

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ANÁLISE ANTIFÚNGICA DO CINAMALDEÍDO  
APÓS INCLUSÃO COM 2-HIDROXIPROPIL- $\beta$ -  
CICLODEXTRINA SUBMETIDOS A ESTABILIDADE  
ACELERADA.**

**Beatriz Barros Viana**

**SAPIENTIA AEDIFICAT**

**BEATRIZ BARROS VIANA**

**ANÁLISE ANTIFÚNGICA DO CINAMALDEÍDO APÓS INCLUSÃO  
COM 2-HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA SUBMETIDOS A  
ESTABILIDADE ACELERADA.**

**ANTIFUNGICAL ANALYSIS OF CINNAMALDEHYDE AFTER  
INCLUSION WITH 2-HYDROXYPROPYL- $\beta$ -CYCLODEXTRIN  
SUBJECTED TO ACCELERATED STABILITY TESTING**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista

João Pessoa

2025



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**



**ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**  
**2025**


Aos vinte e nove dias do mês de agosto do ano de 2025, às 08:00 horas, no auditório do Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO) e com uso de recursos híbridos à distância, reuniram-se os membros da banca examinadora composta pelas professores doutores: ANDRE ULISSES DANTAS BATISTA (Orientador(a) e Presidente), RICARDO DIAS DE CASTRO (membro interno ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB) e Sandra Lúcia Dantas de Moraes (membro externo ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB, via Google Meet) a fim de argüirem o(a) mestrando(a) BEATRIZ BARROS VIANA, com relação ao seu trabalho final de curso de mestrado (dissertação), sob o título “ANÁLISE ANTIFÚNGICA DO CINAMALDEÍDO APÓS INCLUSÃO COM 2- HIDROXIPROPIL-β- CICLODEXTRINA SUBMETIDOS A ESTABILIDADE ACELERADA”. Aberta a sessão pelo presidente da mesma, coube o(a) candidato(a), na forma regimental, expor o tema de sua dissertação, dentro do tempo regulamentar. Em seguida, foi questionado pelos membros da banca examinadora, sendo as explicações necessárias fornecidas e as modificações solicitadas registradas. Logo após, os membros da banca examinadora reuniram-se em sessão secreta, tendo chegado ao seguinte julgamento, que, de público, foi anunciado: 1º Examinador (membro externo): Conceito “Aprovado”; 2º Examinador (membro interno): Conceito “Aprovado, 3º Examinador (Orientador e presidente): Conceito “Aprovado”. O que resultou em conceito final igual: “APROVADO”, o que permite o(a) candidato(a) fazer jus ao título de Mestre em Odontologia. Os documentos utilizados para avaliação da candidata durante o processo aqui descrito apresentam-se como prova documental do mesmo e, como tal, serão anexadas a esta ata para arquivamento. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que será assinada pelo presidente, pelos demais membros da banca e pelo(a) candidato (a).

 Documento assinado digitalmente  
SANDRA LÚCIA DANTAS DE MORAES  
Data: 29/08/2025 18:58:53-0300  
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

 Documento assinado digitalmente  
RICARDO DIAS DE CASTRO  
Data: 01/09/2025 09:15:15-0300  
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

1º Examinador – Membro Externo

2º Examinador – Membro interno

 Documento assinado digitalmente  
ANDRE ULISSES DANTAS BATISTA  
Data: 29/08/2025 14:48:52-0300  
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

 Documento assinado digitalmente  
BEATRIZ BARROS VIANA  
Data: 01/09/2025 16:53:13-0300  
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

3º Examinador – Presidente

Candidato (a)

Universidade Federal da Paraíba – Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Odontologia – Campus I – Cidade Universitária  
João Pessoa – PB CEP – 58051-900 Fone: (83) 3216-7797  
[www.ufpb.br/pos/odontologia](http://www.ufpb.br/pos/odontologia)

Catalogação na publicação  
Seção de Catalogação e Classificação

V614a Viana, Beatriz Barros.

Análise antifúngica do cinamaldeído após inclusão com 2-Hydroxypropyl-B-Cyclodextrin submetidos a estabilidade acelerada. / Beatriz Barros Viana. - João Pessoa, 2025.

50 f. : il.

Orientação: André Ulisses Dantas Batista.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS/PPGO.

1. Candidíase oral. 2. Cromatografia líquida. 3. Técnicas microbiológicas. 4. Estabilidade de medicamentos. 5. 2-Hidroxipropil-beta-Ciclodextrina. I. Batista, André Ulisses Dantas. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.31(043)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e a Nossa Senhora, por todas as bênçãos derramadas durante o período desse mestrado, todas as oportunidades e portas que se abriram e por todo pedido feito a Eles terem sido ouvidos. Sem minha fé, esperança e confiança nEles nada teria sido realizado e prosperado.

À minha família, Renata (mainha), Júnior (painho), Maria Auxiliadora (Voinha), Bianca (minha irmã gêmea), Gustavo (meu irmão), Edorice Navarro (vovó – *in memorian*) e José Ferraz (vovô – *in memorian*), Guilherme (cunhado) que sempre me apoiou em todas as ideias que obtive durante minha vida, pelo suporte e por fazerem o possível e o impossível pelo meu sonho. Agradeço a companhia, o ombro, a escuta e os conselhos para me fortificar e me tornar melhor a cada dia. Em especial a minha mãe, que abriu meu olhar para o mundo acadêmico desde nova, sendo uma das minhas inspirações como professora e à minha irmã na qual dividimos ao mesmo tempo as mesmas conquistas, mestrado, concurso, uma engradecendo a outra.

Ao meu orientador, André Ulisses Dantas Batista, o qual tive o prazer de acompanhar na minha graduação, desde esse período sempre foi minha inspiração como profissional (cirurgião-dentista) e docente perpetuando esse sentimento até o momento. Por me favorecer vivenciar o lado acadêmico e pela sua reputação, ampliando assim meu caminho profissional. Além disso, agradeço a paciência para ensinar, cooperação a esse trabalho e por ser tão compreensivo, pelas ideias e experiência que trocamos ao decorrer da pós-graduação sobre os diversos temas relacionados a odontologia. Levarei seus ensinamentos ao decorrer da minha trajetória.

À minha orientadora da graduação, Ana Karina Maciel de Andrade, por toda confiança depositada em mim quando iniciei no programa de iniciação científica, por me ajudar em toda essa trajetória até aqui, por todo apoio, todo ensinamento, todas correções e ajuda necessária. Você foi o ponta-a-pé para descobrir minha capacidade como pesquisadora.

Aos meus coordenadores da especialização de Harmonização Orofacial e amigos Thayse de Medeiros Nobre Bettoni e Carlos Henrique Bettoni Cruz de Castro que enxergaram e confiaram na minha capacidade como docente, me

oferecendo compor como parte do seu grupo antes mesmo da finalização do meu mestrado. Vocês são sinônimos de bondade, fé, humanização, empatia e conhecimento. Sou extremamente grata a vocês por todo apoio e incentivo para a finalização desse projeto, mesmo em momentos de desesperança para isto ocorrer.

Aos meus amigos Luana, Patrick, Mariana, Carol, Raiana, Gabi, Thayane, Thais, Lucas Vieira, Maria Thamires, Natan, Alexia, Matheus, Wesley, Pedro, Felipe, Thiago que sempre estiveram comigo nos bons e mal momentos durante esses anos desafiadores, me oferecendo sempre uma escuta acolhedora e sendo meu ponto de refúgio quando o estresse já não estava mais dando conta.

Aos meus amigos da graduação Matheus, Palloma, Larissa, Lucas Medeiros, Heloísa e Hugo, na qual sempre há uma recíproca de apoio de vermos crescendo profissionalmente e pessoalmente uns aos outros. Levo vocês em meu coração sempre. Em especial à Palloma, pela disposição de me ensinar sobre a análise antifúngica, pela companhia nos laboratórios ao decorrer do processo dessa pesquisa, pelos apelos e escuta.

Aos meus avaliadores da banca, prof. Dr. Ricardo Dias, profa. Dra. Sandra Moraes e prof. Dr. Hugo Ramalho pelas contribuições dadas a esse trabalho desde a minha qualificação para que tornasse um trabalho de excelência.

Aos meus colegas de turma do mestrado, pela divisão das dores e dificuldades ao desenvolver nossas pesquisas e ao compartilhamento de ideias, auxílios durante esta jornada.

Ao prof. Dr. Humberto Xavier e à prof. Dr. Ricardo, pela disponibilidade em oferecer seu laboratório e equipamentos para prosseguimento da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 409610/2023 (Convocatória 10/2023 – Universal).

Agradeço à Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pelo apoio institucional recebido.

## RESUMO

As características inerentes a resina acrílica, material comumente utilizado para confecção de próteses, e o uso indiscriminado de medicamentos terapêuticos favorecem a proliferação de infecções oportunistas, como a candidíase oral. Contudo, devido a resistência antimicrobiana observada nesses últimos tempos e a dificuldade de fabricação de novos antifúngicos, torna-se necessário a utilização de produtos sintéticos com atividade antimicrobiana, como por exemplo, o cinamaldeído. Pelas suas características de baixa biodisponibilidade; instabilidade, sensibilidade a luz, umidade e altas temperaturas, torna-se viável encapsulá-lo para melhorar a estabilidade e a liberação da substância a longo prazo por meio da inclusão com 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HD- $\beta$ -CD). Com isso, o objetivo do trabalho foi analisar a atividade antifúngica em diferentes tempos após teste de estabilidade acelerada, comparando o cinamaldeído com o complexo de inclusão com a HD- $\beta$ -CD. Inicialmente, foi preparada as soluções da emulsão de cinamaldeído de 27  $\mu\text{g/mL}$ , seguindo estudos anteriores, e o complexo de inclusão com cinamaldeído (24 $\mu\text{L}$ ) + HD- $\beta$ -CD. Após o preparo das soluções, foi realizado um estudo piloto, para obter a concentração inibitória mínima (CIM) inicial, a fim de determinar a concentração da ciclodextrina que iria ser utilizada. Prosseguiu-se com as análises de cromatografia gasosa (HPLC), infravermelho (FTIR), testes de estabilidade e de inibição da adesão do biofilme contra *Candida albicans* e *C. glabrata*, avaliando os tempos iniciais ( $T_0$ ), 30 ( $T_{30}$ ) e 60 ( $T_{60}$ ) dias sob variações de temperatura. Os dados foram tabulados e analisados a partir do teste de Shapiro Wilk, no qual apresentaram distribuição normal, posteriormente a isto, foi utilizado o teste ANOVA. A análise por FTIR confirmou a formação do complexo e a interação molecular entre CNM e HD- $\beta$ -CD. Os resultados obtidos para o teste de inibição da adesão do biofilme, foram que no  $T_0$ , CNM e CNM+CD apresentaram atividade antifúngica semelhante em todas as concentrações, reduzindo significativamente o crescimento fúngico quando comparados ao padrão-ouro (nistatina). Aos 30 dias, o ciclo de congelamento e descongelamento manteve a atividade antimicrobiana de ambas as substâncias, enquanto o armazenamento a 4°C promoveu diminuição do crescimento fúngico em todas as concentrações. Em temperatura ambiente (25°C), a inibição significativa ocorreu a partir da CIMx4, e em altas temperaturas (40°C) a partir da CIMx2 para o CNM e da CIMx4 para o CNM+CD. Após 60 dias, apenas concentrações mais elevadas mantiveram efeito,

com desempenho superior do complexo na CIMx8 em 25 °C e 40 °C, enquanto o CNM na CIMx10. Dessa forma, a complexação do cinamaldeído apresentou-se favorável por conseguir preservar a atividade antifúngica, diminuindo os efeitos ambientais deletérios a capacidade volátil do CNM, apresentando como uma alternativa promissora para novas formulações terapêuticas de produtos de limpeza para próteses dentárias, podendo contribuir para a prevenção de candidíase oral. Novos estudos são necessários a fim de avaliar a aplicabilidade clínica e a forma de apresentação desses produtos, buscando alternativas mais estáveis do que a solução líquida, o qual preserve a antifúngica a longo prazo e forneça praticidade ao uso.

**Palavras-chave:** Candidíase; 2-Hidroxipropil-beta-Ciclodextrina; Estabilidade de medicamentos; Técnicas microbiológicas; Cromatografia Líquida de Alta Pressão.



## ABSTRACT

The inherent characteristics of acrylic resin, a material commonly used for the fabrication of prostheses, along with the indiscriminate use of therapeutic drugs, favor the proliferation of opportunistic infections such as oral candidiasis. However, due to the antimicrobial resistance observed in recent years and the challenges in developing new antifungal agents, the use of synthetic products with antimicrobial activity, such as cinnamaldehyde, has become necessary. Because of its low bioavailability, instability, and sensitivity to light, moisture, and high temperatures, it is feasible to encapsulate cinnamaldehyde to improve its stability and ensure long-term release through inclusion with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD). Thus, the aim of this study was to evaluate the antifungal activity of cinnamaldehyde in comparison with its inclusion complex with HP- $\beta$ -CD, at different time points after accelerated stability testing. Initially, cinnamaldehyde emulsion solutions at 27  $\mu\text{g/mL}$  were prepared, following previous studies, along with the inclusion complex of cinnamaldehyde (24  $\mu\text{L}$ ) + HP- $\beta$ -CD. After solution preparation, a pilot study was conducted to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), which established the concentration of cyclodextrin to be used. Subsequently, analyses were performed using high-performance liquid chromatography (HPLC), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), stability testing, and biofilm adhesion inhibition assays against *Candida albicans* and *C. glabrata*, evaluating initial time (T0), 30 days (T30), and 60 days (T60) under different temperature conditions. Data were tabulated and analyzed using the Shapiro–Wilk test, which confirmed normal distribution, followed by ANOVA. FTIR analysis confirmed the formation of the inclusion complex and the molecular interaction between cinnamaldehyde and HP- $\beta$ -CD. Regarding the biofilm adhesion inhibition test, at T0, cinnamaldehyde and the cinnamaldehyde–cyclodextrin complex showed similar antifungal activity at all concentrations, significantly reducing fungal growth when compared with the gold standard (nystatin). After 30 days, freeze–thaw cycles maintained the antimicrobial activity of both substances, while storage at 4°C promoted fungal growth reduction at all concentrations. At room temperature (25°C), significant inhibition was observed from MIC $\times$ 4, whereas at higher temperatures (40°C), inhibition occurred from MIC $\times$ 2 for cinnamaldehyde and MIC $\times$ 4 for the cinnamaldehyde–cyclodextrin complex. After 60 days, only higher concentrations maintained activity, with superior performance of the complex at MIC $\times$ 8 at 25°C and 40°C, while cinnamaldehyde

alone required MIC $\times$ 10. Therefore, cinnamaldehyde complexation proved advantageous by preserving antifungal activity and reducing the deleterious environmental effects on its volatile capacity. This suggests it as a promising alternative for new therapeutic formulations of denture cleaning products, with potential to contribute to the prevention of oral candidiasis. Further studies are needed to assess clinical applicability and presentation forms of such products, seeking alternatives more stable than liquid solutions, capable of preserving antifungal activity in the long term while providing practicality in use.

**Keywords:** Candidiasis; 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin; Drug Stability; Microbiology; Chromatography, High Pressure Liquid.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANPPS - Áreas Nacionais de Prioridades em Saúde

ATCC- American Type Culture Collection

CD - 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CNM – Cinamaldeído

CNM (25°C): Emulsão de Cinamaldeído em 25°C

CNM (40°C): Emulsão de Cinamaldeído em 40°C

CNM (4°C): Emulsão de Cinamaldeído em 4°C

CNM (40/4°C): Emulsão de Cinamaldeído em 24h a 40°C e 24h a 4°C

CNM+CD (25°C): Complexo de Inclusão em 25°C

CNM+CD (40°C): Complexo de Inclusão em 40°C

CNM+CD (4°C): Complexo de Inclusão em 4°C

CNM+CD (40/4°C): Complexo de Inclusão em 24h a 40°C e 24h a 4°C

CNM+CD – Cinamaldeído + 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (complexo de inclusão)

CSD- Caldo Sabouraud Dextrose  
FR-IR – Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier

HP- $\beta$ -CN - 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

NIST – Nistatina

ODS – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diluição da 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina para formular o complexo de inclusão (CNM+CD).....	10
Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima do Complexo de Inclusão (CNM+CD).....	12
Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima da solução de cinamaldeído, do complexo de inclusão e da nistatina contra <i>C. albicans</i> ATCC 90028 e <i>C. glabrata</i> ATCC 90030. Valores das concentrações expressos em $\mu\text{g/mL}$ .....	13
Tabela 4 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLc) do CNM+CD.....	13
Tabela 5 – Médias dos grupos comparados ao crescimento no $T_0$ . Verticalmente, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Horizontalmente, letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa intragrupo (ANOVA de múltiplas comparações, pós-teste de Tukey, $p<0,05$ ).....	31
Tabela 6 – Médias dos grupos comparados ao crescimento no $T_{30}$ . Verticalmente, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Horizontalmente, letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa intragrupo (ANOVA de múltiplas comparações, pós-teste de Tukey, $p<0,05$ ).....	32
Tabela 7 – Médias dos grupos comparados ao crescimento no $T_{60}$ . Verticalmente, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Horizontalmente, letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa intragrupo (ANOVA de múltiplas comparações, pós-teste de Tukey, $p<0,05$ ).....	34

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico das proporções do CNM+CD.....	14
Gráfico 2 – Comparação do FT-IR do Óleo do CNM, da solução de CNM e do complexo de inclusão (CNM+CD).....	18
Gráfico 3 – Baseline do Teste de Inibição do Biofilme ( $T_0$ ).....	19
Gráfico 4 – Tempo de 30 dias do Teste de Inibição do Biofilme ( $T_{30}$ ).....	20
Gráfico 5 – Tempo de 60 dias do Teste de Inibição do Biofilme ( $T_{60}$ ).....	20

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1. Candidíase e Polimetilmetacrilato .....	16
2.2. Cinamaldeído .....	17
2.3. 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina .....	19
2.4. Cinamaldeído Encapsulado .....	20
3. OBJETIVOS .....	22
3.1. Objetivos Gerais .....	22
3.2. Objetivos Específicos .....	22
4. METODOLOGIA .....	23
4.1. Estudo Piloto .....	23
4.1.1 Preparo das Soluções Testes .....	23
4.1.1.1 Cinamaldeído (Grupo Controle) .....	23
4.1.1.2. Cinamaldeído Encapsulado com 2-hidroxipropil- $\beta$ - ciclodextrina .....	23
4.1.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) .....	24
4.1.3. HPLc .....	25
4.1.4. Resultados do Estudo Piloto .....	25
4.2. Pesquisa Principal .....	28
4.2.1. Preparo das Soluções .....	28
4.2.2. HPLc .....	28
4.2.3. Infravermelho .....	28
4.2.4. Inibição da Adesão do Biofilme <i>in vitro</i> .....	29
4.2.5. Teste de Estabilidade Acelerada .....	30
4.2.5.1. Centrifugação .....	30
4.2.5.2. Temperatura e Umidade .....	30
4.2.5.3. Ciclo de Congelamento e Descongelo .....	30
4.3. Análise Estatística .....	30
5. RESULTADOS .....	31
5.1. Infravermelho .....	31
5.2. Atividade Antifúngica .....	32
6. DISCUSSÃO .....	34

<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>44</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A candidíase oral é uma infecção oportunista causada pelo fungo do gênero *Candida* que se desenvolve como uma infecção secundária a partir de deficiência imunológica, má higiene oral e distúrbios metabólicos. Dentre as espécies que encontramos nessa doença, temos a *Candida albicans* e as espécies não albicans (Arya e Naureen, 2023). O aumento da incidência de candidíase tem sido relatado nos últimos anos, o que torna crítico e essencial o seu entendimento (Qiu et al., 2023).

A presença desses microrganismos na forma de biofilme fúngico altamente resistente é retida e aderida em próteses dentárias (Távora et al., 2019). Com isso, diferentes estratégias terapêuticas têm sido implementadas para a prevenção ou tratamento da candidíase, desde o uso de desinfetantes e produtos de limpeza para próteses até a administração de medicamentos antifúngicos orais e sistêmicos (Bajunaid et al., 2022).

Ao contrário da diversidade de classes de antibióticos disponíveis para uso contra patógenos bacterianos, existem apenas três classes principais de medicamentos antifúngicos usados para tratar infecções fúngicas invasivas: azóis, equinocandinas e polienos (Kaur, Nobile, 2024).

Além disso, o uso indiscriminado desses fármacos, aliado a terapia prolongada e repetida favorecem o desenvolvimento de resistência à antimicrobianos (Sultan et al., 2019). Associado a isso, as alterações superficiais na prótese causadas pelo impacto do uso de produtos de limpeza protética podem atuar como reservatórios desses microrganismos (Kiesow et al., 2016), a partir disso, busca-se terapias alternativas, como os fitoterápicos, substâncias de fontes naturais ou vegetais, sintéticas com provável atividade antimicrobiana a fim da substituição medicamentosa (Pasrija et al., 2023).

O cinamaldeído apresenta como uma solução alternativa de limpeza prolongada de próteses, demonstrando desempenho similar aos outros produtos de higienização, como peróxido alcalino e hipoclorito de sódio, garantindo ter uma boa biocompatibilidade e custo-benefício (Macêdo et al., 2022). Além disso, é uma substância que consegue remover de forma efetiva o biofilme presente no material



protético de forma semelhante ao hipoclorito de sódio (Martorano-Fernandes et al., 2021). Contudo, apresenta algumas limitações, como a baixa biodisponibilidade; instabilidade da substância decorrente da rápida oxidação do grupo aldeído (Liu et al., 2020); sensibilidade à luz, à umidade e a altas temperaturas (Chimvaree et al., 2020).

A partir disso, surge avanços que formulam um melhor tratamento podendo efetivamente melhorar a estabilidade (Liu et al., 2020), como a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas (Xavier-Júnior et al., 2019). Essa estratégia apresenta a vantagem de uma alta relação entre área superficial e volume (nm), na qual ajuda a liberação de forma regular e controlada do medicamento, em um maior contato com a área (Lo, Mahmoudi E Fauzi, 2023). Além disso, não promove alterações na estrutura da substância principal (Xavier-Júnior et al., 2019).

Resultados promissores têm sido relatados em estudos anteriores de Chen et al., (2019) quando comparou o efeito inibitório contra *Streptococcus aureus* do cinamaldeído não complexado com cinamaldeído encapsulado por lipossomas, após 30 dias de armazenamento, a capacidade antimicrobiana do cinamaldeído puro diminui enquanto o associado aos lipossomas manteve-se com o prolongamento do tempo de armazenamento. Dados semelhantes foram obtidos no estudo de Yildiz et al., (2019) avaliando a estabilidade térmica após inclusão do cinamaldeído com 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, na qual a evaporação do cinamaldeído puro iniciou-se abaixo de 50°C e sua vaporização total deu-se antes de 200°C, após inclusão com a ciclodextrina na proporção (1:1) passou a, respectivamente, 85°C e 240°C, já na proporção (2:1) estabelece em 75°C e 270°C.

O presente trabalho tem o intuito de complementar e elucidar evidências obtidas na literatura referente ao uso do cinamaldeído, por este apresentar instabilidade ao meio compromete a formulação de novos produtos terapêuticos de limpeza para prótese, essa limitação reforça a necessidade de investigar estratégias que aumentem a estabilidade e prolonguem sua atividade antimicrobiana, como o encapsulamento em ciclodextrina. Tal abordagem pode viabilizar a formulação de novos produtos de higienização protética contribuindo para a diminuição de infecções oportunistas associadas ao uso de próteses.

Este estudo trata-se do uso de cinamaldeído encapsulado em ciclodextrina com potencial aplicação antifúngica, voltada para prevenção/tratamento de candidíase protética. De acordo com os objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) conecta-se diretamente a ODS 3 ao favorecer a prevenção da candidíase protética e melhorar a qualidade de vida dos usuários de próteses; ao ODS 9, por estimular inovação em biomateriais odontológicos. No contexto das Áreas Nacionais de Prioridades em Saúde (ANPPS), dialoga com os eixos de doenças transmissíveis, saúde bucal por envolver a prevenção de infecções fúngicas oportunistas, especialmente em populações vulneráveis que afetam diretamente a qualidade de vida e inovação tecnológica em saúde por desenvolvimento de uma complexação bioativo, evidenciando seu potencial impacto clínico e social.

Assim, este estudo teve por objetivo analisar a atividade antifúngica do cinamaldeído após inclusão com 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, a partir da submissão em diferentes parâmetros de armazenamento, testando uma estabilidade acelerada, por diferentes períodos e compará-las. A hipótese nula testada foi: a) O complexo de inclusão de cinamaldeído com 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina não apresenta diferença estatisticamente significativa na atividade antifúngica quando comparado ao cinamaldeído não encapsulado, em quaisquer condições de armazenamento e tempos de análise.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Candidíase e Polimetilmetacrilato**

A candidíase oral é uma infecção fúngica oportunista, no qual os biofilmes de *Candida albicans* têm sido comumente associados à sua causa e ao desenvolvimento de estomatite protética. Dentre as espécies que mais acometem a cavidade oral temos: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea* e *C. tropicalis* (R e Rafiq, 2023).

O polimetilmetacrilato (PMMA) tem sido amplamente utilizado como material de base para próteses dentárias, principalmente devido à sua relação custo-benefício, fabricação e manipulação simples, processo de manutenção e reparo mais fácil, baixa densidade, propriedades físicas e mecânicas satisfatórias (Farid et al., 2022).

A diminuição do fluxo salivar, má higiene e uso prolongado da prótese são fatores de risco associados a estomatite protética (Qiu et al., 2023). Além disso, a escovação associada ao uso de dentífrico e imersões em soluções químicas podem causar efeitos deletérios na rugosidade da superfície e perda de massa do material da prótese, favorecendo a sua atuação como reservatório e facilitando a adesão de microrganismos à prótese, contribuindo assim, no aumento da formação de biofilme (Campos et al., 2023). Portanto, a confecção de próteses com rugosidade baixa, limitadas a 0,2µm tem sido preconizada para manutenção da mucosa oral saudável (Ayaz, Bagis e Turgut, 2015).

Segundo estudo de Montoya et al., (2024) no qual avaliou a interação entre o biofilme fúngico e biomaterial de polimetacrilato de metila, demonstrou um aumento na biomassa do biofilme, na atividade metabólica, no número de células viáveis e na formação de hifas. Ademais, foi observada uma expressão significativa de genes associados à virulência quando as células de *Candida* aderiram e formaram biofilmes nas superfícies do material. Esses resultados indicam que a tensão superficial repetitiva/deformação pode contribuir na adesão de microbiana, formação de biofilme e patogênese, o que pode levar à progressão de doenças infecciosas, como a estomatite protética (Montoya et al., 2024).

Diferentes abordagens são implementadas para inibir e controlar a estomatite protética, por meio da diminuição da formação de biofilme e da adesão da *C. albicans*, como aplicação tópica de agentes antifúngicos, modificação da superfície da base protética e incorporação de agentes antimicrobianos na resina acrílica. Contudo, mudanças superficiais podem afetar a retenção da prótese, rugosidade do material, pigmentação (Gad, Abualsaud, Khan, 2022).

## **2.2. Cinamaldeído**

O cinamaldeído é um aldeído aromático de ocorrência na natureza, que possui forte atividade antibacteriana (Chen et al., 2019), extraído da casca de espécies do gênero *Cinnamomum* e outras espécies vegetais (Alves et al., 2021) aparenta uma cor amarelada e apresenta odor de canela, contribuindo amplamente para a prevenção e tratamento de doenças inflamatórias (Han et al., 2024). Contudo, apresenta uma baixa disponibilidade e instabilidade causadas pela oxidação do grupo aldeído, resultando em uma menor eficácia do fármaco limitando

sua aplicação clínica. Para superação dessas desvantagens, proteger a parte instável da substância aparenta ser um método eficaz (Chang et al., 2021).

De acordo com um estudo *in situ* e *in vitro*, a comparação entre o hipoclorito de sódio a 0,5% e o cinamaldeído (27 µg/mL) na redução de unidades formadoras de colônias de *Candida albicans* (ATCC 90058) não revelou diferenças estatisticamente significativas após 7 e 14 dias de avaliação. Em relação à rugosidade superficial da resina, houve um aumento após o período de imersão, enquanto a microdureza superficial apresentou uma ligeira diminuição. A estabilidade de cor apresentou-se semelhantes em ambos os grupos, com  $\Delta E$  (<3,7), sem diferenças estatísticas significativas para os parâmetros testados (Almeida et al., 2020). Estes resultados evidenciam a capacidade antifúngica do cinamaldeído por não apresentar diferenças significativas comparando ao agente de limpeza padrão-ouro.

A pesquisa de Macêdo e colaboradores (2022) revelou que as soluções testadas de cinamaldeído (27µg/mL), hipoclorito de sódio e peróxido alcalino, provocaram aumento na rugosidade das resinas após cinco anos de simulação, sem diferenças estatísticas significativas entre os grupos. As alterações cromáticas foram pequenas, permanecendo abaixo dos limites perceptíveis e clinicamente aceitáveis, também sem variações significativas entre os grupos. Os achados indicam que o cinamaldeído apresenta segurança comparável às soluções tradicionais para desinfecção de próteses em uso prolongado, sem impactos relevantes na integridade superficial ou na estética da resina.

Em estudos anteriores, avaliando o efeito inibitório sobre a formação de biofilme fúngico por óleo de essencial de canela em concentrações de 0,08% v/v (8 vezes a CIM) ou 0,64% v/v (16 vezes a CIM) por 24 horas, observou-se uma inibição de 70% ou mais ( $p < 0,001$ ) nos espécimes de resina acrílica pré-revestidas com este óleo, sendo mais eficaz que a solução de clorexidina a 0,2% que permaneceu em inibição de 50% (Choonharuangdej, Srithavaj e Thummawanit, 2021). Mostrando que esse composto apresenta resultados promissores em relação a atividade antifúngica quando comparado a soluções bem documentadas na literatura.

Em relação a citotoxicidade do cinamaldeído em invertebrados *in vitro*, Alves et al., (2021) avaliaram diferentes concentrações (0,15, 0,31, 0,62, 1,25, 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 mg/kg) por 72 horas em larvas *Galleria mellonella*, observando que nenhuma dessas doses resultou em mortalidade. Em camudongos, doses únicas de 4mg/kg não induziu aumento do número de eritrócitos micronucleados no sangue periférico. Assim como, após teste de toxicidade do cinamaldeído em mucosa oral queratinizada de rato em diferentes concentrações (25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700µg/mL) também não apresentou evidências clínicas e/ou macroscópicas de inflamação.

Já em relação a utilização do cinamaldeído em pomada orabase em estudo clínico de fase I (Alves et al., 2022) aplicado em mucosa oral, na concentração de 200µg/mL, observou que teve uma redução de 99% no número de UFCs de *Candida* spp., já nas concentrações de 300 e 400µg/mL reduziu em 100%. Os eventos adversos registrados foram uma leve queimação e transitória ao aplicar a pomada. Constatando que o cinamaldeído apresenta uma boa citotoxicidade aos tecidos.

### **2.3. 2-Hidroxipropil-β-Ciclodextrina**

A ciclodextrina (CD) é um composto oligossacarídeo cíclico com pelo menos 6 unidades de D-(+)-glicopirranose ligadas a ligações glicosídicas α-1,4, formato toroidal e uma cavidade com interior hidrofóbico e exterior hidrofílico (Isadiartuti et al., 2021). As ciclodextrinas são utilizadas em formulações de alimentos e produtos farmacêuticos e cosméticos para aumento da solubilidade, proteção e entrega de agentes ativos. Existem principalmente três classes: seis (α-CD), sete (β-CD) e oito (γ-CD) (Yildiz et al., 2019).

O tipo de ciclodextrina comumente utilizada para a formação de complexos de inclusão é a hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD). Trata-se de um derivado da β-ciclodextrina, com alta solubilidade em água (acima de 50 g/100 mL, a 25 °C), devido à substituição do grupo hidroxila pela glicose. O composto também é menos tóxico e mais ecológico (Isadiartuti et al., 2021).

Suas propriedades podem melhorar a capacidade de carregamento de medicamentos, a interação celular e a penetração tumoral, os perfis de liberação

de medicamentos e a citotoxicidade dos sistemas de entrega de fármacos (Varan et al., 2017; Chimvaree et al., 2020). Essas características tornam a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina um componente farmacêutico promissor (Pitha et al., 1986). A interação entre o hospedeiro e compostos ativos pode envolver inclusão total ou parcial com região hidrofóbica ou hidrofílica da molécula (Chimvaree et al., 2020).

Estudo anteriores em análise de termograma, avaliou a perda de peso pelo aumento da temperatura ao comparar a inclusão de cinamaldeído com  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD. Os resultados mostraram que a vaporização do cinamaldeído iniciou-se em 85°C e finalizou em 240°C a 260°C nos complexos de ciclodextrinas, enquanto o cinamaldeído livre evaporou abaixo de 100°C (Yildiz et al., 2019). Esses dados demonstram que a presença do complexo de inclusão fornece uma estabilidade térmica melhorada necessária devido a capacidade rápida de volatilização do constituinte.

Após inclusão da  $\beta$ -ciclodextrina no cinamaldeído e análise de liberação do cinamaldeído ao longo do tempo em diferentes concentrações cinamaldeído/  $\beta$ -ciclodextrina (25:75; 50:50), conforme pesquisa realizada por Chimvaree e colaboradores (2020), a proporção de 25:75 apresentou melhor desempenho na fase inicial e mais rápida de liberação (até 3h), enquanto após as 3h a taxa de liberação torna-se constante e menor do que a proporção 50:50. Para a proporção 25:75, o tempo de liberação foi de 8h enquanto para a de 50:50 o tempo foi de aproximadamente 105h (Yildiz et al., 2019). Estes dados demonstram que a concentração de cinamaldeído no complexo de inclusão influencia tanto na taxa de liberação quanto no tempo de liberação ao decorrer do tempo.

#### **2.4. Cinamaldeído encapsulado**

Segundo dados de pesquisa de Chen e colaboradores (2019), no qual utilizaram vesículas lipossômicas para encapsulamento do cinamaldeído, a partir de diferentes proporções de 10, 20 e 30% da substância, avaliou-se a retenção do cinamaldeído durante armazenamento em 37°C por 30 dias. Os resultados indicaram que o cinamaldeído livre apresentou retenção de 49% em 5 dias, enquanto as formulações encapsuladas, mesmo em diferentes proporções, mantiveram cerca de 70% de retenção. Após 30 dias, respectivamente, apresentaram 30% e 55%. Quanto à atividade antimicrobiana contra

*Staphylococcus aureus*, por meio do valor logaritmo de morte, observou-se que após 24h, o cinamaldeído livre apresentou maior atividade bacteriostática em comparação aos encapsulados. Contudo, após armazenamento a 37°C por 30 dias, a atividade do cinamaldeído livre diminuiu comparada aos incluídos na qual apresentaram um aumento da atividade antimicrobiana ao longo do tempo de armazenamento.

Resultados semelhantes foram obtidos quando avaliou atividade antibacteriana, contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os autores relataram que a nanopartícula inibiu o crescimento bacteriano, respectivamente em 65% e 62%; o cinamaldeído puro em 51% e 54%, enquanto o cinamaldeído + quitosona 98% e 96% (Gadkari et al., 2019). Isto nos mostra que a nanopartículas tem auxílio sinérgico na atividade antibacteriana do cinamaldeído, potencializando a atividade antibacteriana do cinamaldeído, assim como se espera para o encapsulamento da substância.

Estudo anterior avaliando o cinamaldeído encapsulado em nanopartícula de biopolímero quanto à eficiência do encapsulamento, capacidade de carga, espectroscopia infravermelha e estabilidade de armazenamento em diferentes níveis de concentração (1:5; 1:4; 1:3; 1:2; 1:1; 2:1; 3:1). Os resultados obtidos foram que com o aumento da concentração de cinamaldeído livre houve uma redução significativa na eficiência do encapsulamento, enquanto para a capacidade de carga aumentou proporcionalmente à massa. Para o parâmetro do espectro infravermelho, no qual avalia a potencial interação envolvendo as nanopartículas, indicou a presença de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre as nanopartículas e o cinamaldeído. Já na estabilidade de armazenamento em 6 semanas, com temperatura entre 4°C-25°C foi observada retenção acima de 95% em toda a variação de faixa de pH (1-10) com concentrações de NaCl diferentes (0 a 4M). Em relação estabilidade térmica, o cinamaldeído livre sofreu uma degradação total em 237°C, enquanto o encapsulado manteve-se até 326°C para uma redução de peso significativa, com retenção superior a 80% (Li et al., 2020). Esses dados demonstram que a estabilidade térmica e a variação do pH é melhorada pelo encapsulamento da substância, superando as limitações apresentadas pelo cinamaldeído.

Pesquisas anteriores de Chen et al., (2024) testaram cinamaldeído livre e cinamaldeído em emulsão, armazenado em diferentes períodos (simulando 5 minutos e 2 anos) a fim de testar a sua atividade antibacteriana contra *Actinomyces viscosus* e obteve-se como resultado uma taxa de inibição de 50 a 75% quando atuou por 2/5min utilizando a CIM do cinamaldeído fresco, desaparecendo seu efeito de inibição quando simulado um armazenamento por 2 anos, enquanto a mesma concentração da emulsão de cinamaldeído fresco apresentou maior taxa de inibição (100 % da taxa de inibição) quando atuou por 2 min ou 5 min e ainda manteve o mesmo efeito inibitório por 2 anos. Observando assim, uma melhora na capacidade antifúngica do cinamaldeído após associação com sistemas de entrega.

Estudo de Li et al., (2024) investigou a molécula de transcinamaldeído com 2-hidropropil- $\beta$ -ciclodextrina (1:1) em relação a sua estabilidade por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em diferentes períodos (0, 7, 14, 30 dias) expondo três amostras dessa solução em temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C} \pm 5$ ) a luz do dia e mais três à temperatura ambiente e escura, obtiveram que a estabilidade da amostra exposta à luz, no período de 30 dias foi significativamente maior (73,2%) em comparação a amostra mantida no escuro (57,83%). Como também, aplicou no espectrofotômetro infravermelho e possuiu como resultado que os principais picos aparentados no cinamaldeído não apareceu no complexo de inclusão, mostrando que foram encapsuladas de forma satisfatória. Isso verifica a boa solubilização e a interação eficaz entre os dois componentes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Analisar a atividade antifúngica *in vitro* do cinamaldeído após submissão a diferentes parâmetros de armazenamento com a inclusão da substância com 2-hidroxipropil-  $\beta$ -ciclodextrina.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o tempo de prateleira do cinamaldeído após inclusão com 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina:



- Determinar a concentração do cinamaldeído, tanto do não encapsulado quanto do complexo de inclusão, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Analisar as interações do complexo de inclusão utilizando a espectroscopia no infravermelho (FT-IR);
- Submeter as amostras a testes de estabilidade acelerada, incluindo centrifugação, exposição a diferentes temperaturas (5°C, 25°C e 40°C) em variados períodos (T<sub>0</sub>, T<sub>30</sub> dias, T<sub>60</sub> dias) e ciclos de congelamento e descongelamento (T<sub>0</sub> e T<sub>30</sub> dias);
- Avaliar a atividade antifúngica (T<sub>0</sub>, T<sub>30</sub> dias, T<sub>60</sub> dias), comparando os resultados com o cinamaldeído não encapsulado (grupo controle negativo) e nistatina (grupo controle positivo).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. ESTUDO PILOTO**

#### **4.1.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES TESTES**

##### **4.1.1.1 CINAMALDEÍDO (GRUPO CONTROLE)**

A emulsão do cinamaldeído (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 27 µg/mL ( $2 \times 10^{-4}$  mol/L), seguindo estudo de Almeida et al., (2020).

##### **4.1.1.2. CINAMALDEÍDO ENCAPSULADO COM 2-HIDROXIPROPIL- B-CICLODEXTRINA**

O complexo de inclusão de cinamaldeído com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi preparado utilizando a quantidade de cinamaldeído de 24µL em um frasco de vidro com 500µL da solução mãe de hidroxipropil-β-ciclodextrina (MM = 1,380g/mol), na qual foi adquirida utilizando o cálculo da  $c = \frac{m}{MM \times V}$ , com m = 0,69g da substância aferida em balança analítica ATY224 (Schimadzu, Kyoto, Japão) e dissolvida em V = 5mL de água milli-q.

A partir da solução mãe, foram obtidas as soluções filhas de 100mM, 50mM, 25mM, 10mM, 1mM. Seguindo a concentração, respectivamente de:

Tabela 1 – Diluição da 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina para formular o complexo de inclusão (CNM+CD)

Solução	Solução	Água destilada
A	1000 $\mu$ L	-
B	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
C	250 $\mu$ L	750 $\mu$ L
D	100 $\mu$ L	900 $\mu$ L
E	10 $\mu$ L	990 $\mu$ L

Fonte: Autoria própria, 2024.

Foram adicionadas a cada solução 50 $\mu$ L de cinamaldeído. Posteriormente, para facilitar a solubilização dos dois constituintes foi utilizado o vórtex até estar visivelmente diluído. Após isso, agitado mecanicamente em banho ultrassônico (SP Labor, São Paulo, Brasil) de 40KHz durante 3 horas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### 4.1.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

A CIM foi determinada através da técnica de microdiluição segundo a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Para obtenção do inóculos com concentração final entre  $5 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL de cepas de *C. albicans* ATCC90028 pertencentes a coleção da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA) foram realizadas sucessivas diluições utilizando placas de microdiluição de 96 poço, em formato de “U”, contendo RPMI-1640, na qual foram incubadas por 24h a  $35^\circ\text{C}$  e os resultados foram lidos a partir da análise de agregados celulares no fundo dos poços (Costa et al., 2024).

Para isso, 100  $\mu$ L das soluções testes foram dispensadas nas cavidades da primeira coluna da placa, que foram diluídos seriadamente, a partir da retirada de uma alíquota de 100  $\mu$ L da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora, obtendo-se concentrações da emulsão de cinamaldeído de 27  $\mu\text{g/mL}$  até 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , de modo que na primeira coluna da placa irá se encontrar a maior concentração e na última, a menor concentração, enquanto o cinamaldeído encapsulado com 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina de. Por fim, será adicionado 100  $\mu$ L do inóculo das espécies de *Candida* na cavidade. A nistatina (Sigma-Aldrich,

São Paulo, Brasil) foi utilizada como grupo controle positivo (Almeida *et al.*, 2020; Alves *et al.*, 2021).

Foi definida a CIM para os produtos testados como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o controle de crescimento. O resultado foi expresso pela mediana dos valores de CIM obtidas nos ensaios.

A CFM foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento visível. Alíquotas dos poços correspondentes à CIM e maiores concentrações foram subcultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (KASVI1, Kasv Imp e Dist. Prod/Laboratórios LTDA, Curitiba, Brasil). As placas foram incubadas por 24 h a 35 °C, e a leitura foi realizada por observação visual do crescimento fúngico no meio sólido com base na contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). A relação MFC / MIC foi calculada para determinar se a substância tinha atividade fungistática ( $MFC / MIC \geq 4$ ) ou fungicida ( $MFC / MIC < 4$ ) (Alves *et al.*, 2021).

#### **4.1.3. HPLc**

A quantificação do cinamaldeído e do complexo de inclusão e curvas de calibração foram desenvolvidas utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLc). O método foi otimizado visando adaptação à coluna, solventes e amostra de análise. Assim, foram preparadas soluções de análise para as curvas contendo as concentrações 1-20 ug/mL e injetadas no sistema.

Utilizou-se um sistema CLAE equipado com detector UV-VIS SPD-10A (Shimadzu, Kyoto, Japão) e coluna GIST C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) acoplado a pré-coluna GIST C18 (4 x10mm). A fase móvel foi composta por metanol: água (70:30 v/v), que foram filtrados e degaseificados previamente. O comprimento de onda de análise foi obtido a partir do espectro de varredura de 256nm. O fluxo da fase móvel foi estabelecido para 1mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL de amostra. Os cromatogramas resultantes foram analisados usando o Software Empower® para obter as áreas dos picos correspondentes a cada concentração (Xavier-Júnior *et al.*, 2017).

### **4.1. RESULTADOS DO ESTUDO PILOTO**

Os resultados obtidos para a análise inicial microbiológica para o a solução de cinamaldeído (CNM) apresentou a 27µg/mL. Em relação a nistatina, obteve-se 1,5µg/mL. Já em relação ao complexo de inclusão do cinamaldeído com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CN), as soluções de A a E apresentaram resultados bem semelhantes (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima do Complexo de Inclusão (CNM+CD)

Soluções	Concentração em (µg/mL)
A	99
B	48,12
C	60,6
D	54,37
E	75,87
Nistatina	1,5

Fonte: Autoria própria, 2024.

Os valores de CIM e CFM referentes ao CNM, CNM+CD e da nistatina (controle positivo), estão apresentados na Tabela 2. Para a solução de CNM, as concentrações foi de 27 µg/mL, enquanto o complexo de inclusão exibiu uma CIM de 48,12 µg/mL para todas as cepas testadas. Já a nistatina manteve concentração constante de 1,5 µg/mL em todos os isolados testados. A relação entre CFM e CIM demonstrou perfil fungicida para as substâncias analisadas (Tabela 3).

Cepa	Cinamaldeído (CNM)			Complexo de Inclusão (CNM + CD)			Nistatina		
	CIM	CFM	CFM/ CIM	CIM	CFM	CFM/ CIM	CIM	CFM	CFM/CIM
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	27	27	1	48,12	48,12	>1	1,5	1,5	1
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	27	27	1	48,12	48,12	>1	1,5	1,5	1

Nota: CFM/CIM > 4 = atividade fungistática; CFM/CIM < 4 = atividade fungicida (Popielek *et al*, 2016)

Fonte: Autoria própria, 2025.

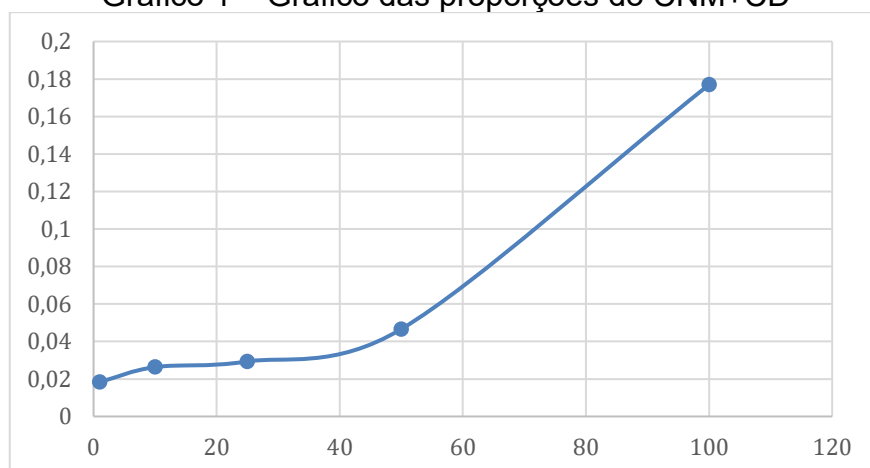
Tabela 4 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLc) do CNM+CD

Soluções	Concentrações (mg/mL)	Concentração em (µg/mL)
A	23,39	23390
B	8,8	6160
C	3,88	3880
D	3,48	3480
E)	2,43	2430

Fonte: Autoria Própria, 2024.

Esses resultados de concentração foram dados pela equação  $y = 29518x + 11105$ , com  $R^2 = 0,9843$ . Utilizando todos esses valores de concentrações e dividindo pela massa molar do cinamaldeído (132,16g/mol), obtemos o gráfico da proporção do HPLc (Gráfico 1). Na qual, temos:

Gráfico 1 – Gráfico das proporções do CNM+CD



Fonte: Autoria Própria, 2025.

Após o estudo piloto, foram obtidos resultados bem semelhantes entre as soluções de B a D, tanto em relação a concentração inibitória mínima (Tabela 1) desses complexos de inclusão, como da concentração de cinamaldeído (Tabela 2) que foi dissolvido na 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (Gráfico 1). em proporções

B1/L1 mais baixas (C a E), a quantidade de cinamaldeído encapsulado manteve-se praticamente constante, variando de 0,018 a cerca de 0,03. A partir da proporção da solução B, observou-se aumento acentuado, alcançando o valor máximo na proporção na solução A. Por isso, para prosseguimento da pesquisa, foi escolhida a solução B para teste de estabilidade acelerada com concentração de 8,8mg/mL, além disso, foi adequado a quantidade de cinamaldeído inserido no complexo de inclusão, pois observou-se precipitação da substância quando acrescentado 50µL, a partir dos dados do HPLC o valor máximo, aproximadamente, da substância que conseguia interagir com a ciclodextrina era de 24µL.

## **4.2. PESQUISA PRINCIPAL**

### **4.2.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES**

O preparo das soluções seguiu como descrito nos itens 4.1.1 e 4.1.2. Para o item 4.1.2, foi utilizado a concentração da solução B para a formulação da solução de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (500µL da solução + 500µL de água destilada) e incorporado 24µL de cinamaldeído, essas concentrações foram definidas com base nos resultados obtidos no estudo piloto (item 4.1.5.).

### **4.2.2 HPLC**

Seguindo os mesmos parâmetros citados anteriormente (item 4.1.4).

### **4.2.3. INFRAVERMELHO**

Espectros de infravermelho transformada de Fourier (FT-IR) da emulsão de cinamaldeído, hidroxipropil-β-ciclodextrina e complexo de inclusão (cinamaldeído e hidroxipropil-β-ciclodextrina) foi registrado em um Vertex 70 (Bruker Optics, Ontario, Canadá), espectrômetro equipado com um DTGS detector, com fonte Global e um divisor de feixe de amplo alcance, associado a um acessório de refletância total atenuada (ATR) de diamante de reflexão única (Platinum, Bruker Optics, Ontario, Canadá). Os espectros FT-IR foram obtidos com uma resolução de 2cm<sup>-1</sup> na região de 4000-600cm<sup>-1</sup>. Os pellets de KBr foram preparadas a partir de misturas de KBr e da amostra na proporção de 200:1 utilizando uma prensa hidráulica. Após isso, foi utilizado o software OPUS multitarefa para a análise de dados (Xavier-Júnior et al., 2019; Xavier-Júnior et al., 2017).

#### 4.2.4 INIBIÇÃO DE ADESÃO DO BIOFILME *in vitro*

Placas de fundo plano de 96 poços foram usadas para inocular 200 µL de suspensões de um biofilme multiespécies (fúngico) (*C. albicans* ATCC 90028; *C. glabrata* ATCC 90030), no qual cada poço foi considerado uma variável independente, cultivado em meio CSD (KASVI®, Kasv Imp e Dist da Prod Laboratorios LTDA, Curitiba, Brasil), suplementado com 2% de sacarose e ajustado para  $2,5 \times 10^5$  UFC/mL.

Para controle negativo, foram utilizados poços contendo apenas o meio de cultura estéril, sem adição do inóculo fúngico, com a finalidade de assegurar a ausência de contaminação.

Após a cultura, 100 µL de solução de cinamaldeído (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), foram transferidos para as placas de biofilme multiespécies, com concentrações variando de 27 µg/mL (CIM; CIMx2; CIMx4; CIMx8; CIMx10) (Almeida et al., 2020). Assim como, 100 µL do complexo de inclusão (CN + CD) também foi transferido, com concentração inicial de 48,12 µg/mL (CIM; CIMx2; CIMx4; CIMx8; CIMx10). Avaliando após o preparo das soluções (T0), após 30 dias, 60 dias. As placas foram incubadas por 48 h em microbiológico a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Após a incubação, o meio foi aspirado das placas, as células não ligadas foram removidas lavando os poços duas vezes com 200 µL de solução salina tamponada com fosfato e secado à temperatura ambiente por 45 min. A solução aquosa de cristal violeta (200µL, 0,4%) foi adicionada a cada poço e permaneceu em contato com o biofilme por 45 min.

Após a incorporação do corante, os poços foram lavados quatro vezes com 200 µL de água destilada e imediatamente branqueados por 45 min com 200 µL de 95% etanol. Finalmente, 100 µL da solução branqueada foram transferidos para uma nova placa de fundo plano e a absorbância medida a 595 nm em um leitor de microplacas.

Os valores de absorbância do cinamaldeído e do controle de crescimento foram usados para calcular a inibição percentual da formação de biofilme. O controle de crescimento foi considerado como 100% de formação fúngica. Os ensaios foram realizados em triplicata, a fim de minimizar erros experimentais e

garantir a confiabilidade dos resultados. Os controles estéreis não receberam suspensão celular e os controles de crescimento receberam apenas meio de cultura e cepas correspondentes ao biofilme multiespécies (Almeida et al., 2020).

#### **4.2.5 TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA**

Para todos os parâmetros da estabilidade a seguir, foram analisados a atividade antifúngica em diferentes períodos: após o preparo  $T_0$ ,  $T_{30}$ ,  $T_{60}$  dias.

##### **4.2.5.1 CENTRIFUGAÇÃO**

As soluções foram submetidas a rotações crescentes de 980, 1800 e 3.000rpm, em centrífuga (Eppendorf® Centrifuge 5430/5430R, Hamburg, Germany), durante quinze minutos em cada rotação, à temperatura ambiente (Anvisa, 2004; Isaac et al., 2008). Avaliando a instabilidade da solução para posteriormente ser aplicado aos testes de estabilidade.

##### **4.2.5.2 TEMPERATURA E UMIDADE**

As soluções foram submetidas ao armazenamento em  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  a 75% de umidade relativa  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ , simulando elevadas temperaturas. Para simulação de baixas temperaturas, foram submetidas à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  a 60% de umidade relativa  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  (EMEA, 2003; Isaac et al., 2008).

##### **4.2.5.3 CICLO DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO**

As soluções adquiridas foram submetidas a condições extremas de temperaturas, alternando ciclos de 24h:  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (ANVISA, 2004; Isaac et al., 2008), durante quatro semanas.

#### **4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os valores medidos foram apresentados como médias  $\pm$  SD (desvio padrão). A análise estatística dos dados foi realizada com o software GraphPad Prism versão 8.4.2., a normalidade de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk ( $n < 26$ ). Após verificação da normalidade dos dados, as médias de vários grupos foram usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) aplicada com o procedimento de comparação múltipla de Tukey. Os dados estatísticos foram considerados significativos em  $p < 0,05$ .

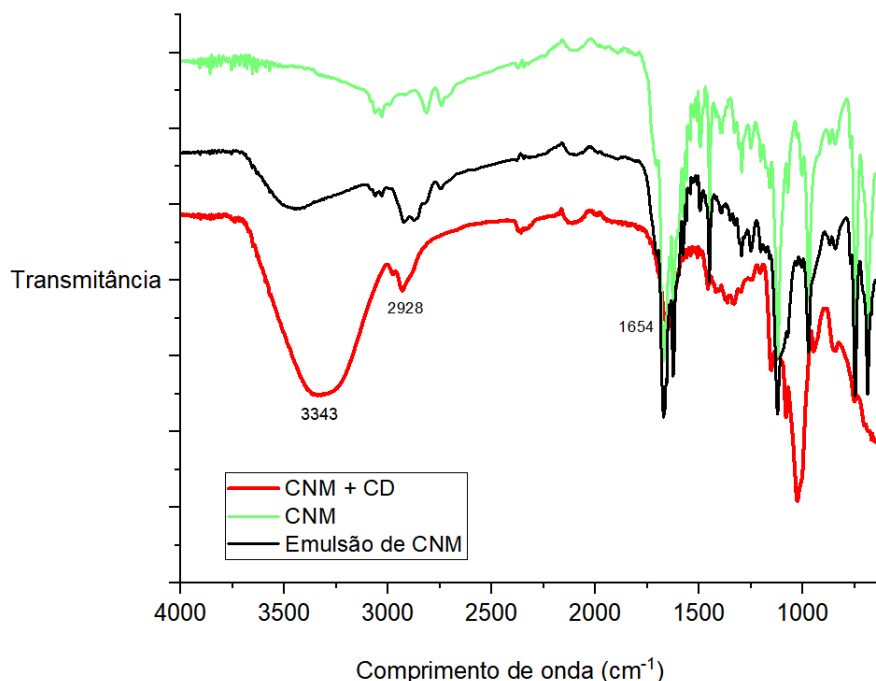


## 5. RESULTADOS

### 5.1. INFRAVERMELHO

De acordo com os dados obtidos pelo espectro de FT-IR (Gráfico X) do complexo de inclusão (CNM+CD) foram observadas alterações pós inclusão com a molécula de 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. O complexo de inclusão apresentou um pico largo em  $\sim 3343\text{ cm}^{-1}$ , quando comparados com o CNM e a emulsão de CNM, na qual sugere um estiramento nas ligações de hidrogênio (O-H), compatível com a presença da polaridade da ciclodextrina, indicando a formação de interações do complexo. Pequenas alterações nas intensidades e deslocamentos das bandas em  $\sim 2928\text{ cm}^{-1}$  (C-H) indica o estiramento das ligações alifáticas, sugerindo a interação entre os dois componentes. Além disso, a diminuição da intensidade do pico de  $\sim 1654\text{ cm}^{-1}$  (C=O), no CNM + CD, evidencia a inclusão satisfatória das duas substâncias, devido a interação hidrofóbica do óleo com a ciclodextrina.

Gráfico 2 – Comparação do FT-IR do Óleo do CNM, da solução de CNM e do complexo de inclusão (CNM+CD).

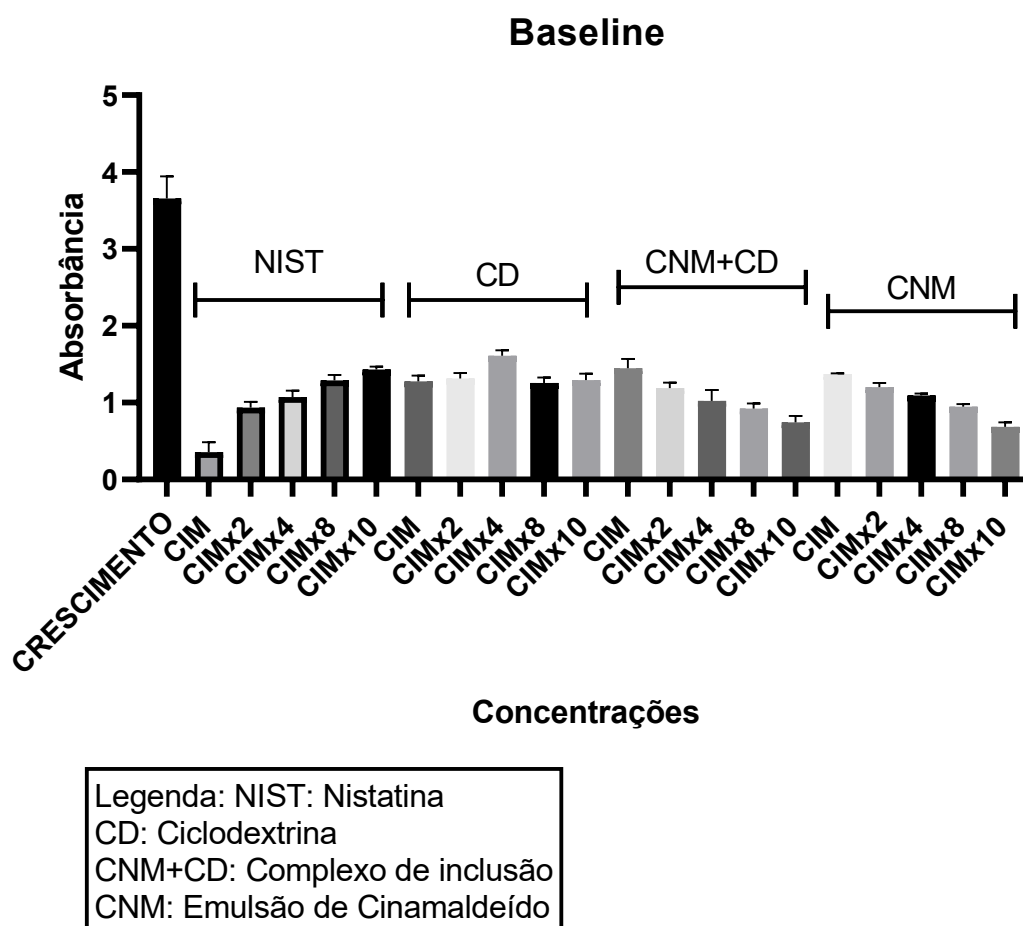


Fonte: Dados coletados da autora, 2025.

## 5.2. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A partir dos dados obtidos com o teste de inibição de adesão do biofilme contra as cepas *Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida Glabrata* ATCC 90030 para o baseline ( $T_0$ ), observou-se que os constituintes testados (nistatina, complexo de inclusão e solução de cinamaldeído) em concentrações diferentes (CIM, CIMx2, CIMx4, CIMx8 e CIMx10) promoveram redução significativa do crescimento fúngico quando comparados ao controle de crescimento (Gráfico 3), pois apresentaram  $p < 0,05$  (Apêndice – Tabela 5).

Gráfico 3 – Baseline do Teste de Inibição do Biofilme ( $T_0$ )



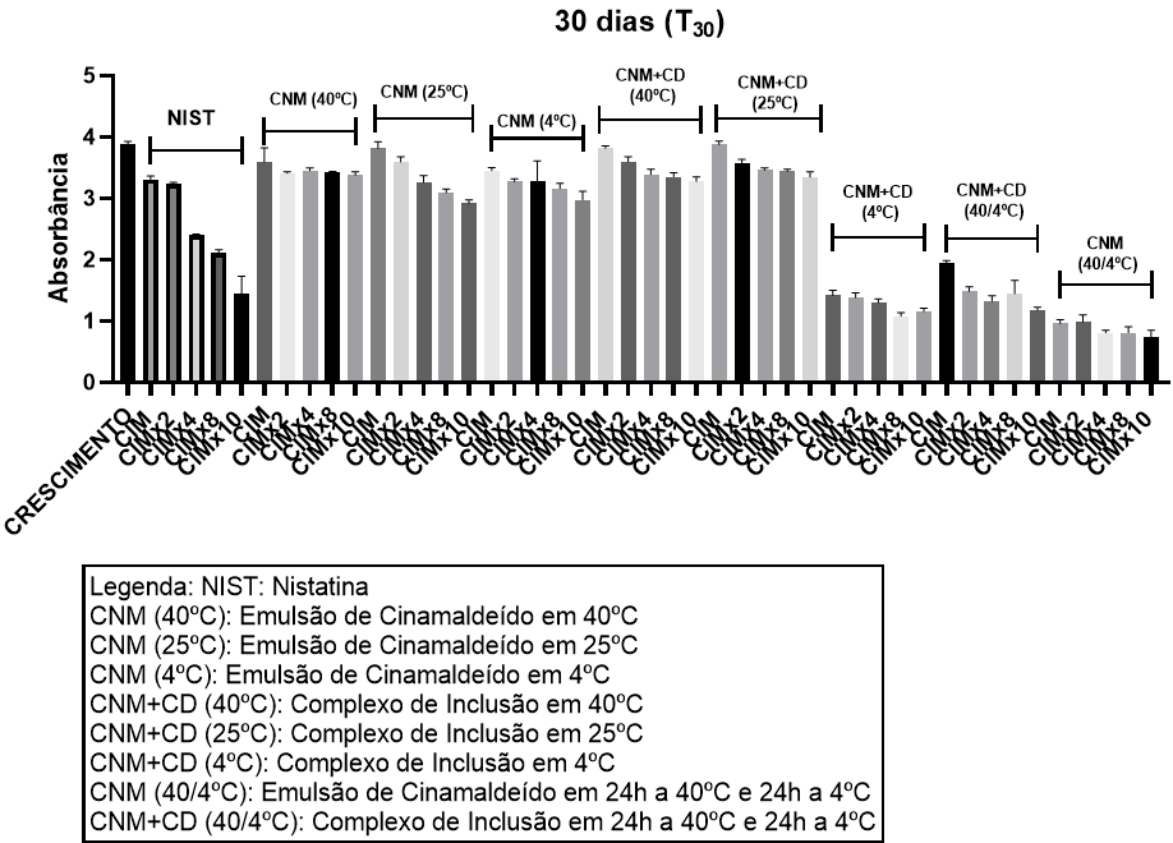
Fonte: Dados coletados da autora, 2025.

Os dados obtidos, após 30 dias, demonstraram que houve diminuição do crescimento do biofilme para todas as concentrações do grupo controle positivo (nistatina), pois apresentaram diferença estatisticamente significativa, com  $p < 0,05$ .

Essa redução também foi melhor observada no processo do ciclo de congelamento e descongelamento da solução de CNM e cinamaldeído encapsulado (Gráfico 4).

Contudo, para os constituintes que sofreram processo de envelhecimento simulando diferentes condições de temperaturas, verificou-se que todas as concentrações em refrigeração (4°C) apresentaram uma diminuição do crescimento, tanto para o CNM quanto para o CNM+CD. No entanto, a redução significativa para a temperatura ambiente (25°C) ocorreu a partir da concentração inibitória mínima multiplicada 4 (CIMx4). Em relação a simulação em altas temperaturas observou-se diferença a partir do CIMx2 para o CNM (40°C) e CIMx4 para o complexo de inclusão (Apêndice – Tabela 6).

Gráfico 4 – Tempo de 30 dias do Teste de Inibição do Biofilme (T<sub>30</sub>)

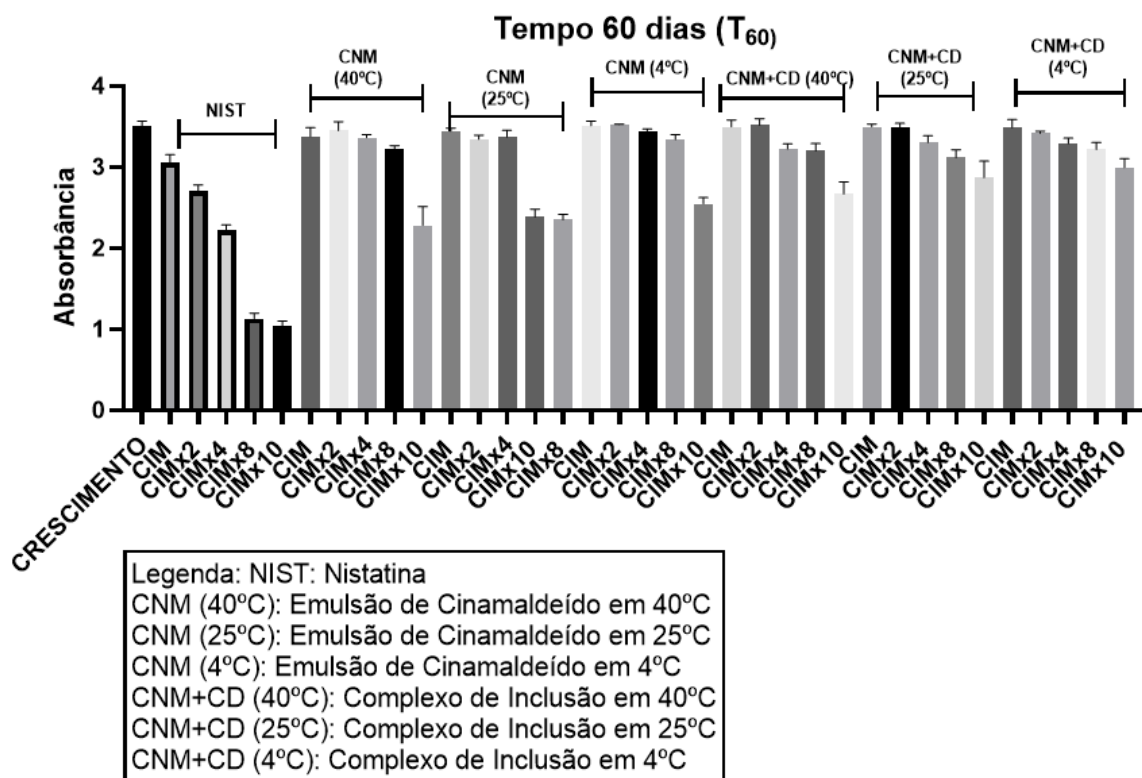


Fonte: Dados coletados da autora, 2025.

Após 60 dias de armazenamento (Gráfico 5), os dados obtidos demonstraram que somente concentrações mais elevadas da solução de cinamaldeído e do cinamaldeído encapsulado apresentaram diferença estatisticamente significativa. Para o CNM, essa diferença foi observada na CIMx10 para as temperaturas de 40°C e 4°C, enquanto para a temperatura de 25°C a partir

da CIMx8. Para o complexo de inclusão, a partir da CIMx8 em 40°C e 25°C e só na CIMx10 quando armazenado a 4°C (Apêndice – Tabela 7).

Gráfico 5 – Tempo de 60 dias do Teste de Inibição do Biofilme ( $T_{60}$ ).



Fonte: Autoria Própria, 2025.

## 6. DISCUSSÃO

O uso de métodos físicos e químicos para desinfecção da prótese dentária, por meio de escovação e produtos de limpeza, pode acarretar efeito deletérios na superfície do material da base da prótese no qual favorece a proliferação e a adesão do biofilme pelas espécies de *Candida* spp.. Por este motivo, terapias alternativas com utilização de produtos sintéticos possuem resultados promissores, entretanto, por advir de constituintes que possuem baixa volatilidade, sensibilidade à luz e a temperatura torna-se necessário encapsular a molécula tentando manter a atividade antifúngica da substância. A hipótese nula testada foi rejeitada. Tanto a emulsão de cinamaldeído quanto o complexo de inclusão, apresentaram um efeito antifúngico menor que a nistatina (padrão-ouro), pois observou-se diferenças estatisticamente significantes em algumas formas de armazenamento na inibição

da formação do biofilme. Esses resultados sugerem que, embora o complexo de inclusão seja promissor como uma terapia alternativa ou adjuvante, ele pode exigir concentrações mais altas ou mudança no veículo do complexo para alcançar eficácia clínica na erradicação do biofilme. Quanto mais cinamaldeído livre, mais efetiva sua atividade antimicrobiana devido a sua exposição aos microrganismos (Chen et al., 2019).

Estudos prévios conduzidos por Tuan (2025) testou a CIM do trans-cinamaldeído e da nistatina na inibição da formação de biofilme contra *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, demonstrou que em todas as três espécies de *Candida*, a nistatina exibiu valores significativamente mais baixos do que o cinamaldeído em todos os níveis de inibição do biofilme. O cinamaldeído apresentou efeito total (100%) em concentrações acima de 1,25mg/mL (1250µg/mL), diminuindo consideravelmente em doses mais baixas. Confirmando que a nistatina exerceu efeito superior na diminuição do crescimento do biofilme contra a formação de biofilme em geral. Estes resultados corroboram com o do presente estudo, quando comparamos os resultados da inibição da formação do biofilme da emulsão do cinamaldeído, cinamaldeído encapsulado e da nistatina (grupo controle positivo) em períodos diferentes. Os valores da nistatina em relação a inibição do biofilme permaneceu com diferenças estatisticamente significantes em todas as concentrações nos períodos propostos, enquanto as substâncias envelhecidas apresentaram  $p < 0,05$  em concentrações maiores, contudo a dosagem do CNM e do CNM+CD utilizado foi bastante baixa em relação a este estudo, sendo respectivamente, 27µg/mL e 48,12µg/mL, além da nistatina não ter sido submetida ao processo de armazenamento e da estabilidade acelerada.

Estudos anteriores apresentam resultados semelhantes em relação inibição máxima da formação do biofilme durante tratamentos de 24 e 48 horas após encapsulamento do cinamaldeído com lipossomas (300µg/mL), apresentando respectivamente, 81 a 83% da inibição, comparando a anfotericina B que apresentou inibição de 28 e 45% (Khan et al., 2017). Resultados semelhantes foram obtidos na concentração de 195µg/mL do CNM, na qual apresentou aproximadamente 82% da inibição da formação do biofilme, apresentando resultados similares a uma substância padrão-ouro (hipoclorito de sódio) (Almeida et al., 2020). Outros dados obtidos nos estudos de Alves e colaboradores (2021),

no qual o cinamaldeído reduziu o biofilme em aproximadamente 30% em baixas concentrações (49,96 - 19,98  $\mu\text{g/mL}$ ). A nistatina, utilizada como controle, reduziu a adesão ao biofilme em 14,1%. Estes resultados apresentam algumas convergências com o presente trabalho, quando observamos os resultados obtidos do CNM e do complexo de inclusão após 30 dias de armazenamento com alterações diárias entre altas temperaturas (40°C) e baixas temperaturas (4°C).

Dados anteriores da pesquisa de Mishra, Gupta e Pruth (2021) utilizando nanofibras carregadas de cinamaldeído eliminaram em até 50% do biofilme maduro de *C. albicans*, mostrando que a atividade antibiofilme aumentou com o encapsulamento. Estes resultados se alinham com o dessa pesquisa, pois após 60 dias, é observado uma redução menor que 50% da formação do biofilme. Essa diminuição da atividade antifúngica das substâncias testadas pode ser justificada devido a estrutura complexa do biofilme presente com duas espécies de *Candida* associadas, como também pela quantidade de cinamaldeído livre da substância liberadas ao decorrer do armazenamento.

A análise realizada neste trabalho da comparação entre CNM e CNM+CD, na qual em alguns dados da solução de CNM apresenta diferenças maiores de inibição da formação de biofilme, podem ser justificadas pela liberação mais lenta do fármaco quando o encapsulamento está presente (Bastos et al., 2025; Xu et al., 2022).

Assim como, em uma solução aquosa, a ciclodextrina ligeiramente polar é ocupada por moléculas de água e, portanto, elas podem ser prontamente substituídas por "moléculas convidadas" apropriadas, que são menos polares que a água, esta tem que migrar do interior da cavidade e ser substituída pelo ligante. Assim, as interações com a água determinam a capacidade de formar os complexos, mas também sua estabilidade (Cevallos, Buera e Elizalde, 2010). Justificando assim, a possibilidade de uma possível instabilidade do complexo devido estar presente em meio aquoso.

Achados de Li et al., (2024) utilizando molécula de trans-cinamaldeído e  $\beta$ -ciclodextrina apresentaram resultados convergentes, picos de  $1669,08\text{cm}^{-1}$  do cinamaldeído e picos de  $3363,16\text{cm}^{-1}$  da ciclodextrina corroborando com os obtidos no presente estudo, quando observado o complexo de inclusão, no qual o pico de

$\sim 1654\text{cm}^{-1}$  diminuiu sua intensidade, assim como apareceu um pico largo e longo na faixa dos  $3343\text{cm}^{-1}$  que caracteriza a ligação O-H, sugerindo a efetividade no encapsulamento da substância.

Alterações semelhantes em relação ao espectro infravermelho foram obtidas em estudos anteriores, com diversas outras moléculas, como as quitosanas em que os achados mostram picos após encapsulamento em  $1683,3\text{cm}^{-1}$  e picos em  $3026\text{cm}^{-1}$  comprovando ao estiramento da parte aromática e sugerindo interações entre as substâncias (Gadkari et al., 2019). Resultados compatíveis foram obtidos em relação aos picos observados ( $1686,3\text{cm}^{-1}$  e  $3026,3\text{cm}^{-1}$ ), utilizando essas duas mesmas moléculas citadas anteriormente (Subhaswaraj et al., 2018). Apesar das divergências metodológicas observadas em relação a utilização de outros constituintes orgânicos, como a quitosana, ainda é sugerível um bom encapsulamento por meio da utilização da ciclodextrina, por meio dos dados obtidos no FT-IR, com alargamento e diminuição de picos, no qual compatível um possível isolamento parcial da substância devido ao encapsulamento.

A contribuição gerada à sociedade dá-se após teste em diferentes armazenamentos o complexo de inclusão utilizado ainda apresentar atividade antifúngica para que possam ser formulados novos recursos terapêuticos de higienização de prótese, testando novas formas de veículo para a substância que mantenham a sua atividade antifúngica ao decorrer do tempo, simulando o tempo de prateleira dessa substância.

Apesar dos resultados promissores, este estudo *in vitro* apresenta limitações os quais não reproduzem fielmente o ambiente oral que são afetados diretamente por fatores internos e externos, como a composição e pH salivar. Além disso, o biofilme formado em 48 horas para avaliar o efeito antifúngico da solução não simula totalmente a base da prótese *in vivo* (Kaypetch et al., 2023), testes microbiológicos são limitados pela sensibilidade do operador, risco de contaminação da solução ou do meio utilizado. Por isso, pesquisas futuras devem ser realizadas alterando os sistemas de entrega da substância ou o veículo que está sendo utilizado, a fim de tentar manter por mais tempo a atividade fungicida do cinamaldeído, assim como para ter parâmetros mais ideais da inibição da

formação do biofilme realizar o processo de envelhecimento no grupo controle positivo.

## **7. CONCLUSÃO**

O cinamaldeído apresenta uma inclusão em 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina satisfatória, assim como apresentado na cromatografia líquida de alta eficiência e comprovado pelo espectro infravermelho.

O complexo de inclusão apresentou resultados promissores em concentrações maiores na simulação da estabilidade acelerada (CIMx8 e CIMx10). Principalmente, quando foi submetido ao ciclo de congelamento e descongelamento, com alterações nas temperaturas de forma diária, na qual obteve uma boa inibição de formação do biofilme.

## **REFERÊNCIAS\***

Almeida MAL, Batista AUD, de Araújo MRC, Almeida VFDS, Bonan PRF, Alves DN et al. Cinnamaldehyde is a biologically active compound for the disinfection of removable denture: blinded randomized crossover clinical study. BMC Oral Health. 2020;20:223. doi: 10.1186/s12903-020-01212-5.

Alves DN, Martins RX, Ferreira EDS, Alves AF, Andrade JC, Lazarini JD et al. Toxicological Parameters of a Formulation Containing Cinnamaldehyde for Use in Treatment of Oral Fungal Infections: An In Vivo Study. BioMed Res Int. 2021Oct;2021:2305695. doi: 10.1155/2021/2305695.

Alves DN, Melo AKV, Alves AF, Araujo MRC, Araujo RS, Castro RD. Safety and tolerability of cinnamaldehyde in orabase for oral candidiasis treatment: phase I clinical trial. Clin Oral Invest 26, 4825–4833 (2022). doi: 10.1007/s00784-022-04450-9.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. 1ª ed. Brasília: ANVISA, 2004. 52 p.

Arya NR, Naureen BR. Candidiasis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. PMID: 32809459



Ayaz EA, Bagis B, Turgut S. Effects of Thermal Cycling on Surface Roughness, Hardness and Flexural Strength of Polymethylmethacrylate and Polyamide Denture Base Resins. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Material* 2015 Oct; 13(3):280-286. doi: 10.5301/jabfm.5000236.

Bajunaid SO, Baras BH, Weir MD, Xu HHK. Denture Acrylic Resin Material with Antibacterial and Protein-Repelling Properties for the Prevention of Denture Stomatitis. *Polymers (Basel)*. 2022 Jan;14(2):230. doi: 10.3390/polym14020230.

Bastos CFB, Gomes-Filho FN, Borges-Grisi MHS, D'Assunção VCSC, Barros ABC, Xavier-Júnior FH, Almeida LFD. Antibacterial effect of cinnamaldehyde in a microemulsion system against oral colonizing biofilms. 2025 May; 85(e294221):1-9. doi: 10.1590/1519-6984.294221.

Campos DS, Muniz IAF, Costa TKVL, Lima RBW, Neppelenbroek KH, et al.. Effect of simulated brushing with dentifrices on surface roughness and the mass loss of acrylic resin: A systematic review and meta-analysis of in vitro studies. *J Prosthet Dent*. 2023 Aug 21;S0022-3913(23)00437-7. doi: 10.1016/j.prosdent.2023.06.027.

Cevallos PAP, Buera MP, Elizalde BE. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in  $\beta$ -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. *J Food Eng*. 2010;99(1):70–75. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.01.039

Chang S, Qin D, Wang L, Zhang M, Yan R, et al. Preparation of novel cinnamaldehyde derivative–BSA nanoparticles with high stability, good cell penetrating ability, and promising anticancer activity. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2021 Sep;624:126765. doi: 10.1016/j.colsurfa.2021.126765.

Chen S, Li J, Li Z, Gu Z, Ban X, Hong Y, Li C. Enhanced antimicrobial activity against oral bacteria *Actinomyces viscosus* by cinnamaldehyde emulsion microencapsulated with cyclodextrin glycosyltransferase-catalyzed products. *Int J Biol Macromol*. 2024;279(1): 135084. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.135084.

Chen W, Cheng F, Swing CJ, Xia S, Zhang X. Modulation effect of core-wall ratio on the stability and antibacterial activity of cinnamaldehyde liposomes. *Chem Phys Lipids*. 2019 Jun;223:104790:1-9. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2019.104790.

- Chimvaree C, Tepsorn R, Supapvanich S, Wongs-Aree C, Srilaong V, Boonyarittongchai P. Encapsulation of Cinnamaldehyde from Cinnamon Essential Oils in Cyclodextrin. IOP Conf Ser Earth Environ Sci. 2020;515:012034:1-8. doi: 10.1088/1755-1315/515/1/012034.
- Choonharuangdej S, Srithavaj T, Thummawanit S. Fungicidal and inhibitory efficacy of cinnamon and lemongrass essential oils on *Candida albicans* biofilm established on acrylic resin: an in vitro study. J Prosthet Dent. 2021 Apr;125(4):707.e1–707.e6. doi:10.1016/j.prosdent.2020.12.017
- Costa PCQG, Nogueira PL, Nascimento YM, Sobral MV, Silvestre GFG, Castro RD. Bioactive potential of *Eugenia luschnathiana* essential oil and extract: antifungal activity against *Candida* species isolated from oncological patients. Braz J Biol. 2024 Jul;84:e286419. doi: 10.1590/1519-6984.286419
- Emea, European Medicines Agency. ICH Topic Q1A (R2): Note for Guideline on Stability Testing: Stability Testing of New Drug Substances and Products. London: EMEA; 2003 Aug. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-and-products-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-and-products-step-5_en.pdf).
- Farid DAM, Zahari NAH, Said Z, Ghazali MIM, Hao-Ern L, Mohamad Zol S, Aldhuwayhi S, Alauddin MS. Modification of Polymer Based Dentures on Biological Properties: Current Update, Status, and Findings. Int J Mol Sci. 2022 Sep 9;23(18):10426. doi: 10.3390/ijms231810426.
- Gad MM, Abualsaud R, Khan SQ. Hydrophobicity of Denture Base Resins: A Systematic Review and Meta-analysis. J Int Soc Prev Community Dent. 2022 Apr 8;12(2):139-159. doi: 10.4103/jispcd.JISPCD\_213\_21.
- Gadkari RR, Suwalka S, Yogi MR, Ali W, Das A, Alagirusamy R. Green Synthesis of chitosan-cinnamaldehyde cross-linked nanoparticles: characterization and antibacterial activity. Carbohydr Polym. 2019 Dec;226:115298. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115298.

Han R, Li X, Gao X, Lv G. Cinnamaldehyde: Pharmacokinetics, anticancer properties and therapeutic potential (Review). *Mol Med Rep.* 2024 Sep;30(3):163. doi: 10.3892/mmr.2024.13287.

Isaac VLB, Cefali LC, Chiari BG, Oliveira CCLG, Salgado HRN, Corrêa MA. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2008 maio-jul;29(1):81-96.

Isadiartuti D, Rosita N, Ekowati J, Syahrani A, Ariyani T, Rifqi MA. The thermodynamic study of p-methoxycinnamic acid inclusion complex formation, using  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2021 Jun 25;32(4):663-667. doi: 10.1515/jbcpp-2021-0008.

Kaur J, Nobile CJ. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 2023 Feb;71:102237. doi: 10.1016/j.mib.2022.102237.

Kaypetch R, Rudrakanjana P, Tua-Ngam P, Tosrisawatkasem O, Thairat S, Tonput P, Tantivitayakul P. Effects of two novel denture cleansers on multispecies microbial biofilms, stain removal and the denture surface: an in vitro study. *BMC Oral Health.* 2023 Nov 11;23(1):852. doi: 10.1186/s12903-023-03535-5.

Kiesow A, Sarembe S, Pizzey RL, Axe AS, Bradshaw DJ. Material compatibility and antimicrobial activity of consumer products commonly used to clean dentures. *J Prosthet Dent.* 2016 Feb;115(2):189-198.e8.

Khan SN, Khan S, Iqbal J, Khan R, Khan AU. Enhanced killing and antibiofilm activity of encapsulated cinnamaldehyde against *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology.* 2017;8:1641. doi:10.3389/fmicb.2017.01641.

Li J, Cui Z, Xiong X, Zhang R, Lu W, Cai Z, et al. Preparation, characterization, and release behavior of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes of trans-cinnamaldehyde. *Res Sq.* 2024 Jun; 1. doi: 10.21203/rs.3.rs-4376749/v1

Liu Q, Cui H, Muhoza B, Duhoranimana E, Xia S, Hayat K et al. Fabrication of low environment-sensitive nanoparticles for cinnamaldehyde encapsulation by heat-induced gelation method. *Food Hydrocolloids.* 2020 Feb;105:105789. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105789

- Lo, S.; Mahmoudi, E.; Fauzi, M.B. Applications of drug delivery systems, organic, and inorganic nanomaterials in wound healing. *Discover Nano*. 2023 Aug;18(1):104. doi: 10.1186/s11671-023-03880-y
- Macêdo LO, Campos DSC, Alves DN, Carreiro AFT, Castro RD, Batista AUD. Effects of long-term cinnamaldehyde immersion on the surface roughness and color of heat-polymerized denture base resin. *J Prosthet Dent*. 2022;128(3):e1-e8. doi: 10.1016/j.prosdent.2022.07.002.
- Martorano-Fernandes L, Rodrigues NC, Bezerra NVF, Borges MHS, Cavalcanti YW, Almeida LFD. Cinnamaldehyde and  $\alpha$ -terpineol as an alternative for using as denture cleansers: antifungal activity and acrylic resin color stability. *Res Soc Dev*. 2021;10(3):e28010313512-e28010313512. doi: 10.33448/rsd-v10i3.13512.
- Mishra P, Gupta P, Pruthi V. Cinnamaldehyde incorporated gellan/PVA electrospun nanofibers for eradicating *Candida* biofilm. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;119:111588. doi: 10.1016/j.msec.2020.111450.
- Montoya, C, Kurylec J, Ossa A, Orrego S. Cyclic strain of Poly (methyl methacrylate) surfaces triggered the pathogenicity of *Candida albicans*. *Acta Biomater*. 2023 Aug 24;170:415–426. doi: 10.1016/j.actbio.2023.08.037.
- Pasrija R, Kumari D, Wadhwan S, Chhillar A, Mittal V. The *Zanthoxylum armatum* fruit's oil exterminates *Candida* cells by inhibiting ergosterol biosynthesis without generating reactive oxygen species. *Int Microbiol*. 2023 Jul 27;2:1-12. doi: 10.1007/s10123-023-00401-w.
- Pitha J, Milecki J, Fales H, Pannell L, Uekama K. Hydroxypropylcyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs. *Int J Pharm*. 1986;29:73-82. doi: 10.1016/0378-5173(86)90201-2.
- Qiu J, Roza MP, Colli KG, Dalben YR, Maifrede SB, Valiatti TB, et al. *Candida*-associated denture stomatitis: clinical, epidemiological, and microbiological features. *Braz J Microbiol*. 2023 Jun;34(2):841-848. doi: 10.4317/medoral.16.e139. doi: 10.1007/s42770-023-00952-0.
- R AN, Rafiq NB. Candidiasis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 May-. PMID: 32809459

Sultan AS, Rick AM, Vila T, Ji T, Masri R, Rizk-Jabra MA. Digital Design of a Universal Rat Intraoral Device for Therapeutic Evaluation of a Topical Formulation against Candida-Associated Denture Stomatitis. *Infect Immun*. 2019 Nov;87(12):617-19. doi: 10.1128/IAI.00617-19.

Távora FFF, Chocano APC, Oliveira DG, Pereira JR, Almeida RS, Neppelenbroek KH, et al. Beneficial Effects of Ethyl-Cyanoacrylate Coating Against Candida Albicans Biofilm Formation. *Braz Dent J*. 2019 May-Jun;30(3):266-71. doi: 10.1590/0103-6440201901953.

Tuan, DA. Comparative antifungal efficacy of trans-cinnamaldehyde and nystatin against biofilm-forming Candida Species: Structural insights and drug susceptibility. *Microbial Pathogenesis*. 2025 Sep;206:107763. doi: 10.1016/j.micpath.2025.107763.

Varan G, Varan C, Erdogan N, Hincal AA, Bilensoy E. Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Int J Pharm*. 2017 Oct;531(2):457-69. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.06.010,

Xavier-Júnior FH, Tavares CT, Rabello MM, Hernandes MZ, Bezerra BP, Ayala AP et al. Elucidation of the mechanism of complexation between oncocalyxone A and cyclodextrins by isothermal titration calorimetry and molecular modeling. *J Mol Liq*. 2019 Sep-Oct;274:165-72. doi: 10.1016/j.molliq.2018.10.129.

Xavier-Junior FH, Rabello MM, Hernandes MZ, Dias MÊS, Andrada OHMS, Bezerra BP et al. Supramolecular interactions between  $\beta$ -lapachone with cyclodextrins studied using isothermal titration calorimetry and molecular modeling. *J Mol Recognit*. 2017 Feb-May;30:e2646:1-10. doi: 10.1002/jmr.2646.

Xu J, Lin Q, Sheng M, Ding T, Li B, Gao Y, Tan Y. Antibiofilm Effect of Cinnamaldehyde-Chitosan Nanoparticles against the Biofilm of *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2022;11(10):1403. doi: 10.3390/antibiotics11101403.

Yildiz ZI, Kilic ME, Durgun E, Uyar T. Molecular Encapsulation of Cinnamaldehyde within Cyclodextrin Inclusion Complex Electrospun Nanofibers: Fast-Dissolution, Enhanced Water Solubility, High Temperature Stability, and Antibacterial Activity

of Cinnamaldehyde. J Agric Food Chem. 2019 Sep;67:11066-76. doi: 10.1021/acs.jafc.9b02789.

---

\* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do *International Committee of Medical Journal Editors* - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o *Medline*.

## APÊNDICE

Tabela 5 – Médias dos grupos comparados ao crescimento no T<sub>0</sub>. Verticalmente, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Horizontalmente, letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa intragrupo (ANOVA de múltiplas comparações, pós-teste de Tukey, p<0,05).

GRUPOS	Absorbância	Valor de p
	Média ± Desvio Padrão (SD)	
Controle de Crescimento	3,655 ± 0,287 <sup>a</sup>	-
NIST CIM	1,429 ± 0,038 <sup>b</sup> A	<0,0001
NIST CIMx2	1,288 ± 0,071 <sup>b</sup> AB	<0,0001
NIST CIMx4	1,071 ± 0,084 <sup>b</sup> B	<0,0001
NIST CIMx8	0,936 ± 0,072 <sup>b</sup> C	<0,0001
NIST CIMx10	0,355 ± 0,132 <sup>b</sup> D	<0,0001
CD CIM	1,293 ± 0,085 <sup>b</sup> A	<0,0001
CD CIMx2	1,257 ± 0,069 <sup>b</sup> A	<0,0001
CD CIMx4	1,608 ± 0,071 <sup>b</sup> B	<0,0001
CD CIMx8	1,315 ± 0,071 <sup>b</sup> AB	<0,0001
CD CIMx10	1,277 ± 0,075 <sup>b</sup> A	<0,0001
CNM CIM	0,684 ± 0,059 <sup>b</sup> A	<0,0001
CNM CIMx2	1,375 ± 0,008 <sup>b</sup> B	<0,0001
CNM CIMx4	1,203 ± 0,054 <sup>b</sup> B	<0,0001
CNM CIMx8	1,092 ± 0,025 <sup>b</sup> B	<0,0001
CNM CIMx10	0,9483 ± 0,032 <sup>b</sup> AB	<0,0001
CNM+CD CIM	1,446 ± 0,124 <sup>b</sup> A	<0,0001
CNM+CD CIMx2	1,191 ± 0,068 <sup>b</sup> AB	<0,0001
CNM+CD CIMx4	1,023 ± 0,139 <sup>b</sup> BC	<0,0001
CNM+CD CIMx8	0,9217 ± 0,066 <sup>b</sup> BC	<0,0001
CNM+CD CIMx10	0,7447 ± 0,080 <sup>b</sup> CB	<0,0001

Fonte: Dados coletados da autora, 2025.

Tabela 6 – Médias dos grupos comparados ao crescimento no T<sub>30</sub>. Verticalmente, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos, Horizontalmente, letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa intragrupo (ANOVA de múltiplas comparações, pós-teste de Tukey, p<0,05).

GRUPOS	Absorbância	Valor de p
	Média ± Desvio Padrão (SD)	
Crescimento	3,887 ± 0,045 <sup>a</sup>	-
NIST CIM	3,309 ± 0,053 <sup>b</sup> A	<0,0001
NIST CIMx2	3,232 ± 0,03 <sup>b</sup> A	<0,0001
NIST CIMx4	2,403 ± 0,015 <sup>b</sup> B	<0,0001
NIST CIMx8	2,106 ± 0,052 <sup>b</sup> B	<0,0001
NIST CIMx10	1,446 ± 0,285 <sup>b</sup> C	<0,0001
CNM (40°C) CIM	3,593 ± 0,23 <sup>a</sup> A	0,2566
CNM (40°C) CIMx2	3,411 ± 0,019 <sup>b</sup> A	0,0002
CNM (40°C) CIMx4	3,452 ± 0,047 <sup>b</sup> A	0,0012
CNM (40°C) CIMx8	3,425 ± 0,014 <sup>b</sup> A	0,0003
CNM (40°C) CIMx10	3,378 ± 0,053 <sup>b</sup> A	<0,0001
CNM (25°C) CIM	3,814 ± 0,107 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM (25°C) CIMx2	3,595 ± 0,087 <sup>a</sup> AB	0,2678
CNM (25°C) CIMx4	3,259 ± 0,112 <sup>b</sup> BC	<0,0001
CNM (25°C) CIMx8	3,095 ± 0,055 <sup>b</sup> C	<0,0001
CNM (25°C) CIMx10	2,919 ± 0,052 <sup>b</sup> C	<0,0001
CNM (4°C) CIM	3,451 ± 0,051 <sup>b</sup> A	0,0012
CNM (4°C) CIMx2	3,274 ± 0,043 <sup>b</sup> AB	<0,0001
CNM (4°C) CIMx4	3,279 ± 0,329 <sup>b</sup> AB	<0,0001
CNM (4°C) CIMx8	3,160 ± 0,082 <sup>b</sup> AB	<0,0001
CNM (4°C) CIMx10	2,976 ± 0,138 <sup>b</sup> B	<0,0001
CNM (40°C/4°C) CIM	0,959 ± 0,062 <sup>b</sup> A	<0,0001
CNM (40°C/4°C) CIMx2	0,983 ± 0,118 <sup>b</sup> A	<0,0001
CNM (40°C/4°C) CIMx4	0,811 ± 0,037 <sup>b</sup> A	<0,0001
CNM (40°C/4°C) CIMx8	0,810 ± 0,094 <sup>b</sup> A	<0,0001



CNM (40°C/4°C) CIMx10	0,734 ± 0,115 <sup>b</sup> A	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (40°C) CIM	3,818 ± 0,037 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM + CD (40°C) CIMx2	3,599 ± 0,082 <sup>a</sup> AB	0,2934
CNM + CD (40°C) CIMx4	3,390 ± 0,085 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (40°C) CIMx8	3,353 ± 0,068 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (40°C) CIMx10	3,278 ± 0,067 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (25°C) CIM	3,879 ± 0,057 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM + CD (25°C) CIMx2	3,572 ± 0,064 <sup>a</sup> AB	0,1409
CNM + CD (25°C) CIMx4	3,461 ± 0,035 <sup>b</sup> B	<b>0,0019</b>
CNM + CD (25°C) CIMx8	3,443 ± 0,033 <sup>b</sup> B	<b>0,0008</b>
CNM + CD (25°C) CIMx10	3,349 ± 0,082 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (4°C) CIM	1,420 ± 0,08 <sup>b</sup> A	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (4°C) CIMx2	1,381 ± 0,08 <sup>b</sup> A	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (4°C) CIMx4	1,301 ± 0,057 <sup>b</sup> A	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (4°C) CIMx8	1,079 ± 0,055 <sup>b</sup> A	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (4°C) CIMx10	1,155 ± 0,054 <sup>b</sup> A	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (40°C/4°C) CIM	1,947 ± 0,038 <sup>b</sup> A	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (40°C/4°C) CIMx2	1,485 ± 0,071 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (40°C/4°C) CIMx4	1,321 ± 0,091 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (40°C/4°C) CIMx8	1,447 ± 0,214 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (40°C/4°C) CIMX10	1,176 ± 0,049 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>

Fonte: Dados coletados da autora, 2025.

Tabela 7 – Médias dos grupos comparados ao crescimento no T<sub>60</sub>. Verticalmente, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Horizontalmente, letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa intragrupo (ANOVA de múltiplas comparações, pós-teste de Tukey, p<0,05).

GRUPOS	Absorbância	Valor de p
	Média ± Desvio Padrão (SD)	
Crescimento	3,503 ± 0,066 <sup>a</sup>	-
NIST CIM	3,059 ± 0,096 <sup>b</sup> A	<b>&lt;0,0001</b>
NIST CIMx2	2,708 ± 0,071 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>
NIST CIMx4	2,218 ± 0,068 <sup>b</sup> C	<b>&lt;0,0001</b>
NIST CIMx8	1,131 ± 0,067 <sup>b</sup> D	<b>&lt;0,0001</b>
NIST CIMx10	1,047 ± 0,054 <sup>b</sup> D	<b>&lt;0,0001</b>
CNM (40°C) CIM	3,377 ± 0,111 <sup>a</sup> A	0,9989
CNM (40°C) CIMx2	3,450 ± 0,01 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM (40°C) CIMx4	3,364 ± 0,037 <sup>a</sup> A	0,9941
CNM (40°C) CIMx8	3,223 ± 0,043 <sup>a</sup> A	0,0905
CNM (40°C) CIMx10	2,283 ± 0,22 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>
CNM (25°C) CIM	3,444 ± 0,036 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM (25°C) CIMx2	3,346 ± 0,049 <sup>a</sup> A	0,9700
CNM (25°C) CIMx4	3,371 ± 0,082 <sup>a</sup> A	0,9976
CNM (25°C) CIMx8	2,353 ± 0,066 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>
CNM (25°C) CIMx10	2,386 ± 0,096 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>
CNM (4°C) CIM	3,511 ± 0,056 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM (4°C) CIMx2	3,523 ± 0,008 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM (4°C) CIMx4	3,443 ± 0,029 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM (4°C) CIMx8	3,343 ± 0,057 <sup>a</sup> A	0,9613
CNM (4°C) CIMx10	2,549 ± 0,076 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (40°C) CIM	3,498 ± 0,085 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM + CD (40°C) CIMx2	3,519 ± 0,079 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM + CD (40°C) CIMx4	3,224 ± 0,063 <sup>a</sup> AB	0,0949
CNM + CD (40°C) CIMx8	3,201 ± 0,091 <sup>b</sup> B	<b>0,0391</b>

CNM + CD (40°C) CIMx10	2,668 ± 0,15 <sup>b</sup> C	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (25°C) CIM	3,497 ± 0,035 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM + CD (25°C) CIMx2	3,487 ± 0,054 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM + CD (25°C) CIMx4	3,305 ± 0,082 <sup>a</sup> AB	0,7200
CNM + CD (25°C) CIMx8	3,118 ± 0,098 <sup>b</sup> BC	<b>0,0009</b>
CNM + CD (25°C) CIMx10	2,872 ± 0,02 <sup>b</sup> C	<b>&lt;0,0001</b>
CNM + CD (4°C) CIM	3,490 ± 0,097 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM + CD (4°C) CIMx2	3,420 ± 0,026 <sup>a</sup> A	>0,9999
CNM + CD (4°C) CIMx4	3,290 ± 0,067 <sup>a</sup> A	0,5741
CNM + CD (4°C) CIMx8	3,218 ± 0,087 <sup>a</sup> AB	0,0745
CNM + CD (4°C) CIMx10	2,994 ± 0,109 <sup>b</sup> B	<b>&lt;0,0001</b>

*Fonte: Dados coletados da autora, 2025.*