotérmicos e exotérmicos não coincidentes com o complexo de inclusão CBZ/ β CD. O perfil da curva de DTA da MM é mais próximo ao perfil da curva da β CD pura completamente distinto do perfil da curva do complexo de Inclusão, o que demonstra um significativo novo número de interações entre fármaco matriz.

O complexo de inclusão CBZ/ β CD apresenta comportamento térmico distinto dos seus precursores e também da MM (Tabela 2). Foi observada, no complexo de inclusão, perda de interação com H₂O residual, quando comparado à β CD pura, sendo que a desidratação ocorreu em uma faixa de temperatura inferior (34,0 a 61,6 °C). O fenômeno da decomposição do

complexo de inclusão CBZ/ β CD conforme figura 13(a) tem início em 201,5 °C, sendo a temperatura superior à temperatura determinada para o CBZ (156,9 °C) e também para a MM (195 °C), o que demonstra uma maior estabilidade térmica/perfil térmico do complexo de inclusão quando se compara ao CBZ puro e assim houve, de fato, a formação de novas interações entre fármaco/matriz formando o complexo de inclusão (CI).

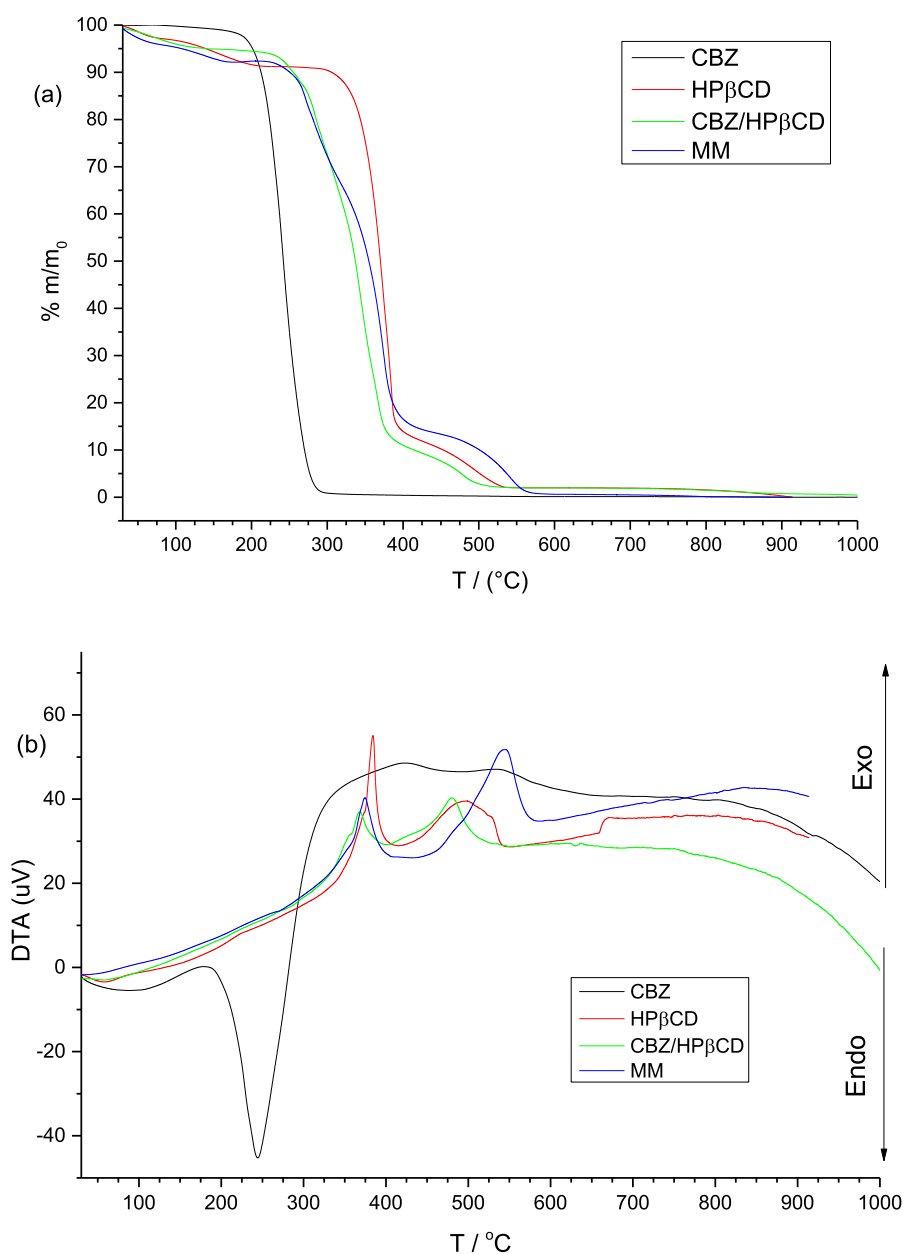
Tabela 2 - Principais eventos térmicos atribuídos ao CBZ, β CD, CBZ/ β CD e MM

Material	1ª Perda de massa (%)	Intervalo de temp (°C)	2ª Perda de massa (%)	Intervalo de temp. (°C)	3ª Perda de massa (%)	Intervalo de temp. (°C)
CBZ	98,0	156,9 - 292,0	-	-	-	-
β CD	12,5	34,0 - 99,7	69,5	344,0 - 566,8	-	-
CBZ/ β CD	5,0	34,0 - 61,6	90,0	202,0 - 573,0	2,45	578,0 - 940,0
MM	10,5	34,0 - 136,0	88,0	195,0 - 599,0	-	-

Fonte: o autor (2026).

Na Figura 14 estão apresentadas as curvas de TGA (a) e DTA (b) do CBZ, HP β CD, CBZ/HP β CD e MM.

Figura 14 - Curva termogravimétrica (a) e Curva térmica diferencial (b) do CBZ, HP β CD, CBZ/HP β CD e MM



Fonte: o autor (2026).

Analisando a curva DTA e TGA da HP β CD pura, encontra-se um primeiro pico endotérmico onde ocorre a primeira etapa de perda de massa (9%), o qual sugere uma desidratação, que se encontra na faixa de 32 °C à 209 °C. Uma fração da água residual está retida na cavidade interana da HP β CD, fato que impede toda a sua evaporação e dessa forma amplia a faixa de temperatura do processo (Cetin Babaoglu *et al.*, 2017). Logo em seguida é

encontrado mais duas etapas de degradação, sendo uma a 288 °C e o outro em torno de 391 °C até 528,45 °C, sendo assim todas as duas etapas atribuídas à decomposição final da HPβCD pura.

A MM apresentou um perfil térmico próximo ao seu respectivo CI CBZ/HPβCD, sugerindo dessa forma que ocorreu interação entre o CBZ e a HPβCD mesmo no estado sólido, pois o estado deliquescente do CBZ sugere também essa possibilidade ao realizar a mistura. Entretanto, quando se compara as faixas de temperatura em que ocorre perda de massas entre as curvas CI e MM, apresentam temperaturas diferentes do processo de perda se comparado aos precursores e também entre o CI e a MM.

O CBZ/HPβCD demonstrou em sua curva da primeira etapa de decomposição ser mais estreita quando comparado à curva referente à mesma etapa da HPβCD pura, sugerindo que a reação processou em maior velocidade. O CI apresentou alteração nas faixas de temperatura em todas as etapas de perda de massa quando se comparado aos precursores, sugerindo que ocorre a encapsulação em proporções equimolares. Iniciando pela etapa de desidratação de CBZ/HPβCD (até 116,62 °C), cuja a temperatura é inferior à da HPβCD para a mesma etapa. Sugere que ocorreu redução das moléculas de água residuais. Porém, é sugestivo que a encapsulação foi mais efetiva para a proporção equimolar, considerando que CBZ/HPβCD desidratou menos e numa faixa de temperatura inferior, conforme a Tabela 3.

O CBZ puro obteve 99% de perda de massa, que é devido ao processo de decomposição, a 295 °C. Foi observada perda semelhante para o complexo CBZ/HPβCD a 503 °C. Sugerindo que o CBZ presente na cavidade da molécula de HPβCD foi dessa forma protegido, e assim aumentado a sua estabilidade térmica.

Tabela 3 - Principais eventos térmicos atribuídos ao CBZ, HPβCD, CBZ/HPβCD e MM

Material	1ª Perda de massa (%)	Intervalo Temp (°C)	2ª Perda de massa (%)	Intervalo Temp. (°C)	3ª Perda de massa (%)	Intervalo Temp. (°C)
CBZ	98	156,9-292	-	-	-	-
HPβCD	9	32-209	75,11	288-391	13,59	391-528,45
CBZ/HPβCD	6	32-116	79,5	221-376	12	376-511
MM	7,6	32-161	72,5	227-388	19	388-575

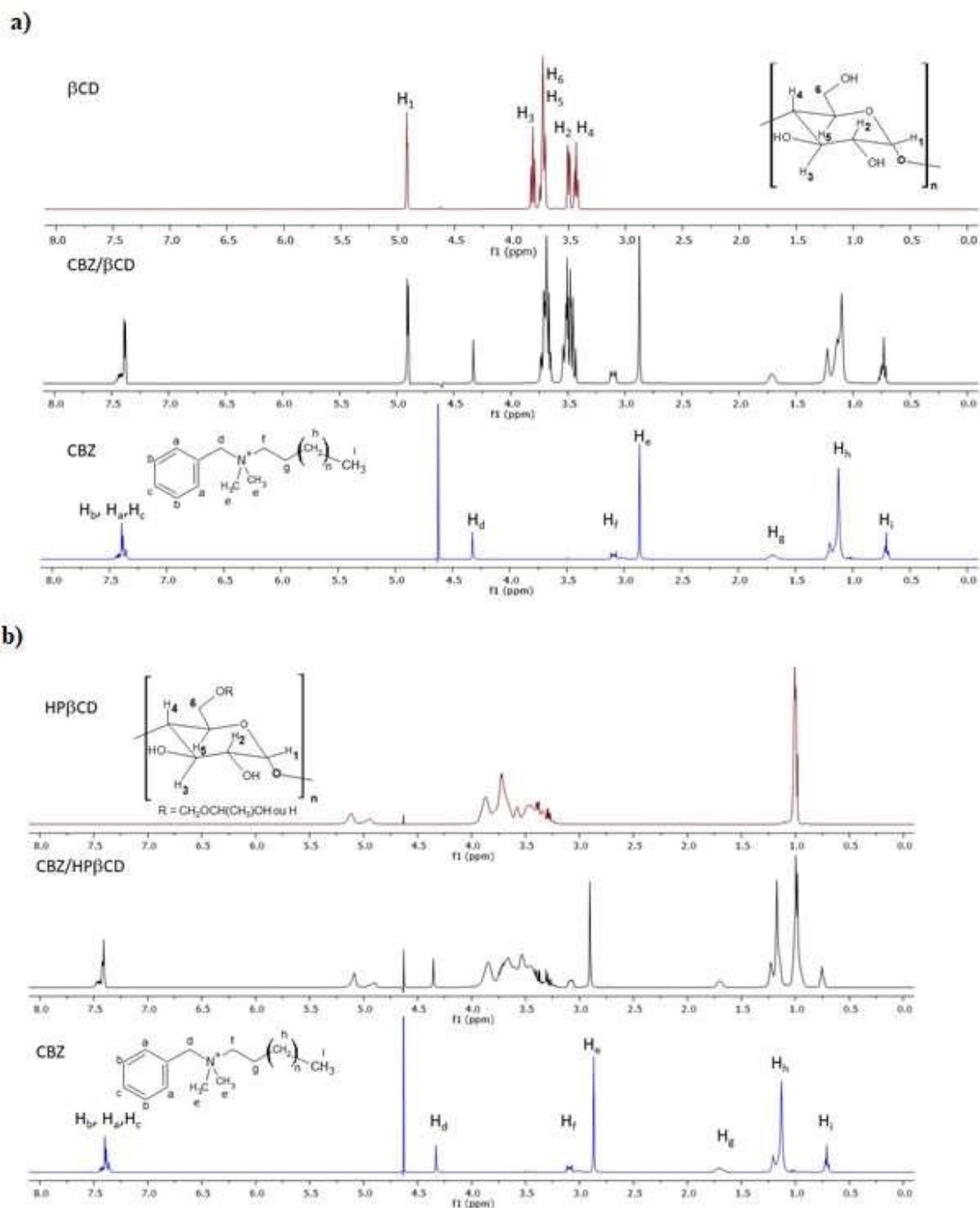
Fonte: o autor (2026).

5.1.3 Caracterização estrutural dos complexos de inclusão CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD por RMN de ^1H e NOESY

A técnica de RMN de ^1H (Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear) foi empregada nesse trabalho no intuito de elucidar as possíveis interações supramoleculares que foram estabelecidas na complexação do cloreto de benzalcônio (CBZ) e as matrizes hospedeiras de ciclodextrinas: β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD). A RMN de ^1H é uma das técnicas analíticas mais empregadas na caracterização de compostos do tipo complexos de inclusão, tendo em vista que mudanças nos deslocamentos químicos indicam modificações no ambiente químico, elucidando informações importantes sobre a formação de interações dos complexos supramoleculares (Schneider *et al.*, 1998; Pilipovic *et al.*, 2025).

A Figura 15 está apresentado os espectros obtidos de RMN de ^1H dos compostos livres e dos complexos de inclusão obtidos. A figura (a) apresenta o sistema CBZ/ β CD e figura (b) o sistema CBZ/HP β CD. Os sinais obtidos no espectro para o CBZ, atribui-se aos prótons do anel aromático do grupamento benzílico (Ha–Hc), já os prótons metilênicos adjacentes ao nitrogênio quaternário (Hd–Hf) e aos grupamentos metileno e metila da cadeia alquílica (Hg–Hi). As ciclodextrinas, atribuíram-se os sinais dos prótons H1–H6, que estão distribuídos entre δ 3,4 e 5,0 ppm, e que estão em concordância com dados descritos na literatura (Jopa *et al.*, 2024).

Figura 15 - Comparação dos espectros de RMN de ^1H do cloreto de benzalcônio, das ciclodextrinas e dos respectivos complexos de inclusão: (a) sistema CBZ/ β CD; (b) sistema CBZ/HP β CD.



Fonte: O autor (2026).

Ao comparar os espectros das substâncias livres e dos complexos, evidenciaram-se modificações relevantes que corroboram com a formação de complexos de inclusão. Os deslocamentos químicos mais acentuados observados para o CBZ ocorreram nos prótons aromáticos Ha, Hb e Hc. No complexo de inclusão CBZ/ β CD foram obtidos deslocamentos (Ver tabela 4) de $-0,016$, $-0,027$ e $-0,041$ ppm, respectivamente. Para o sistema CBZ/HP β CD os valores (Ver tabela 5) obtidos foram de $-0,026$, $-0,037$ e $-0,053$ ppm. As alterações indicam que o ambiente químico da região aromática da molécula é significativamente alterado pela complexação, sugerindo que a região aromática modifica seus deslocamentos pela alteração no ambiente químico (Debnath *et al.*, 2024). Os maiores valores dos deslocamentos químicos obtidos para o complexo de inclusão contendo HP β CD corrobora que sua interação de maior magnitude ocorre entre a molécula hóspede (cloreto de benzalcônio) e a cavidade hospedeira.

Tabela 4 - Deslocamentos químicos (δ) e variações de deslocamento químico ($\Delta\delta$) dos prótons do cloreto de benzalcônio na ausência e na presença de β -ciclodextrina.

Próton	δ CBZ (ppm)	δ CBZ/ β CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
Ha	7,389	7,405	-0,016
Hb	7,423	7,450	-0,027
Hc	7,359	7,400	-0,041
Hd	4,324	4,35	-0,026
He	2,867	2,894	-0,027
Hf	3,093	3,122	-0,029
Hg	1,705	1,731	-0,026
Hi	0,706	0,755	-0,049
	δ β CD (ppm)	δ CBZ/ β CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H1	4,923	4,925	-0,002
H2	3,505	3,550	-0,045
H3	3,819	3,743	0,076
H4	3,437	3,454	-0,017
H5	3,720	3,687	0,033
H6	3,740	3,713	0,027

Fonte: O autor (2026).

Os valores positivos de $\Delta\delta$ indicam blindagem magnética dos prótons, enquanto valores negativos refletem desblindagem (desblindagem), decorrentes da redistribuição eletrônica provocada pela aproximação espacial entre o hóspede e a cavidade das ciclodextrinas. Em

sistemas supramoleculares, essas alterações constituem um dos principais indicativos da formação de complexos de inclusão (Schneider *et al.*, 1998).

Os prótons H3 e H5 encontram-se orientados para o interior da cavidade hidrofóbica da β CD. Enquanto H3 está localizado próximo à abertura mais larga da molécula, H5 encontra-se em posição mais profunda na cavidade. Dessa forma, alterações simultâneas nesses dois sinais constituem forte evidência de encapsulamento molecular, permitindo inclusive inferir a orientação preferencial da molécula hóspede no interior da cavidade.

Tabela 5 - Deslocamentos químicos (δ) e variações de deslocamento químico ($\Delta\delta$) dos prótons do cloreto de benzalcônio na ausência e na presença de hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Próton	δ CBZ (ppm)	δ CBZ/HP β CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
Ha	7,389	7,415	-0,026
Hb	7,423	7,460	-0,037
Hc	7,359	7,412	-0,053
Hd	4,324	4,354	-0,03
He	2,867	2,904	-0,037
Hf	3,093	3,082	0,011
Hg	1,705	1,700	0,005
Hi	0,706	0,753	-0,047
δ HP β CD (ppm)			
H1	Complexo de ser determinando		
H2	Complexo de ser determinando		
H3	Complexo de ser determinando		
H4	Complexo de ser determinando		
H5	Complexo de ser determinando		
H6	Complexo de ser determinando		

Fonte: O autor (2026).

Perfil semelhante foi obtido para os prótons benzílicos e para parte da cadeia alquílica do cloreto de benzalcônio. Os prótons Hd e He apresentaram deslocamentos químicos mais acentuados na presença da HP β CD quando comparado à β CD, corroborando a hipótese de que a molécula hóspede encontra-se inserida em um ambiente de natureza hidrofóbica e que é tem o potencial de alterar a distribuição eletrônica ao longo de diferentes regiões da estrutura

química do CBZ. De uma forma global, os resultados obtidos sugerem que experimentos de RMN de ^1H isoladamente não são suficientes compreender a geometria/orientação da inclusão sendo necessários experimentos bidimensionais. Mas é suficiente para sugerir que ocorreram mudanças no ambiente químico após a inclusão molecular tanto na região do anel aromático, quanto também na parte da cadeia alifática.

Os resultados dos deslocamentos químicos dos prótons da βCD apresentaram alterações dos hidrogênios localizados dentro da cavidade. O próton H3 obteve o maior deslocamento químico ($\Delta\delta = +0,076$ ppm), seguido pelos prótons H5 ($\Delta\delta = +0,033$ ppm) e H6 ($\Delta\delta = +0,027$ ppm), enquanto o próton H1 apresentou variação praticamente desprezível. Considerando que os prótons H3 e H5 estão orientados para o interior da cavidade hidrofóbica da ciclodextrina, tais resultados constituem forte evidência da formação de um complexo de inclusão. A perturbação observada nesses sinais demonstra a proximidade espacial entre o CBZ e a região interna da βCD , corroborando a ocorrência do encapsulamento molecular no processo de formação do complexo de inclusão.

Para a $\text{HP}\beta\text{CD}$, a determinação individual dos deslocamentos químicos dos prótons H1–H6 mostrou-se inviável devido ao elevado alargamento e à sobreposição dos sinais. Esse comportamento é característico dessa ciclodextrina modificada, cuja distribuição estatística de grupos hidroxipropila produz múltiplos ambientes químicos distintos. Apesar dessa limitação, a comparação visual dos espectros revelou alterações expressivas na região correspondente aos prótons da cavidade, indicando que a presença do CBZ modifica significativamente o ambiente químico da $\text{HP}\beta\text{CD}$. O maior alargamento observado para esse sistema sugere maior flexibilidade conformacional e a possibilidade de diferentes modos de acomodação do hóspede dentro da cavidade do hospedeiro.

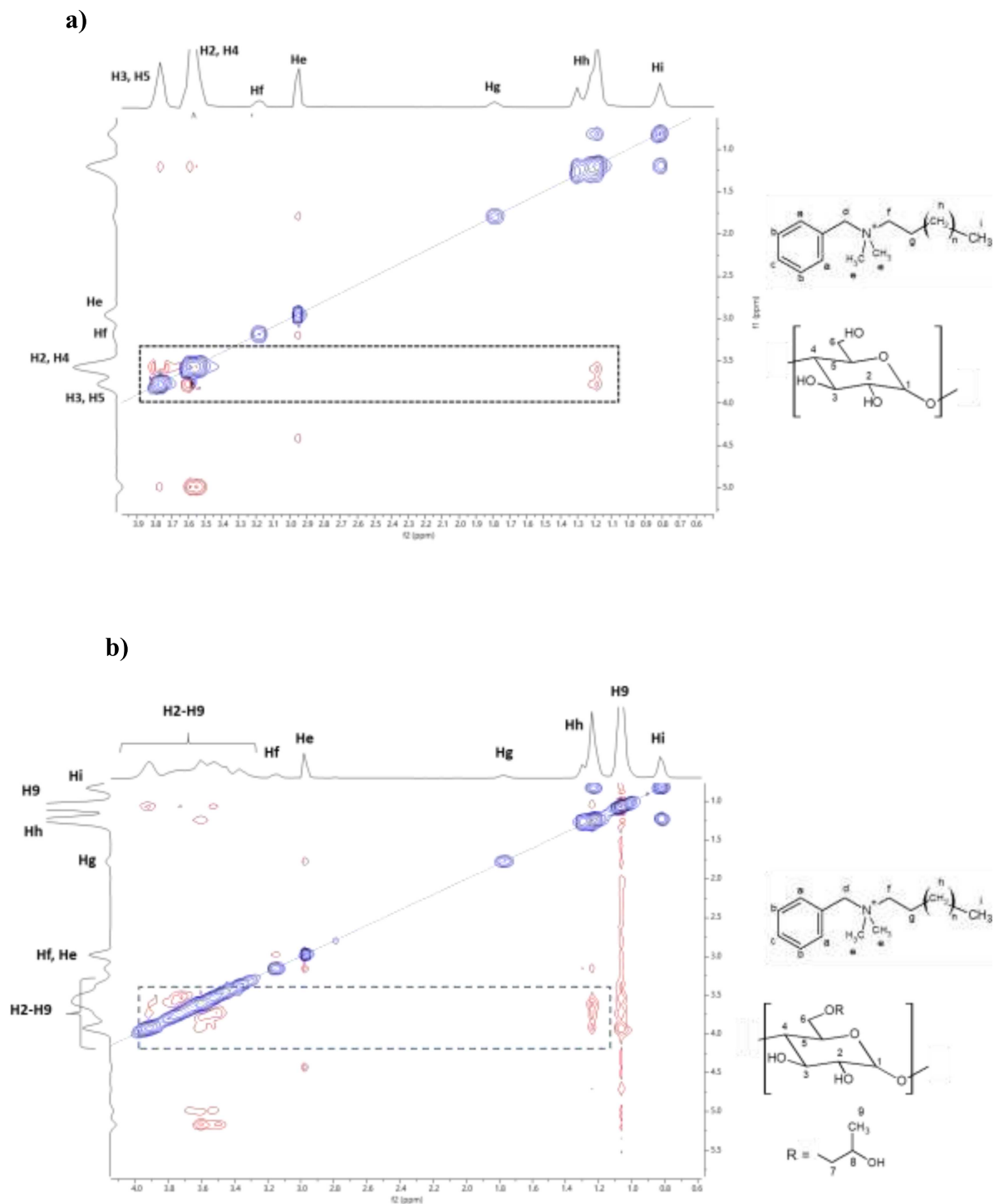
Em conjunto, os resultados obtidos por RMN de ^1H demonstram a formação de complexos de inclusão entre o cloreto de benzalcônio e ambas as ciclodextrinas avaliadas. As alterações observadas para os prótons aromáticos do CBZ, associadas às perturbações verificadas nos prótons internos da βCD e também aos alargamentos dos sinais da $\text{HP}\beta\text{CD}$. Além disso, a $\text{HP}\beta\text{CD}$ apresentou perturbações espectrais mais pronunciadas, sugerindo maior capacidade de acomodação molecular quando comparada à matriz βCD ambas empregadas para formação de complexo de inclusão com o CBZ (Debnath *et al.*, 2024).

Os experimentos bidimensionais de NOESY (Figura 16a-b) reforçam as evidências obtidas por RMN de ^1H quanto à formação dos complexos de inclusão entre o cloreto de benzalcônio e as ciclodextrinas.

O efeito Overhauser Nuclear (NOE) é observado somente quando os núcleos estão separados por distâncias inferiores à 5 Å. Dessa forma, a presença de correlações cruzadas entre os prótons aromáticos do CBZ e os prótons H3/H5 das ciclodextrinas constitui evidência direta da proximidade espacial entre essas regiões moleculares. Diferentemente dos experimentos unidimensionais de RMN, que detectam alterações eletrônicas, os experimentos NOESY fornecem informações estruturais tridimensionais, permitindo confirmar que as alterações observadas nos deslocamentos químicos decorrem efetivamente do processo de encapsulamento molecular e não apenas de interações intermoleculares em solução.

De forma integrada, os resultados obtidos por RMN de ^1H e NOESY demonstram que o cloreto de benzalcônio forma complexos de inclusão estáveis tanto com βCD quanto com $\text{HP}\beta\text{CD}$. As alterações observadas nos deslocamentos químicos, associadas às correlações espaciais identificadas pelos experimentos bidimensionais, indicam que apenas a cadeia alifática do CBZ encontram-se inserida na cavidade hidrofóbica das ciclodextrinas já que é encontrado uma correlação do hidrogênio Hh com os hidrogênios H3 e H5 do interior da cavidade hidrofóbica da ciclodextrina. A maior magnitude das perturbações espectrais e o maior número de correlações observadas para o sistema CBZ/ $\text{HP}\beta\text{CD}$ sugerem que essa matriz apresenta maior capacidade de acomodação molecular, resultado que será posteriormente corroborado pelas análises termodinâmicas, coloidais e pelos ensaios biológicos.

Figura 16 - (a) experimentos bidimensionais NOESY CBZ/ β CD, (b) experimentos bidimensionais NOESY CBZ/HP β CD



Em ambos os sistemas, as correlações cruzadas observadas entre os prótons alifáticos do CBZ e os prótons localizados no interior da cavidade das ciclodextrinas confirmam a proximidade espacial característica do processo de encapsulamento. No sistema CBZ/HP β CD (Figura 16b), o maior número e a maior intensidade das correlações sugerem uma interação supramolecular mais extensa quando comparada ao complexo CBZ/ β CD (Figura 16a), corroborando a maior flexibilidade conformacional e capacidade de acomodação da HP β CD (Ueda *et al.*, 2024).

5.1.4 Caracterização coloidal dos sistemas CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD

A técnica analítica por espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês, *dynamic light scattering*) é empregada objetivando determinar o tamanho médio de partículas em suspensão colóide, seu é mecanismo emprega a incidência luminosa (por um feixe de laser) em uma suspensão de partículas sujeitas ao movimento Browniano. O diâmetro hidrodinâmico (D_h) é um parâmetro físico-químico que é aferido pela medida da flutuação da intensidade de luz espalhada em função do tempo, sendo que sistemas constituídos por partículas pequenas na dispersão, ocorrerá com maior velocidade (Gordillo-Galeano; Mora-Huertas, 2021). A velocidade do movimento browniano é indicada pelo coeficiente de difusão translacional (D). O tamanho determinado por essa técnica corresponde ao diâmetro de uma esfera com o mesmo coeficiente de difusão translacional da partícula. Utilizando o valor de D obtido na Equação 1, é viável calcular o D_h por meio da equação de Stokes-Einstein (Equação 1) (Mahjoub; Aouissi; Othman, 2018):

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta D_h} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: D_h = diâmetro hidrodinâmico (nm), D = coeficiente de difusão translacional, k = constante de Boltzmann, T = temperatura absoluta e η = viscosidade do meio.

Neste trabalho foram conduzidas medições de DLS para investigar o efeito das ciclodextrinas no diâmetro hidrodinâmico (D_h) das moléculas de CBZ (Figuras 17(a) e 17(b)).

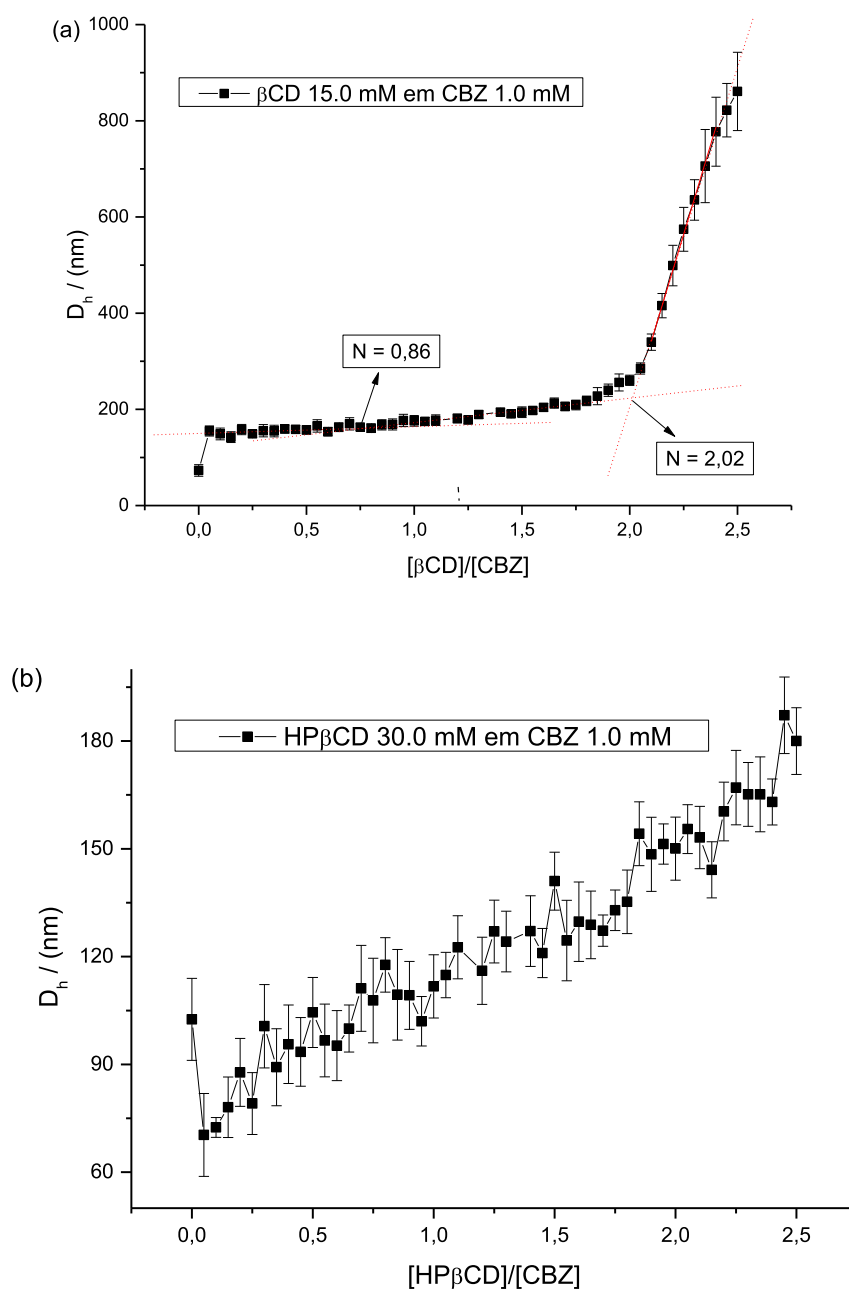
O gráfico da Figura 17(a) mostra que à medida que se titula β CD em CBZ, ocorre um aumento discreto dos valores de tamanho de partícula até a razão de aproximadamente 0,86, próximo faixa de 200 nm. A manutenção do tamanho em valores de até $\approx$ 200 nm em 0,86 nos leva a sugerir que esta concentração se refere à estequiometria 1:1 e que as estruturas são formadas por agregados de compostos de inclusão, com algum modo de inclusão preferencial.

Após $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}] = 0,86$ ocorre um pequeno aumento do D_h sugerindo alteração das propriedades físico-químicas da solução, o que pode estar relacionado com novos nanoagregados. Acima de 2,0 mM ocorre elevação repentina nos valores de D_h atribuída à formação de estruturas supramoleculares de estequiometria ainda maiores, possivelmente com diversos modos de inclusão.

Na titulação no sistema CBZ/HP β CD (Figura 17(b)), observa-se desde o início um aumento de tamanho de partícula a partir injeções de titulantes contendo HP β CD. O comportamento da curva é praticamente linear durante todo o processo, sem nenhuma inflexão, o que demonstra um aumento do tamanho de nanoagregados ao longo das injeções, ficando entre 60 a 180 nm.

É importante ressaltar que o CBZ puro, sendo um surfactante, é capaz de sofrer auto-organização em micelas. A presença de ciclodextrinas, contudo, tende a desfazer micelas levando à formação de compostos de inclusão. Porém, em concentrações de ciclodextrinas acima de ≈ 1 mM, na presença de moléculas hóspede, tem sido comum a formação de agregados de compostos de inclusão de elevada estequiometria, conforme visto por Denadai *et al.* (2006) no sistema β CD/hidroclorotiazida; por De Sousa *et al.* (2012) no sistema β CD/ampicilina; e por De Paula, *et al.* no sistema HP β CD/Losartan (2011). Além desses sistemas, a possibilidade de agregação de compostos de inclusão ou mesmo das ciclodextrinas puras tem sido extensivamente revisado por Messner, Kurkov, Flavià-Piera, Brewster e Loftsson (2011) e por Do, Van Hooghten e Mooter (2017).

Figura 17 – Variação do diâmetro hidrodinâmico de soluções de CBZ 1mM em função da concentração de β CD (a) e de HP β CD (b), com ângulo de espalhamento a 90° à 25 °C



Fonte: o autor (2026).

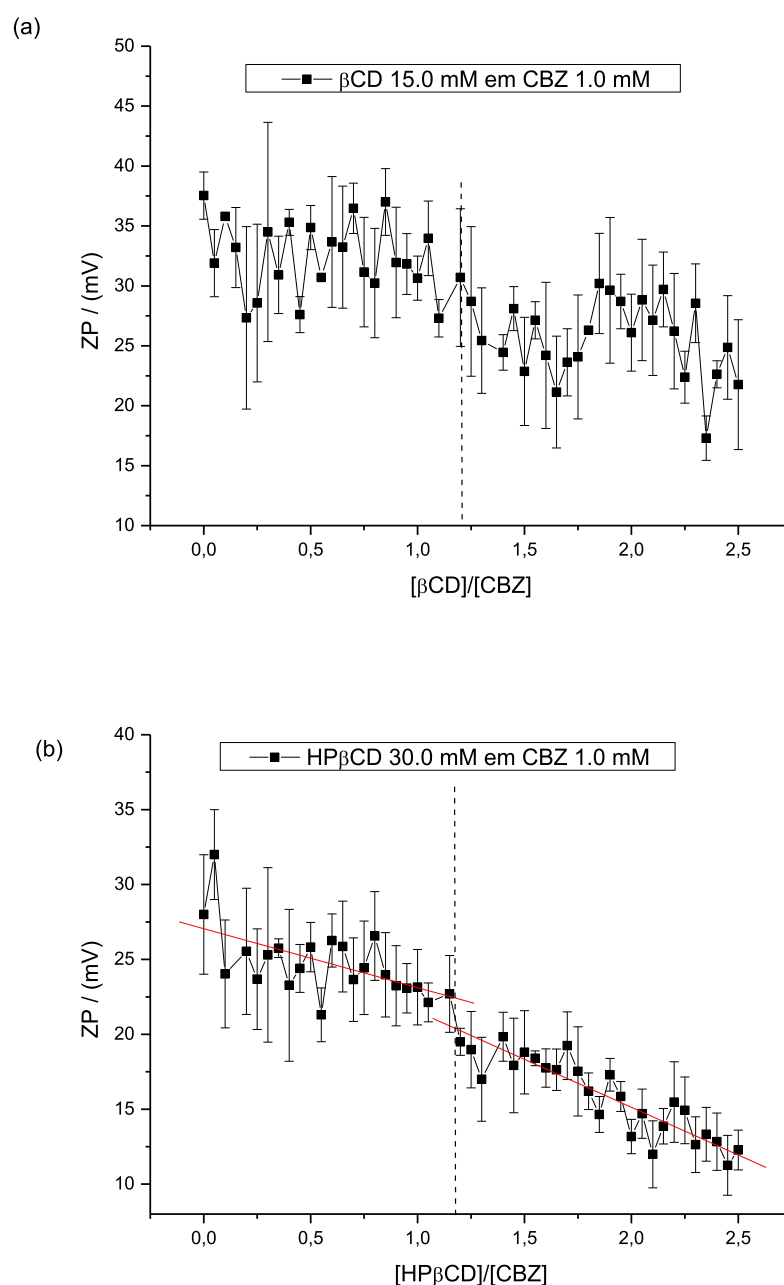
Medidas de potencial zeta também foram realizadas afim de melhor caracterizar os sistemas em termos de cargas superficiais. No presente estudo, foi detectado o valor de ZP ($\approx +37,5$ mV) no início das titulações, decorrente do caráter catiônico do CBZ. Os valores de ZP

obtidos durante o experimento são mostrados na Figura 18(a). Observa-se que os valores médios de *ZP* durante as titulações vão se tornando menores, devido à neutralização de cargas negativas do CBZ ocasionada pela presença da β CD, devido ao encapsulamento molecular. É importante ressaltar que as ciclodextrinas são moléculas ricas em hidroxilas que são parcialmente ionizadas ($pK_a = 12.2$), formando ânions, que por sua vez podem neutralizar as espécies CBZ^+ (Ohta; Takatani; Kawakishi, 2004).

A curva mostra uma ligeira inflexão nos valores de *ZP* a partir da razão 1,2 mM, apontando um ponto estequiométrico. Ao longo das titulações subsequentes, o *ZP* continua reduzindo, o que corrobora com os valores de D_h discutidos acima para formação de novos nanoagregados, apontando para uma inversão de carga.

Ao analisar os resultados de *ZP* ao longo das titulações de HP β CD (Figura 18(b)), observou-se que os valores de *ZP* foram reduzindo à medida que aumentou a concentração de HP β CD e complexos no meio. No início o valor médio de +30 mV de *ZP*, atribuídos à presença dos grupos quaternários de amônio com caráter catiônico, sugere a estabilidade da dispersão. À medida que se adiciona HP β CD, ocorre a redução do *ZP*, sugerindo também que pode ser em decorrência da neutralização de moléculas de CBZ por ciclodextrinas parcialmente ionizadas.

Figura 18 - (a) Variação do potencial zeta da solução de CBZ a 1 mM em função das concentrações de β CD e (b) do potencial zeta da solução de CBZ a 1 mM em função das concentrações de HP β CD, com ângulo de espalhamento de 173°, a 25 °C

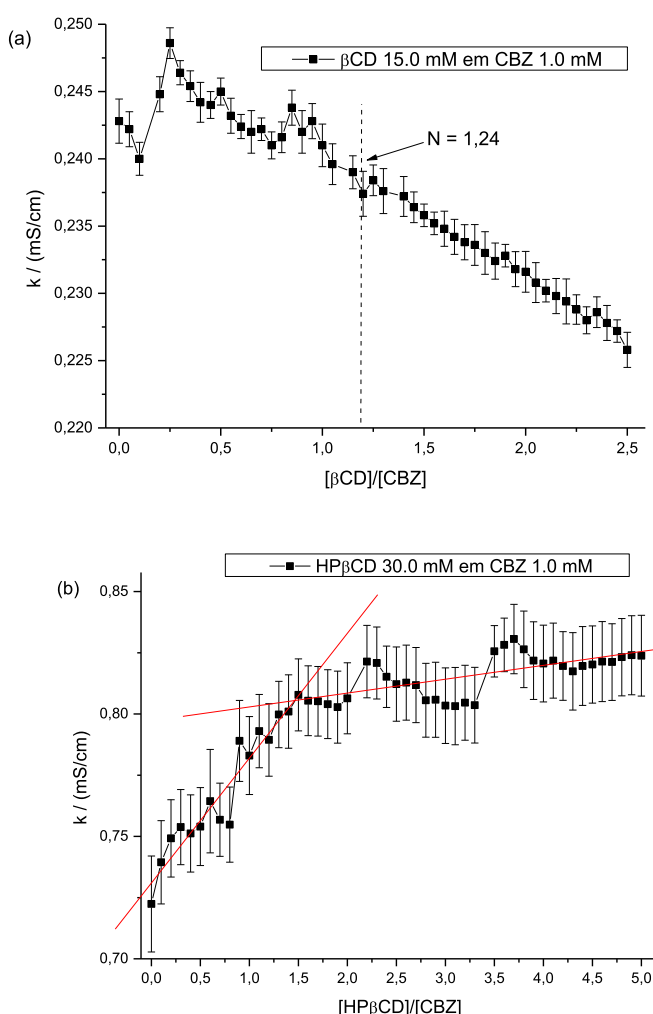


Fonte: o autor (2026).

A Figura 19(a) mostra os valores de condutividade elétrica para o sistema CBZ/ β CD ao longo das titulações. A condutividade do CBZ em água é determinada pelos pelo

comportamento catinônico do íon benzalcônio $C_{21}H_{38}N^+$, e íons cloreto (Cl^-). Durante a formação dos complexos, ocorre uma redução da condutividade elétrica em função da concentração de β CD, que pode ser explicado assim como no *ZP*, pelo encapsulamento molecular e a minimização do comportamento catiônico do CBZ. O resultado corrobora com os estudos anteriores de D_h e *ZP*. Neste sistema, o aumento da concentração de β CD leva a uma redução da condutividade devido à formação de grandes agregados, conforme demonstrado por DLS.

Figura 19 - (a) Variação da condutividade elétrica da solução de CBZ a 1 mM em função das concentrações de β CD (b) da condutividade elétrica da solução de CBZ a 1 mM em função das concentrações de HP β CD, com ângulo de espalhamento de 173° , a $25^\circ C$



Fonte: o autor (2026).

A análise conjunta dos resultados de diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e condutividade elétrica demonstra que a complexação entre o cloreto de benzalcônio e as ciclodextrinas modifica significativamente as propriedades coloidais do sistema em solução aquosa. Embora cada técnica investigue uma propriedade físico-química distinta, todas convergem para a mesma interpretação: a formação progressiva de complexos de inclusão seguida da organização desses complexos em agregados supramoleculares de maior ordem.

No sistema CBZ/ β CD, os resultados de DLS evidenciam inicialmente um aumento discreto do diâmetro hidrodinâmico até aproximadamente a razão molar β CD/CBZ igual a 0,86, sugerindo que essa região corresponde predominantemente à formação de complexos de inclusão de estequiometria 1:1. A manutenção do tamanho médio em torno de 200 nm indica que os agregados formados apresentam relativa uniformidade estrutural nessa faixa de concentração. Entretanto, acima desse ponto observa-se novo crescimento do diâmetro hidrodinâmico, indicando que, após o preenchimento da maior parte das moléculas de CBZ disponíveis, os próprios complexos passam a interagir entre si, formando agregados supramoleculares maiores. Esse comportamento tem sido descrito para diversos sistemas envolvendo ciclodextrinas, nos quais os complexos de inclusão deixam de atuar como entidades isoladas e passam a constituir nanoestruturas organizadas por interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals.

Por outro lado, o sistema CBZ/HP β CD apresentou comportamento distinto. O crescimento praticamente linear do diâmetro hidrodinâmico ao longo de toda a titulação indica que a formação dos agregados ocorre de maneira gradual, sem a presença de um ponto de transição bem definido. A maior flexibilidade conformacional da HP β CD, decorrente da substituição por grupos hidroxipropila, provavelmente favorece diferentes modos de acomodação do CBZ dentro da cavidade, produzindo populações de agregados com dimensões menores e distribuição mais homogênea quando comparadas ao sistema contendo β CD natural. Esse comportamento é compatível com resultados previamente descritos para derivados hidroxipropilados de ciclodextrinas, cuja elevada solubilidade e menor tendência à cristalização favorecem a formação de sistemas coloidais mais estáveis.

Os resultados obtidos por potencial zeta complementam diretamente as observações obtidas por DLS. O elevado potencial zeta inicial observado para o CBZ confirma a elevada densidade de cargas positivas associadas ao grupamento amônio quaternário presente na molécula. À medida que ocorre a adição das ciclodextrinas, observa-se redução progressiva dos valores de potencial zeta, indicando diminuição da carga superficial efetiva das partículas

dispersas. Esse comportamento é compatível com o encapsulamento parcial da região hidrofóbica do CBZ pelas cavidades das ciclodextrinas, modificando simultaneamente a distribuição espacial das cargas superficiais e o ambiente eletrostático ao redor das partículas. Além disso, as numerosas hidroxilas presentes nas ciclodextrinas contribuem para reorganizar a camada de solvatação e a dupla camada elétrica, refletindo diretamente na diminuição do potencial zeta.

No sistema contendo β CD, a presença de uma inflexão na curva de potencial zeta próxima à razão molar de 1,2 reforça a hipótese sugerida pelos resultados de DLS quanto à existência de um ponto de saturação da complexação, seguido pela formação de agregados supramoleculares de maior tamanho. Após essa região, a continuidade da redução do potencial zeta indica que novos processos associativos passam a ocorrer entre os próprios complexos de inclusão. Em contraste, o sistema HP β CD apresenta redução contínua do potencial zeta durante toda a titulação, corroborando a ausência de um ponto de transição claramente definido observada nas medidas de tamanho de partículas.

As medidas de condutividade elétrica também acompanharam as modificações estruturais observadas pelas demais técnicas. Para o sistema CBZ/ β CD, verificou-se redução progressiva da condutividade elétrica à medida que aumentava a concentração de β CD. Esse comportamento pode ser explicado pela diminuição da mobilidade dos íons presentes em solução após a formação dos complexos de inclusão e, principalmente, pelo crescimento dos agregados supramoleculares, que apresentam coeficientes de difusão menores. Dessa forma, embora a quantidade total de espécies carregadas permaneça praticamente constante, sua mobilidade diminui significativamente, resultando na redução da condutividade do sistema.

Em contraste, o sistema CBZ/HP β CD apresentou aumento gradual da condutividade elétrica durante a titulação. Esse resultado aparentemente contraditório pode ser explicado pelo menor tamanho dos agregados formados nesse sistema. Como as nanoestruturas permanecem relativamente pequenas ao longo de toda a titulação, sua mobilidade continua elevada, permitindo maior contribuição das espécies iônicas presentes na solução para o transporte de carga elétrica. Além disso, a elevada hidratação característica da HP β CD favorece maior dissociação de grupos hidroxila superficiais, aumentando a disponibilidade de espécies carregadas no meio aquoso. Após a aproximação da estequiometria de complexação, observa-se estabilização da condutividade elétrica, indicando que o sistema alcança um novo equilíbrio entre formação de complexos, agregação supramolecular e mobilidade iônica.

De maneira integrada, os resultados obtidos pelas três técnicas demonstram elevada concordância entre si. O aumento do diâmetro hidrodinâmico, acompanhado pela redução do potencial zeta e pelas alterações no perfil de condutividade elétrica, evidencia que a formação dos complexos de inclusão modifica profundamente a organização coloidal do sistema. Os resultados também indicam diferenças importantes entre as duas ciclodextrinas avaliadas: enquanto a β CD favorece a formação de agregados supramoleculares maiores e mais definidos, a HP β CD origina agregados menores, mais homogêneos e estruturalmente mais flexíveis. Essas diferenças estruturais podem exercer influência direta sobre propriedades farmacotécnicas relevantes, como solubilidade, estabilidade coloidal, difusão em meio biológico e interação com membranas celulares, aspectos que serão posteriormente discutidos em conjunto com os resultados termodinâmicos, computacionais e microbiológicos.

5.1.5 Titulações por calorimetria de titulação isotérmica

A calorimetria de titulação isotérmica é uma técnica analítica que em seu princípio de funcionamento afere o fluxo de calor liberado ou absorvido pelo sistema em um processo durante a formação ou quebra de interações intermoleculares. A energia é anotada em função da concentração de reagente titulante, tendo a quantidade de calor liberado ou absorvido proporcionalmente à quantidade de reagente injetado (Wiseman *et al.*, 1989).

Após obter os dados empregando a isoterma de Wiseman (Equação 2) ocorre a determinação da constante de equilíbrio aparente (K_a) e também o parâmetro (N) definido como estequiometria de reação. Empregando equações da termodinâmicas clássicas (Equação 3 e 4), se torna possível a determinação da variação da energia livre de Gibbs ($\Delta_{int}G^\circ$), da variação da entalpia ($\Delta_{int}H^\circ$) e também da variação da energia entrópica ($T\Delta_{int}S^\circ$), obtendo assim os principais parâmetros termodinâmicos de ligação (Cavalcanti *et al.*, 2023; Denadai *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2022).

$$\frac{dQ}{d[tit]} = \Delta_{inj}H = \Delta H^\circ V^\circ \left[\frac{1}{2} + \frac{1-X_R - r}{2\sqrt{(1+X_R+r)^2 - 4X_R}} \right] \quad \text{Eq. 2}$$

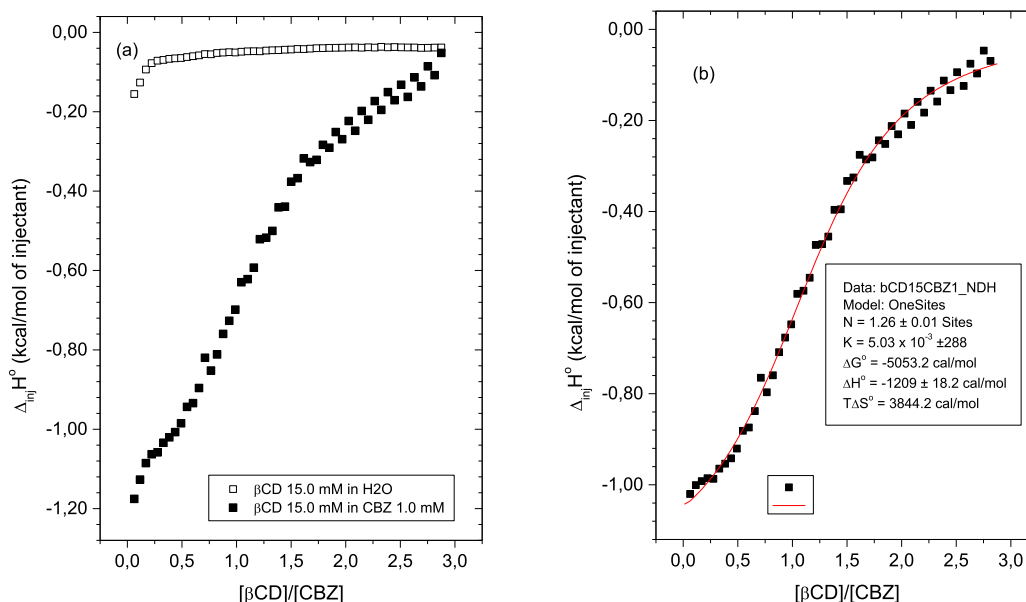
$$\Delta_{int}G^\circ = -RT \ln K \quad \text{Eq. 3}$$

$$\Delta_{int}G^\circ = \Delta_{inj}H^\circ - T\Delta_{inj}S^\circ \quad \text{Eq. 4}$$

Essa abordagem tem sido amplamente utilizada na análise de complexos de inclusão, pois durante o processo de complexação, uma gama de interações ocorre, sendo: 1) expulsão da água da cavidade e sua liberação para o ambiente; 2) desolvatação da molécula hospedeira; 3) transferência de calor para o meio circundante; 4) mudanças conformacionais; 5) inclusão da molécula hospedeira com o estabelecimento de novas interações intermoleculares; 6) rearranjo das moléculas de água em torno do complexo de inclusão; e 7) restrição da mobilidade rotacional das ligações glicosídicas da ciclodextrina devido à presença da molécula hospedeira na cavidade. O equilíbrio entre essas interações pode resultar em um processo que é exotérmico ou endotérmico, com aumento ou diminuição da entropia. Dado que a calorimetria isotérmica de titulação monitora apenas processos que ocorrem espontaneamente, a variação da energia livre de Gibbs será sempre negativa ($\Delta_{int}G^\circ < 0$) (Denadai *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2011; Ohta *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2006).

Objetivando analisar as interações da β CD com o CBZ, procedeu-se com titulação de solução de β CD 15,0 mM em solução de CBZ 1,0 mM. Na Figura 20 estão representadas as curvas de titulação da β CD em água pura (branco da reação) (a) e em solução de CBZ 1,0 mM, como também a curva de titulação final após a subtração do branco (b). Esse processo objetiva realizar a exclusão dos efeitos de interação soluto-solvente, com o intuito de realizar a avaliação apenas das interações β CD/CBZ (Denadai *et al.*, 2012). Na Tabela 6 estão apresentados os valores termodinâmicos de interação entre β CD e CBZ obtidos pelo experimento.

Figura 20 - (a) Titulação da β CD 15,0 mM em água pura e em solução de CBZ 1,0 mM e (b) curva de titulação final após a subtração do branco



Fonte: o autor (2026).

Tabela 6 – Parâmetros termodinâmicos da interação de β CD 15,0 mM titulado em CBZ 1,0 mM

Parâmetros termodinâmicos	Média ± Desvio Padrão
N_{ap}	$1,260 \pm 0,001$
K	$5,03 \times 10^3 \pm 288$
$\Delta_{int}H^\circ$ (cal/mol)	$-1209 \pm 18,2$
$T\Delta_{int}S^\circ$ (cal/mol)	$+3844,2$
$\Delta_{int}G^\circ$ (cal/mol)	$-5053,2$

Fonte: o autor (2026).

Os parâmetros termodinâmicos obtidos para o sistema CBZ/ β CD evidenciam que a formação do complexo de inclusão ocorre de forma espontânea, uma vez que a variação da energia livre de Gibbs apresentou valor negativo ($\Delta_{int}G^\circ = -5053,2 \text{ cal mol}^{-1}$). Valores negativos de energia livre constituem o principal indicativo termodinâmico da espontaneidade do processo de complexação, refletindo que a energia liberada durante o estabelecimento das

novas interações intermoleculares supera a energia necessária para promover a reorganização estrutural do sistema. Esse comportamento é característico de sistemas supramoleculares envolvendo ciclodextrinas e surfactantes catiônicos, nos quais diferentes contribuições energéticas ocorrem simultaneamente durante o processo de inclusão.

A constante aparente de associação obtida ($K = 5,03 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$) demonstra elevada afinidade entre o cloreto de benzalcônio e a β -ciclodextrina. Constantes dessa ordem de grandeza são frequentemente descritas para sistemas de inclusão envolvendo compostos anfífilos e indicam que o equilíbrio químico encontra-se deslocado em favor da formação do complexo. Embora não representem ligações covalentes, esses valores revelam que as interações hidrofóbicas, forças de dispersão de London e ligações de hidrogênio cooperam de maneira eficiente para estabilizar o complexo em solução aquosa.

Outro aspecto importante refere-se ao parâmetro estequiométrico obtido ($N_{\text{ap}} = 1,260 \pm 0,001$). Apesar de apresentar valor ligeiramente superior à unidade, esse resultado encontra-se muito próximo da estequiometria 1:1, amplamente observada em complexos envolvendo β -ciclodextrina. Pequenos desvios em relação ao valor ideal podem decorrer da coexistência de diferentes populações de agregados supramoleculares em solução, fenômeno já sugerido pelos experimentos de DLS e potencial zeta, nos quais foram observadas evidências da formação de nanoagregados após a saturação inicial das cavidades da ciclodextrina.

Do ponto de vista energético, observa-se que a contribuição entrópica constitui o principal fator responsável pela estabilidade do complexo. O valor positivo de $T\Delta_{\text{int}}S^\circ$ (+3844,2 cal mol⁻¹) representa aproximadamente 76% da energia livre de interação, enquanto a contribuição entálpica corresponde a cerca de 24%. Esse perfil caracteriza um processo predominantemente dirigido pela entropia (entropy-driven process), comportamento frequentemente observado em sistemas de inclusão envolvendo ciclodextrinas.

O aumento da entropia decorre principalmente da expulsão das moléculas de água previamente organizadas tanto no interior da cavidade hidrofóbica da β CD quanto na camada de solvatação que envolve o grupamento hidrofóbico do cloreto de benzalcônio. Essas moléculas de água encontram-se inicialmente altamente organizadas devido às ligações de hidrogênio estabelecidas com o meio aquoso. Durante a complexação, sua liberação para o solvente promove aumento significativo dos graus de liberdade translacionais e rotacionais, produzindo incremento da desordem molecular e tornando o processo termodinamicamente favorável.

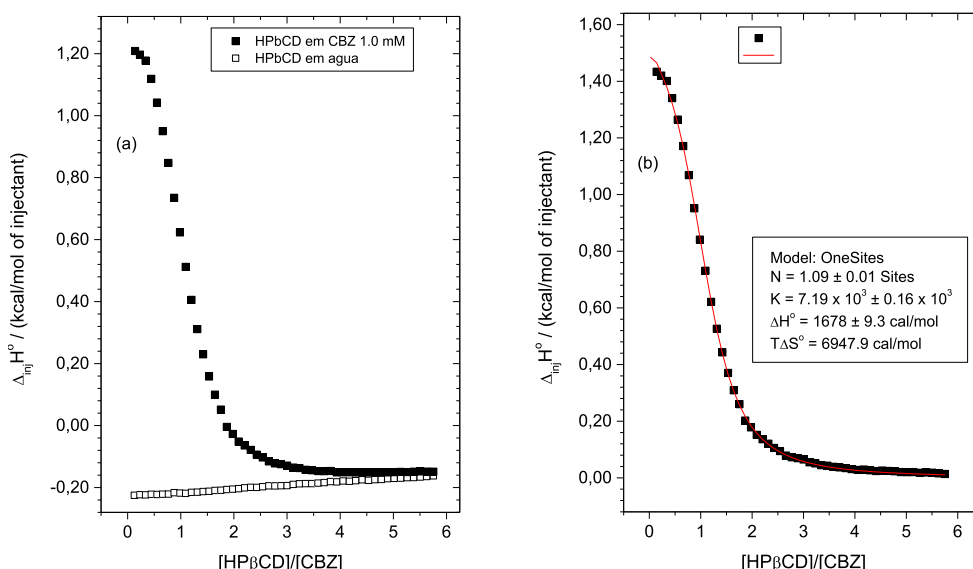
Embora a contribuição entrópica seja predominante, a variação negativa de entalpia ($\Delta_{int}H^\circ = -1209 \text{ cal mol}^{-1}$) demonstra que o processo também apresenta caráter exotérmico. Essa contribuição está relacionada ao estabelecimento de novas interações intermoleculares durante o encapsulamento, incluindo interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e possíveis ligações de hidrogênio envolvendo grupos hidroxila localizados nas bordas da ciclodextrina. Dessa forma, observa-se uma cooperação entre fatores entrópicos e entálpicos na estabilização do complexo formado.

Os resultados obtidos por ITC apresentam elevada concordância com as demais técnicas empregadas neste trabalho. A estequiometria próxima de 1:1 confirma os resultados observados por DLS, potencial zeta (ZP) e RMN de ^1H , os quais indicaram que a etapa inicial da interação corresponde ao encapsulamento individual das moléculas de CBZ pelas cavidades da βCD . Da mesma forma, a elevada constante de associação explica a maior estabilidade térmica observada nos experimentos de TGA, evidenciando que a formação do complexo modifica significativamente as propriedades físico-químicas do surfactante.

O processo de inclusão e formação do complexo demonstrou uma alta contribuição entrópica, uma vez que a componente $T\Delta_{int}S^\circ$ contribuiu com aproximadamente 76,1% do valor de $\Delta_{int}G^\circ$, já aos outros 23,9% restante foram contribuição do $\Delta_{int}H^\circ$. Na formação do CI quando ocorre a variação positiva de entropia ($T\Delta_{int}S^\circ$) de acordo com os estudos, há uma indicação de que as moléculas passam por uma significativa desolvatação durante o processo de inclusão. Ao longo do processo é realizado a quebra da estrutura de solvatação dos grupos funcionais do CBZ e em função disso, ocorre a liberação de moléculas de água que aumentam graus de liberdade rotacionais e translacionais produzindo assim, um aumento da entropia (grau de desordem) do sistema (Miranda, 2020).

Objetivando analisar as interações da HP β CD com o CBZ, procedeu-se com titulação de solução de HP β CD 30,0 mM em solução de CBZ 1,0 mM. Na Figura 21 estão representadas as curvas de titulação da HP β CD em água pura (branco da reação) e em solução de CBZ 1,0 mM, como também a curva de titulação final após a subtração do branco. Esse processo objetiva realizar a exclusão dos efeitos de interação soluto-solvente, com o intuito de realizar a avaliação apenas das interações HP β CD /CBZ (Denadai *et al.*, 2012). Na Tabela 7 estão apresentados os valores termodinâmicos de interação entre HP β CD e CBZ obtidos pelo experimento.

Figura 21 - (a) Titulação da HP β CD 30,0 mM em água pura e em solução de CBZ 1,0 mM e
(b) curva de titulação final após a subtração do branco



Fonte: o autor (2026).

Tabela 7 – Parâmetros termodinâmicos da interação de HP β CD 30,0 mM titulado em CBZ 1,0 mM

Parâmetros termodinâmicos	Média $\pm$ Desvio Padrão
N_{ap}	$1,090 \pm 0,001$
K	$7,19 \times 10^3 \pm 0,16 \times 10^3$
$\Delta_{int}H^\circ$ (cal/mol)	$+1678 \pm 9,3$
$T\Delta_{int}S^\circ$ (cal/mol)	$+6947,9$
$\Delta_{int}G^\circ$ (cal/mol)	$-5269,9$

Fonte: o autor (2026).

De acordo com a Tabela 7, processo de inclusão é endotérmico ($\Delta_{int}H^\circ > 0$) e foi favorecida pelo aumento de entropia ($T\Delta_{int}S^\circ > 0$). Sugere que os valores positivos de entalpia são responsáveis à quebra das micelas e das estruturas de solvatação, já a entropia ($T\Delta_{int}S^\circ$) positiva, sugere à ocorrência de interações de natureza hidrofóbicas. Conforme descrito na literatura, uma variação positiva de entropia é explicada por uma grande dessolvatação das

moléculas ao longo do fenômeno de inclusão, sendo que ocorre a dessolvatação da cavidade interna da HP β CD e conseqüentemente a quebra da estrutura de solvatação dos grupos funcionais do CBZ, assim, quando ocorre liberação de moléculas de água, também ocorre o aumento de graus de liberdade rotacionais e translacionais (Agnes *et al.*, 2017).

Os resultados termodinâmicos obtidos para o sistema CBZ/HP β CD demonstram comportamento distinto daquele observado para a β CD natural, embora ambos conduzam à formação espontânea de complexos de inclusão. O valor negativo da energia livre de Gibbs ($\Delta_{int}G^\circ = -5269,9 \text{ cal mol}^{-1}$) confirma que o processo ocorre espontaneamente, apresentando estabilidade ligeiramente superior à observada para o complexo formado com β CD.

A constante aparente de associação ($K = 7,19 \times 10^3$) foi aproximadamente 43% superior à obtida para a β CD, indicando maior afinidade molecular entre o cloreto de benzalcônio e a HP β CD. Esse resultado está de acordo com os experimentos de RMN, nos quais foram observados deslocamentos químicos mais pronunciados para o sistema HP β CD/CBZ, sugerindo interação supramolecular mais intensa. A maior flexibilidade conformacional conferida pelos grupos hidroxipropila amplia a capacidade adaptativa da cavidade hospedeira, permitindo acomodação mais eficiente da molécula hóspede.

O parâmetro estequiométrico ($N = 1,090 \pm 0,001$) encontra-se extremamente próximo da unidade, reforçando que a principal espécie formada corresponde ao complexo 1:1. A proximidade desse valor ao ideal sugere que, durante o processo monitorado por ITC, predomina a formação do complexo individual antes do surgimento de agregados supramoleculares observados pelas técnicas coloidais.

Diferentemente do sistema β CD, a formação do complexo com HP β CD apresentou variação positiva de entalpia ($\Delta_{int}H^\circ = +1678 \text{ cal mol}^{-1}$), caracterizando um processo endotérmico. Isso significa que parte da energia fornecida ao sistema é consumida na ruptura das estruturas organizadas de solvatação tanto da cavidade da HP β CD quanto das micelas formadas pelo cloreto de benzalcônio. A energia absorvida também está associada às alterações conformacionais necessárias para acomodação da molécula hóspede no interior da cavidade modificada da ciclodextrina.

Apesar da contribuição entálpica desfavorável, a elevada contribuição entrópica ($T\Delta_{int}S^\circ = +6947,9 \text{ cal mol}^{-1}$) supera amplamente esse efeito, tornando o processo espontâneo. O ganho entrópico observado é aproximadamente duas vezes superior ao valor da entalpia, caracterizando um sistema completamente governado pela entropia. Esse comportamento evidencia intensa dessolvatação das superfícies hidrofóbicas durante o processo de

encapsulamento, promovendo liberação de grande quantidade de moléculas de água anteriormente organizadas.

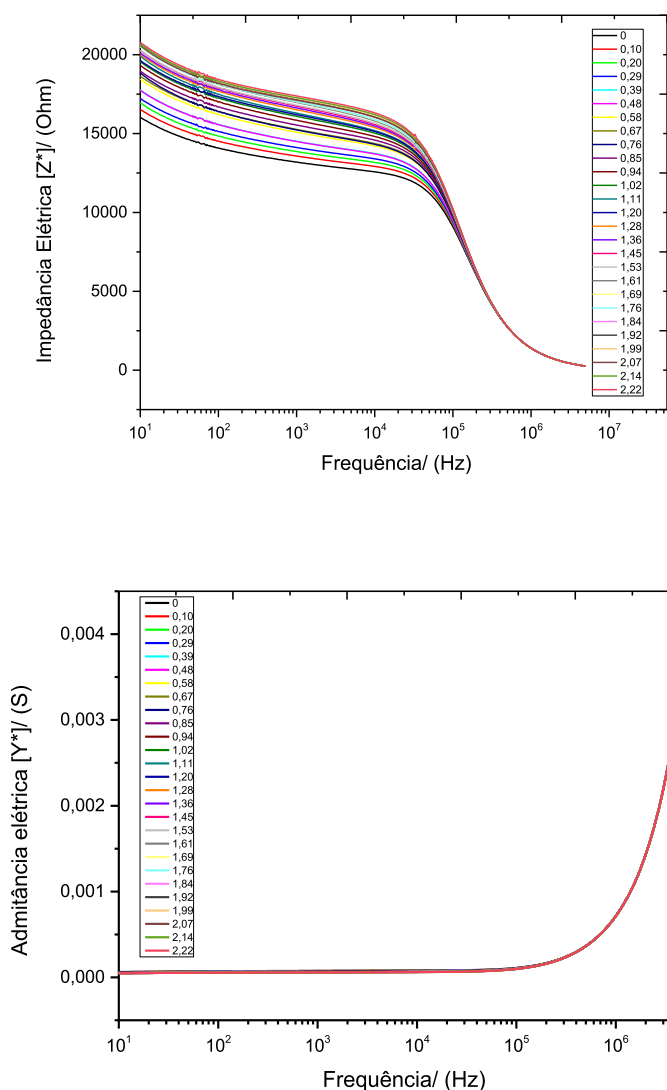
Esse mecanismo explica simultaneamente os resultados obtidos por RMN, DLS, potencial zeta e condutividade elétrica. A maior flexibilidade estrutural da HP β CD favorece diferentes modos de acomodação do CBZ, originando agregados menores e mais homogêneos, porém apresentando afinidade molecular superior à observada para a β CD natural. Dessa forma, embora ambos os sistemas apresentem formação espontânea de complexos de inclusão, a β CD produz um processo parcialmente estabilizado por contribuições entálpicas, enquanto a HP β CD apresenta um mecanismo dominado quase exclusivamente pelo efeito hidrofóbico e pela elevada contribuição entrópica decorrente da reorganização do solvente.

Em conjunto, os resultados obtidos por calorimetria isotérmica corroboram todas as evidências previamente obtidas por FTIR, TGA, RMN e técnicas coloidais, demonstrando que o encapsulamento do cloreto de benzalcônio pelas ciclodextrinas modifica profundamente as propriedades estruturais, termodinâmicas e supramoleculares do sistema, sendo a HP β CD a matriz que apresentou maior afinidade molecular e maior estabilidade termodinâmica para a formação do complexo de inclusão.

5.1.6 Caracterização por Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIS) dos Sistemas CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD

Neste estudo, a espectroscopia de impedância elétrica (EIS, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) foi utilizada para investigar as alterações elétricas decorrentes da titulação das ciclodextrinas β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) com o cloreto de benzalcônio (CBZ). Considerando que o CBZ é um surfactante catiônico da classe dos sais de amônio quaternário, capaz de formar agregados em solução aquosa, espera-se que sua complexação com ciclodextrinas modifique a distribuição de cargas, a mobilidade iônica e as propriedades elétricas e dielétricas do sistema. A formação dos complexos de inclusão promove rearranjos supramoleculares que alteram a dinâmica do meio, justificando a aplicação da EIS como ferramenta sensível para monitorar tanto a complexação molecular quanto a agregação coloidal. A técnica baseia-se na aplicação de uma perturbação senoidal de pequena amplitude e na análise da resposta elétrica do sistema, permitindo determinar a impedância e a admitância complexas em função da frequência aplicada.

Figura 22 - Espectros de ($|Z^*|$) e ($|Y|$) em função da frequência com a variação da razão molar $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$.



Fonte: O autor (2026).

Os espectros de impedância demonstraram forte dependência da frequência, com redução de $|Z^*|$ à medida que a frequência aumentou, comportamento característico de sistemas iônicos. Observou-se também aumento da impedância com o incremento da razão molar $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$, indicando redução da condutividade elétrica em decorrência da formação dos complexos de inclusão entre o cloreto de benzalcônio e a β -ciclodextrina. Esse efeito é atribuído ao encapsulamento parcial do surfactante, que diminui a mobilidade das espécies responsáveis

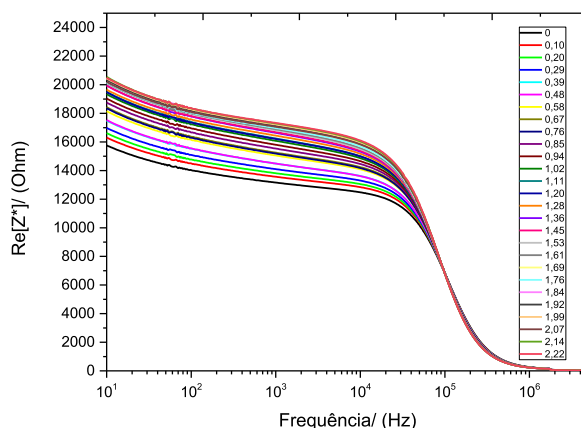
pelo transporte de carga. De forma complementar, os espectros de admitância apresentaram aumento de $|Y^*|$ com a frequência, porém com redução de sua magnitude à medida que a concentração de β CD aumentou. Esses resultados evidenciam que a complexação molecular modifica as propriedades elétricas do sistema, corroborando a ocorrência de alterações na condução de cargas e na organização supramolecular da solução.

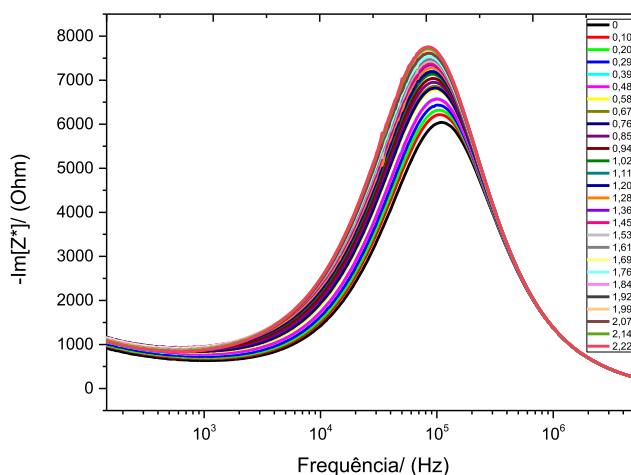
A impedância elétrica complexa pode ser expressa ainda em termos de suas componentes real ($\text{Re}[Z^*]$) e imaginária ($\text{Im}[Z^*]$). A interpretação desses parâmetros fornece informações relevantes acerca da resistência elétrica, capacitância, processos de polarização interfacial e fenômenos de difusão presentes na amostra (Orazem; Tribollet, 2008). A impedância complexa é matematicamente descrita pela equação 5:

$$[Z^*](\omega) = \text{Re}[Z^*] + j\text{Im}[Z^*] \quad \text{Eq.5}$$

Onde: $[Z^*]$ é a impedância complexa, $\text{Re}[Z^*]$ corresponde à efeitos de resistência elétrica do meio, $\text{Im}[Z^*]$ representa a reatância elétrica e tem relação com efeitos capacitivos, j é a unidade imaginária ($\sqrt{-1}$) e ω é a frequência angular do sinal aplicado ($\omega = 2\pi f$). Na figura 23 estão representados dos dados da parte $\text{Re}[Z^*]$ e $\text{Im}[Z^*]$ da impedância em função da frequência com a variação da razão molar de $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$.

Figura 23 - dados da parte $\text{Re}[Z^*]$ e $\text{Im}[Z^*]$ da impedância em função da frequência com a variação da razão molar de $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$.





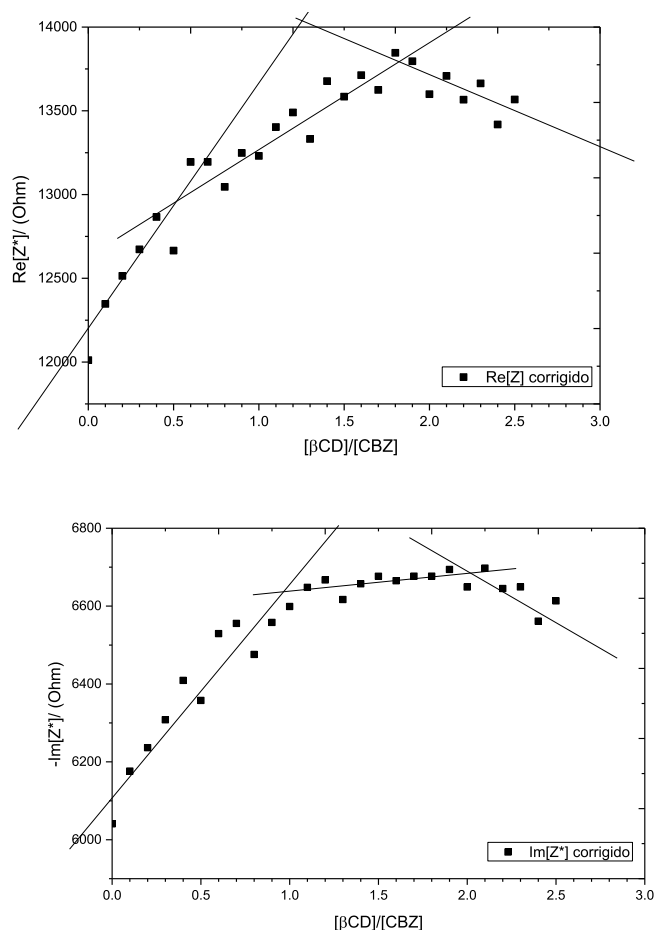
Fonte: O autor (2026).

A Figura 23 apresenta a evolução das componentes real, $\text{Re}(Z^*)$, e imaginária, $\text{Im}(Z^*)$, da impedância em função da frequência para diferentes razões molares $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$. Observa-se que os valores de $\text{Re}(Z^*)$ tendem a zero com o aumento da frequência, comportamento característico e que são previstos pelos modelos teóricos (Lima *et al.*, 2022). Além disso, verifica-se que o aumento da concentração de βCD promove aumento nos valores de $\text{Re}(Z^*)$, indicando modificações nas características resistivas do sistema decorrentes das interações supramoleculares entre os componentes.

A componente imaginária da impedância, $\text{Im}(Z^*)$, apresentou máximos na região de kHz, associados aos processos de relaxação do sistema. O deslocamento desses picos para frequências menores com o aumento da concentração de βCD indica alterações nos tempos de relaxação molecular decorrentes da formação dos complexos de inclusão. Esse comportamento sugere a formação de estruturas supramoleculares progressivamente maiores e com dinâmica de relaxação mais lenta, em concordância com os resultados obtidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS), que evidenciaram aumento do diâmetro hidrodinâmico nas mesmas condições experimentais.

Foram selecionados o limite tangencial da parte real e imaginária em função da razão molar para construir os gráficos presentes na figura 24.

Figura 24 - Gráfico do limite tangencial parte $\text{Re}[Z^*]$ e $\text{Im}[Z^*]$ da frequência em função da razão molar de $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$.

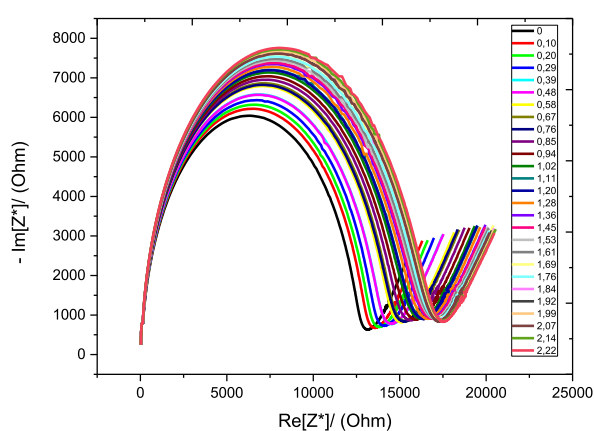


Fonte: O autor (2026).

Os perfis de $\text{Re}(Z^*)$ e $\text{Im}(Z^*)$ em função da razão molar $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$ apresentaram mudanças de inclinação próximas às razões 1:1 e 1:2, indicando diferentes etapas de organização estrutural do sistema. A primeira inflexão está associada à formação predominante dos complexos de inclusão $\text{CBZ}/\beta\text{CD}$, enquanto a segunda sugere processos de autoassociação envolvendo os complexos previamente formados. Esses resultados estão em concordância com os dados de DLS, que evidenciaram aumento do diâmetro hidrodinâmico em maiores concentrações de βCD , indicando a formação de nanoagregados supramoleculares. De forma complementar, as análises de potencial zeta e condutividade elétrica demonstraram redução da carga superficial e da mobilidade das espécies carregadas, corroborando um processo de reorganização estrutural progressiva caracterizado pela formação inicial de complexos 1:1 seguida pela agregação desses sistemas em estruturas de maior dimensão.

No diagrama de Nyquist, a componente imaginária da impedância é representada em função da componente real, permitindo avaliar quantitativamente a resistência elétrica do sistema além dos efeitos capacitivos presentes. Na figura 25 está representado o diagrama de Nyquist em função da frequência com a variação da razão molar de $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$.

Figura 25 - Representação do diagrama de Nyquist em função da frequência com a variação da razão molar de $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$.

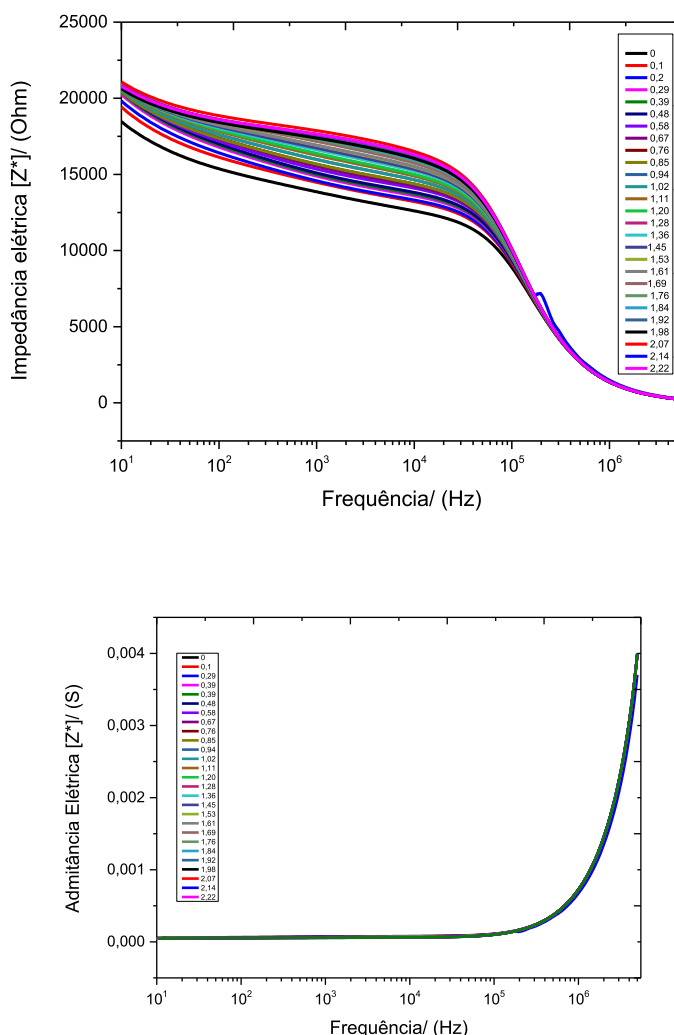


Fonte: O autor (2026).

Os diagramas de Nyquist evidenciaram aumento progressivo do diâmetro dos semicírculos com o incremento da razão molar $[\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$, indicando elevação da resistência elétrica e redução da capacidade de condução de cargas em decorrência da formação dos complexos de inclusão. Em concentrações mais elevadas de βCD , as alterações na geometria dos semicírculos sugerem reorganização estrutural e formação de agregados supramoleculares. Esses resultados corroboram os dados obtidos por DLS, potencial zeta e condutividade elétrica, demonstrando que a interação entre o cloreto de benzalcônio e a β -ciclodextrina promove inicialmente a formação de complexos de inclusão, seguida pela agregação dessas estruturas, modificando significativamente as propriedades eletroquímicas do sistema.

Na figura 26 estão apresentados os espectros de $([Z^*])$ e $([Y^*])$ em função da frequência com a variação da razão molar $[\text{HP}\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$.

Figura 26 - espectros de ($[Z^*]$) e ($[Y^*]$) em função da frequência com a variação da razão molar $[HP\beta CD]/[CBZ]$.



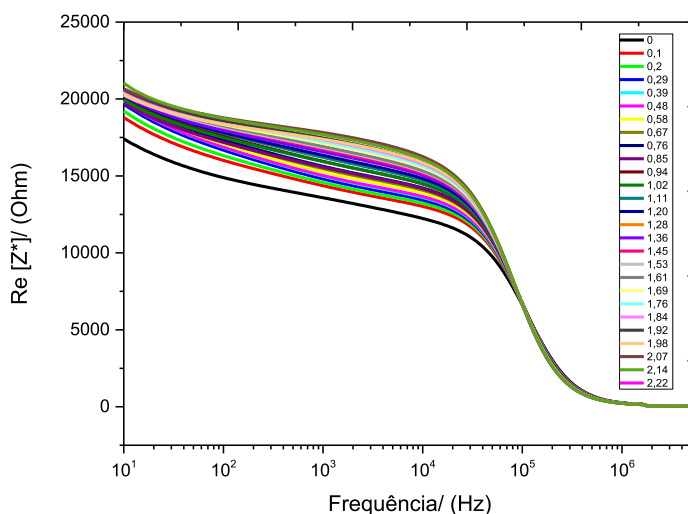
Fonte: O autor (2026).

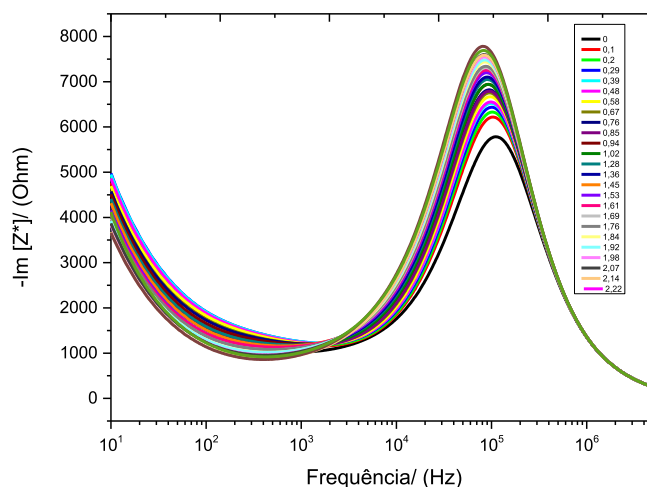
A Figura 26 apresenta os espectros de impedância do sistema CBZ/HP β CD para diferentes razões molares $[HP\beta CD]/[CBZ]$. Assim como observado para o sistema contendo β CD, os valores de $[Z^*]$ diminuem com o aumento da frequência, evidenciando a predominância dos efeitos de polarização em baixas frequências e a contribuição crescente dos mecanismos de condução em frequências mais elevadas. Entretanto, diferentemente do sistema CBZ/ β CD, as alterações entre os espectros ocorrem de forma mais gradual ao longo das titulações. Sugere com esse comportamento que ocorra de forma contínua a formação dos CIs, sem a ocorrência de transições estruturais abruptas. A alta solubilidade que a matriz HP β CD

tem e também sua maior flexibilidade conformacional sugerem favorecer interações progressivas com o CBZ, gerando reorganizações estruturais não tão pronunciadas no meio.

Os espectros de admitância apresentados na Figura 26 exibem aumento dos valores de $[Y^*]$ em função da frequência para todas as razões molares investigadas. Demonstra-se que as alterações decorrentes da adição de HP β CD ocorrem gradualmente, sugerindo transporte de carga e polarização do sistema. Esse comportamento corrobora que a formação dos complexos de inclusão modifica de maneira contínua o ambiente eletroquímico da solução, não ocorrendo mudanças estruturais abruptas. Os resultados demonstram que os dados obtidos por DLS, os quais apresentam crescimento gradual dos agregados ao longo das titulações, mantendo dimensões inferiores às observadas para o sistema contendo β CD.

Figura 27 - dados da parte $\text{Re}[Z^*]$ e $\text{Im}[Z^*]$ da impedância em função da frequência com a variação da razão molar de $[\text{HP}\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$.





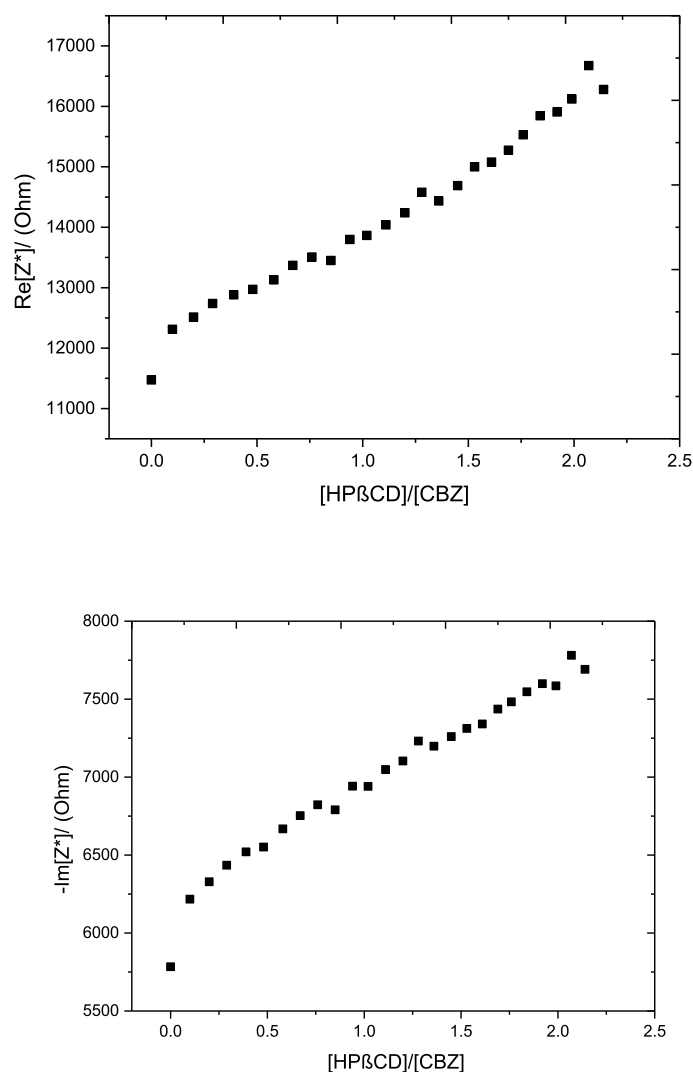
Fonte: O autor (2026).

A Figura 27 apresenta as componentes real e imaginária da impedância para o sistema CBZ/HP β CD em diferentes razões molares. Os valores de $\text{Re}(Z^*)$ diminuem progressivamente com o aumento da frequência, comportamento associado à redução dos efeitos de polarização interfacial em regiões de maior frequência. As alterações observadas entre as curvas indicam que a adição de HP β CD promove modificações graduais na resistência elétrica do sistema, refletindo a formação progressiva dos complexos de inclusão.

Os espectros de $\text{Im}(Z^*)$ apresentam máximos característicos relacionados aos processos de relaxação dielétrica presentes na solução. O deslocamento gradual desses máximos ao longo das titulações sugere alterações contínuas nos tempos característicos de relaxação molecular, decorrentes das interações supramoleculares entre o CBZ e a HP β CD. Diferentemente do sistema contendo β CD, os deslocamentos observados são menos pronunciados, indicando que as reorganizações estruturais ocorrem de forma mais homogênea. Esse comportamento encontra suporte nos resultados de DLS, que evidenciaram crescimento gradual dos agregados sem mudanças abruptas de tamanho ao longo da titulação.

Os resultados obtidos para o sistema CBZ/HP β CD (Figura 28) revelam comportamento distinto daquele observado para o sistema contendo β CD. As alterações nos diagramas de impedância ocorrem de maneira mais gradual e contínua ao longo das titulações, sem mudanças abruptas na geometria das curvas.

Figura 28 - Gráfico do limite tangencial parte $\text{Re}[Z^*]$ e $\text{Im}[Z^*]$ da frequência em função da razão molar de $[\text{HP}\beta\text{CD}]/[\text{CBZ}]$.



Fonte: O autor (2026).

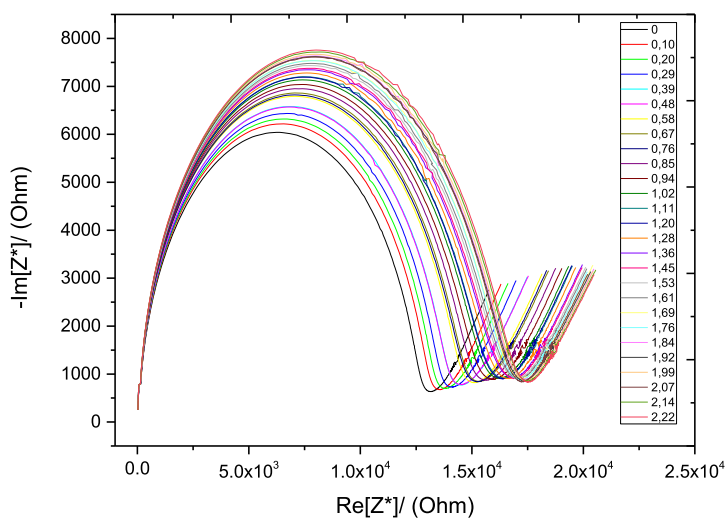
Esse perfil sugere que a $\text{HP}\beta\text{CD}$, devido à presença de grupos hidroxipropila em sua estrutura, promove a formação de complexos de inclusão mais solúveis e estruturalmente mais flexíveis. A maior hidratação da molécula e a redução da cristalinidade favorecem a dispersão dos complexos no meio aquoso, dificultando a formação de agregados extensos.

A variação do limite tangencial apresentada na Figura 28 demonstra que a adição de $\text{HP}\beta\text{CD}$ promove alterações progressivas na resposta elétrica do sistema. Diferentemente do observado para o sistema $\text{CBZ}/\beta\text{CD}$, não são identificadas inflexões abruptas ou regiões de

transição claramente definidas, sugerindo que a formação dos complexos de inclusão ocorre de maneira contínua ao longo de toda a titulação. As mudanças observadas refletem modificações graduais nos mecanismos de polarização e transporte de carga decorrentes da interação entre as moléculas de CBZ e HP β CD.

Os resultados obtidos são coerentes com as medidas de DLS, no qual foi observado de forma linear o aumento do D_h com o aumento da concentração da matriz de HP β CD. A correlação encontrada entre as técnicas, corroboram que a organização supramolecular do sistema ocorre na sua evolução de forma contínua, não tendo agregados supramoleculares distintos, obtendo agregados menores e com uma distribuição mais homogênea quando comparados ao sistema contendo β CD.

Figura 29 - Representação do diagrama de Nyquist em função da frequência com a variação da razão molar de [HPBCD]/[CBZ].



Fonte: O autor (2026).

Os diagramas de Nyquist apresentados na Figura 29 evidenciam alterações graduais na resposta eletroquímica do sistema à medida que aumenta a razão molar [HP β CD]/[CBZ]. Observa-se deslocamento progressivo dos semicírculos, indicando modificações nos processos de transferência de carga e polarização interfacial associados à formação dos complexos de inclusão. Entretanto, diferentemente do sistema CBZ/ β CD, as alterações observadas ocorrem de forma mais suave, sem mudanças abruptas na geometria dos semicírculos (Piccardi *et al.*, 2025; Orazem; Tribollet, 2008).

Os resultados indicam que a interação entre o cloreto de benzalcônio e a HP β CD promove reorganizações estruturais mais homogêneas, favorecidas pela maior solubilidade dessa ciclodextrina e pela formação de agregados de menores dimensões. Em concordância, as análises de DLS evidenciaram diâmetros hidrodinâmicos inferiores aos observados para o sistema CBZ/ β CD, enquanto os ensaios de potencial zeta e condutividade elétrica indicaram redução da carga superficial e maior mobilidade das espécies carregadas. Em conjunto, esses achados sugerem que os processos de encapsulamento e autoassociação no sistema CBZ/HP β CD ocorrem de forma gradual e distribuída, sem transições estruturais abruptas.

5.2 Estudo Teórico Computacional

Os dados experimentais obtidos através de ITC (Tabela 6 e 7) indicam que o composto de inclusão formado com HP β CD apresenta uma constante de ligação (K) mais alta e, conseqüentemente, uma energia de Gibbs de inclusão mais negativa (veja Tabela 6 e 7).

O primeiro estudo teórico foi conduzido assumindo, de acordo com trabalhos anteriores (Dos Santos; Anconi, 2024; Dos Santos; Anconi, 2025), um HP β CD com funcionalização no átomo O2 e, portanto, na porção cabeça do CD. A investigação de 3.744 arranjos iniciais para BZ⁺/ β CD, BZ⁺/HP β CD (2) 00, BZ⁺/HP β CD (2) 01, BZ⁺/HP β CD (2) 02 e, portanto, a investigação de 14.976 (4 x 3.744) não corresponde à tendência experimental. Descobrimos através da abordagem multi-equilíbrio GFN2-xTB que o log K para BZ⁺@ β CD é maior do que os valores de log K para BZ⁺@HP β CD (2) 00, BZ⁺@HP β CD (2) 01 e BZ⁺@HP β CD (2) 02.

Recentemente, um estudo sobre HP β CD (Sun *et al.*, 2023) discutiu o grau de funcionalização em cada porção da cavidade do CD em termos da distorção do sinal anomérico em torno de cinco ppm, que é bem conhecido por ser característico dos CDs.

A análise de RMN de ¹H do HP β CD utilizado no presente trabalho sugere que a funcionalização pode estar presente em ambos os lados do hóspede da CD (chamados de cabeça e cauda). Decidimos então construir HP β CD com grupos propílicos na porção da cauda da CD, assumindo os três isômeros inicialmente investigados. Após a construção dos sistemas de HP β CD (6) com a distribuição espacial identificada como 00, 01 e 02 (veja a Figura 13), 11.232 (3x3.744) sistemas adicionais foram investigados. Os dados teóricos GFN2-xTB em um escopo de múltiplos equilíbrios foram incluídos na Tabela 8.

Tabela 8 - Constantes de ligação ITC e dados da abordagem multi-equilíbrio quântico GFN2-xTB. Um total de 26.208 sistemas iniciais (7×3.744) foram investigados através do método GFN2-xTB.

Experimental System	$\log K_{\text{Expt.}}$	System	$\log K_{\text{GFN2-xTB}}$
BZ ⁺ @βCD	3.702	BZ ⁺ @βCD	5.311
BZ ⁺ @HPβCD	3.857	BZ ⁺ @HPβCD (6) 00	5.597
		BZ ⁺ @HPβCD (6) 01	1.611
		BZ ⁺ @HPβCD (6) 02	7.496
		BZ ⁺ @HPβCD (2) 00	3.856
		BZ ⁺ @HPβCD (2) 01	3.012
		BZ ⁺ @HPβCD (2) 02	2.629

Fonte: O autor (2026).

Vemos na tabela 8 que a tendência experimental foi alcançada quando os sistemas HPβCD (6) (00 e 02) foram usados para construir os sistemas supramoleculares. Da Tabela (6 e 7), os valores experimentais para $\log K$ correspondem a 3,702 e 3,857 para BZ⁺@βCD e BZ⁺@HPβCD, respectivamente. O valor teórico de $\log K$ para BZ⁺@βCD corresponde a 5,311. Para BZ⁺@HPβCD (6) 00 e 02, encontramos $\log K$ correspondentes a 5,597 e 7,496, respectivamente, um valor maior do que o avaliado para BZ⁺@βCD, conforme abordado experimentalmente. Os valores de $\log K$ para BZ⁺@HPβCD (6) 01 e os outros BZ⁺@HPβCD (2), 00, 01 e 02 são menores que 5,311. Os valores de $\log K$ foram obtidos combinando muitos dados de equilíbrio no âmbito da abordagem de multi-equilíbrio. Uma letra maiúscula (A, B, C, etc.) é usada para cada tipo de arranjo espacial, que é estável em meios aquosos e contribui para a constante de ligação para uma janela de energia particular, aproximadamente 3,0 kcal mol⁻¹. Os dados termodinâmicos para todos os sistemas investigados foram incluídos nas Tabelas 9 a 11.

Tabela 9 - Energias livres de associação em água ($\Delta_w G$), de solvatação ($\Delta_{\text{solv}} G$) energias de interação determinados computacionalmente ($\Delta_c G^0$, $\Delta_c H^0$ e $T\Delta_c S^0$), contribuições correspondentes e os parâmetros geométricos de associação obtidos a partir do APARM (r, α , β e γ). Dados para os sistemas empregados para calcular o $\log K$ teórico, a $T = 298$ K, após o estudo de 3.744 sistemas iniciais no nível de teoria GFN2-xTB (ALPB).

BZ ⁺ @βCD	ID	$\Delta_w G$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta_{\text{solv}} G$ (kcal mol ⁻¹)	ΔG^0 (kcal mol ⁻¹)	ΔH^0 (kcal mol ⁻¹)	$T\Delta S^0$ (kcal mol ⁻¹)	r (Å)	α (deg)	β (deg)	γ (deg)
log K=5.311	A	-5.70	21.03	-26.74	-45.02	-18.28	4.1	32	328	272
	B	-5.47	21.57	-27.03	-45.78	-18.75	3.2	4	32	81
	C	-5.34	20.67	-26.01	-44.34	-18.34	4.3	74	332	285
	D	-5.24	22.13	-27.37	-46.97	-19.60	3.4	14	34	86
	E	-5.07	21.09	-26.16	-45.05	-18.89	4.4	205	35	78
	F	-5.03	20.75	-25.77	-44.76	-18.99	4.7	230	34	77

G*	-3.90	18.01	-21.90	-39.97	-18.07	6.8	32	126	0
----	-------	-------	--------	--------	--------	-----	----	-----	---

*Sistema com a porção aromática incluída na cavidade da ciclodextrina.

Fonte: O autor.

Tabela 10 - Energias livres de associação em água ($\Delta_w G$), de solvatação ($\Delta_{solv} G$) energias de interação determinados computacionalmente ($\Delta_c G^0$, $\Delta_c H^0$ e $T\Delta_c S^0$), contribuições correspondentes e os parâmetros geométricos de associação obtidos a partir do APARM (r, α , β e γ). Dados para os sistemas empregados para calcular o log K teórico, a T = 298 K, após o estudo de 11.232 sistemas iniciais, 3.744 para cada isômero de HP β CD (2) no nível de teoria GFN2-xTB (ALPB).

BZ*@HP β CD (propyl at head)	I D	$\Delta_w G$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta_{solv} G$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta_c G^0$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta_c H^0$ (kcal mol ⁻¹)	$T\Delta_c S^0$ (kcal mol ⁻¹)	r (Å)	α (deg)	β (deg)	γ (deg)
(2) 00 log K=3.856	A	-4.00	18.44	-22.44	-43.33	-20.89	2.1	125	150	275
	B	-3.88	20.58	-24.45	-45.94	-21.48	2.2	301	210	82
	C	-3.77	19.20	-22.97	-44.27	-21.31	1.9	257	33	310
	D	-3.28	22.01	-25.30	-45.69	-20.39	1	217	208	58
	E	-3.25	18.74	-21.99	-41.39	-19.40	1.1	118	156	273
	F	-2.49	19.12	-21.61	-41.21	-19.61	2.8	5	145	271
	G	-2.19	16.78	-18.97	-37.76	-18.79	1.8	125	158	285
	H	-2.06	16.90	-18.95	-37.64	-18.69	3.1	188	42	320
	I	-2.01	16.84	-18.85	-37.60	-18.74	3.1	9	138	41
(2) 01 log K=3.012	A	-3.37	18.49	-21.86	-41.48	-19.62	2.1	276	211	76
	B	-2.15	21.79	-23.94	-43.77	-19.83	2.2	244	207	46
	C	-2.13	16.54	-18.67	-37.44	-18.76	2	294	202	69
	D									
	*	-2.05	24.67	-26.73	-46.55	-19.82	4.5	288	70	276
	E	-1.90	19.37	-21.27	-41.16	-19.89	2.6	181	215	67
	F	-1.49	16.97	-18.46	-38.24	-19.78	2.3	326	150	308
(2) 02 log K=2.629	G	-1.45	17.01	-18.47	-37.87	-19.41	4.3	201	142	281
	A	-2.63	16.33	-18.96	-37.18	-18.23	3.4	204	213	73
	B	-2.49	18.13	-20.62	-39.21	-18.59	3	168	215	65
	C	-2.18	16.65	-18.83	-37.72	-18.89	3.2	295	205	88
	D	-1.50	14.81	-16.31	-34.11	-17.79	1.7	178	147	283
	E	-1.48	17.14	-18.62	-36.66	-18.05	3.2	197	210	68
	F	-1.05	14.86	-15.91	-34.36	-18.45	2.9	96	154	49
	G	-0.95	16.59	-17.54	-35.44	-17.91	2.1	86	157	339

*Sistema com a porção aromática incluída na cavidade da ciclodextrina.

Fonte: O autor (2026).

Tabela 11 - Energias livres de associação em água ($\Delta_w G$), de solvatação ($\Delta_{solv} G$) energias de interação determinados computacionalmente ($\Delta_c G^o$, $\Delta_c H^o$ e $T\Delta_c S^o$) e os parâmetros geométricos de associação obtidos a partir do APARM (r , α , β e γ). Dados para os sistemas empregados para calcular o log K teórico, a $T = 298$ K, após o estudo de 11.232 sistemas iniciais (3.744 para cada isômero de HP β CD (6)) no nível de teoria GFN2-xTB (ALPB).

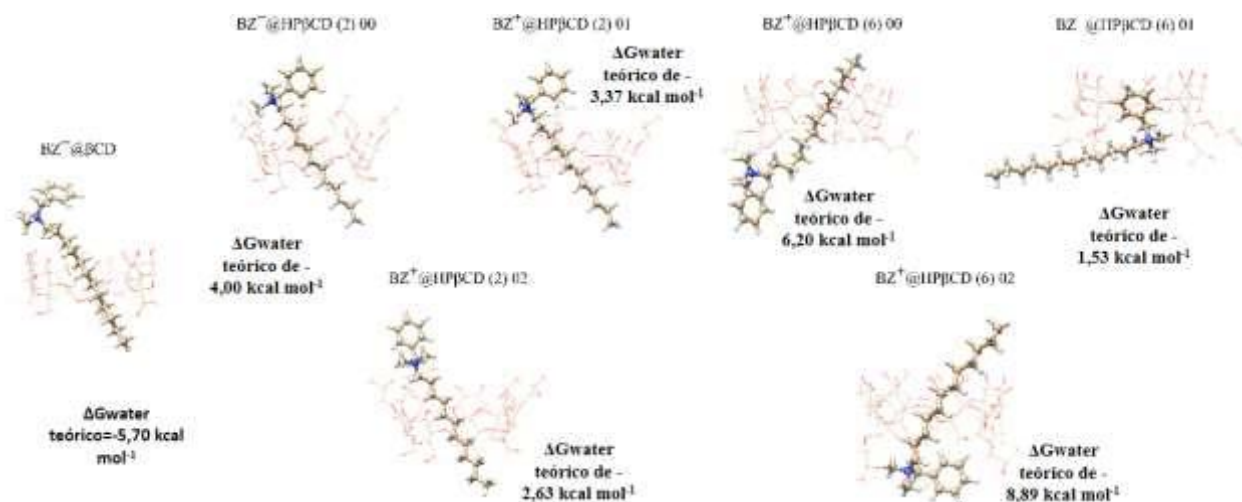
BA ⁺ @HP β CD (propyl at tail)	ID	ΔG_{water} (kcal mol ⁻¹)	$\Delta_{solv} G$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta_c G^o$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta_c H^o$ (kcal mol ⁻¹)	$T\Delta_c S^o$ (kcal mol ⁻¹)	r (Å)	α (deg)	β (deg)	γ (deg)
(6) 00 log K=5.597	A	-6.20	23.77	-29.97	-50.21	-20.24	4.4	121	136	36
	B	-5.77	17.05	-22.82	-42.29	-19.47	3.3	290	130	36
	C	-5.23	22.13	-27.36	-45.80	-18.44	4.3	239	25	335
	D	-5.21	24.48	-29.69	-50.05	-20.36	4.3	116	138	35
	E*	-5.20	21.56	-26.77	-45.67	-18.90	6.8	219	235	50
	F	-4.91	23.34	-28.25	-48.60	-20.35	4.8	112	133	41
	G	-4.82	20.31	-25.13	-45.36	-20.22	3.2	271	129	29
	H	-4.70	24.05	-28.75	-48.31	-19.56	6.1	23	44	10
	I	-4.42	15.90	-20.31	-39.53	-19.21	6.1	352	229	86
	J	-4.35	22.26	-26.61	-45.67	-19.06	4.3	234	25	332
(6) 01 log K=1.611	A*	-1.53	14.38	-15.91	-34.57	-18.66	4.9	252	66	87
	B*	-1.40	17.94	-19.34	-37.57	-18.23	6.8	33	125	77
	C	-0.32	15.04	-15.35	-35.95	-20.60	4.9	43	224	57
	D	-0.28	14.32	-14.60	-34.54	-19.94	5	302	216	31
	E	-0.16	14.16	-14.32	-33.61	-19.29	1.4	8	152	26
	F	-0.13	13.68	-13.82	-33.87	-20.05	4.2	108	149	278
(6) 02 log K=7.496	A	-8.89	20.91	-29.80	-52.00	-22.20	1.4	305	203	342

*System with BZ⁺ aromatic portion included in the CD cavity.

Fonte: O autor (2026).

Juntamente com os dados termodinâmicos, alguns parâmetros representativos de associação foram incluídos nessas tabelas.

Figura 30 - Arranjo espacial do sistema mais estável (A na Tabela 9) para o composto de inclusão BZ⁺@βCD. Os sistemas mais representativos obtidos a partir do estudo de 26.208 sistemas iniciais (7 x 3.744) no nível de teoria GFN2-xTB (ALPB) são representados.



Fonte: O autor (2026).

De acordo com a Figura 30 e os dados nas Tabelas 9-11, vemos que os sistemas mais estáveis implicam a inclusão da cadeia linear do BZ⁺ dentro da cavidade do CD. Para o HPβCD (6) 01 menos estável (Figura 30), observamos a porção aromática BZ⁺ do hóspede dentro do hospedeiro HPβCD o que corrobora com os ensaios bidimensionais de NOESY anteriormente discutido. Alguns sistemas representativos contribuem para a constante de ligação, com a porção aromática do convidado BZ⁺ dentro da cavidade do CD (aqueles estão marcados com * nas Tabelas 9-11).

5.3 Ensaios Biológicos

São apresentados abaixo, os resultados dos ensaios biológicos bem como sua comparação com a literatura científica da área.

5.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração inibitória mediana

Na etapa de ensaios biológicos foram realizados testes microbiológicos com o intuito de se avaliar se a presença de βCD e HPβCD possuem relação na efetividade do CBZ na ação antimicrobiana contra quatro linhagens de *Staphylococcus aureus*, sendo uma ATCC e as outras

três clínicas. Também foram realizados os ensaios de CIM das duas formas isoladas (β CD, HP β CD) que apresentaram valor de CIM superior a 1000 ug/mL (>1000) o sugere que as ciclodextrinas não possuem atividade antimicrobiana e seu papel é atuar como sistemas carreadores de fármacos.

A escolha inicial das dosagens se basearam nos estudos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do cloreto de benzalcônio para HA-MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) foi de 5 μ g/mL (Rahmi, K. A; Purwono, P. B; Rochmanti, M, 2019).

Os resultados obtidos estão representados nas Figuras (37 a 41) tanto na determinação da CIM quanto na determinação da IC₅₀ para as linhagens de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923 (37), 170 (38), 15 (39), 1369061 (40) e ATCC 6538(41). Em todas as figuras, consideram-se os sistemas: CBZ (curva vermelha) e dos sistemas: CBZ/ β CD (curva lilás), CBZ/HP β CD (curva verde). Empregando o trabalho de Srinivasan e Lloyd (2024), foi utilizada a equação 6 de logística de quatro parâmetros (4PL) abaixo para obter o valor estimado de IC₅₀ de forma mais precisa.

$$Y = Y_{\{min\}} + \frac{Y_{\{max\}} - Y_{\{min\}}}{1 + 10^{\{[(\log IC_{\{50\}} - X) \times h]\}}}$$
 Eq 6.

Onde:

Y = Resposta observada;

Y_{max} = Resposta Máxima;

Y_{min} = Resposta Mínima;

X = Logaritmo decimal da concentração;

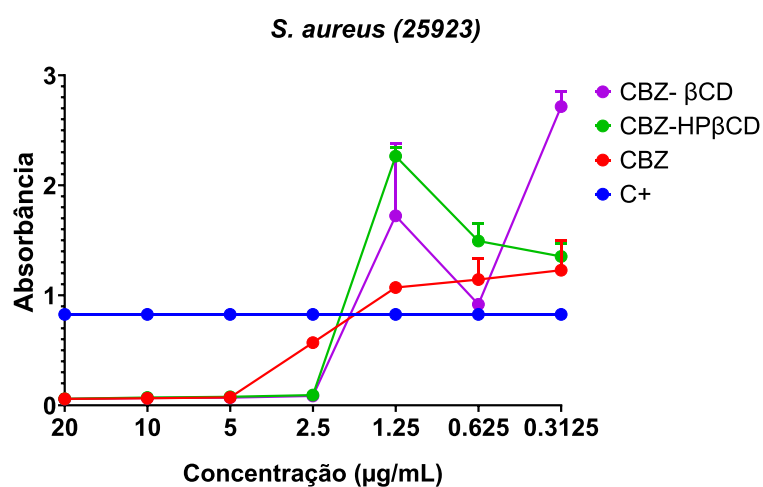
h = Coeficiente de Hill (inclinação da curva);

IC₅₀ = Concentração responsável por 50% da inibição da resposta biológica.

Os resultados obtidos de CIM frente às linhagens de *Staphylococcus aureus* estão apresentados na Tabela 12, os quais mostram que a CIM encontrada para o CBZ frente às linhagens de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 170, 1369061, 15 foi 5 μ g/mL e a ATCC 6538 foi de 0,97. As Figuras 37 a 40 demonstram que a CIM do CBZ complexado na proporção molar 1:1 nos CIs (CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD) foi menor que a CIM do CBZ puro quando comparada com as linhagens ATCC 25923, 170, 1369061, 15 de *Staphylococcus aureus*, tendo

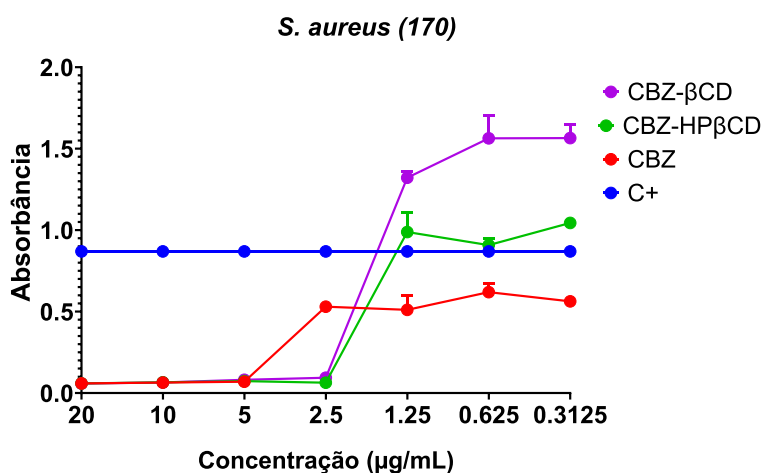
o valor obtido de aproximadamente 2,5 µg/mL, tendo como exceção na figura 41 a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 1,80 µg/mL para CBZ/βCD e 1,52 para CBZ/HPβCD.

Figura 31 - Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração inibitória mediana, contra linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, do CBZ (curva vermelha) e dos sistemas: CBZ/βCD (curva lilás), CBZ/HPβCD (curva verde)



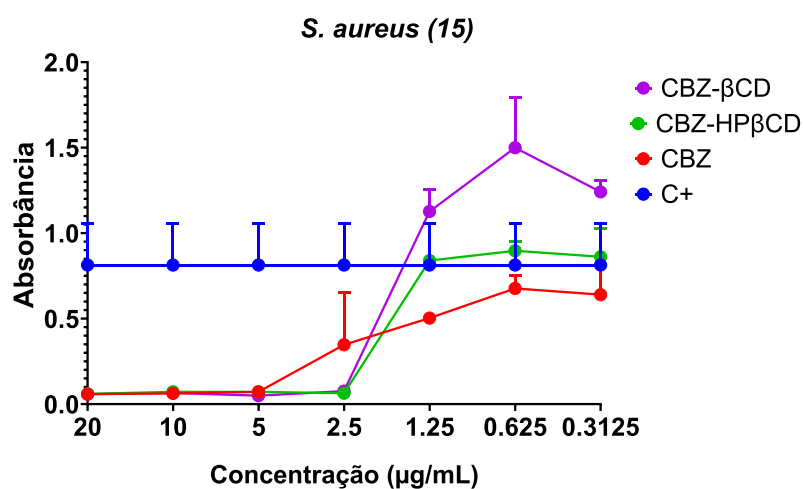
Fonte: o autor (2026).

Figura 32 - Determinação da concentração inibitória mínima e concentração inibitória mediana, contra a cepa clínica *Staphylococcus aureus* 170, do CBZ (curva vermelha) e dos sistemas: CBZ/βCD (curva lilás), CBZ/HPβCD (curva verde)



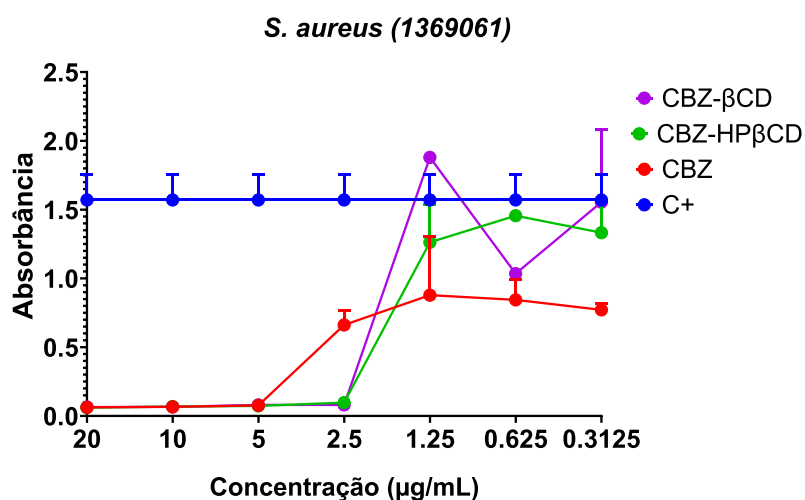
Fonte: o autor (2026).

Figura 33 - Determinação da concentração inibitória mínima e concentração inibitória mediana, contra a cepa clínica *Staphylococcus aureus* 15, do CBZ (curva vermelha) e dos sistemas: CBZ/ β CD (curva lilás), CBZ/HP β CD (curva verde)



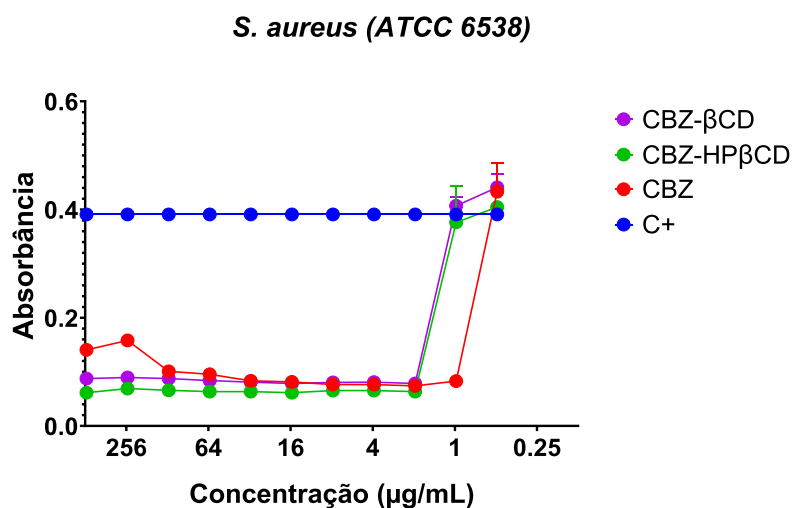
Fonte: o autor (2026).

Figura 34 - Determinação da concentração inibitória mínima e concentração inibitória mediana, contra a cepa clínica *Staphylococcus aureus* 1369061, do CBZ (curva vermelha) e dos sistemas: CBZ/ β CD (curva lilás), CBZ/HP β CD (curva verde)



Fonte: o autor (2026).

Figura 35 - Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração inibitória mediana, contra a cepa clínica *Staphylococcus aureus* ATCC6538, do CBZ (curva vermelha) e dos sistemas: CBZ/ β CD (curva lilás), CBZ/HP β CD (curva verde)



Fonte: o autor (2026).

Tabela 12 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do CBZ puro e complexado contra as quatro linhagens de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, 170, 15 e 1369061).

Sistemas	$\mu\text{g/mL}$ <i>Staphylococcus aureus</i> . ATCC 25923	$\mu\text{g/mL}$ <i>Staphylococcus aureus</i> . 170	$\mu\text{g/mL}$ <i>Staphylococcus aureus</i> . 15	$\mu\text{g/mL}$ <i>Staphylococcus aureus</i> . 1369061	$\mu\text{g/mL}$ <i>Staphylococcus aureus</i> . ATCC 6538
CBZ	5	5	5	5	0,97
CBZ/ β CD	2,5	2,5	2,5	2,5	1,80
CBZ/HP β CD	2,5	2,5	2,5	2,5	1,52

Fonte: o autor (2026).

Tabela 13 - Determinação da concentração inibitória mediana (IC_{50}) do CBZ puro e complexado contra as quatro linhagens de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, 170, 15 e 1369061) empregando a equação 6 de 4PL.

Sistemas	$\mu\text{g/mL}$ <i>Staphylococcus aureus</i> . ATCC 25923	$\mu\text{g/mL}$ <i>Staphylococcus aureus</i> . 170	$\mu\text{g/mL}$ <i>Staphylococcus aureus</i> .15	$\mu\text{g/mL}$ <i>Staphylococcus aureus</i> . 1369061	$\mu\text{g/mL}$ <i>Staphylococcus aureus</i> . ATCC 6538
CBZ	2,0	2,1	2,0	1,90	0,50
CBZ/ β CD	1,70	1,80	1,70	1,60	0,75
CBZ/HP β CD	1,80	1,90	1,80	1,50	0,75

Fonte: o autor (2026).

Os resultados obtidos para a IC_{50} estão apresentados na Tabela 13 acima. Os complexos de inclusão CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD apresentaram redução da IC_{50} para quase todas as linhagens de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 170, *Staphylococcus aureus* .15 e *Staphylococcus aureus* 1369061, tendo como exceção a ATCC 6538.

Os dois sistemas estudados são considerados promissores contra *Staphylococcus aureus*, uma vez que eles obtiveram redução da CIM e da IC_{50} do CBZ.

O aumento da atividade antimicrobiana de CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD contra *Staphylococcus aureus* sugere ser atribuída ao surgimento no complexo de inclusão de novas interações intermoleculares demonstradas pelo valor da constante K (ordem de grandeza 10^3) obtida no experimento de ITC (figuras 26 e 27 e tabelas 6 e 7) que envolve os grupos hidroxilos da β CD e da HP β CD com a membrana da célula bacteriana. Essa abordagem é corroborada pelos relatos de Suárez e colaboradores (2014) na literatura, onde o fenômeno de adesão media o efeito sinérgico do complexo de inclusão envolvendo fármaco/ciclodextrina e que possibilitam surgir novas interações iônicas entre um fármaco com carga positiva e uma superfície celular com carga negativa. Esse mecanismo pode levar a redução da dose que é algo bastante relevante, mas, precisa ser avaliada em ensaios posteriores. A redução da dosagem contribui para redução da ocorrência de efeitos adversos, contribuindo para uma melhor qualidade de vida ao paciente e a uma menor taxa de exposição ao patógeno, favorecendo positivamente a redução da resistência antimicrobiana já que a taxa de exposição ao patógeno é um importante fator que leva ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana e que é

reconhecido internacionalmente como um grave problema de saúde pública na atualidade (Miranda *et al.*, 2020).

Por fim, os resultados sugerem que ambos os sistemas não se enquadram em sistema linhagem-dependente assim como os encontrados nos estudos de Almeida 2024 e Miranda 2020 *et al.*, já que os mesmos apresentaram gráficos com curvas semelhantes para a maioria das linhagens estudadas. Isso implica que os complexos estudados podem ter ação para diferentes linhagens da mesma espécie e assim sugere que a ação é sobre a espécie (Miranda *et al.*, 2020; Almeida, 2024).

Além de Miranda *et al.* (2020) e Almeida (2024), podemos confirmar estudos recentes que corroboram com o achado em que complexos à base de fármaco/ciclodextrina não se enquadram em sistema do tipo linhagem-dependente. Os achados recentes demonstraram que a atividade antimicrobiana possui um mecanismo homogêneo em diferentes isolados bacterianos, o que corrobora que a ação ocorre nas estruturas das macromoléculas que compõem a estrutura celular bacteriana. Yamamura *et al.* (2024) encontraram em seus estudos que fármacos derivados anfifílicos de ciclodextrina demonstram apresentar atividade antimicrobiana que está associada principalmente ao mecanismo de perturbação da membrana celular bacteriana, sendo esse mecanismo potencial perturbador de diferentes isolados com o mesmo mecanismo de inativação. Da mesma forma, Alabrahim *et al.* (2025) obtiveram em seus ensaios que o processo de complexação de compostos bioativos provenientes de extratos naturais em β -ciclodextrina promoveu de forma significativa o aumento consistente da atividade antimicrobiana quando testado com diferentes linhagens de microrganismos, sem ocorrer seleção para isolados específicos. O mecanismo foi atribuído a maior biodisponibilidade do fármaco. Ainda Zhang *et al.* (2025), obtiveram resultados que corroboram nesse sentido. Foi verificado o aumento da atividade antimicrobiana da clortetraciclina após ser complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina, estabelecendo que o padrão de resposta se repete com a espécie bacteriana testada e não linhagens diferentes. Já, Fajardo *et al.* (2025) encontraram que quando ocorre a inclusão de ácido ursólico em β -ciclodextrina, apresenta o incremento de maneira uniforme da atividade antimicrobiana em diferentes linhagens avaliadas em seus estudos. Ainda de maneira adicional, Kharbouch *et al.* (2025) demonstraram que complexos de inclusão envolvendo benzotiazol-ftalimida complexado à metil- β -ciclodextrina sugere levar a um aumento consistente da atividade antimicrobiana quando comparados às formas livre da benzotiazol-ftalimida, o que corrobora que o mecanismo de atuação é em alvos celulares conservados.

De forma global, esses resultados de estudos recentes corroboram com a hipótese de que sistemas de complexos sintetizados com ciclodextrinas podem aumentar a atividade antibacteriana através de mecanismos que não são dependentes de uma determinada linhagem, o que favorece uma resposta homogênea em diferentes linhagens pertencentes à mesma espécie bacteriana.

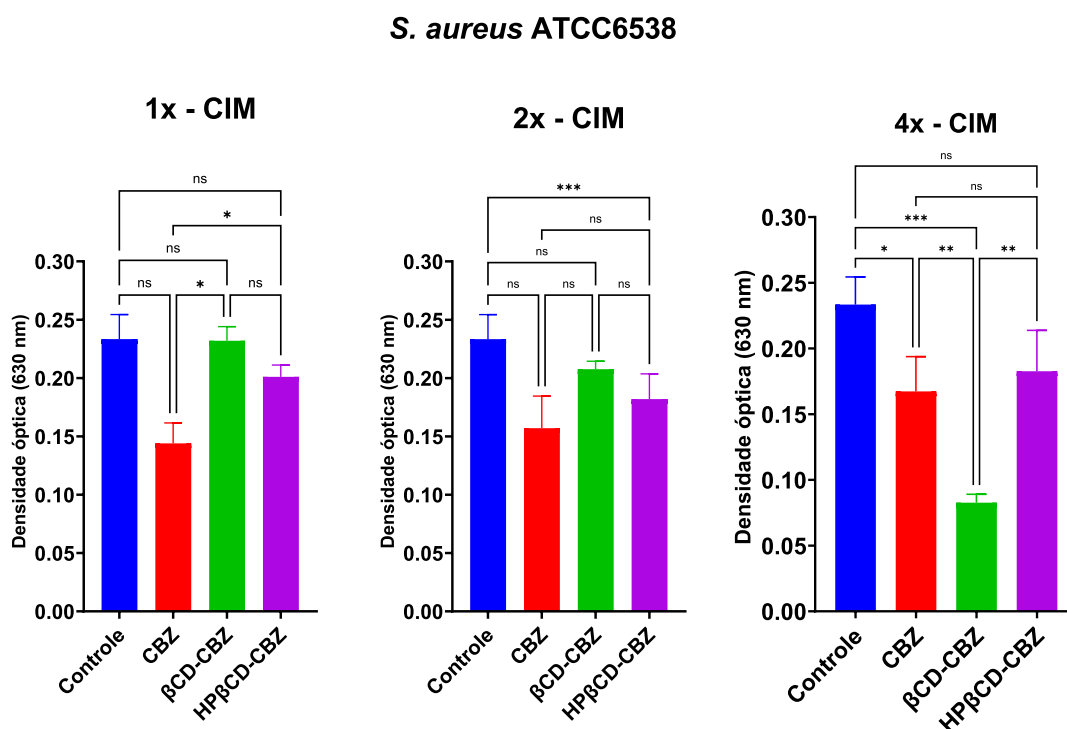
5.3.2 Avaliação da erradicação de biofilme pré-formado

Os microrganismos que possuem uma relevância clínica, também possuem uma elevada capacidade de se organizar formando biofilmes. Considerando esse aspecto, realizar o ensaio de erradicação de biofilme com o microrganismo estudado *Staphylococcus aureus*, pode representar uma ferramenta importante em estudos *in vitro* na análise da eficácia de complexos antimicrobianos, mas, sempre somados a realização de outros ensaios, tais como (CIM e Interação fármaco-membrana). A organização estrutural do biofilme ajuda a conferir uma elevada resistência aos compostos antimicrobianos, considerando que a matriz extracelular possui um mecanismo que dificulta a penetração dos compostos antimicrobianos no interior do biofilme, e assim, favorece o mecanismo de resistência bacteriana (Amorim *et al.*, 2020).

Nesse estudo, foi avaliado a atividade de sistemas nanoestruturados (complexos) quando em contato com biofilmes pré-formados, permitindo assim compreender de uma maneira mais global o mecanismo dos complexos estudados frente às bactérias de *Staphylococcus aureus*.

A análise do mecanismo de ação dos sistemas CBZ, CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD frente ao biofilme pré-formado de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 demonstrou ter um perfil de atividade dependente da concentração administrada da droga. De uma forma geral, demonstrou-se que os sistemas analisados resultaram em efeitos diferentes na biomassa residual do biofilme de *Staphylococcus aureus*, sugerindo que a presença das ciclodextrinas enquanto hospedeira pode influenciar a atividade antibiofilme que o cloreto de benzalcônio possui como podemos observar na figura 35.

Figura 36 - Atividade dos sistemas CBZ, CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD sobre biofilme pré-formado de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. A) Biomassa residual do biofilme após tratamento na concentração correspondente a $1 \times$ a concentração inibitória mínima (CIM); B) biomassa residual do biofilme após tratamento na concentração correspondente a $2 \times$ CIM; C) biomassa residual do biofilme após tratamento na concentração correspondente a $4 \times$ CIM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.



Fonte: O autor.

Quando testado na concentração que corresponde o valor de $1 \times$ CIM (Figura 35), observa-se que o sistema contendo apenas CBZ apresenta uma redução significativa da biomassa residual do biofilme de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 quando comparado ao controle e a todos os outros compostos testados. Em contrapartida, os sistemas CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD tiveram um comportamento semelhante ao do controle, muito embora tenham resultado em discreta redução da biomassa residual, dessa forma não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Já na concentração que corresponde o valor de $2 \times$ CIM (Figura 35), obteve-se uma redução da biomassa residual do biofilme em todos os compostos avaliados quando comparado ao controle. Dessa forma, apenas o complexo CBZ/HP β CD apresentou

diferença estatisticamente significativa. Os sistemas CBZ e CBZ/ β CD também apresentaram uma redução discreta da biomassa residual, porém não tendo significância estatística.

Nos testes envolvendo os compostos na concentração que corresponde o valor de $4 \times$ CIM (Figura 35), todos os compostos resultaram em uma redução significativa do biofilme de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 quanto a sua biomassa residual se comparado ao grupo controle. Entre os sistemas, o sistema CBZ/ β CD se destacou apresentando uma redução mais acentuada da densidade óptica quando se compara com os outros grupos avaliados, apresentando assim uma diferença estatisticamente significativa em relação ao fármaco CBZ livre e ao complexo CBZ/HP β CD. Sugere que o resultado obtido para o complexo CBZ/ β CD pode estar diretamente relacionado às alterações físico-químicas que são promovidas pela presença da β CD permitindo novas interações intermoleculares quando comparado a forma livre do CBZ. Sendo assim, fica evidente que a formação do complexo de inclusão sugere o favorecimento de alterações no mecanismo de dispersão do composto em meio aquoso. Além disso, modifica a dinâmica do mecanismo de interação que ocorre entre o surfactante catiônico e os componentes aniônicos presentes na matriz extracelular do biofilme bacteriano (Suárez *et al.*, 2014; Real *et al.*, 2021). Alterações essas, que favorecem a interação do complexo com a matriz do biofilme, contribuindo para uma redução mais acentuada da biomassa residual obtida na concentração $4 \times$ CIM que é a maior concentração avaliada.

Sobretudo, é descrito na literatura que os sistemas supramoleculares compostos por fármaco/ciclodextrinas, podem alterar parâmetros físico-químicos que resultam na disponibilidade do fármaco, no mecanismo de estabilidade coloidal e no mecanismo de interação com membranas biológicas, dessa forma, modificando diretamente a atividade antimicrobiana (Liu; Li; Shi, 2021; Park; Otte; Park, 2022). Nesse estudo, os resultados apresentados para o complexo CBZ/ β CD corroboram de forma a elucidar os dados microbiológicos de redução do CIM de $5,0 \mu\text{g/ml}$ para $2,5 \mu\text{g/ml}$ ou $1,80 \mu\text{g/ml}$ para ATCC 6538 (não reduzido se comparado com o fármaco livre) e dados coloidais de redução da condução em solução sugerindo que partículas carregadas estão menos disponíveis (sugerindo inclusão) e o aumento do tamanho das partículas no DLS sugerindo a formação de complexos/sistemas supramoleculares que foram anteriormente obtidos, corroborando com a hipótese de que a inclusão do CBZ pela β CD modifica o comportamento do CBZ frente a estruturas bacterianas.

Em relação ao sistema CBZ/HP β CD, embora tenha sido observada atividade sobre o biofilme bacteriano, os resultados sugerem comportamento distinto daquele observado para o

sistema contendo β -ciclodextrina. A maior hidratação e solubilidade da HP β CD podem influenciar a organização supramolecular do sistema em solução, alterando a disponibilidade do CBZ e a forma de interação com a matriz do biofilme (Derkach; Voron'ko; Kuchina, 2022). Dessa maneira, mesmo apresentando atividade antimicrobiana, o sistema CBZ/HP β CD demonstrou menor capacidade de redução da biomassa residual quando comparado ao sistema CBZ/ β CD na maior concentração avaliada.

De uma forma geral, os resultados apontaram para o sentido de que os sistemas contendo ciclodextrinas alteram a atividade do cloreto de benzalcônio quando exposto a biofilmes bacterianos pré-formados. O complexo CBZ/ β CD apresentou resultados promissores quando comparado aos outros compostos, e especialmente quando testado na concentração que corresponde a $4 \times \text{CIM}$, sugerindo que a complexação com β -ciclodextrina é uma estratégia relevante e promissora para potencializar a atividade antibiofilme do CBZ frente a biofilmes bacterianos organizados.

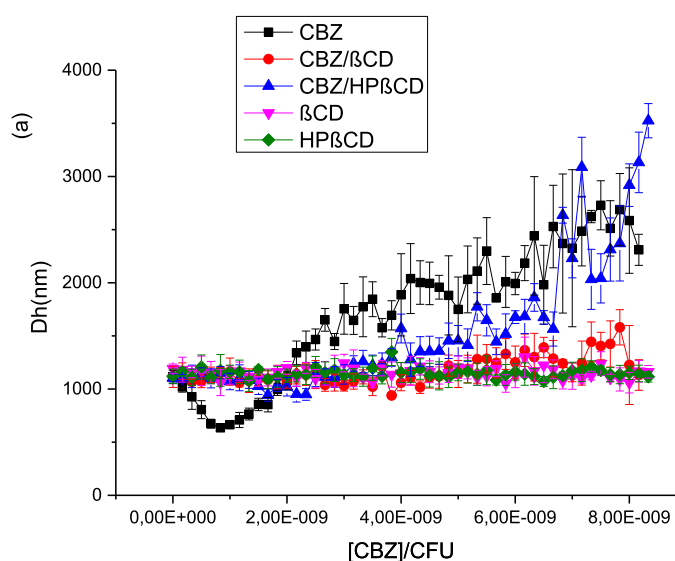
5.3.3 Avaliação da interação fármaco-membrana

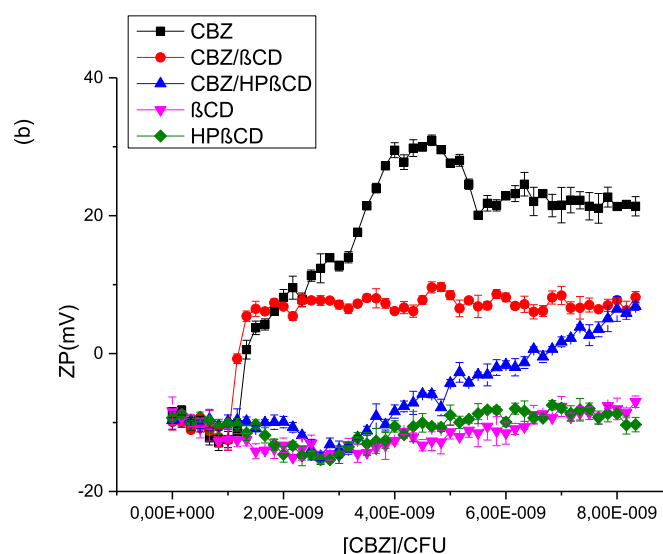
O mecanismo pelo qual surfactantes catiônicos agem como antimicrobiano é totalmente dependente da interação que ocorre entre a estrutura molecular do surfactante quando colocado em contato com a superfície da membrana celular da bactéria em questão que nesse estudo é a *Staphylococcus aureus*. Mais especificamente, o CBZ empregado nesse estudo, possui um mecanismo da adsorção que ocorre inicialmente com a predominância de interações de natureza eletrostáticas do grupamento amônio quaternário que é carregado positivamente com os grupamentos de natureza aniônica que estão presentes na parede celular da membrana da bactéria em questão. Dentre os grupamentos que possuem interação destacada com o CBZ em bactérias de natureza Gram-positivas como a bactéria empregada nesse estudo merecem destaque os ácidos teicoicos e lipoteicoicos. Recentemente na literatura científica, tem se demonstrado que na complexação de moléculas antimicrobianas em matrizes do tipo ciclodextrinas pode se alterar de forma significativa o mecanismo de interação dos complexos formados entre fármaco/CD com as referidas membranas das bacterianas, isso influencia o mecanismo que regula sua disponibilidade, sua estabilidade e também sua eficácia como agente antimicrobiano (Boczar; Michalska, 2022; Alabrahim *et al.*, 2025).

Foram empregadas medidas de diâmetro hidrodinâmico (Dh) figura 36a e potencial zeta (ZP) figura 36b para a realização da caracterização/determinação das interações que ocorrem

entre os sistemas CBZ, β CD, HP β CD, CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD já que são parâmetros largamente empregados na análise e ensaios para aferir alterações que ocorrem na estabilidade de sistemas coloidais e também nos mecanismos de interação de complexos antimicrobianos com superfícies celulares do tipo membrana. Esses parâmetros possibilitam analisar de forma simultânea se ocorrem modificações na composição estrutural das suspensões bacterianas e também alterações na carga de superfície diretamente associada à adsorção dos compostos estudados (Boczar; Michalska, 2022; Andersen; Sørensen; Holm, 2026).

Figura 37 - a) Medidas de diâmetros hidrodinâmicos (D_h) em função do [CBZ]/CFU dos compostos CBZ, β CD, HP β CD, CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD, b) Medidas de potencial zeta (ZP) em função do [CBZ]/CFU dos compostos CBZ, β CD, HP β CD, CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD





Fonte: O autor

Nesse trabalho, o ponto de início das titulações corresponde à composição apenas do inóculo bacteriano, ou seja, não tendo ainda adição de fármaco na forma livre ou na forma de complexos objeto direto da avaliação desse trabalho, representando dessa forma o Dh de início das células presentes na suspensão. O Dh resultante dessa medida inicial é próximo de 1100 nm e PZ em torno de -10 mV, o que é normalmente encontrado em suspensão bacteriana com agregados celulares na condição de estabilizados. É relatado na literatura que as unidades de células de *Staphylococcus aureus* apresentam aproximadamente diâmetro que varia entre 0,5 e 1,0 μm , sendo assim, os valores obtidos nas aferições por DLS sugerem a formação de agregados bacterianos e possivelmente que não estão organizados na forma de células isoladas, já que essa espécie demonstra uma tendência natural à agregação celular. Analisando o primeiro ponto da titulação com os demais pontos, as modificações refletem alterações na estrutura coloidal, que são provavelmente decorrentes da interação entre as moléculas e os complexos estudados e a superfície bacteriana.

Ao avaliar as ciclodextrinas nas formas isoladas, foram determinadas alterações discretas sobre os parâmetros avaliados. As duas formas empregadas no ensaio βCD e $\text{HP}\beta\text{CD}$ de uma forma geral levaram a pequenas modificações tanto no ZP quanto no Dh das suspensões bacterianas, o que corrobora com fracas interações com a superfície celular. Embora objeto de análise, esse comportamento era previsto, tendo em vista que nos ensaios de CIM as duas formas isoladas (βCD , $\text{HP}\beta\text{CD}$) apresentaram valor de CIM superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (>1000) o que sugere que as ciclodextrinas não possuem atividade antimicrobiana e seu papel é atuar como

sistemas carreadores de fármacos e modificando a disponibilidade, solubilidade e comportamento interfacial das moléculas complexadas (Boczar; Michalska, 2022; Zhang *et al.*, 2025).

De forma distinta ao comparar com as formas isoladas, quando se realiza o ensaio com a adição de CBZ, ocorrem grandes modificações nos parâmetros coloidais. Ocorre aumento progressivo do *ZP* no sentido à neutralidade evidenciando a interação das moléculas de natureza catiônica do surfactante com a superfície bacteriana. Foi medido valores de *ZP* no entorno de 0 mV quando atingido concentrações próximos da ordem de $1,0\text{--}1,5 \times 10^{-9}$ [CBZ]/CFU, algo a se destacar, já que esses valores de concentrações corresponde a região próxima ao entorno da concentração inibitória mínima do composto CBZ ($\text{CIM} = 5 \mu\text{g mL}^{-1}$). O perfil de comportamento do CBZ corrobora classicamente com o mecanismo de ação dos sais quaternários de amônio, onde a neutralização das cargas superficiais facilita aproximação molecular e essas interações decorrentes da proximidade e natureza eletrostática desencadeia perturbações na entropia da membrana celular.

Ao avaliar o complexo CBZ/ β CD, obteve-se com os resultados alterações significativas do comportamento/perfil de interação com as membranas celulares. O complexo demonstrou alta capacidade de neutralizar as cargas presentes na superfície da membrana celular bacteriana, corroborando que a matriz complexante β CD pode favorecer que o CBZ aproxime da membrana celular bacteriana. Os valores de *ZP* atingiram próximo ao ponto isoelétrico quando em concentrações iguais ou pouco inferiores às concentrações observadas quando foi avaliado o CBZ livre, enquanto que o *Dh* máximo ficou aproximadamente entre 1500 – 1600 nm, o que corresponde a um incremento de aproximadamente 40 a 50% quando comparado ao valor inicial. Sugere-se que a presença da β CD pode diminuir os processos de autoagregação que ocorrem com o CBZ quando em solução, e assim, aumentar a fração molar que está disponível de forma efetiva para realizar a interação com a membrana celular bacteriana (Boczar; Michalska, 2022; Alabrahim *et al.*, 2025). Importante destacar que esse comportamento foi observado quando as concentrações se aproximaram ao CIM do complexo CBZ/ β CD ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), corroborando com o mecanismo de dependência entre interação do fármaco com a membrana e atividade antimicrobiana.

Ao avaliar o segundo complexo estudado CBZ/HP β CD, obteve-se um perfil distinto do complexo CBZ/ β CD. Mesmo considerando que a neutralização das cargas superficiais ocorreu de forma mais gradual, à medida que a aproximação ao ponto isoelétrico ocorreu em concentrações mais elevadas, aproximadamente de $6 - 7 \times 10^{-9}$ [CBZ]/CFU, observou-se

maiores alterações no *Dh* das suspensões bacterianas. Foram obtidos valores de *Dh* próximos de 3500 nm, o que demonstra incremento superior a 200% quando comparado ao tamanho inicial da suspensão bacteriana. Resultado esse que corrobora que a matriz HP β CD quando presente junto ao fármaco auxilia no mecanismo de interação que resulta em alterações estruturais mais extensas quanto à organização do sistema coloidal do ponto de vista supramolecular. Na HP β CD a introdução dos grupamentos hidroxipropila (HP) leva ao aumento significativo da solubilidade da HP β CD em fase aquosa e dessa forma resulta em favorecer a formação de complexo de inclusão com maior estabilidade e mais dispersos em meio da solução, favorecendo uma interação diferente da β CD com a membrana celular bacteriana (Zhang et al., 2025; Andersen; Sørensen; Holm, 2026). As alterações discutidas foram observadas em concentrações quando próximas à CIM do complexo HP β CD (2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Comparando os dois sistemas, diferenças são encontradas entre os dois complexos. O que indica que as matrizes do tipo β CD e a HP β CD regem mecanismos diferentes de interação entre o fármaco complexado a membrana celular bacteriana alvo. Quando é empregado no CI matriz do tipo β CD, sugere que mecanismo é favorecido com a predominância de processos de interação superficial tendo como consequência a neutralização de cargas aniônicas presentes na membrana celular bacteriana, essa constatação se deve ao *ZP* atingir a neutralidade de forma rápida ou com um número menor de adições. Quando é empregado no CI a matriz do tipo HP β CD, sugere que ocorre alterações mais efetivas na organização estrutural da suspensão coloidal bacteriana, corroborado pelo maior aumento do *Dh* se comparado ao sistema anterior. Esse entendimento é sustentado em trabalhos recentes que apresentam sistemas semelhantes onde alterações estruturais realizadas em matrizes do tipo ciclodextrinas podem modificar de forma substancial a estabilidade dos complexos de inclusão e também o mecanismo como compostos antimicrobianos interagem com membranas celulares bacterianas (Alabrahim et al., 2025; Zhang et al., 2025).

Quando se correlaciona os resultados da caracterização coloidal e microbiológicos realizados nesse trabalho, esse entendimento é reforçado. Os sistemas complexados apresentaram comportamento distinto daquele observado para o CBZ livre também nas referidas caracterizações, demonstrando que o processo de complexação não apenas altera propriedades físico-químicas do surfactante como ficou determinado no estudo de caracterização estrutural, mas também modifica diretamente o mecanismo de como o surfactante interage com a membrana celular bacteriana. O complexo CBZ/ β CD demonstrou uma maior eficácia em neutralizar cargas superficiais da membrana celular bacteriana, já o

complexo CBZ/HP β CD demonstrou ter gerado maiores alterações estruturais na suspensão coloidal que foi observada por DLS com maior aumento do Dh . Dessa forma, os resultados corroboram que a ação antimicrobiana registrada é causada não somente pelo surfactante CBZ, mas auxiliada também das alterações causadas pela matriz ciclodextrina na dinâmica de adsorção, organização supramolecular e por fim no mecanismo de interação fármaco–membrana.

Todos os resultados em conjunto envolvendo a avaliação da interação fármaco membrana, caracterização estrutural realizados na primeira fase desse trabalho e avaliação microbiológica, corroboram com as evidências recentes da literatura científica que sistemas do tipo fármaco/ciclodextrinas são estratégias promissoras para regulação da atividade antimicrobiana e o aumento da eficiência de compostos antimicrobiana frente a microrganismos patogênicos e podendo ser uma importante ferramenta contra a resistência antimicrobiana. Não apenas favorece melhorias da solubilidade e estabilidade dos complexos. Os complexos de inclusão geralmente alteram significativamente o mecanismo molecular de como os agentes antimicrobianos interagem com as superfícies celulares bacterianas em seus grupamentos aniônicos, favorecendo a otimização de sua atividade biológica (Alabrahim *et al.*, 2025; Zhang *et al.*, 2025; Boczar; Michalska, 2022).

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou:

A utilização de β CD e HP β CD na função de matrizes supramoleculares possibilitou a obtenção de sistemas com viabilidade de estudo na utilização de sistema e liberação controlada de drogas. A estratégia de complexação possibilitou a obtenção de sistemas com boa estabilidade e também propriedades físico-químicas diferentes das espécies isoladas.

Os espectros de FTIR apresentaram deslocamento nas bandas que demonstrando alterações nos modos vibracionais dos CI's quando comparados às espécies isoladas (precursoras) e mistura mecânica. O que demonstrou mudanças ocorridas no ambiente químico o que sugere formação de novas interações intermoleculares.

A análise térmica corroborou com a formação do complexo. O CBZ puro sofreu decomposição na faixa de 156,9 a 292,0°C tendo uma perda de massa maior que 98%. Já os complexos de inclusão formados deslocaram seus eventos de decomposição para faixas de temperaturas mais elevadas que terminaram por volta de 511°C. Esses dados, além de corroborar com a formação do complexo, ainda sugerem que os complexos sintetizados possuem uma maior estabilidade térmica e também evidenciam que matrizes do tipo oligossacarídicas exercem um papel protetor sobre o hóspede.

A avaliação termodinâmica realizada por meio de ITC corroborou a espontaneidade da complexação em meio aquoso por meio dos parâmetros obtidos. Para o sistema CBZ/ β CD $N = 1,26$ e para CBZ/HP β CD o $N = 1,09$, sendo então descritos por um modelo de inclusão na estequiometria de 1:1. As constantes de associação obtidas foram para o CBZ/ β CD $K = 5,03 \times 10^3$ M e para CBZ/HP β CD $K = 7,19 \times 10^3$, sendo na ordem 10^3 o que sugere formação de novas interações intermoleculares entre matriz e hóspede. Quanto aos valores de energia livre de Gibbs ($\Delta_{int}G^\circ = -5053,2$ cal mol⁻¹ e $-5269,9$ cal mol⁻¹, respectivamente) negativos, demonstrou claramente que a complexação é espontânea destacando de forma sutil ser mais favorável para HP β CD.

Os resultados obtidos apontam que as interações entre o CBZ e as ciclodextrinas são governadas por um conjunto de efeitos de natureza hidrofóbica, interações de van der Waals e também a reorganização das moléculas de água que estão presentes dentro da cavidade das CDs. O maior valor da constante de associação obtida para a HP β CD, corrobora que a alteração química da β CD a partir da adição de um grupo hidroxipropil gera condições que favorece a acomodação e estabilização da molécula do surfactante em solução aquosa.

A caracterização coloidal elucidou que a interação existente entre o CBZ e as ciclodextrinas não se limita apenas à formação de complexos moleculares simples. As medidas de D_h sugeriram formação de agregados supramoleculares que possuem organização estrutural elevada.

A avaliação do ZP demonstrou redução progressiva das cargas positivas do CBZ ao ser titulado com as ciclodextrinas. Esse comportamento corrobora com a inclusão molecular do CBZ surfactante catiônico, reduzindo cargas livres em solução e assim neutralizando as cargas devido ao encapsulamento do CBZ pela matriz oligossacarídica.

A comparação entre as duas matrizes empregadas demonstrou que ambas são capazes de formar complexos estáveis com o CBZ, porém a HP β CD apresentou desempenho superior em diversos aspectos físico-químicos. A correlação entre o maior valor de constante de associação obtida por ITC, com um maior nível de reorganização do sistema coloidal observada por experimentos de DLS, sugere que a HP β CD é um sistema mais promissor se comparado ao contendo β CD.

Os ensaios microbiológicos realizados sugerem um incremento da atividade antimicrobiana dos complexos de inclusão estudados frente às linhagens de *Staphylococcus aureus*. Para a maioria das cepas analisadas, obteve-se uma redução da CIM de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ após a complexação, o que resulta em uma redução de aproximadamente 50% da concentração necessária para inibir o crescimento bacteriano. Sugerindo que a complexação do CBZ às ciclodextrinas potencializa sua ação biológica.

De forma complementar, os valores de IC_{50} obtidos para os complexos foram inferiores aos observados para o CBZ livre na maioria das linhagens avaliadas. Como exemplo, quando avaliada a cepa ATCC 25923, o valor de IC_{50} obteve uma redução de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para $1,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ quando exposto ao complexo CBZ/ β CD e para $1,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ quando exposto ao complexo CBZ/HP β CD. De forma semelhante, a tendência também foi observada quanto às cepas clínicas avaliadas, sugerindo que a complexação melhora a eficiência da ação antimicrobiana do CBZ sem dependência da origem da linhagem bacteriana.

Considerando os ensaios de interação fármaco membrana, os resultados obtidos sugerem que o incremento da atividade antimicrobiana não está associada somente à estabilização termodinâmica/estrutural do CBZ, mas ocorre também pelas modificações ocasionadas pela ação das ciclodextrinas na organização supramolecular do sistema. O processo de formação de agregados estruturados, relacionado à neutralização parcial das cargas superficiais gerando alteração das propriedades coloidais do CBZ, sugere favorecer

mecanismos diferentes de interação intermolecular com a membrana bacteriana, o que aumenta a eficiência do mecanismo de ação do antimicrobiano. Os resultados obtidos do ensaio de erradicação de biofilme pré-formado sugere que os complexos modificam não apenas a atividade antimicrobiana, mas também o mecanismo íntimo de interação do CBZ com a superfície bacteriana, tendo em vista que a composição quantitativa dos ensaios do fármaco livre é igual nos complexos. Podemos destacar nesse ensaio o complexo CBZ/ β CD, que apresentou uma maior capacidade de redução da biomassa residual, sugerindo que a matriz β CD altera a interação do CBZ, facilitando o contato com a membrana celular e consequentemente potencializa a ação antibiofilme. Comparando os dois sistemas, o complexo CBZ/ β CD obteve resultados que sugerem mecanismo de neutralização mais destacado das cargas aniônicas que estão presentes na membrana celular bacteriana, enquanto o complexo CBZ/HP β CD apresentou alterações estruturais mais pronunciadas na estrutura coloidal da suspensão, sugerido pelo maior aumento do D_h .

Considerando uma perspectiva de aplicação tecnológica e farmacêutica, os dois complexos estudados demonstram possuir características que são compatíveis com aplicações em sistemas de liberação controlada. Considerando os resultados, eles demonstram uma maior estabilidade térmica dos complexos, a formação dos complexos ocorre de forma espontânea, os complexos em solução são dotados de uma capacidade de auto-organização supramolecular em sistemas coloidais e que também possuem uma melhora da atividade antimicrobiana, tudo isso constitui evidências que corroboram com o potencial dessas formulações para aplicações futuras na área biomédica e farmacêutica.

A maioria dos resultados dessa pesquisa, corroboram que a complexão é uma estratégia promissora, para o desenvolvimento de complexos de inclusão envolvendo o cloreto de benzalcônio com β CD e com HP β CD, ambos como novos sistemas antimicrobianos nanoestruturados.

Por fim, as evidências obtidas experimentalmente todas em conjunto, FTIR, TGA/DTA, DLS (D_h), ZP, condutividade elétrica, ITC (dados termodinâmicos) e ensaios microbiológicos sugerem que os complexos de inclusão CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD possuem propriedades físico-químicas e biológicas superiores quando comparadas às do CBZ livre, dessa forma os complexos CBZ/ β CD e CBZ/HP β CD são sistemas promissores que merecem atenção em estudos futuros tendo como sugestão, estudo de citotoxicidade, curva cinética de morte bacteriana, aplicações em sistemas avançados de liberação controlada e estudos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AGNES, M. *et al.* **Designed positively charged cyclodextrin hosts with enhanced binding of penicillins as carriers for the delivery of antibiotics: the case of oxacillin.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 531, n. 2, p. 480–491, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.072>. Acesso em 31/07/2024.
- ALABRAHIM, K. A. *et al.* **A biocompatible β -cyclodextrin inclusion complex containing natural extracts: a promising antibiofilm agent.** *Nanoscale Advances*, v. 7, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D4NA00916A>. Acesso em 22/02/2026.
- ALMEIDA, K. M. O. **Caracterização reológica e coloidal de xantana biossintetizada a partir de glicose e uso como sistema de liberação controlada de doxiciclina.** 2018. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, Governador Valadares, 2018.
- ALMEIDA, K. M. O. **Uso de xantana e ciclodextrina como sistema de liberação controlada de cloreto de cetilpiridínio.** 2024. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, Governador Valadares, 2024.
- ALVES, D. *et al.* **Cloreto de cetilpiridínio: revisão da literatura.** *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, v. 53, n. 3, p. 181–189, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rpemd.2012.04.002>. Acesso em 08/08/2024.
- ALVES, M. R. A. *et al.* **Study of the interaction between glucosamine hydrochloride and sodium dodecyl sulphate micelles using conductometric, isothermal calorimetry, zeta-potential titrations, and NMR NOESY.** *Turkish Journal of Chemistry*, v. 38, p. 248–259, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3906/kim-1304-68>. Acesso em 09/02/2024.
- AMORIM, E. A. F. *et al.* **Antimicrobial potential of *Streptomyces ansochromogenes* PB3 against *Pseudomonas aeruginosa*.** *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 574693, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.574693>. Acesso em 12/03/2024.
- ANCONI, C. P. A. **Relative position and relative rotation in supramolecular systems through the analysis of the principal axes of inertia: ferrocene/cucurbit[7]uril and ferrocenyl azide/ β -cyclodextrin case studies.** *ACS Omega*, v. 5, n. 10, p. 5013–5025, 2020. Disponível em <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03914>. Acesso em 03/04/2024.
- ANCONI, C. P. A.; SOUZA, L. C. A. **Multi-equilibrium approach to study cyclodextrin host–guest systems with GFN2-xTB quantum method: a case study of phosphorothioates included in β -cyclodextrin.** *Computational and Theoretical Chemistry*, v. 1217, p. 113916, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2022.113916>. Acesso em 03/05/2025.
- ANDERSEN, M. S.; SØRENSEN, R.; HOLM, R. **Characterization of the interaction between cyclodextrins and preservatives for topical eye preparations.** *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 106, p. 95–107, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10847-025-01314-z>. Acesso em 15/07/2026.

ASANUMA, H. *et al.* **Molecular imprinting of cyclodextrin in water for the recognition of nanometer-scaled guests.** *Analytica Chimica Acta*, v. 435, p. 25–33, 2001. Disponível em [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01342-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01342-2). Acesso em 17/03/2023.

BARHOUMI, Z. *et al.* **Formation and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes with 1-allyl-3-methyl dicyanamide ionic liquids.** *Chemical Thermodynamics and Thermal Analysis*, v. 20, p. 100232, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ctta.2025.100232>. Acesso em 02/04/2026.

BAUTISTA-RENEDO, J. M. *et al.* **Non-covalent interactions between sertraline stereoisomers and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: a quantum chemistry analysis.** *RSC Advances*, v. 10, n. 34, p. 20202–20210, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D0RA02573G>. Acesso em 08/07/2023.

BHARDWAJ, R.; DORR, R. T.; BLANCHARD, J. **Approaches to reducing toxicity of parenteral anticancer drug formulations using cyclodextrins.** *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, v. 54, n. 3, p. 233–239, 2000.

BLACKBURN, R. S. *et al.* **Sorption of chlorhexidine on cellulose: mechanism of binding and molecular recognition.** *Journal of Physical Chemistry B*, v. 111, p. 8775–8784, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp071950k>. Acesso em 29/03/2022.

BOCZAR, D.; MICHALSKA, K. **Cyclodextrin inclusion complexes with antibiotics and antibacterial agents as drug-delivery systems: a pharmaceutical perspective.** *Pharmaceutics*, v. 14, n. 7, p. 1389, 2022. Disponível em <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071389>. Acesso em 19/11/2023.

BRUNCHI, C. E. *et al.* **Some properties of xanthan gum in aqueous solutions: effect of temperature and pH.** *Journal of Polymer Research*, v. 23, p. 1–8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10965-016-0942-z>. Acesso em 10/06/2022.

CAMPOS, L. M. *et al.* **Development and in vivo evaluation of chitosan gel containing *Mitracarpus frigidus* methanolic extract for vulvovaginal candidiasis treatment.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 130, p. 110608, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110608>. Acesso em 17/05/2025.

CAO, F.; GUO, J.; PING, Q. **The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes.** *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 31, n. 8, p. 747–756, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03639040500215789>. Acesso em 14/05/2022.

CAO, J. *et al.* **Near-infrared light-triggered dissociation of block copolymer micelles for controlled drug release.** *Proceedings of SPIE*, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1117/12.2003247>. Acesso em 19/04/2022.

CARNEIRO, S. B. *et al.* **Cyclodextrin–drug inclusion complexes: in vivo and in vitro approaches.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 3, p. 642, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20030642>. Acesso em 19/04/2022.

CATHUM, S. *et al.* **Detoxification of mercury in the environment.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 381, n. 8, p. 1491–1498, 2005.

- CAVALCANTI, I. D. L. *et al.* **Isothermal titration calorimetry (ITC) as a promising tool in pharmaceutical nanotechnology.** *International Journal of Pharmaceutics*, p. 123063, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123063>. Acesso em 15/05/2024.
- CELENZA, G. *et al.* **In vitro antimicrobial activity of pannarin alone and in combination with antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates.** *Phytomedicine*, v. 19, n. 7, p. 596–602, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.02.001>. Acesso em 05/06/2022.
- DAS, S.; BANERJEE, A.; NANDI, U. N.; GHOSH, A. **Critical review on the analysis of electrochemical impedance spectroscopy data.** *Journal of Applied Physics*, v. 138, n. 12, p. 125002, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/5.0275205>. Acesso em 02/04/2026.
- DE PAULA, W. X. *et al.* **Supramolecular interactions between losartan and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: ESI mass spectrometry, NMR techniques, phase solubility, isothermal titration calorimetry and antihypertensive studies.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 404, n. 1–2, p. 116–123, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.11.027>. Acesso em 05/03/2023.
- DEBNATH, S. *et al.* **Investigation of host–guest inclusion complex of mephenesin with α -cyclodextrin for innovative application in biological systems.** *ACS Omega*, v. 9, n. 34, p. 36066–36075, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c08185>. Acesso em 11/07/2025.
- DEEPIKA, B. *et al.* **Matrix drug delivery system: a review.** *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, v. 5, n. 1, p. 150–154, 2018.
- DEL VALLE, E. M. M. **Cyclodextrins and their uses: a review.** *Process Biochemistry*, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9). Acesso em 05/06/2022.
- DENADAI, A. M. *et al.* **Chlorhexidine/losartan ionic pair binding and its nanoprecipitation: physicochemical characterization and antimicrobial activity.** *Supramolecular Chemistry*, v. 24, n. 3, p. 204–212, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10610278.2011.644535>. Acesso em 09/10/2022.
- DENADAI, Â. M. *et al.* **Self-assembly characterization of the β -cyclodextrin and hydrochlorothiazide system: NMR, phase solubility, ITC and QELS.** *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 55, n. 1–2, p. 41–49, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9014-7>. Acesso em 21/07/2022.
- DENADAI, Â. M.; OLIVEIRA, T. M. **Dispositivos de liberação controlada por difusão versus dispositivos de liberação controlada por dissociação: estudo comparativo.** *Journal of Exact Sciences*, v. 31, n. 1, p. 12–17, 2021.
- DERKACH, S. R.; VORON'KO, N. G.; KUCHINA, Y. A. **Interactions between polysaccharides, surfactants and biologically active compounds: modern trends and applications.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 213, p. 1305–1321, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.030>. Acesso em 02/03/2023.
- DO, T. T.; VAN HOOCHTEN, R.; DE MOOTER, G. **A study of the aggregation of cyclodextrins: determination of the critical aggregation concentration, size of aggregates**

and thermodynamics using isodesmic and K2–K models. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 521, n. 1–2, p. 318–326, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.02.037>. Acesso em 03/02/2023.

DOS SANTOS, H. F.; ANCONI, C. P. A. **Predicting inclusion free energy for clomiphene in HP β CD using a QC/MD approach.** *Computational and Theoretical Chemistry*, v. 1254, p. 115484, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2025.115484>. Acesso em 03/04/2026.

DOS SANTOS, H. F.; ANCONI, C. P. A. **Structure, stability, and dynamics of inclusion complexes formed from auranofin derivatives and hydroxypropyl- β -cyclodextrin.** *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 104, p. 513–526, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10847-024-01248-y>. Acesso em 03/04/2026.

DRAPÍŃSKA, Paulina; SKULMOWSKA-POŁOK, Katarzyna; CHAŁUPKA, Joanna; SIKORA, Adam. **Sustained-release oral delivery of NSAIDs and acetaminophen: advances and recent formulation strategies—A systematic review.** *Pharmaceutics*, Basel, v. 17, n. 10, p. 1264, 2025. DOI: 10.3390/pharmaceutics17101264. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17101264>. Acesso em: 13 jul. 2026.

EHLERT, S. *et al.* **Robust and efficient implicit solvation model for fast semiempirical methods.** *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 17, n. 7, p. 4250–4261, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00471>. Acesso em 05/07/2025.

FAJARDO, A. R. *et al.* **Enhanced antitumor and antibacterial activities of ursolic acid through β -cyclodextrin inclusion complexation.** *ACS Omega*, v. 10, n. 6, p. 6178–6190, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08337>. Acesso em 02/05/2026.

FALK, R. *et al.* **Controlled release of ionic compounds from poly(L-lactide) microspheres produced by precipitation with a compressed antisolvent.** *Journal of Controlled Release*, v. 44, p. 77–85, 1997.

FARIAS, J. M. *et al.* **Mouthwash containing a biosurfactant and chitosan: an eco-sustainable option for the control of cariogenic microorganisms.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 129, p. 853–860, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.084>. Acesso em 05/02/2023.

FATIN-ROUGE, N.; BÜNZLI, J.-C. G. **Thermodynamic and structural study of inclusion complexes between trivalent lanthanide ions and native cyclodextrins.** *Inorganica Chimica Acta*, v. 293, p. 53–60, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(99\)00307-2](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(99)00307-2). Acesso em 05/07/2023.

FERNÁNDEZ, M. *et al.* **Complex systems that incorporate cyclodextrins to obtain materials for specific applications.** *Carbohydrate Research*, v. 480, p. 12–34, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.05.004>. Acesso em 11/02/2024.

FOLLIERO, V. *et al.* **Rhein: a novel antibacterial compound against *Streptococcus mutans* infection.** *Microbiological Research*, v. 261, p. 127062, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127062>. Acesso em 06/04/2023.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. **Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos.** *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 23, n. 4, p. 558–566, 2004.

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, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tca.2015.03.010>. Acesso em 02/05/2022.

GILBERT, P.; MCBAIN, A. J. **Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 2, p. 189–208, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.189-208.2003>. Acesso em 02/03/2023.

GONTIJO FILHO, P. P. *et al.* **Spread of multidrug-resistant microorganisms: a global threat and critical healthcare problem.** *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 6, n. 3, p. 1–2, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.17058/reci.v6i3.6708>. Acesso em: 08/05/2023.

GOPFERICH, A. *et al.* **Drug delivery from bioerodible polymers: systemic and intravenous administration.** In: CLELAND, J. L.; LANGER, R. (ed.). *Formulation and Delivery of Proteins and Peptides*. Washington: American Chemical Society, 1994. p. 242–277.

GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E. **Hydrodynamic diameter and zeta potential of nanostructured lipid carriers: emphasizing parameters for correct measurements.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 620, p. 126610, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126610>. Acesso em: 07/08/2024.

GRAHAM, N. B. **Polymeric inserts and implants for the controlled release of drugs.** *British Polymer Journal*, v. 10, n. 4, p. 260–266, 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pi.4980100412>. Acesso em 04/04/2026.

GRIMME, S.; BANNWARTH, C.; SHUSHKOV, P. **A robust and accurate tight-binding quantum chemical method for structures, vibrational frequencies, and noncovalent interactions of large molecular systems parametrized for all spd-block elements (Z = 1–86).** *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 13, n. 5, p. 1989–2009, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00118>. Acesso em 18/12/2023.

HASHEMI, M. M.; AMINLARI, M.; MOOSAVINASAB, M. **Preparation of and studies on the functional properties and bactericidal activity of the lysozyme–xanthan gum conjugate.** *LWT – Food Science and Technology*, v. 57, n. 2, p. 594–602, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.005>. Acesso em 04/06/2023.

HE, J. *et al.* **Difference in the complexation of cholesterol with β -cyclodextrin derivatives: a combined theoretical and experimental study.** *Food Chemistry*, v. 435, p. 137459, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137459>. Acesso em 05/09/2025.

HE, Z. X. *et al.* **Doxycycline and hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex in poloxamer thermosensitive hydrogel for ophthalmic delivery.** *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 1, n. 4, p. 254–260, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2011.11.004>. Acesso em: 22/03/2023.

HOVGAARD, L.; BRØNDSTED, H. **Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery.** *Journal of Controlled Release*, v. 36, p. 159–166, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00062-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00062-2). Acesso 07/08/2022.

HRKACH, J.; LANGER, R. **Da micro à nano: evolução e impacto da entrega de medicamentos no tratamento de doenças.** *Drug Delivery and Translational Research*, v. 10, n. 3, p. 567–570, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00703-3>. Acesso em 28/03/2023.

HUANG, H. *et al.* **Comparisons of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and hospital-associated MRSA infections in Sacramento, California.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 7, p. 2423–2427, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.00254-06>. Acesso em 17/12/2023.

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI). **Fascículo de pedido de patente.** Publicação PT1809237E. Requerente: Alberto Hemínio Manique Canelas. Lisboa, 2005.

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. **Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex.** *Drug Discovery Today*, v. 21, n. 2, p. 356–362, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.017>. Acesso em 17/12/2022.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. **Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.018>. Acesso em 11/09/2022.

JHA, V. K.; MATSUDA, M.; MIYAKE, M. **Sorption properties of the activated carbon–zeolite composite prepared from coal fly ash for Ni²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 160, p. 148–153, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.02.087>. Acesso em: 15/09/2023.

Jl, X. Y. *et al.* **Advances in cyclodextrins and their derivatives in nano-delivery systems.** *Pharmaceutics*, v. 16, n. 8, p. 1054, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16081054>. Acesso em 17/05/2025.

JOPA, S.; WÓJCIK, J.; EJCHART, A.; NOWAKOWSKI, M. **NMR methods for studying inclusion complexes focused on chiral hosts.** *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 104, p. 547–568, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10847-024-01251-3>. Acesso em: 03/09/2025.

KALI, G.; HADDADZADEGAN, S.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. **Cyclodextrins and derivatives in drug delivery: new developments, relevant clinical trials, and advanced products.** *Carbohydrate Polymers*, v. 324, p. 121500, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121500>. Acesso em: 07/08/2025.

KAMPF, G. **Biocidal agents used for disinfection can enhance antibiotic resistance in Gram-negative species.** *Antibiotics*, v. 7, n. 4, p. 110, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040110>. Acesso em 11/05/2022.

KARATHANASIS, E.; BHAVANE, R.; ANNAPRAGADA, A. V. **Triggered release of inhaled insulin from agglomerated vesicles: pharmacodynamic studies in rats.** *Journal of Controlled Release*, v. 113, p. 117–127, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.03.018>. Acesso em 11/04/2022.

KARAYIL, J. *et al.* **Micellar growth in cetylpyridinium chloride/alcohol systems: role of long-chain alcohol, electrolyte and surfactant head group.** *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 19, n. 4, p. 849–860, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11743-016-1834-5>. Acesso em 03/05/2022.

KHAN, N.; BRETTMANN, B. **Intermolecular interactions in polyelectrolyte and surfactant complexes in solution.** *Polymers*, v. 11, n. 1, p. 51, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym11010051>. Acesso em 05/02/2025.

KHARBOUCH, N. *et al.* **Enhanced antibacterial efficacy of new benzothiazole phthalimide hybrid compounds/methyl- β -cyclodextrin inclusion complexes compared to the free forms.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 670, p. 125481, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2025.125481>. Acesso em 03/03/2026.

KIM, S. *et al.* PubChem in 2021: **new data content and improved web interfaces.** *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. D1, p. D1388–D1395, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>. Acesso em 04/03/2023.

KRAJEWSKI, A. *et al.* **Porous ceramic bodies for drug delivery.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 11, p. 763–771, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1008959311238>. Acesso em 07/11/2022.

KRISHNAMOORTHY, B. *et al.* **Polymersomes as an effective drug delivery system for glioma: a review.** *Journal of Drug Targeting*, v. 22, p. 469–477, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/1061186X.2014.885017>. Acesso em 06/08/2022.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. **Cyclodextrins.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 453, n. 1, p. 167–180, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.055>. Acesso 03/04/2022.

LACERDA, E. F.; TEIXEIRA, G.; ANCONI, C. P. A. **GFN2-xTB study of the inclusion of thymol and carvacrol in β -cyclodextrin.** *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 104, p. 487–499, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10847-024-01249-x>. Acesso em 07/04/2025.

LANGDON, A.; CROOK, N.; DANTAS, G. **The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation.** *Genome Medicine*, v. 8, p. 39, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0294-z>. Acesso em 03/09/2022.

LI, S.; PURDY, W. C. **Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry.** *Chemical Reviews*, v. 92, p. 1457–1470, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr00014a002>. Acesso 04/06/2023.

LIMA, L. K. R. *et al.* **Electrical characterization of milk samples by electrical impedance spectroscopy (EIS).** *QUARKS: Brazilian Electronic Journal of Physics, Chemistry and Material Science*, v. 4, n. 1, 2022.

LIU, Y.; LI, J.; SHI, L. **Cyclodextrin-based supramolecular systems and their interactions with biological membranes.** *Carbohydrate Polymers*, v. 269, p. 118339, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118339>. Acesso em: 11/09/2022.

LULA, I. *et al.* **Interaction between bradykinin potentiating nonapeptide (BPP9a) and β -cyclodextrin: a structural and thermodynamic study.** *Materials Science and Engineering C*, v. 32, n. 2, p. 244–253, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.10.017>. Acesso em 09/04/2023.

MAAMAR, S. B.; HU, J.; HARTMANN, E. M. **Implications of indoor microbial ecology and evolution on antibiotic resistance.** *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, v. 30, n. 1, p. 1–15, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41370-019-0180-2>. Acesso em 05/06/2022.

MAHJOUB, H. F.; AOUISSI, Z.; OTHMAN, T. **Influence of carboxymethylcellulose on aggregation and micellization behaviors in aqueous cetylpyridinium chloride solutions: thermodynamic study and effect of polymer concentration.** *Journal of Molecular Liquids*, v. 265, p. 473–486, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.005>. Acesso em 06/05/2022.

MALKOW, K. T. **Analytical inversion of complex-valued DRT in impedance spectroscopy by integral transforms.** *Electrochimica Acta*, v. 535, p. 146500, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2025.146500>. Acessado em 21/05/2026.

MARCHESANI, A. *et al.* **4-Ethoxybenzoic acid interferes with the spatiotemporal dynamics of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 biofilm formation.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 136, n. 12, p. lxaf282, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jambio/lxaf282>. Acesso em 21/05/2026.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. **Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 1, p. 147–179, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>. Acesso em 03/02/2024.

MESSNER, M. *et al.* **Self-assembly of cyclodextrins: the effect of the guest molecule.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 408, n. 1–2, p. 235–247, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.008>. Acesso em 03/02/2025.

MIRANDA, T. M. **Composições nanoestruturadas de cloreto de cetilpiridínio com β -ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e avaliação da interação com *Staphylococcus aureus*.** 2020. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares, 2020.

MIRANDA, T. M. *et al.* **Mechanisms of interaction of cetylpyridinium chloride with *Staphylococcus aureus* in the presence of β -cyclodextrin.** *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 97, n. 3–4, p. 205–215, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10847-020-01017-8>. Acesso em 07/05/2022.

MISRA, N. *et al.* **Atmospheric pressure cold plasma improves viscosifying and emulsion stabilizing properties of xanthan gum.** *Food Hydrocolloids*, v. 82, p. 29–33, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.036>. Acesso em 07/05/2022.

MONTEIRO, A. S. *et al.* **Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on polystyrene surfaces by biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense*.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 84, n. 2, p. 467–476, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.003>. Acesso em: 11/01/2023.

NIWA, T.; TAKEUCHI, H.; HINO, T.; KUNOU, N.; KAWASHIMA, Y. **Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior.** *Journal of Controlled Release*, v. 25, n. 1–2, p. 89–98, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(93\)90097-O](https://doi.org/10.1016/0168-3659(93)90097-O). Acesso em 13/01/2023.

OHTA, A. *et al.* **Effect of the side chain of N-acyl amino acid surfactants on micelle formation: an isothermal titration calorimetry study.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 317, n. 1–3, p. 316–322, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.10.043>. Acesso em 06/07/2022.

OHTA, Y.; TAKATANI, K.; KAWAKISHI, S. **Effects of ionized cyclodextrin on decomposition of allyl isothiocyanate in alkaline solutions.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 68, n. 2, p. 433–435, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1271/bbb.68.433>. Acesso em 03/05/2025.

ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. *Electrochemical impedance spectroscopy*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470381588>. Acesso em 05/06/2026.

PALAZZO, B. *et al.* **Controlled drug delivery from porous hydroxyapatite grafts: an experimental and theoretical approach.** *Materials Science and Engineering C*, v. 25, n. 2, p. 207–213, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2004.08.018>. Acesso em 03/07/2022.

PARK, H.; OTTE, A.; PARK, K. **Evolution of drug delivery systems: from 1950 to 2020 and beyond.** *Journal of Controlled Release*, v. 342, p. 53–65, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.030>. Acesso em 17/03/2023.

PARK, K. **Controlled drug delivery systems: past forward and future back.** *Journal of Controlled Release*, v. 190, p. 3–8, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.054>. Acesso em 17/03/2023.

PATEL, D. K.; BISWAS, A.; MAITI, P. **Nanoparticle-induced phenomena in polyurethanes.** In: THOMAS, S.; KUMAR, R.; EBRAHIMI, D. (ed.). *Advances in Polyurethane Biomaterials*. Amsterdam: Elsevier, 2016. p. 171–194. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100614-6.00006-8>. Acesso em 18/04/2025.

PICCARDI, A.; PETTINATO, S.; ROSSI, M. C.; GIROLAMI, M.; SALVATORI, S. **Low-frequency measurements in electrochemical impedance spectroscopy: a brief review.** *Electronics*, v. 14, n. 20, p. 4048, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/electronics14204048>. Acesso em 19/03/2026.

PILIPOVIĆ, A.; TEPAVČEVIĆ, V.; KUMAR, D.; POŠA, M. **Cyclodextrins, surfactants and their inclusion complexes.** *Molecules*, v. 30, n. 19, p. 3944, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules30193944>. Acesso em 19/03/2026.

- PINCUS, N. B. *et al.* **Strain-specific phage treatment for *Staphylococcus aureus* infection is influenced by host immunity and site of infection.** *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, e0124280, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124280>. Acesso em 17/03/2022.
- PRACHT, P.; BOHLE, F.; GRIMME, S. **Automated exploration of the low-energy chemical space with fast quantum chemical methods.** *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 22, n. 14, p. 7169–7192, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C9CP06869D>. Acesso em 07/06/2022.
- RAHMI, K. A.; PURWONO, P. B.; ROCHMANTI, M. **Benzalkonium chloride effectiveness as a disinfectant against hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA).** *Malaysian Journal of Microbiology*, v. 15, n. 2, p. 88–94, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21161/mjm.180035>. Acesso em 21/04/2023.
- REAL, D. A. *et al.* **Cyclodextrin-modified nanomaterials for drug delivery: classification and advances in controlled release and bioavailability.** *Pharmaceutics*, v. 13, n. 12, p. 2131, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122131>. Acesso em 08/07/2022.
- RISSI, N. C. *et al.* **Relationship between composition and organizational levels of nanostructured systems formed by Oleth 10 and PPG-5-Ceteth-20 for potential drug delivery.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 50, n. 4, p. 653–661, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502014000400006>. Acesso em 09/11/2022.
- ROCHA, J. C. B. **Estrutura e termodinâmica de formação dos complexos de polímero de β -ciclodextrina com surfactantes iônicos e efeito da associação do polímero com cadeias de DNA.** 2016. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.
- SAHA, P.; RAFF, M. R. **Cyclodextrin: a prospective nanocarrier for the delivery of antibacterial agents against antibiotic-resistant bacteria.** *Heliyon*, v. 9, n. 9, e19287, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19287>. Acesso em 03/02/2024.
- SALTON, M. R. J. **Lytic agents, cell permeability and monolayer penetrability.** *Journal of General Physiology*, v. 52, p. 227–252, 1968. Disponível em: <https://doi.org/10.1085/jgp.52.2.227>. Acesso em 02/03/2024.
- SANTOS, C. R. S.; SILVA, É. A. **Cyclodextrins: possible therapeutic agents in neurodegenerative diseases.** *Research, Society and Development*, v. 11, n. 13, e400111335610, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i13.35610>. Acesso em 14/01/2023.
- SAOKHAM, P.; LOFTSSON, T. **γ -Cyclodextrin.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 516, n. 1–2, p. 278–292, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.060>. Acesso em 14/04/2022.
- SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* **Physicochemical characterization and stability of polymeric nanoparticle systems for drug administration.** *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>. Acesso em 25/08/2022.

SCHNEIDER, H. J. *et al.* **NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes.** *Chemical Reviews*, v. 98, n. 5, p. 1755–1786, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr970019t>. Acesso em 23/03/2022.

SEIDEL, R. W.; KOLEVA, B. B. **β -Cyclodextrin 10.41-hydrate.** *Acta Crystallographica Section E*, v. 65, p. o3162–o3163, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1107/S1600536809046678>. Acesso em 22/04/2022.

SESLIJA, S. *et al.* **Physico-chemical evaluation of hydrophobically modified pectin derivatives: step toward application.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 113, p. 924–932, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.147>. Acesso em 13/03/2025.

SHIROODI, S. G.; LO, Y. M. **The effect of pH on the rheology of mixed gels containing whey protein isolate and xanthan-curdlan hydrogel.** *Journal of Dairy Research*, v. 82, p. 506–512, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0022029915000569>. Acesso em 09/04/2026.

SIGMA-ALDRICH. **Product specifications.** St. Louis, 2024.

SINISTERRA, R. D. *et al.* **Preparation of a ferrofluid using cyclodextrin and magnetite.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, n. 6, p. 936–941, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000600018>. Acesso em 18/03/2023.

SØRENSEN, C.; HESS, M.; JARBEAU, J.; DODD, M. **Quaternary ammonium compounds: an antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance.** *ACS Infectious Diseases*, v. 6, n. 1, p. 70–90, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00361>. Acesso em 08/09/2022.

SOUSA, F. B. **Estudo e caracterização estrutural e termodinâmica de compostos de inclusão formados entre antidepressivos e ciclodextrinas.** 2007. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SOUSA, R. R. M. **Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de tiabendazol utilizando sílica modificada com 2-mercaptobenzimidazol.** *Desafios: Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins*, v. 7, supl., p. 270–276, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.20873/uftsupl2020-8637>. Acesso em 09/07/2022.

THOMPSON, D. O. **Cyclodextrins: enabling excipients—their present and future use in pharmaceuticals.** *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 14, n. 1, p. 1–104, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v14.i1.10>. Acesso em 14/07/2023.

TIBBITT, M. W.; DAHLMAN, J. E.; LANGER, R. **Emerging frontiers in drug delivery.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 138, n. 3, p. 704–717, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jacs.5b09974>. Acesso em 11/03/2022.

TOKIHIRO, K.; IRIE, T.; UEKAMA, K. **Varying effects of cyclodextrin derivatives on aggregation and thermal behavior of insulin in aqueous solution.** *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 45, n. 3, p. 525–531, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/cpb.45.525>. Acesso em 23/08/2022.

TOPUZ, F.; UYAR, T. **Recent advances in cyclodextrin-based nanoscale drug delivery systems.** *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 16, n. 6, e1995, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wnan.1995>. Acesso em 15/01/2025.

UEDA, T.; YAMAGUCHI, M. S.; CHRISTIAN-TABAK, L.; TAKAI, Y.; TODE, C. **Quantifying the bitter masking effect of drug–cyclodextrin complexation: NMR-ROESY mixing time approach.** *Carbohydrate Research*, v. 537, p. 109067, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2024.109067>. Acesso em 17/02/2025.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. **Cyclodextrin drug carrier systems.** *Chemical Reviews*, v. 98, n. 5, p. 2045–2076, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr970025p>. Acesso em 19/04/2022.

UZAKOVA, Assem B.; YERGALIYEVA, Elmira M.; YERLANULY, Azamat; MUKATAYEVA, Z. S. **A systematic review of advanced drug delivery systems: engineering strategies, barrier penetration, and clinical progress (2016–April 2025).** *Pharmaceutics*, Basel, v. 18, n. 1, p. 11, 2026. DOI: 10.3390/pharmaceutics18010011. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics18010011>. Acesso em: 13 jul. 2026.

VENTURINI, C. G. *et al.* **Properties and recent applications of cyclodextrins.** *Química Nova*, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000200035>. Acesso em 18/02/2025.

VIGLIANTI, C. *et al.* **Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged contaminated soil using cyclodextrins: experimental study.** *Environmental Pollution*, v. 140, n. 3, p. 427–435, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.024>. Acesso em 08/03/2025.

VYAS, A.; SARAF, S.; SARAF, S. **Cyclodextrin based novel drug delivery systems.** *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 62, p. 23–42, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10847-008-9456-8>. Acesso em 22/03/2026.

WANG, Z. **Distribution of relaxation times for impedance analysis in batteries and fuel cells.** *Nature Reviews Clean Technology*, v. 1, p. 453, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s44359-025-00071-z>. Acesso em 18/05/2026.

WISEMAN, T. *et al.* **Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter.** *Analytical Biochemistry*, v. 179, n. 1, p. 131–137, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90213-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90213-3). Acesso em 03/05/2024.

YAMAMURA, M. *et al.* **Amphiphilic cyclodextrin derivatives with antibacterial activity: chemical mutation and structure–activity relationship.** *New Journal of Chemistry*, v. 48, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D4NJ01874E>. Acesso em 22/03/2026.

YAZAR, K. *et al.* **Preservative efficacy and *Pseudomonas* biofilm formation on bronchoalveolar lavage containers after antimicrobial photodynamic therapy: a pilot study.** *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, v. 5, n. 5, p. 72–78, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0975-7406.111815>. Acesso em 08/07/2024.

YUKSEL, N.; KÖSE, A.; FELLAH, M. F. **The supramolecular complexes of calix[4]arene derivatives toward favipiravir antiviral drug (used to treat COVID-19): a DFT study on geometry optimization, electronic structure and infrared spectroscopy of adsorption and**

sensing. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 101, n. 1–2, p. 77–89, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10847-021-01087-1>. Acesso em 19/03/2026.

ZHANG, C. *et al.* **Thermodynamic analysis of hydrogen-bonded polymer complexation with isothermal titration calorimetry.** *Polymer*, v. 256, p. 125196, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2022.125196>. Acesso em 12/03/2023.

ZHANG, Y. *et al.* **Cyclodextrin inclusion complex enhances solubility and antimicrobial activity of chlortetracycline hydrochloride.** *Talanta*, v. 289, p. 127977, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.127977>. Acesso em 17/05/2026.