

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARIANA HAUCK VIANNA

Filmes de quitosana com extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*:
propriedades físico-químicas e atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-
inflamatória

JUIZ DE FORA-MG

2023

MARIANA HAUCK VIANNA

**Filmes de quitosana com extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*:
propriedades físico-químicas e atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-
inflamatória**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

JUIZ DE FORA-MG

2023

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

Vianna, Mariana Hauck.

Filmes de quitosana com extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* : propriedades físico-químicas e atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória / Mariana Hauck Vianna. -- 2023.
145 f. : il.

Orientador: Ângelo Márcio Leite Denadai

Coorientador: Rodrigo Luiz Fabri

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. Filmes poliméricos. 2. Filmes de quitosana. 3. *Plinia cauliflora*. 4. Curativos. 5. Jabuticaba. I. Denadai, Ângelo Márcio Leite , orient. II. Fabri, Rodrigo Luiz, coorient. III. Título.

Mariana Hauck Vianna

Filmes de quitosana com extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*: propriedades físico-químicas e atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências
Farmacêuticas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestra em
Ciências
Farmacêuticas. Área
de concentração:
Produtos Naturais e
Sintéticos Ativos.

Aprovada em 22 de novembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Rodrigo Luiz Fabri - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Thaís Nogueira Barradas

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Hudson Caetano Polonini

Juiz de Fora, 08/11/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Angelo Marcio Leite Denadai, Diretor(a)**, em 22/11/2023, às 11:01, 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 **Hudson Caetano Polonini, Usuário Externo**, em 22/11/2023, às 11:32, 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 **Thais Nogueira Barradas, Professor(a)**, em 22/11/2023, às 12:26, 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 **Rodrigo Luiz Fabri, Professor(a)**, em 22/11/2023, 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](#).



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 **1565079** e o código CRC **61ECDD27**.

AGRADECIMENTOS

Sem dúvidas, embarcar no “barco da pós-graduação” é de uma dimensão inimaginável. Durante essa trajetória, por vezes fui confrontada pelo medo, mas, incontestavelmente, é uma jornada que fomentou o meu crescimento, tanto profissional quanto pessoal. Por isso, agradeço, acima de tudo, a Deus. A realização deste sonho foi intermediada por Sua presença constante em minha jornada.

Agradeço, imensamente, a minha família, em particular aos meus queridos pais, Anna e Leandro, que não mediram esforços para me apoiar e encorajar. À querida Leticia, minha irmã, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e motivando-me. Aos meus avós, que, mesmo sem compreender plenamente a natureza dessa conquista, celebraram a cada etapa vencida. Aos meus tios, em especial ao Leonardo, por me incentivar e acreditar no meu potencial. Obrigada por tudo que vocês construíram comigo até hoje. Esta conquista é, sem dúvidas, também de vocês!

Palavras não são capazes de descrever a minha eterna gratidão, ao meu maior e melhor amigo, meu “formatador particular”, meu incentivador, meu noivo: Lucas. Obrigada por embarcar nessa jornada comigo, sempre lado a lado em todos os momentos. Seu apoio, incentivo e assistência desempenharam um papel fundamental em minha jornada. Tenho a felicidade de compartilhar a vida com alguém tão especial quanto você. Obrigada por estar sempre ao meu lado, motivando-me não apenas com palavras, mas também com ações concretas. Eu te amo!

Navegar nessas “águas” nem sempre foi fácil, mas existem pessoas que deixaram essa viagem ainda mais especial e menos angustiante. Agradeço, em especial, às minhas amigas Júlia, Thalita e Thayná, que estiveram comigo desde o primeiro dia dessa longa jornada. Foi um grande prazer velejar com vocês por esses mares...

A todos os queridos amigos do LPNB e Bioensaios, sou grata por todos os ensinamentos, trocas, auxílios, apoios e risadas. Sem vocês, não seria tão especial essa conquista. Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus orientadores, Ângelo e Rodrigo, por me auxiliarem pacientemente e com grande sabedoria ao longo deste processo. Obrigada por contribuir para o meu crescimento acadêmico, incentivar-me a alcançar o melhor e acreditar em meu potencial!

RESUMO

Os biopolímeros, como a quitosana, ganharam destaque na pesquisa contemporânea devido às suas características físico-químicas e às possibilidades de formulações. Com uma ampla gama de utilidades, os filmes de quitosana chamam a atenção pelo seu potencial biológico e pela possibilidade de desenvolver sistemas de liberação controlada. Por outro lado, a *Plinia cauliflora*, a jabuticaba, é uma planta nativa, reconhecida na literatura por seus benefícios anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos. Portanto, este estudo buscou desenvolver filmes de quitosana incorporados com extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* e avaliar as suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes. As folhas de *Plinia cauliflora* passaram inicialmente pelo processo de extração e em seguida pelo doseamento de fenóis, taninos e flavonoides. No doseamento foram encontrados $310,42 \pm 8,75$ µg/mg em equivalente de ácido tânico de fenóis totais, $108,56 \pm 0,39$ µg/mg em equivalente de ácido tânico de taninos e $36,80 \pm 3,44$ µg/mg em equivalente de rutina de flavonoides. Nos testes de viabilidade celular, anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobiano *in vitro* o extrato se mostrou eficiente. Através da técnica de evaporação de solvente, os filmes de quitosana foram formulados com a adição do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* nas concentrações de 5% (EEPC5%), 2,5% (EEPC2,5%) e 1% (EEPC1%). As soluções precursoras dos filmes foram caracterizadas por meio de medidas reológicas e de parâmetros como potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e condutividade elétrica, onde foi possível observar que EEPC5% apresenta uma melhor interação entre os componentes da formulação e do extrato. No ensaio de liberação, os filmes mostraram o funcionamento do sistema de liberação controlada e foi possível ainda verificar que o filme EEPC5% apresenta uma maior porcentagem de liberação. Outros parâmetros físico-químicos dos filmes secos foram avaliados através de medidas de espessura, peso médio, teor de umidade, grau de intumescimento, solubilidade e microscopia eletrônica de varredura. A fim de compreender as interações intermoleculares nos filmes secos foram realizados também a análise térmica, a espectroscopia vibracional na região do infravermelho e a análise dinâmico mecânica no modo axial e rotacional. No teste de viabilidade celular, os filmes não se mostraram tóxicos às linhagens de macrófagos intraperitoneais de camundongos BALB/c e a fibroblastos L929. No ensaio de atividade anti-inflamatória, o filme EEPC5% se mostrou mais eficaz, reduzindo a produção de óxido nítrico e de interleucina 6 (IL-6). Enquanto os filmes EEPC2,5% e EEPC1% apresentaram apenas uma ligeira redução de IL-6. Os filmes se mostraram excelentes antioxidantes, especialmente EEPC5%, com resultados significativos no método do sequestro do radical livre DPPH e no de redução do complexo fosfomolibdênio. Avaliando o seu efeito antimicrobiano, os filmes conseguiram inibir entre 80 e 100% o crescimento de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Portanto, podemos considerar que a integração entre os componentes da formulação foi viável, capaz de produzir filmes maleáveis e flexíveis, com atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana *in vitro* significativa, com potencial utilização como curativo de lesões cutâneas.

Palavras-chave: Filmes poliméricos; Filmes de quitosana; *Plinia cauliflora*; Curativos; Jabuticaba.

ABSTRACT

Biopolymers such as chitosan have gained prominence in contemporary research due to their physicochemical characteristics and formulation possibilities. With a wide range of uses, chitosan films attract attention due to their biological potential and the possibility of developing controlled release systems. On the other hand, *Plinia cauliflora*, or jaboticaba, is a native plant, recognized in the literature for its anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial benefits. Therefore, this study sought to develop chitosan films incorporated with ethanolic extract of *Plinia cauliflora* leaves and evaluate their antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant properties. The leaves of *Plinia cauliflora* were first extracted and then assayed for phenols, tannins and flavonoids. The assay found 310.42 ± 8.75 $\mu\text{g}/\text{mg}$ to tannic acid equivalent of total phenols, 108.56 ± 0.39 $\mu\text{g}/\text{mg}$ to tannic acid equivalent of tannins and 36.80 ± 3.44 $\mu\text{g}/\text{mg}$ to rutin equivalent of flavonoids. In the cell viability, anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial in vitro tests, the extract proved to be effective. Using the solvent evaporation technique, chitosan films were formulated with the addition of the ethanolic extract of *Plinia cauliflora* leaves at concentrations of 5% (EEPC5%), 2.5% (EEPC2.5%) and 1% (EEPC1%). The film precursor solutions were characterized by means of rheological measurements and parameters such as zeta potential, hydrodynamic diameter and electrical conductivity, where it was possible to observe that EEPC5% has a better interaction between the components of the formulation and the extract. In the release test, the films showed the functioning of the controlled release system and it was also possible to verify that the EEPC5% film had a higher release percentage. Other physicochemicals parameters of the dried films were evaluated by measuring thickness, average weight, moisture content, degree of swelling, solubility and scanning electron microscopy. In order to understand the intermolecular interactions in the dried films, thermal analysis, vibrational spectroscopy in the infrared region and dynamic mechanical analysis in axial and rotational mode were also carried out. In the cell viability test, the films were not toxic to intraperitoneal macrophage strains from BALB/c mice and to L929 fibroblasts. In the anti-inflammatory activity test, the EEPC5% film proved to be more effective, reducing the production of nitric oxide and interleukin 6 (IL-6). While the EEPC2.5% and EEPC1% films showed only a slight reduction in IL-6. The films proved to be excellent antioxidants, especially EEPC5%, with significant results in the DPPH free radical scavenging method and in the phosphomolybdenum complex reduction method. Evaluating their antimicrobial effect, the films were able to inhibit the growth of *C. albicans*, *S. aureus* and *S. epidermidis* by between 80 and 100%. Therefore, we can consider that the integration between the components of the formulation was viable, capable of producing malleable and flexible films with significant antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activity in vitro, with potential use as a dressing for skin lesions.

Keywords: Polymeric films; Chitosan films; *Plinia cauliflora*; Dressings; Jaboticaba.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da quitosana.....	24
Figura 2 - Estrutura química da quitina	24
Figura 3 - Processo de obtenção da quitina e desacetilação para quitosana.....	25
Figura 4 - Espécie vegetal <i>Plinia cauliflora</i> (DC.) Kausel	30
Figura 5 - Esquema ilustrado da formulação dos filmes de quitosana com extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i> (EEPC).....	50
Figura 6 - Imagem demonstrando o suporte com tubo falcon para análise dos filmes no sistema de liberação	53
Figura 7 - Esquema ilustrado do estudo de liberação dos filmes de quitosana com extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i> (EEPC).....	54
Figura 8 - Avaliação do perfil de viabilidade celular do extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i> em diferentes concentrações frente a macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	64
Figura 9 - Avaliação do perfil de viabilidade celular do extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i> em diferentes concentrações frente fibroblastos L929	65
Figura 10 - Dosagem de óxido nítrico em macrófagos de camundongos BALB/c, após estímulo com LPS e IFN- γ e tratamento com extrato etanólico de <i>Plinia cauliflora</i> em diferentes concentrações.....	66
Figura 11 - Dosagem da produção de TNF α em macrófagos após estímulo com LPS e tratamento com extrato etanólico de <i>Plinia cauliflora</i> em diferentes concentrações.	68
Figura 12 - Dosagem da produção de IL-6 em macrófagos após estímulo com LPS e tratamento com extrato etanólico de <i>Plinia cauliflora</i> em diferentes concentrações.	69
Figura 13 - Avaliação do acúmulo de corpúsculos lipídicos em macrófagos de camundongos BALB/c após estímulo com LPS e IFN- γ e tratamento com extrato etanólico de <i>Plinia cauliflora</i> em diferentes concentrações	70
Figura 14 - Dosagem da produção de EROS em macrófagos de camundongos BALB/c após estímulo com LPS e IFN- γ , e tratamento com extrato etanólico de <i>Plinia cauliflora</i> em diferentes concentrações.....	72
Figura 15 - Curva de oxidação do β -caroteno, avaliando a absorbância em 470 nm, mostrando a preservação da sua coloração ao longo de 120 min de reação na presença do extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i>	76

Figura 16 - Gráfico de redução da produção de malondialdeído na presença extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i> e de BHT nas concentrações de 7,5; 15,0 e 30,0 µg/mL	77
Figura 17 - Filmes de quitosana com extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i> em diferentes concentrações, cortados em quadrados de 1 x 1 cm.....	81
Figura 18 - Varredura de amplitude no ensaio oscilatório avaliando os parâmetros reológicos da solução precursora dos filmes de quitosana	82
Figura 19 - Viscosidade complexa em relação a frequência aplicada no ensaio oscilatório dos parâmetros reológicos da solução precursora dos filmes de quitosana.	84
Figura 20 - Curva de fluxo e de viscosidade avaliados no ensaio rotacional dos parâmetros reológicos da solução precursora dos filmes de quitosana	85
Figura 21 - Valores de condutividade elétrica da solução precursora dos filmes de quitosana incorporados à EEPC nas diferentes concentrações.....	87
Figura 22 - Valores de potencial zeta da solução precursora dos filmes de quitosana incorporados à EEPC nas diferentes concentrações.	89
Figura 23 - Valores de diâmetro hidrodinâmico da solução precursora dos filmes de quitosana incorporados à EEPC nas diferentes concentrações.....	89
Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de quitosana incorporados à EEPC nas diferentes concentrações, considerando um aumento de 200x e 1000x	91
Figura 25 - Microscopia eletrônica de varredura transversal dos filmes de quitosana incorporados à EEPC nas diferentes concentrações.	92
Figura 26 - Espectro de absorção do extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i> em diferentes concentrações.....	93
Figura 27 - Curva analítica do extrato das folhas de <i>Plinia cauliflora</i> nas diferenças absorbâncias máximas.	94
Figura 28 - Porcentagem de extrato liberado dos filmes de quitosana com EEPC, considerando $\lambda=225$ nm	97
Figura 29 - Porcentagem de extrato liberado dos filmes de quitosana com EEPC, considerando $\lambda=275$ nm	98
Figura 30 - Doseamento de compostos fenólicos presente nas alíquotas retiradas do estudo de liberação dos filmes de quitosana com EEPC.....	99

Figura 31 - Porcentagem de umidade dos filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações de EEPC	101
Figura 32 - Porcentagem de intumescimento dos filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações de EEPC	102
Figura 33 - Porcentagem de solubilidade dos filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações de EEPC	104
Figura 34 - Análise térmica da quitosana pura e do filme SEEPC.....	105
Figura 35 - Análise térmica do extrato puro e dos filmes de quitosana incorporados com EEPC.....	107
Figura 36 - Espectros de infravermelho em conjunto do extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i>	109
Figura 37 - Espectros de infravermelho do filme de quitosana sem a incorporação de EEPC	110
Figura 38 - Espectros de infravermelho dos filmes de quitosana incorporados com EEPC, do EEPC puro e do filme sem a incorporação de extrato	111
Figura 39 - Análise reológica de ruptura axial dos filmes de quitosana incorporados com EEPC.....	113
Figura 40 - Análise reológica de ruptura rotacional dos filmes de quitosana incorporados com EEPC	114
Figura 41 - Avaliação da citotoxicidade dos filmes de quitosana com EEPC em macrófagos de camundongos BALB/c.....	115
Figura 42 - Avaliação da citotoxicidade dos filmes de quitosana com EEPC em fibroblastos L929.....	116
Figura 43 - Dosagem de óxido nítrico em macrófagos de camundongos BALB/c, após estímulo com LPS, IFN- γ e tratamento com os filmes de quitosana incorporado com EEPC em diferentes concentrações.....	117
Figura 44 - Dosagem da produção de IL-6 em macrófagos após estímulo com LPS e tratamento com os filmes de quitosana incorporado com EEPC em diferentes concentrações.....	118
Figura 45 - Avaliação do potencial antioxidante dos filmes de quitosana incorporado com EEPC através dos métodos de sequestro de radical livre DPPH	119
Figura 46 - Porcentagem de inibição dos filmes de quitosana incorporados com EEPC em diferentes concentrações frente as espécies fúngicas selecionadas.....	122

Figura 47 - Porcentagem de inibição dos filmes de quitosana incorporados com EEPC em diferentes concentrações frente as espécies bacterianas selecionadas..... 123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração dos constituintes dos filmes de quitosana com extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i> (EEPC).....	50
Tabela 2 - Dosagem de fenóis totais, taninos e flavonoides no extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i>	62
Tabela 3 - Avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i> através dos métodos de sequestro de radical livre DPPH• e da redução do complexo fosfomolibdênio	73
Tabela 4 - Avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i> por meio do método de inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico	75
Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM), efeito no valor da CIM e a concentração bactericida mínima (CBM) ou concentração fungicida mínima (CFM) do extrato etanólico de <i>Plinia cauliflora</i> frente as espécies bacterianas e fúngicas selecionadas.....	79
Tabela 6 - Cálculo de tixotropia de cada amostra a partir da curva de fluxo apresentado pelas soluções precursoras dos filmes de quitosana.....	86
Tabela 7 - Relação de volume de fluido, área de filme e concentração de extrato em relação à cada filme.....	95
Tabela 8 - Peso médio e espessura dos filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações de EEPC	100
Tabela 9 - Avaliação do potencial antioxidante dos filmes de quitosana incorporado com EEPC através da redução do complexo fosfomolibdênio.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg –	micrograma
μL –	microlitro
β -caroteno –	Beta-caroteno
AAR% –	Atividade antioxidante relativa
Abs –	Absorbância
AlCl_3 –	Cloreto de alumínio
ATP –	Adenosine TriPhosphate - Trifosfato de adenosina
CBM –	Concentração bactericida mínima
CI_{50} –	Concentração Inibitória de 50 %
CIM –	Concentração inibitória mínima
CO_2 –	Dióxido de carbono
D_h –	Diâmetro hidrodinâmico
DMEM –	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO –	Dimetilsulfóxido
DPPH• –	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTA –	Differential Thermal Analysis - Análise térmica diferencial
EEPC –	Extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i>
EEPC5% –	Filmes de quitosana com a incorporação de 5% do Extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i>
EEPC2,5% –	Filmes de quitosana com a incorporação de 2,5% do Extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i>
EEPC1% –	Filmes de quitosana com a incorporação de 1% do Extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i>
ELISA –	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EROS –	Espécies reativas de oxigênio
EtOH –	Etanol
H –	Hora (s)
H_3PO_4 –	Ácido fosfórico
IFA –	Insumo farmacêutico ativo
$\text{IFN-}\gamma$ –	Interferon-gama
IL-1 –	Interleucina 1

IL-6 –	Interleucina 6
IL-8 –	Interleucina 8
L929 –	Linhagem de fibroblastos
LPS –	Lipopolissacarídeo
min –	Minuto (s)
MDA –	Malondialdeído
MTT –	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- brometo de difeniltetrazólio
Mg –	Miligrama(s)
nm –	Nanomêtros
NO –	Óxido nítrico
PBS –	Tampão fosfato-salino
PZ –	Potencial Zeta
q.s.p –	Quantidade suficiente para
RPMI –	<i>Roswell Park Memorial Institute – 1640</i>
SFB –	Soro fetal bovino
SEEPC –	Filmes de quitosana sem a incorporação do Extrato etanólico das folhas de <i>Plinia cauliflora</i>
TBA –	Ácido tiobarbitúrico
TNF α –	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	21
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 – BIOPOLÍMEROS.....	23
2.2 – QUITOSANA.....	24
2.2.1 - Processos de obtenção da quitosana	25
2.3 - APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DA QUITOSANA.....	26
2.3.1 - Efeito antimicrobiano da quitosana	27
2.4 - CARACTERÍSTICAS DOS FILMES DE QUITOSANA.....	27
2.4.1 - Desenvolvimento de filmes pelo método de <i>casting</i>	27
2.4.2 - Formulação de sistemas de liberação controlada.....	28
2.5 - A ESPÉCIE <i>PLINIA CAULIFLORA</i>	29
2.6 - CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DE <i>PLINIA CAULIFLORA</i>	31
2.7 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE <i>PLINIA CAULIFLORA</i>	32
2.7.1 - Propriedades antioxidantes da jabuticaba	33
2.7.2. - Propriedade anti-inflamatória da jabuticaba	34
2.7.3 - Propriedade antimicrobiana da jabuticaba.....	34
2.8 - CULTIVO E SUBUTILIZAÇÃO DAS FOLHAS DE <i>PLINIA CAULIFLORA</i> ...	Erro!
Indicador não definido.	
2.9 - APLICAÇÕES POTENCIAIS PARA OS FILMES DE QUITOSANA.....	35
2.9.1 - Curativos a base de biopolímeros	35
3 – OBJETIVOS.....	37
3.1 – OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 - COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	38
4.2 - PREPARO DO EXTRATO VEGETAL.....	38
4.3 - DOSEAMENTO DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DE EEPC.....	38
4.3.1 - Teor de fenóis totais e taninos	38

4.3.2 - Teor de flavonoides	39
4.4 - CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE EEPC.....	39
4.4.1 - Determinação da citotoxicidade em linhagens celulares	39
4.4.1.1 – Viabilidade celular <i>in vitro</i> em macrófagos.....	39
4.4.1.2 - Viabilidade celular <i>in vitro</i> em fibroblastos	41
4.4.2 - Determinação da atividade anti-inflamatória de EEPC	42
4.4.2.1 - Ensaio de dosagem de óxido nítrico (NO)	42
4.4.2.2 - Ensaio de dosagem de TNF α	42
4.4.2.3 Ensaio de dosagem de citocina pró-inflamatória Interleucina-6	43
4.4.2.4 Ensaio de dosagem de corpúsculos lipídicos	43
4.4.3 - Determinação da atividade antioxidante de EEPC	44
4.4.3.1 Dosagem dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS)	44
4.4.3.2 - Método de sequestro de radical livre DPPH•.....	44
4.4.3.3 - Método de redução do complexo de fosfomolibdênio.....	45
4.4.3.4 Sistema β -caroteno / ácido linoleico	46
4.4.3.5 Inibição da formação de malondialdeído	47
4.4.4 Determinação da atividade antimicrobiana de EEPC	48
4.4.4.1 Linhagens bacterianas e fúngicas	48
4.4.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	48
4.4.4.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM).....	49
4.5 - DESENVOLVIMENTO DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EEPC	49
4.6 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EEPC	51
4.6.1 - Caracterização físico-química das soluções precursoras dos filmes de quitosana contendo EEPC	51
4.6.1.1 Determinação dos parâmetros reológicos das soluções precursoras dos filmes de quitosana contendo EEPC.....	51
4.6.1.2 Determinação da condutividade elétrica e potencial zeta (PZ) das soluções precursoras dos filmes	51
4.6.1.3 Distribuição do tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das soluções precursoras dos filmes.....	52
4.6.2 Caracterização físico-química dos filmes de quitosana contendo EEPC	52

4.6.2.1 Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de quitosana contendo EEPC	52
4.6.2.2 Estudo de liberação dos filmes.....	52
4.6.2.3 - Determinação do peso médio dos filmes	55
4.6.2.4 Determinação da espessura dos filmes.....	55
4.6.2.5 Determinação da umidade	55
4.6.2.6 Determinação do grau de intumescimento e solubilidade dos filmes	55
4.6.2.7 Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TGA) dos filmes.....	56
4.6.2.8 Espectroscopia eletrônica vibracional na região do infravermelho dos filmes	57
4.6.2.9 Análise dinâmico mecânica nos modos axial e rotacional dos filmes dos filmes	57
4.7 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EEPC	57
4.7.1 Determinação da atividade citotóxica dos filmes	57
4.7.1.1 Ensaio de redução metabólica do MTT em macrófagos.....	57
4.7.1.2 Ensaio de redução metabólica do MTT em fibroblastos	58
4.7.2 Determinação da atividade anti-inflamatória dos filmes	58
4.7.2.1 Ensaio de dosagem de óxido nítrico (NO).....	58
4.7.2.2 Ensaio de dosagem de citocina pró-inflamatória Interleucina-6	58
4.7.3 Determinação da atividade antioxidante dos filmes	59
4.7.3.1 Método de sequestro de radical livre DPPH•	59
4.7.3.2 Método de redução do complexo de fosfomolibdênio	59
4.7.4 Determinação da atividade antimicrobiana dos filmes.....	60
4.7.4.1 Linhagens bacterianas e fúngicas	60
4.7.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes	60
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE EEPC	62
5.1.1 - Teor de fenóis totais, taninos e flavonoides	62
5.2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE EEPC	63

5.2.1 Determinação da citotoxicidade.....	63
5.2.1.1 Análise da viabilidade celular <i>in vitro</i>	63
5.2.2 Determinação da atividade anti-inflamatória de EEPC.....	65
5.5.2.1 Ensaio de dosagem de óxido nítrico (NO).....	65
5.5.2.2 Ensaio de dosagem de TNF α	67
5.5.2.3 Ensaio de dosagem de citocina pró-inflamatória Interleucina 6.....	68
5.5.2.4 Ensaio de dosagem de corpúsculos lipídicos	70
5.5.3 Determinação da atividade antioxidante de EEPC.....	71
5.5.3.1 Dosagem dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS).....	71
5.5.3.2 Método de sequestro de radical livre DPPH \bullet e método de redução do complexo de fosfomolibdênio.....	73
5.5.3.3 Sistema β -caroteno / ácido linoleico	74
5.5.3.4 Inibição da formação de malondialdeído	76
5.5.4 Determinação da atividade antimicrobiana de EEPC	78
5.5.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM).....	78
5.6 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EEPC.....	80
5.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EEPC	81
5.7.1 Caracterização físico-química das soluções precursoras dos filmes.....	81
5.7.1.1 Determinação dos parâmetros reológicos das soluções precursoras dos filmes	81
5.7.1.2 Determinação da condutividade elétrica, potencial zeta (PZ) e do tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das soluções precursoras dos filmes	87
5.7.2 Caracterização físico-química dos filmes.....	90
5.7.2.1 Microscopia eletrônica de varredura dos filmes	90
5.7.2.2 Estudo de liberação dos filmes.....	92
5.7.2.3 Determinação do peso médio e espessura dos filmes.....	99
5.7.2.4 Determinação da umidade	101
5.7.2.5 Determinação do grau de intumescimento e solubilidade dos filmes	102
5.7.2.6 Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TGA) dos filmes	104

5.7.2.7 Espectroscopia eletrônica vibracional na região do infravermelho dos filme	108
5.7.2.8 Análise dinâmico mecânica nos modos axial e rotacional dos filmes dos filmes	112
5.8 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EEPC	114
5.8.1 Determinação da atividade citotóxica dos filmes	114
5.8.2 Determinação da atividade anti-inflamatória dos filmes	116
5.8.2.1 Ensaio de dosagem de óxido nítrico (NO).....	116
5.8.2.2 Ensaio de dosagem de citocina pró-inflamatória Interleucina-6	117
5.8.3 - Determinação da atividade antioxidante dos filmes.....	119
5.8.3.1 - Método de sequestro de radical livre DPPH• e de redução do complexo de fosfomolibdênio	119
5.8.4 - Determinação da atividade antimicrobiana dos filmes	121
6- CONCLUSÃO	125
7 – REFERÊNCIAS	127

1 - INTRODUÇÃO

No cenário atual, os biopolímeros estão dentro de um campo de pesquisa de grande interesse. Estes compostos, originados a partir do metabolismo de plantas, animais e fungos, destacam-se por sua ampla disponibilidade na natureza e têm sido objeto de muitas pesquisas em uma diversidade de campos industriais, abrangendo desde a indústria farmacêutica até a de alimentos e sanitária (HABITZREUTER, *et al.*, 2020).

Um grupo notável dentre os biopolímeros são os polissacarídeos, exemplificados pelo amido, quitina e quitosana. Se destacam por suas propriedades intrínsecas notáveis, como a biocompatibilidade, não toxicidade e biodegradabilidade (AHMED *et al.*, 2020). Além dessas propriedades, os biopolímeros atraem a atenção da indústria devido às suas características estruturais e físico-químicas. Atualmente, essas macromoléculas são empregues de várias formas, incluindo de nanofibras, filmes, hidrogéis e membranas.

Um exemplo relevante dentro desse grupo de biopolímeros é a quitosana, que tem ganhado reconhecimento crescente devido à sua capacidade de se transformar em diversas modelos de formulação (YIN *et al.*, 2021). Originada da desacetilação da quitina, a quitosana está abundantemente disponível e apresenta um conjunto de propriedades físico-químicas notáveis em formulações de géis e filmes (MATICA *et al.*, 2019).

As possibilidades de uso da quitosana são vastas, abrangendo diversos setores, desde a indústria farmacêutica até a de embalagens. Especificamente na área farmacêutica, a quitosana se destaca por sua capacidade de gerar sistemas de liberação controlada, permitindo a liberação gradual de princípios ativos incorporados em suas formulações (PEREIRA *et al.*, 2022).

Além disso, a literatura científica relata o potencial mucoadesivo, antimicrobiano e cicatrizante dessa substância (MOEINI *et al.*, 2020). É importante mencionar que o efeito antimicrobiano da quitosana ocorre por meio da interação de seus componentes com o ácido teicoico, presente na membrana celular de microrganismos, resultando na redução da proteção da bactéria em relação ao ambiente externo e dificultando a interação com receptores de superfície (XIA *et al.*, 2010; ÁVILHA FILHO *et al.*, 2020)

Por outro lado, a jabuticaba, *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, é uma espécie nativa da mata atlântica brasileira, amplamente distribuída em todo o território nacional e

apreciada na gastronomia, sendo consumida em diversas formas, como geleias, licores, doces e ao natural (NEVES, *et al.*, 2021). Recentemente, pesquisas confirmaram suas notáveis propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (BRITO *et al.*, 2021; PAULA *et al.*, 2021).

Segundo a literatura, a jabuticaba é rica em compostos fenólicos, especialmente antocianinas, ácido elágico, ácido gálico, elagitaninos, entre outros. Esses compostos são conhecidos por suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias bem documentadas (NEVES *et al.*, 2021). As folhas da jabuticabeira, em particular, destacam-se por sua riqueza em compostos fenólicos, conferindo-lhes propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas notáveis (BRITO *et al.*, 2021; FRAZOLIN *et al.*, 2022).

Considerando a gama de multifuncionalidades oferecidas tanto pela quitosana quanto pela *Plinia cauliflora* (jabuticaba), emerge a perspectiva de uma associação entre esses compostos para a formulação de um sistema de liberação controlada de uso tópico. Além disso, acredita-se que os filmes de quitosana incorporados com extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* apresentem um notável potencial antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – BIOPOLÍMEROS

Desde 1944, os biopolímeros tem sido objeto de extensas pesquisas. Nos últimos cinco anos, um notável acervo de conhecimento foi gerado, com aproximadamente 94.968 artigos catalogados em diferentes bases de dados. Este vasto corpo de literatura direciona-se para diversas aplicações, evidenciando a crescente importância e versatilidade dos biopolímeros.

Esses materiais são produzidos no metabolismo intracelular de plantas, animais e fungos (GEORGE *et al.*, 2020). Dentre os compostos mais abundantes, destacam-se os polissacarídeos, como o amido, a quitina, a quitosana, o alginato e a celulose. Em seguida, temos as proteínas, os polinucleotídeos, os poli-isoprenos e os poliésteres (AHMED *et al.*, 2020). Devido à facilidade de serem coletados e de originarem de fontes renováveis, os polissacarídeos e as proteínas têm sido amplamente utilizados para o desenvolvimento de novos materiais (HABITZREUTER, *et al.*, 2020). Além de serem biocompatíveis, não tóxicos e biodegradáveis, apresentam propriedades físico-químicas interessantes e atividades biológicas.

Os biopolímeros encontram aplicação em uma ampla variedade de campos, abrangendo desde o uso como curativos para lesões de pele até filtros para o tratamento de água, sistemas de liberação controlada de medicamentos e embalagem de alimentos. A eficácia dessas aplicações está diretamente relacionada às características estruturais, propriedades físico-químicas e atividades biológicas desses biopolímeros e por isso têm sido empregadas de diversas formas (AHMED *et al.*, 2020).

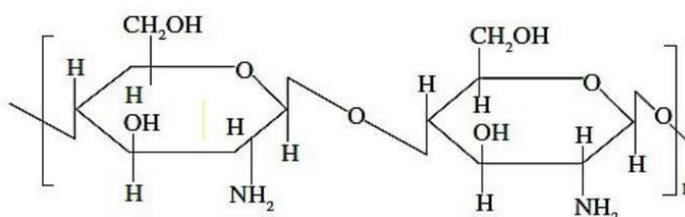
Os polissacarídeos, em particular, são macromoléculas compostas por longas cadeias de carboidratos unidas por ligações glicosídicas. Esses compostos são ubíquos na natureza, desempenhando papéis diversos. Por um lado, servem de reserva energética vital em organismos, exemplificado pelo amido, um polissacarídeo encontrado nas plantas. Por outro lado, desempenham funções de sustentação e proteção mecânica, exemplificado pela quitosana e sua precursora, a quitina (HABITZREUTER, *et al.*, 2020).

A quitosana tem se tornado bastante conhecida por suas notáveis propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade, o que a torna um candidato promissor para diversas aplicações, incluindo a indústria biomédica e alimentícia.

2.2 – QUITOSANA

A quitosana é reconhecida como um copolímero, derivado da quitina, e é composta por unidades β (1,4) - 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose e β (1,4) -2-acetamino-2-desoxi-D-glucopiranosose (Figura 1). Embora possa ser encontrada na parede celular de fungos, sua fonte de obtenção mais comum é o resultado da reação de reação de desacetilação da quitina, extraída da carapaça de crustáceos e cascas de camarões (DIAS *et al.*, 2013). A quitosana possui uma estrutura cristalina e organizada, comprovada por difração de raio X (LARANJEIRA *et al.*, 2009).

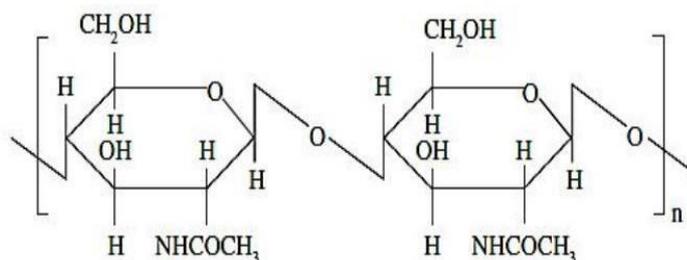
Figura 1 - Estrutura química da quitosana.



Fonte: Adaptado de Dias, *et al* (2013).

A quitina, por sua vez, é um polissacarídeo, reconhecido como o segundo mais abundante na natureza. É um biopolímero atóxico, biodegradável e biocompatível, insolúvel em água e solventes orgânicos. Encontrado nas conchas de crustáceos, paredes celulares de fungos e algas, bem como exoesqueleto de insetos (MATICA *et al.*, 2019). A quitina é composta por uma cadeia linear de unidades de N-acetil-2-dioxdi-D-glicopiranosose, ligadas entre si por ligações glicosídicas β (1,4), como mostrado na figura 2.

Figura 2 - Estrutura química da quitina.



Fonte: Adaptado de Dias, *et al* (2013).

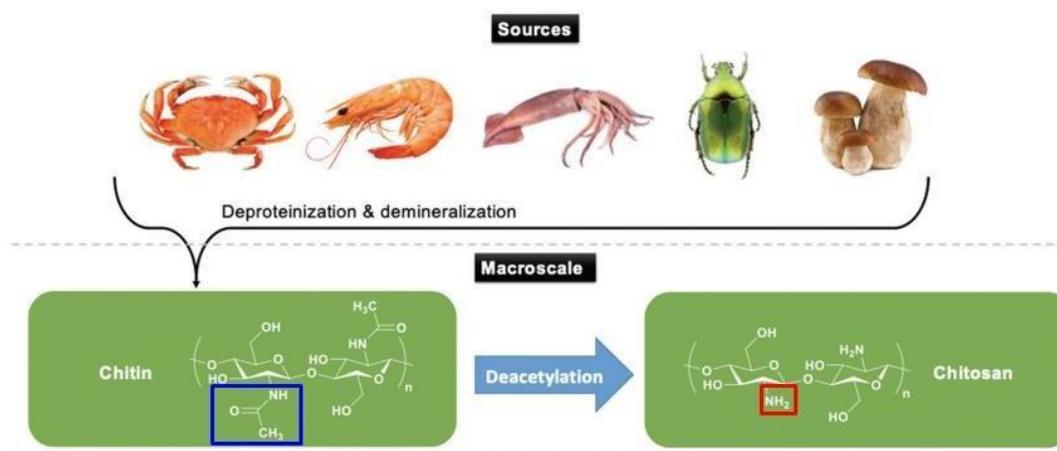
A quitina e a quitosana são biopolímeros similares à celulose. Esses biopolímeros se diferenciam apenas no substituinte do carbono 2 do anel glicopiranosídeo. Na celulose, esse carbono possui um grupo hidroxila, na quitina um grupo acetoamida e na quitosana um grupo amino (DIAS *et al.*, 2013).

A quitosana vêm sendo aplicada em diversos setores, desde a indústria agrícola até a indústria farmacêutica. Demonstrou suas inovações em insumos médicos, engenharia de tecidos, indústria de alimentos, embalagens e até mesmo em cosméticos (RIBEIRO *et al.*, 2017). Graças à sua capacidade de formular uma variedade de sistemas, a quitosana pode ser usada para veicular insumo farmacêutico ativo (IFA) de diferentes formas, que vão desde géis até filmes.

2.2.1 - Processos de obtenção da quitosana

A comercialização da quitina envolve um processo de desmineralização e desproteinização das cascas dos crustáceos. Para obtenção e comercialização da quitosana, é realizado o processo de desacetilação, conforme ilustrado na figura 3. Esse procedimento envolve a adição da quitina em meio alcalino, resultando na hidrólise dos grupos acetamida da quitina e, portanto, conferindo a quitosana o grupamento de amina primária. A eficácia desse processo é quantificada através do grau de desacetilação (DDA), onde a quitina geralmente possui um DDA entre 0-15%, enquanto a quitosana apresenta um DDA entre 60-100% (YIN, *et al.*, 2021).

Figura 3 - Processo de obtenção da quitina e desacetilação para quitosana.



Fonte: Adaptado de JIN *et al.*, 2021.

A solubilidade da quitosana em meio aquoso está diretamente relacionada ao seu grau de desacetilação, sendo que a quitina apresenta baixa solubilidade em água, enquanto a quitosana é facilmente solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos (YIN *et al.*, 2021; YANEVA *et al.*, 2020). De maneira geral, a quitosana dissolve-se facilmente em soluções de ácidos fracos devido à protonação dos seus grupamentos amino (LARANJEIRA *et al.*, 2009).

O grau de desacetilação da quitosana é um fator determinante para diversas de suas propriedades funcionais, incluindo sua solubilidade, bioatividade e biodegradação. Além disso, o peso molecular da quitosana desempenha um papel crucial na determinação e controle de suas especificidades, como sua viscosidade e solubilidade em água (MATICA *et al.*, 2019; ROLIM *et al.*, 2018).

2.3 - APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DA QUITOSANA

A quitosana é um polímero versátil que tem sido explorado em uma ampla variedade de formulações, com o objetivo de veicular ativos e de utilizar de sua ação biológica. Registros na literatura indicam uma gama de propriedades, incluindo atividade antimicrobiana, cicatrizante, analgésica e antioxidante (ROLIM *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018; BANO *et al.*, 2017; YIN *et al.*, 2021).

A ação cicatrizante da quitosana foi demonstrada em estudos anteriores, como o realizado por Fráguas e colaboradores (2015), onde as feridas cutâneas em ratos que foram tratadas com a quitosana pulverizada apresentaram um processo acelerado de recuperação e redução significativa da sua largura. Esses efeitos cicatrizantes muitas das vezes coincidem com as propriedades imunoestimulantes da quitosana, uma vez que a substância demonstrada aumenta a ativação e quimiotaxia de macrófagos, estimula a produção de fibroblastos e promove a síntese de interleucinas (OKAMOTO *et al.*, 2003; HOWLING *et al.*, 200; MORI *et al.*, 1997).

Além disso, há relatos de indução da analgesia por parte da quitosana e da quitina, especialmente quando aplicada topicamente em feridas abertas, proporcionando um efeito refrescante e calmante (OKAMOTO, 2002). Acredita-se que essa ação analgésica está relacionada à capacidade da quitosana de capturar estímulos ácidos liberados no local da lesão, resultando no bloqueio das terminações nervosas (AHMED *et al.*, 2016).

No cenário atual de pesquisa, inúmeras investigações exploraram a associação de ativos naturais com formulações à base de quitosana, com o objetivo de

desenvolver alternativas inovadoras e melhorar o desempenho dessas formulações (BASHIR *et al.*, 2023; AY *et al.*, 2023; D'SOUZA *et al.*; 2022). Essas iniciativas visam não apenas ampliar as propriedades terapêuticas, mas também potencializar os efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos e cicatrizantes quando combinados com a quitosana.

2.3.1 - Efeito antimicrobiano da quitosana

A atividade antimicrobiana da quitosana é reportada desde 1979 por Allan e colaboradores. Esses estudos iniciais destacam o amplo espectro de ação antimicrobiano da quitosana. No entanto, é importante observar que esse efeito antimicrobiano pode variar dependendo de fatores como o grau de acetilação, massa molecular, condições ambientais e do microrganismo em questão (ÁVILA FILHO *et al.*, 2020).

No caso de bactérias gram-positivas, acredita-se que a ação antimicrobiana da quitosana ocorre devido a interações não covalentes com o ácido teicoico presente na superfície da membrana celular bacteriana. Embora o processo não esteja completamente elucidado, sugere-se que a interação com o ácido teicoico afete a capacidade da bactéria de se proteger contra o estresse ambiental, regular a concentração catiônica interna ou mesmo dificultar a ligação com receptores de superfície (XIA *et al.*, 2010).

Por outro lado, em bactérias gram-negativas, acredita-se que a quitosana esteja competindo, em um ambiente ácido, com os cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} presentes na parede celular bacteriana. Essa competição leva à desestabilização da parede celular e por consequência comprometendo a sua integridade (PELGRIFT *et al.*, 2013).

2.4 - CARACTERÍSTICAS DOS FILMES DE QUITOSANA

2.4.1 - Desenvolvimento de filmes pelo método de *casting*

Existem diversas técnicas disponíveis para a fabricação dos filmes de quitosana. Dentre as mais conhecidas estão o *dip-coating*, *spin-coating* e, notavelmente, a técnica de *casting*, que é amplamente utilizada (MALI *et al.*, 2010). A escolha da técnica de *casting* é justificada pela sua praticidade em ser utilizada em escala industrial e pela capacidade de formular filmes biodegradáveis com ótimos resultados (VIÉGAS, 2016).

Na da técnica de *casting*, a solução precursora é transformada em um filme sólido após o processo de evaporação do solvente. Essa técnica é versátil e permite a formulação de filmes a partir de uma variedade de polímeros, incluindo polissacarídeos, proteínas, lipídeos e seus derivados (SOUZA *et al.*, 2010). Geralmente, os polímeros são solubilizados em água, etanol ou ácidos orgânicos, e uma solução plastificante é adicionada para obter uma solução filmogênica. Após essa etapa, a solução é vertida sobre um suporte (placa de petri ou vidro) e conduzida a uma estufa, normalmente sob condições controladas (TERRAZAS, 2019).

A transformação da solução filmogênica em filmes é um resultado das interações intermoleculares entre os componentes do filme e, quando presente, do IFA (VIÉGAS, 2016). Durante o processo de secagem, a concentração do polímero na solução aumenta, resultando na agregação das moléculas e na formação de uma rede tridimensional.

As propriedades finais dos filmes são influenciadas por vários fatores, incluindo a escolha do polímero, a natureza do IFA, as condições de secagem e o ambiente. Uma das principais desvantagens da técnica de *casting* é o tempo de secagem e a dificuldade da produção de filmes grandes. De maneira geral, os filmes produzidos por essa técnica exibem boas propriedades mecânicas e menor opacidade. No entanto, eles tendem a ser sensíveis à umidade e apresentam alta permeabilidade ao vapor de água (TERRAZAS, 2019).

2.4.2 - Formulação de sistemas de liberação controlada

A quitosana tem sido alvo de muitas pesquisas com o objetivo de desenvolver sistemas nanoestruturados destinados à entrega de princípios ativos. Esses sistemas abrangem uma ampla variedade de aplicações, desde a fabricação de curativos avançados para o tratamento de lesões de pele até a formulação de géis termorreversíveis para aplicação tópica.

Os sistemas de liberação controladas vêm ganhando destaque crescente na pesquisa farmacêutica devido à sua eficiência no tratamento de diversas doenças. Além disso, esses sistemas oferecem vantagens notáveis, como a redução da toxicidade e a diminuição da necessidade de administração frequente de doses terapêuticas (PRIMO, 2015).

A quitosana se destaca nesse cenário, sendo capaz de formular sistemas de liberação controlada altamente eficazes. Um dos aspectos cruciais para o sucesso

desses sistemas é que a quitosana esteja carregada positivamente. Essa característica é fundamental para promover a difusão do IFA por meio dos mecanismos de liberação (LARANJEIRA *et al.*, 2009).

O principal benefício desses sistemas é a capacidade de administrar medicamentos com maior segurança e eficácia, ao mesmo tempo que minimiza os efeitos adversos indesejados. Além disso, as características da quitosana possibilitam a formulação de sistemas de liberação controlada adaptados para diferentes aplicações terapêuticas, como a liberação gradual de medicamentos, cicatrização de feridas ou a entrega localizada de ativos terapêuticos.

2.5 - A ESPÉCIE *PLINIA CAULIFLORA*

A *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel é uma espécie botânica que pertence à família *Myrtaceae* e é amplamente distribuída em florestas abertas no Brasil, Argentina e Paraguai. No Brasil, essa planta é popularmente conhecida como jabuticaba, embora também possa ser referida por diferentes denominações regionais, como jabuticaba-açu, jabuticaba-paulista, jabuticaba-açu-paulista ou jabuticaba-híbrida. Plantações de jabuticaba são frequentemente encontradas nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo (NEVES *et al.*, 2021).

As espécies da família *Myrtaceae*, incluindo a *Plinia cauliflora*, são geralmente caracterizadas como plantas lenhosas e arbustivas que produzem flores de coloração branca ou vermelha (Figura 4). No caso específico da *Plinia cauliflora*, o cultivo dessa planta é geralmente iniciado a partir de sementes, e leva aproximadamente 10 a 12 anos para que os primeiros frutos sejam produzidos. As árvores da jabuticaba atingem uma altura média de 10 a 15 metros e as suas folhas variam entre 2 a 6 centímetros (LORENZI *et al.*, 2006).

Figura 4 - Espécie vegetal *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel.



Árvore de onde são retiradas as amostras para a confecção do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*, localizada Faculdade de Educação Física da UFMG em Belo Horizonte, MG.

Os frutos da jabuticaba crescem agrupados em cachos diretamente nos troncos e ramos da árvore. A maturação dos frutos ocorre em aproximadamente 40 a 60 dias, e a colheita é realizada uma vez ao ano, geralmente entre os meses de novembro e dezembro. Esses frutos apresentam uma polpa branca, que envolve uma única semente de tamanho médio (FRAZOLIN *et al.*, 2022). São consumidos de diversas formas, seja *in natura* ou processados em geleias, sucos, licores ou vinhos. Devido ao teor elevado de açúcar e água, é recomendado que sejam consumidos logo após a colheita (NEVES *et al.*, 2021).

Embora a espécie seja amplamente utilizada na medicina tradicional, seu cultivo comercial é limitado devido ao seu longo período para a frutificação (SANTOS *et al.*, 2020). Normalmente, o interesse econômico recai sobre os frutos, que são consumidos *in natura* ou na fabricação de bebidas ou geleias. No entanto, devido à morosidade do processo de frutificação, muitos produtores são desestimulados para investir no cultivo dessa espécie.

Nesse contexto, a subutilização de outras partes da planta, como as folhas e os ramos, pode representar uma oportunidade potencial para estimular o cultivo

comercial dessa espécie (MARTINY et al., 2021). Enquanto a planta não atingiu a fase de frutificação, esses recursos alternativos podem favorecer aos produtores uma fonte adicional de renda, contribuindo assim para promover o cultivo e a comercialização dessa espécie tão rica em benefícios.

2.6 - CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DE *PLINIA CAULIFLORA*

A *Plinia cauliflora* é uma espécie rica em constituintes ativos provenientes de seu metabolismo secundário. Entre esses componentes, destacam-se os compostos fenólicos, notadamente os taninos e os flavonoides, que apresentam uma atividade antioxidante e anti-inflamatória notável.

Análises fotoquímicas das frutas, cascas e folhas da espécie identificaram diversos compostos fenólicos, incluindo polifenóis, quercitrina, antocianinas, ácido elágico, ácido gálico e ácidos fenólicos (NEVES et al., 2021, PAULA et al., 2021; SOUZA-MOREIRA et al., 2013). Os flavonoides, quercetina, miricitrina e rutina são alguns dos compostos fenólicos mais investigados nessa espécie. A coloração escura dos frutos, que é uma característica marcante da jabuticaba, é atribuída à presença de pectina, peonidina e antocianinas (BOARI et al., 2008). Além disso, a polpa dos frutos é uma fonte rica em nutrientes, contendo o ácido ascórbico, fósforo, ferro e niacina.

Na pesquisa realizada por Paula e colaboradores (2021), foram identificadas aproximadamente 22 substâncias diferentes no extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*, incluindo ácido quínico, ácido gálico, ácido elágico, quercetina, miricitrina e miricetina. Estudos de Souza-Moreira e colaboradores (2011) enfatizam a presença de substâncias fenólicas em folhas e frutos, com destaque para taninos hidrolisáveis, derivados do ácido elágico e de flavonoides. De acordo com o estudo realizado por De Oliveira e colaboradores (2011), as folhas apresentam taninos e flavonoides, destacando a presença de ácido elágico, quercetina e miricetina.

Comparando o perfil de substâncias descoberta no extrato das folhas com os frutos de *Plinia cauliflora*, observa-se uma sobreposição específica, visto que muitos dos compostos fenólicos relatados nos frutos também são encontrados nas folhas (SOUZA-MOREIRA et al., 2011). No entanto, é importante notar que, em pesquisas, as folhas são geralmente menos exploradas em comparação com outras partes da planta (GALVÃO et al., 2021).

2.7 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE *PLINIA CAULIFLORA*

A *Plinia cauliflora*, tem sido amplamente utilizada pela população desde tempos antigos como um recurso medicinal para o tratamento de diversas condições de saúde, como irritações na pele, diarreias, labirintite, inflamações crônicas e asma (GASPAROTTO JUNIOR, *et al.*, 2019). Nas práticas da medicina tradicional, observa-se que os benefícios não estão restritos aos frutos, mas também abrange as folhas, que são frequentemente empregadas em chás, xaropes ou infusões (PAIVA, *et al.*, 2014). Estudos recentes destacam não apenas a abundância de nutrientes nessa espécie, mas também uma rica composição fenólica que se presume ser responsável por muitos de seus efeitos benéficos (NEVES, *et al.*, 2021).

No estudo conduzido por Brito e colaboradores (2021), a *Plinia cauliflora* foi reconhecida como uma fonte rica de substâncias com potencial para prevenir e tratar doenças como diabetes *mellitus*, doenças cardiovasculares e distúrbios inflamatórios. Esse efeito benéfico é diretamente correlacionado com a notável capacidade antioxidante e anti-inflamatória de seus principais constituintes. Além disso, os autores pontuam ainda uma ação analgésica significativa por parte desse extrato.

Conforme evidenciado por Souza-Moreira *et al.* (2011), tanto o extrato hidroalcolólico de folhas quanto o das frutas demonstram atividade antimicrobiana eficaz contra bactérias como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella sp* e *Shigella sonnei*, graças à presença de taninos e flavonoides. Vale destacar que o extrato de folhas se mostrou mais eficaz em inibir o crescimento dessas bactérias em comparação com o extrato dos frutos, alcançando uma concentração inibitória de 5 mg/mL (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2011).

Em um estudo realizado por Frazolin e colaboradores (2022), o extrato aquoso das folhas revelou uma maior capacidade de inibir o crescimento bacteriano quando comparado ao extrato das frutas. Os autores atribuem essa eficácia à presença de flavonoides, alcaloides, saponinas e taninos. Essa rica composição confere tanto às folhas quanto aos frutos propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiproliferativas (BOARI *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2010).

Além disso, na literatura existem relatos sobre a atividade antitumoral das cascas dos frutos, devido ao seu potencial de redução da viabilidade de linhagens celulares leucemóides e de câncer de próstata e mama (PALUDO *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2022). Andrade e colaboradores (2015) destacam a atividade de relaxamento

vascular, demonstrado pelo extrato hidroalcoólico da espécie, que leva a hipotensão arterial sem afetar a frequência cardíaca, devido à sua potente atividade antioxidante.

Existem relatos ainda da sua atividade para redução da adiposidade excessiva e acúmulo de lipídeos hepáticos (MOURA *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2012; LENQUISTE *et al.*, 2015). Vale ressaltar a necessidade de pesquisas adicionais para investigar a biodisponibilidade e o mecanismo de ação específico de taninos e ácidos fenólicos, os compostos que estão associados aos inúmeros benefícios dessa espécie (BRITO *et al.*, 2021).

2.7.1 - Propriedades antioxidantes da jabuticaba

Diariamente, nosso organismo está sujeito a processos de oxidação, seja de origem externa ou interna. No contexto endógeno, esses processos oxidativos ocorrem naturalmente devido à produção de radicais livres, que são átomos reativos capazes de participar em reações químicas com outras moléculas (CAROCHO; FERREIRA, 2013). O acúmulo desses radicais livres pode desencadear o estresse oxidativo, um fator associado ao desenvolvimento de diversas patologias. Além disso, acredita-se que o estresse oxidativo contribui para o agravamento de doenças inflamatórias.

Para neutralizar os radicais livres gerados endogenamente, o organismo dispõe de um sistema antioxidante natural, composto por enzimas e moléculas. No entanto, devido à produção excessiva de radicais livres, faz-se necessária a suplementação desse sistema por outras vias (VELLOSA *et al.*, 2021). Uma fonte rica de compostos antioxidantes são as plantas e os vegetais. As plantas têm uma capacidade de síntese química, em especial os compostos fenólicos, com ênfase nos flavonoides, que podem exercer um papel crucial na neutralização de radicais livres (SOUSA *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, as espécies da família *Myrtaceae* são empregadas para tratar condições de saúde relacionadas com a ação antioxidante dessa família (SALVADOR *et al.*, 2011). O potencial antioxidante da família *Myrtaceae* já foi documentado e investigado por diversos pesquisadores. Um estudo realizado por Magina e colaboradores. (2010) avaliou a atividade antioxidante de três espécies pertencentes a essa família: *Eugenia brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbeliflora*. Os resultados indicaram teores significativos de compostos fenólicos, os quais contribuem com a atividade antioxidante das plantas.

2.7.2. - Propriedade anti-inflamatória da jabuticaba

Sabe-se que muitos processos inflamatórios estão intrinsecamente relacionados ao estresse oxidativo. Assim, devido ao notável potencial antioxidante da *Plinia cauliflora*, acredita-se que essa espécie também possua propriedades anti-inflamatórias. Os compostos presentes na espécie atuam presumivelmente regulando a síntese de citocinas pró-inflamatórias, na inibição da ciclo-oxigenase 2 e afetando a expressão de óxido nítrico (BRITO *et al.*, 2021).

Em um estudo realizado por Brito e colaboradores (2021), o potencial anti-inflamatório do extrato hidroetanólico das cascas dos frutos de *Plinia cauliflora* foi avaliado *in vivo*. Para induzir o edema na pata de camundongos, utilizou-se a carragenina, um agente flogístico conhecido por induzir mediadores de fase aguda.

Os pesquisadores observaram que, na fase tardia do teste, o extrato foi capaz de reduzir significativamente o edema de pata, o que sugere um efeito anti-inflamatório.

Acredita-se que o efeito anti-inflamatório dessa espécie esteja diretamente relacionado à presença de compostos fenólicos, com os taninos se destacando pela sua eficácia. Há relatos na literatura que respaldam a ação eficaz desses compostos devido à sua capacidade de combater espécies reativas de oxigênio, que desempenham um papel crucial nos processos inflamatórios (BAZYLKO *et al.*, 2013).

Outros compostos que podem estar associados à ação anti-inflamatória são os ácidos fenólicos, também encontrados nessa espécie. Acredita-se que esses compostos desempenham um papel eficaz na prevenção da produção exacerbada de óxido nítrico e da redução da síntese de citocinas pró-inflamatórias (MA *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2017).

2.7.3 - Propriedade antimicrobiana da jabuticaba

Alguns polifenóis identificados na *Plinia cauliflora* apresentam relatos de atividade antimicrobiana potente, com ampla eficácia contra microrganismos, tais como *E. coli*, *S. entérica*, *B. cereus*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* (HACKE *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2018; FLECK *et al.*, 2021). Em um estudo recente, foi relatado que a atividade anti-estafilocócica está diretamente relacionada à concentração de antocianinas e compostos fenólicos na constituição do extrato. Os autores afirmam que esse efeito independe de alterações no pH, temperatura ou mesmo da exposição à luz (FLECK *et al.*, 2021).

Os achados de Fleck e colaboradores (2023) sugerem que o extrato aquoso das cascas de jabuticaba é eficaz contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, demonstrando atividade contra *S. aureus* e *E. coli*. Sabe-se que bactérias gram-negativas são mais susceptíveis a compostos ricos em antocianinas e compostos fenólicos, explicando o efeito relatado na literatura para essa espécie (DEMIRBAS *et al.*, 2017, FLECK *et al.*, 2023). Rosas-Burgos e colaboradores (2017), relatam que o ácido elágico é um dos principais componentes responsáveis para que aconteça a inibição de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Essa ação ocorre devido à sua eletrofilicidade, que afeta a hidrofobicidade e a interação com os componentes da superfície bacteriana.

Os autores relatam que a atividade antimicrobiana dos polifenóis em gram-positivas ocorre devido ao aumento da permeabilidade da membrana bacteriana (DIARRA *et al.*, 2020). Já os taninos têm a capacidade de interagir com os componentes da parede celular bacteriana, causando a inibição da síntese de peptídeoglicano (JONES *et al.*, 1994).

2.8 - APLICAÇÕES POTENCIAIS PARA OS FILMES DE QUITOSANA

Além de sua aplicação na área médica, os filmes de quitosana desempenham um papel fundamental em diversas outras áreas. Na indústria alimentícia, eles são utilizados para ampliar a vida útil de produtos frescos, participando como embalagens funcionais. Essas atividades decorrem das propriedades multifuncionais dos filmes, os quais além de prolongar a vida útil, conseguem também criar uma barreira eficaz contra a invasão de microrganismos (WANG *et al.*, 2018).

Outro campo de pesquisa em crescimento explora a utilização desses filmes como curativos para lesão de pele (HABITZREUTER, *et al.*, 2020). A capacidade de incorporar IFA nos filmes e ainda desenvolver um sistema de liberação lenta e progressiva atrai a atenção de pesquisadores.

2.8.1 - Curativos a base de biopolímeros

Sabe-se que uma cicatrização eficiente, requer a proteção da ferida contra a contaminação por microrganismos, a manutenção de um ambiente úmido e a promoção de trocas gasosas. Para atender essas necessidades, iniciou-se a utilização dos curativos (ABDO *et al.*, 2020). No entanto, com o objetivo de melhorar

ainda mais o desempenho, os curativos convencionais vêm sendo substituídos pelos curativos modernos (GONZAGA, 2018).

Além da sua função básica de manter a ferida limpa, protegida do ambiente externo e permitindo a evaporação do exsudato, os curativos modernos possuem ainda a função de carrear IFA, que podem aprimorar e acelerar o processo de cicatrização. Eles são classificados de acordo com a sua atividade e podem ser considerados inativos (gazes e outros tecidos), interativos (hidrocoloides e hidrogéis) e ativos (contêm em sua composição ativos que aceleram a cicatrização) (WEIGAND *et al.*, 2010).

Esses curativos podem ser fabricados utilizando diversas técnicas e materiais, buscando sempre melhorar a agilidade e a eficácia no processo de cicatrização (FERREIRA, 2022). De acordo com Adamu e colaboradores (2021), os curativos modernos devem atender a critérios essenciais, como serem biocompatíveis, atóxicos, permeáveis, ter a capacidade de proteção contra infecções e permitir a liberação controlada de IFA. Eles estão disponíveis no mercado em diferentes formatos, como filmes finos, géis, espumas, loções e cremes ou membranas.

Os hidrogéis são indicados para feridas exsudativas devido à sua alta capacidade de reter água (SUDHEESH KUMAR *et al.*, 2012). Já o hidrocoloide é indicado para feridas com pouca formação de exsudato, devido à sua boa adesão (GAWRYSZEWSKI, *et al.*, 2009). E as membranas porosas, por sua vez, possuem uma rede tridimensional que favorece a migração celular, além de realizar a função de substituição da pele durante o período aplicado (LEE, *et al.*, 2014).

Por fim, os filmes são usados no tratamento de feridas superficiais, proteção de feridas cirúrgicas e prevenção de lesões de pele resultantes de atrito ou umidade excessiva (BOATENG *et al.*, 2008). Essas formulações permitem a liberação gradual de IFA, uma excelente troca gasosa, a proteção contra microrganismos e ao mesmo tempo que realiza as funções de um curativo convencional.

Considerando as potencialidades da quitosana em formular filmes estruturados e maleáveis, com efeitos biológicos e as extensas potencialidades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana da *Plinia cauliflora*, pretende-se nesse trabalho unir esses dois compostos, em uma formulação de filme pela técnica de *casting* almejando a criação de um sistema de liberação controlada, com atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana.

3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

Desenvolver filmes de quitosana incorporados com extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* (EEPC) e avaliar as suas propriedades físico-químicas e as multifuncionalidades em relação ao seu potencial antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar a partir das folhas coletadas o EEPC.
- Realizar a dosagem de fenóis, taninos e flavonoides no EEPC.
- Avaliar o efeito anti-inflamatório *in vitro* do EEPC;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do EEPC;
- Investigar o efeito antimicrobiano do EEPC frente a bactérias colonizadoras da pele;
- Desenvolver filmes de quitosana incorporados com EEPC em diferentes concentrações;
- Avaliar as propriedades físico-químicas da solução precursora dos filmes de quitosana incorporados com EEPC
- Analisar do perfil de liberação dos filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações de EEPC;
- Avaliar as propriedades físico-químicas dos filmes de quitosana incorporados com EEPC
- Investigar potencial anti-inflamatório *in vitro* dos filmes de quitosana incorporados diferentes concentrações de EEPC;
- Avaliar do potencial antioxidante *in vitro* dos filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações de EEPC e;
- Analisar do potencial antimicrobiano dos filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações de EEPC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas foram coletadas em maio de 2022, na Faculdade de Educação Física da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) localizada na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, nas coordenadas 19°52'30,8" S; 43°58'31,7" O e 820 m. Foi preparada uma exsicata (BHCB 174029) com uma amostra da planta inteira para a sua identificação. A partir de análises do curador do herbário da UFMG, Professor Dr. Alexandre Salino, a amostra foi identificada como *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel (Myrtaceae) (SISGEN/Brasil A032F41).

4.2 - PREPARO DO EXTRATO VEGETAL

Cerca de 2 kg de folhas foram coletadas e submetidas à secagem em estufa por 48 h à temperatura de 45 °C. Após a secagem, as folhas passaram pelo processo de pulverização, utilizando um liquidificador industrial até se obter um pó. Em seguida, iniciou-se o processo de maceração estática com álcool etílico absoluto PA, à temperatura ambiente durante 15 dias para esgotamento do material vegetal. Para a obtenção do extrato etanólico bruto, o solvente foi removido em um evaporador rotatório da marca BUCHI Labortechnik AG (V-700), por meio de pressão reduzida e banho maria de 45 – 55 °C. O extrato etanólico bruto das folhas de *Plinia cauliflora* (EEPC) foi armazenado em frasco de vidro com tampa, refrigerado à 5 °C.

4.3 - DOSEAMENTO DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DE EEPC

4.3.1 - Teor de fenóis totais e taninos

A determinação do teor de fenóis totais e de taninos foi realizada através do método descrito por Folin (1927) com adaptações. Foi preparado uma curva analítica padrão com ácido tânico com concentração variável entre 7,5 a 350 µg/mL. Em seguida, foi preparada uma solução estoque com EEPC à 1 mg/mL em metanol e desta solução foram adicionados 30 µL em uma microplaca de 96 poços. Além da amostra, foram adicionados em cada poço 120 µL do reagente de Folin-Ciocalteu à 20 % e 100 µL de carbonato de sódio à 4 %. A solução reagente foi substituída por metanol para o branco do experimento. A placa permaneceu incubada por 30 min, ao abrigo da luz e a absorbância foi medida a 770 nm em espectrofotômetro (UV-Vis ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2). O experimento foi realizado em

triplicata e o conteúdo total de fenóis foi expresso em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato vegetal em equivalentes de ácido tânico.

Para a determinação do teor de taninos, foram preparadas as soluções estoque de EEPC em etanol à 1 mg/mL e uma solução de gelatina em água à 2,5% (p/v). Juntou-se 1 mL de cada solução estoque e agitou-se durante 60 min em agitador magnético e posteriormente foi centrifugada e filtrada em papel de filtro. O filtrado resultante foi utilizado para a análise de fenóis totais não adsorvidos pela gelatina com o mesmo método descrito anteriormente. O experimento foi realizado em triplicata e o conteúdo total de tanino foi expresso pela diferença entre fenóis totais e fenóis não adsorvidos pela gelatina em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato vegetal em equivalentes de ácido tânico.

4.3.2 - Teor de flavonoides

O teor de flavonoides foi determinado pelo método desenvolvido por Miliauskas e colaboradores (2004), com algumas adaptações. Inicialmente, preparou-se uma curva de analítica com diferentes alíquotas de uma solução com rutina a 0,5 mg/mL em etanol. O EEPC foi pesado e solubilizado em etanol até atingir a concentração de 1 mg/mL, padronizando a solução estoque para o experimento. Desta solução foram transferidos 0,2 mL para um tubo de ensaio, juntamente com 4,6 mL de etanol, 1 gota de ácido acético glacial e 0,2 mL de uma solução etanólica de cloreto de alumínio à 2%. Como branco, foi preparado um tubo substituindo a solução de cloreto de alumínio pelo mesmo volume de etanol. Os tubos permaneceram por 40 min incubados ao abrigo da luz e após o período a absorbância das amostras foram lidas utilizando um espectrofotômetro (UV-Vis ThermoScientific Skanlt® Multiskan GO, software 3,2) a 415 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e o conteúdo total de flavonoides foi expresso em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato vegetal, em equivalentes de rutina.

4.4 - CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE EEPC

4.4.1 - Determinação da citotoxicidade em linhagens celulares

4.4.1.1 – Viabilidade celular *in vitro* em macrófagos

4.4.1.1.1 – Linhagem celular

Os macrófagos utilizados no experimento de viabilidade celular foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos machos BALB/c, pesando entre 20-25 g, obtidos no Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de

Fora. Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações das Diretrizes Éticas para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde e protocolo para a utilização dessas linhagens de macrófagos foi aprovado pelo Comitê de Ética para a Investigação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (nº 007/2018-CEUA). As células foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ até a realização do experimento.

4.4.1.1.2 - Ensaio de redução metabólica do MTT

A viabilidade celular foi analisada por meio da redução mitocondrial do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- brometo de difeniltetrazólio (MTT) ao formazam, conforme descrito por Mossman (1983). Inicialmente, as células de macrófagos foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementado com 2Mm de L-glutanima, 5% de SFB, 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Posteriormente, essas células foram distribuídas para placas de 96 poços (2x10⁵ células/poço) e submetidas a um tratamento com diferentes concentrações de EEPC, variando de 300,00 a 18,75 µg/mL. Para fins de controle, células tratadas apenas por dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,06% (veículo) foram incluídas no experimento. Após essa etapa, as células foram reincubadas por 48 h, mantendo-se a atmosfera de 5% de CO₂ e a temperatura de 37 °C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e substituído por 90 µL de meio suplementado e 10 µL da solução de MTT à 5 mg/mL. As placas foram então incubadas por mais 2 h e 30 min à 37 °C, em uma atmosfera com 5% de CO₂. Dois experimentos independentes foram realizados e em triplicata para cada concentração. Após a conclusão do protocolo, a absorbância das amostras foi medida a 570 nm por meio de um espectrofotômetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), e a porcentagem de células viáveis calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = \left(\frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs DMSO 0,06\%}} \right) \times 100$$

Onde: Abs amostra: Absorbância medida após o tratamento das células com a amostra; Abs DMSO 0,06%: Absorbância medida após o tratamento das células com 0,06% de DMSO.

4.4.1.2 - Viabilidade celular *in vitro* em fibroblastos

4.4.1.2.1 Linhagem celular

Os fibroblastos L929 (ATCC® CCL-1 NCTC) foram cedidos pelo professor Dr. Frederico Pittella Silva do Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. As células foram cultivadas em garrafas de cultura com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de uma solução de antibióticos, contendo penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Elas foram incubadas em uma estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ até atingirem 80% de confluência. Posteriormente, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), e em seguida, 1 mL de tripsina à 0,25% em EDTA foi adicionado. Os frascos foram reincubados por 4 min à 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, adicionou-se 4 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibióticos para inativação das enzimas. O meio de cultura e as células foram recolhidos e transferidos para um tubo de centrifugação estéril, onde foram centrifugados por 4 min à 3500 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com DMEM suplementado com soro fetal bovino e antibióticos. A suspensão celular foi contada em uma câmara de Neubauer e utilizadas no ensaio de viabilidade celular.

4.4.1.2.2 Ensaio de redução metabólica do MTT

As células foram transferidas para microplacas de 96 poços, com densidade de 5×10^3 células/poço, e foram incubadas por 24 h à 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi removido, e adicionou-se 100 µL de meio DMEM suplementado com soro fetal bovino e antibióticos, contendo EEPC previamente diluído em 20 µL de DMSO, de modo a obter concentrações variando de 300,00 a 18,75 µg/mL. Como controle utilizou-se as células tratadas apenas com DMSO. As placas foram novamente incubadas por 48 h, mantendo-se a atmosfera de 5% de CO₂ e a temperatura de 37 °C.

Após esse período, o meio foi removido, e 90 µL de meio DMEM suplementado, adicionalmente com 10 µL da solução de MTT à 5 mg/mL, foram adicionados a cada poço. As placas foram então incubadas por mais 2 h e 30 min à 37 °C, em uma

atmosfera com 5% de CO₂. Posteriormente, o precipitado formado foi diluído em 100 µL de DMSO, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA) a 570 nm.

O cálculo da porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas com EEPC foi realizado a partir das medias das respectivas absorbâncias, considerando-se o valor médio da absorbância do grupo controle negativo com 100% de viabilidade. O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração em dois experimentos independentes.

4.4.2 - Determinação da atividade anti-inflamatória de EEPC

4.4.2.1 - Ensaio de dosagem de óxido nítrico (NO)

A determinação dos níveis óxido nítrico (NO) foi realizada após o estímulo e o tratamento dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, de acordo com o método de Griess para a medição indireta de óxido nítrico por dosagem de nitrito, conforme descrito por Sun *et al.* (2003). Inicialmente, os macrófagos foram transferidos para microplacas de 96 poços (2 x 10⁴ células por poço), e tratados com EEPC em concentrações variando de 300,00 a 9,37 µg/mL. Em seguida, foram estimulados com LPS a 1 µg/mL e IFN-γ a 1 ng/mL, com o propósito de intensificar o estímulo. O volume restante do poço foi completado com meio RPMI. As placas foram incubadas por 48 h à 37 °C, em uma atmosfera a 5% de CO₂.

Para fins de controle do experimento, foram utilizadas células que não receberam o tratamento com EEPC, mas que foram estimuladas com LPS e IFN-γ (controle-estímulo). Além disso, utilizou-se também células sem nenhum tipo de tratamento para avaliar a produção basal de NO (controle-basal). A medição indireta de NO foi realizada no sobrenadante da cultura após o período de incubação. A solução resultante foi lida em um espectrofotômetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a 540 nm. A quantidade de óxido nítrico (µM) foi determinada por meio da comparação com uma curva padrão obtida a partir da diluição seriada de nitrito de sódio (GUEVARA *et al.*, 1998). Dois experimentos foram realizados e em triplicata para cada concentração testada.

4.4.2.2 - Ensaio de dosagem de TNFα

Para a dosagem de TNFα, os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram estimulados e tratados com EEPC. Inicialmente, as células foram transferência

das células para microplacas de 96 poços (2×10^4 células por poço), e tratadas com EEPC nas concentrações de 300 e 150 $\mu\text{g/mL}$. A placa foi então incubada 6 h, a 5% de CO_2 a 37 °C. Em seguida, as células foram submetidas a um processo de estímulo, sendo expostas a 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, e incubadas por mais 24 h nas mesmas condições descritas anteriormente.

Os grupos de controle incluíam células que não passaram por tratamento com EEPC, mas que foram estimuladas (controle-estímulo), bem como células que não receberam nenhum tipo de tratamento ou estímulo (controle-basal). A quantificação de $\text{TNF}\alpha$ foi realizada no sobrenadante coletado, empregando o método imunoenzimático (ELISA) com o kit Mouse TNF ELISA Set da BD OptEIA™. As absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA) a 450 nm, e as concentrações de citocinas determinadas conforme a curva padrão. Dois experimentos foram realizados e em triplicata para cada concentração testada.

4.4.2.3 Ensaio de dosagem de citocina pró-inflamatória Interleucina-6

Os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c também foram utilizados para avaliar a produção de interleucina-6 (IL-6) após o tratamento com EEPC, nas concentrações de 300 e 150 $\mu\text{g/mL}$ durante 6 h. Após o tratamento, as células foram estimuladas com LPS à 1 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h. Os grupos de controle incluíam células sem nenhum tipo de estímulo ou tratamento (controle-basal) e células que não foram tratadas com EEPC, mas que foram estimuladas com LPS (controle-estímulo).

O sobrenadante coletado foi submetido à quantificação de IL-6, utilizando um ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche (Kit BD OptEIA™). As concentrações da citocina (pg/mL) foram determinadas por meio da leitura da absorbância em um espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA) a 450 nm, com base em uma curva padrão. Dois experimentos foram realizados e em triplicata para cada concentração testada.

4.4.2.4 Ensaio de dosagem de corpúsculos lipídicos

A dosagem de corpúsculos lipídicos foi realizada em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, de acordo com o método de Basselin *et al.* (1997), com algumas modificações. Inicialmente, as células foram semeadas em uma concentração de 2×10^5 por poço e posteriormente foram tratadas com EEPC nas

concentrações de 300 e 150 µg/mL. Em seguida, foram estimuladas com LPS a 1 µg/mL e IFN-γ a 1 ng/mL, permanecendo incubadas por 48 h, a 5% de CO₂ a 37 °C.

Após esse período de incubação, as células foram lavadas com PBS e coradas com 200 µL de corante Nile Red (10 µg/mL) em PBS, durante 20 min à 25 °C. Os grupos de controle incluíam células que não foram tratadas com EEPC, mas que receberam estímulo com LPS e IFN-γ (controle-estímulo) e células que não foram submetidas a nenhum tratamento (controle-basal).

Para quantificar o acúmulo de corpúsculos lipídicos, a leitura da absorbância foi realizada em um espectrofluorímetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), nos comprimentos de onda de 485 e 528 nm de excitação e emissão, respectivamente. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência. Dois experimentos foram realizados e em triplicata para cada concentração testada.

4.4.3 - Determinação da atividade antioxidante de EEPC

4.4.3.1 Dosagem dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Baseado no método de Stroppa *et al.* (2017), com algumas modificações, o nível de espécies reativas de oxigênio em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foi avaliado. Estes foram semeados, tratados com EEPC nas concentrações de 300 e 150 µg/mL, estimulados com LPS a 1 µg/mL e IFN-γ a 1 ng/mL e em seguida incubados por 48 h, a 5% de CO₂ a 37 °C. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e incubadas com diacetato de 2',7'-diclorodi-fluoresceína (H₂DCFDA) à 1 mM por 30 min no escuro a 37 °C e 5% de CO₂. Como controle do experimento, foram utilizadas células que não receberam tratamento, mas receberam estímulos (controle-estímulo). Para a determinação dos níveis de ROS, o sobrenadante foi avaliado fluorimetricamente a 485/528 nm de excitação e emissão, respectivamente, no equipamento Lx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA e os resultados foram apresentados em intensidade de fluorescência. Dois experimentos foram realizados e em triplicata para cada concentração testada.

4.4.3.2 - Método de sequestro de radical livre DPPH•

Baseada no método de Brand-Williams *et al.* (1995) foi realizada a determinação da atividade sequestrante de radicais DPPH•. Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 100 µL de uma solução 1mg/mL do EEPC e controle positivo (rutina e quercetina) em metanol. Utilizando 50 µL de metanol, foi realizado

uma diluição sucessiva e logo após, adicionou-se 150 µL da solução reagente de DPPH à 20 µg/mL em metanol em todos os poços. Após esse procedimento, obtemos concentrações entre 250,00 a 0,49 µg/mL. Nos poços correspondentes ao branco a solução reagente de DPPH foi substituída pela mesma quantidade de metanol. Já nos poços correspondentes do controle negativo, foi medida a absorvância apenas para a solução de DPPH. A placa foi incubada ao abrigo da luz, por 30 min e após esse tempo foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro (UV-Vis ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2) à 517 nm. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em concentração inibitória de 50 % (CI50) em µg/mL.

4.4.3.3 - Método de redução do complexo de fosfomolibdênio

Baseado no método de Prieto *et al.* (1999), o EEPC e os controles positivos, quercetina e rutina, foram solubilizados em metanol e água (1:1), formando uma solução hidroalcolica na concentração de 0,5 mg/mL. Além disso, preparou-se também uma solução reagente com 1,12 mL da solução de fosfato, 0,48 mL da solução de molibdato e 0,4 mL de ácido sulfúrico. Em tubos de ensaio, foram adicionados 300 µL da amostra (EEPC e controles positivos) e 2 mL da solução reagente preparada anteriormente. Estes tubos foram fechados hermeticamente, aquecidos em banho maria durante 90 min à temperatura de 95 °C e em seguida resfriados em banho de gelo. A solução reagente foi substituída pelo metanol para o branco da amostra. Ao final, a solução foi adicionada em microplaca de 96 poços e realizou-se a leitura em espectrofotômetro à 695 nm (UV-Vis ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2). O experimento foi realizado em triplicata e os valores foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante relativa (AAR%) ao ácido ascórbico, quercetina e rutina, considerando a média e o desvio padrão (NEGRI *et al.*, 2009). A atividade antioxidante relativa é determinada conforme a equação:

$$AAR\% = \frac{Abs(amostra) - Abs(branco amostra)}{Abs(controle positivo) - Abs(branco controle positivo)} \times 100$$

Onde, Abs (controle positivo): absorvância mensurada pelos controles positivos ácido ascórbico, quercetina e rutina; Abs(amostra): absorvância mensurada para as amostras; Abs(branco amostra): absorvância mensurada para o branco das amostras;

e Abs(branco controle positivo): absorvância mensurada para o branco dos controles positivos.

4.4.3.4 Sistema β -caroteno / ácido linoleico

De acordo com o método proposto por Melo & Mancini Filho (1989), com algumas modificações, a atividade de inibição da peroxidação lipídica foi avaliada. Inicialmente, as soluções estoques de 1 mg/mL de EEPC, rutina e quercetina em metanol, foram preparadas. Todas as soluções estoques foram diluídas entre as concentrações de 1000,00 e 31,25 μ g/mL para posteriormente a melhor concentração inibitória ser escolhida. Foi preparado uma emulsão contendo: 100 μ L da solução de β -caroteno à 10mg/mL de CH_2Cl_2 , 30 μ L de ácido linoleico, 265 μ L de Tween 40, 500 μ L de diclorometano. Utilizando nitrogênio gasoso, o solvente foi evaporado por completo e em seguida adicionou-se sob agitação 30 mL de água destilada saturada com oxigênio por 1 hora. A absorvância da emulsão foi ajustada entre 0,6 e 0,7 utilizando um espectrofotômetro UV-Vis à 470 nm.

Foram adicionados 250 μ L de emulsão e 10 μ L de amostra em uma microplaca de 96 poços, obtendo-se concentrações finais entre 38,46 a 1,20 μ g/mL. Substituindo a amostra pelo mesmo volume de metanol, foi realizado o controle negativo onde seria determinado 100% de oxidação. Para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descoramento do β -caroteno, a placa foi incubada à 45 °C. Utilizando um espectrofotômetro (UV-Vis ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2) à 470 nm as absorvâncias dos poços foram avaliadas no tempo zero e com intervalos de 15 min até completar 120 min de reação.

O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de inibição (%). A porcentagem de inibição é mensurada a partir de um cálculo em relação ao decaimento da absorvância do controle negativo, conforme a equação abaixo. São considerados valores menores que 0,2 para que seja considerado 100% de oxidação do ácido linoleico ao final da reação. Para encontrar os valores de F1 (capacidade de bloqueio da formação de peróxidos) entre 15 e 45 min de reação e os valores de F2 (capacidade inibir outras espécies radicalares) entre 75 e 90 min de reação, avaliou-se a curva de oxidação entre o controle negativo, o EEPC e o controle positivo, utilizando um cálculo de tangente. As equações estão demonstradas abaixo:

$$\%I = \frac{Abs\ cn - Abs\ am}{Abs\ cn} \times 100$$

$$Tg = \frac{Abs\ (15') - Abs\ (45')}{45 - 15} \quad F1 = \frac{Tg\ Abs\ am}{Tg\ Abs\ cn}$$

$$Tg = \frac{Abs\ (75') - Abs\ (90')}{75 - 90} \quad F2 = \frac{Tg\ Abs\ am}{Tg\ Abs\ cn}$$

Onde, Abs cn: absorvância mensurada para o controle negativo; Abs am: absorvância mensurada para a amostra; %I: porcentagem de inibição da lipoperoxidação; tg: tangente.

4.4.3.5 Inibição da formação de malondialdeído

Considerando o método descrito por Osa (2005), com algumas modificações, a determinação da peroxidação lipídica por meio da quantificação de malondialdeído (MDA) foi avaliada. Foram utilizadas as concentrações de 7, 15 e 30 µg/mL, para o EEPC e BHT (controle positivo), ambos solubilizados em metanol. Como controle negativo foi utilizado apenas o metanol, sem adição de amostra. Inicialmente, foram preparados os homogenatos para cada amostra contendo em um béquer 25 g de carne moída, 17 mL de água destilada e as respectivas amostras já solubilizadas em metanol. Em seguida, os homogenatos foram aquecidos em chapa aquecedora até o surgimento dos primeiros sinais de cozimento da carne. Nesse momento o volume de água foi completado q.s.p 100 mL e realizou-se a homogeneização. Posteriormente, os homogenatos foram transferidos para um frasco âmbar, vedado e foram armazenados sob refrigeração por 8 dias.

Nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 foram realizadas as leituras das absorvâncias das amostras, a fim de realizar a quantificação de MDA. Para essa leitura, em um tubo de ensaio, adicionou-se 0,5 g de homogenato, 50 µL de BHT, 2,5 mL de ácido fosfórico à 1% e 1,25 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA). Essas soluções foram aquecidas por 15 min à 100 °C em banho maria e resfriadas por 10 min em banho de gelo. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de butanol e os tubos foram centrifugados à 4000 rpm por 5 min. Em uma placa de 96 poços, foram adicionadas alíquotas de 200 µL do sobrenadante de cada tubo de ensaio e foi realizada a leitura em espectrofotômetro (UV-Vis ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2) à 535

nm. A partir da curva padrão de MDA, que foi realizada, a quantidade de MDA formada em cada amostra foi quantificada em triplicata.

4.4.4 Determinação da atividade antimicrobiana de EEPC

4.4.4.1 Linhagens bacterianas e fúngicas

Com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de EEPC, foram selecionadas diversas linhagens de bactérias e fungos, incluindo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 0016™; *Staphylococcus aureus* resistente aos antibióticos convencionais ATCC® 33591™; *Escherichia coli* ATCC® 10536™; *Candida albicans* sensível aos antifúngicos convencionais ATCC® 24433™ e *Candida albicans* resistente a anidulafungina, voriconazol, itraconazol e fluconazol ATCC® 10231™.

4.4.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As linhagens bacterianas foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas à 37 °C por 24 h, baseado no protocolo descrito pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2017; 2018). Por sua vez, as linhagens fúngicas foram cultivadas em ágar Sabouraud e incubadas à 35 °C, também por 24 h, seguindo o mesmo protocolo. O EEPC foi diluído água destilada e em 1:1 DMSO e TWEEN a 1% até obter uma solução estoque de EEPC à 2,5 mg/mL.

Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 100 µL de caldo *Roswell Park Memorial Institute* – 1640 (RPMI-1640) nas placas destinadas aos testes com fungos, enquanto o mesmo volume de caldo Muller-Hinton (MH) foi adicionado nas placas destinadas para o cultivo das bactérias. Posteriormente, em ambas as placas, adicionou-se 80 µL da solução estoque de EEPC, seguido de uma diluição sucessivas, com o intuito de obter concentrações que variam de 1000,0 a 62,5.

Para prepara o inóculo, utilizou-se uma diluição na proporção de 1:99 a partir de uma suspensão contendo 10⁶ UFC/mL, de acordo com a escala turbidimétrica padrão de 1 McFarland para as bactérias e de 0,5 McFarland para os fungos. Para completar os poços, adicionou-se 20 µL do inóculo preparado, resultando em uma concentração de 10³ UFC/mL em cada poço com fungos e 10⁵ UFC/mL em cada poço com bactéria. Simultaneamente, foi adicionado em um poço apenas o caldo, RPMI ou MH, água estéril e o microrganismo, para ter controle de crescimento. Em outro poço foi confeccionado o branco do experimento, utilizando apenas caldo RPMI-1640 ou MH e as concentrações de EEPC.

As placas destinadas ao cultivo de bactérias, foram incubadas por 24 h a 37 °C, enquanto as placas destinadas aos fungos, foram incubadas à 35 °C por 24 h, antes de proceder-se a leitura. Após o período de incubação, analisa-se a presença de turvação em cada poço com microrganismo, caso o meio esteja turvo considera-se que houve crescimento microbiano, caso esteja límpido considera-se que não aconteceu crescimento em decorrência da presença do extrato. A concentração inibitória mínima (CIM) corresponde à concentração mínima de extrato que não apresentou turvação no meio, ou seja, não teve crescimento microbiano. O experimento foi realizado em triplicata.

4.4.4.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM)

A determinação concentração bactericida mínima (CBM) e da concentração fungicida mínima (CFM), após a definição dos valores definidos da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada de acordo com o método de Spencer e Spencer (2004), com algumas modificações.

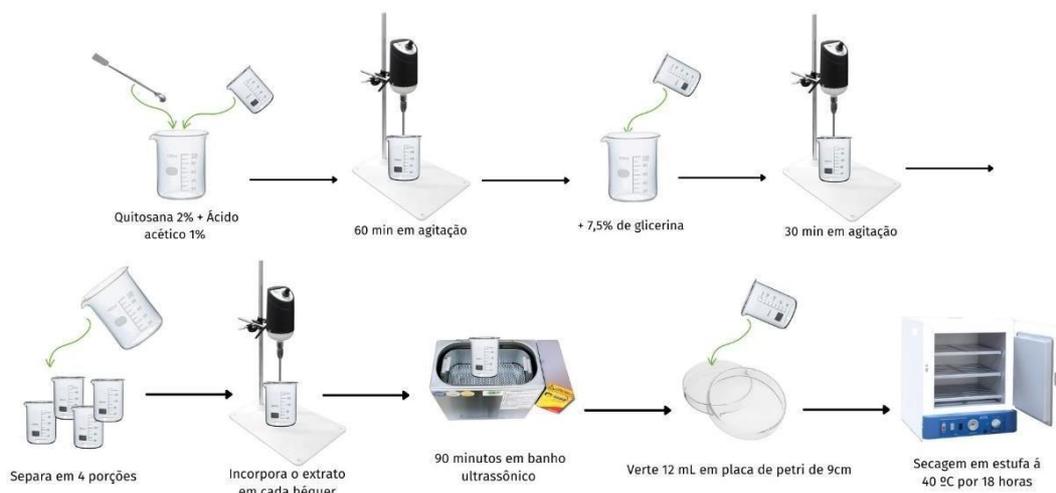
Nos poços em que não foi possível visualizar o crescimento microbiano, retirou-se uma alíquota de 10 µL, que foi cultivada placas de ágar Mueller-Hinton (para bactérias) ou Sabouraud (para fungos), as quais foram subsequentemente incubadas por 24 h a 37 °C e 35 °C, respectivamente.

Após esse período, as amostras que não apresentaram crescimento de colônias foram classificadas consideradas fungicida ou bactericida. Em contrapartida, as amostras que apresentarem o crescimento de alguma colônia foram consideradas fungistática ou bacteriostática.

4.5 - DESENVOLVIMENTO DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EEPC

Os filmes de quitosana foram obtidos através da técnica de evaporação de solvente, segundo a metodologia de Escárcega *et al.*, (2018), com algumas modificações. Inicialmente, foi preparada uma solução precursora base contendo quitosana a 2% (p/v) em ácido acético 1% (v/v). Essa solução foi agitada durante 60 min em um agitador mecânico (Fisatom®) a 1100 rotações/min, aproximadamente, em temperatura ambiente (Figura 5).

Figura 5 - Esquema ilustrado da formulação dos filmes de quitosana com extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* (EEPC).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Após esse tempo, foi adicionada glicerina 7,5% (v/v) e a agitação continuou por mais 30 min. EEPC foi então solubilizado em 2 mL de etanol em diferentes concentrações (Tabela 1) e a solução base foi dividida em 4 frações para a incorporação das diferentes concentrações. Para fins comparativos, foi preparado filme branco, contendo apenas 2 mL de etanol, o solvente utilizado para solubilização do extrato.

Tabela 1 – Concentração dos constituintes dos filmes de quitosana com extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* (EEPC).

Amostra	Quitosana (% p/v)	Glicerina (% v/v)	EEPC (% p/v)
SEEPC	2	7,5	-
EEPC 1%	2	7,5	1
EEPC 2,5%	2	7,5	2,5
EEPC 5%	2	7,5	5

SEEPC: Filmes de quitosana sem a incorporação de extrato; EEPC 1: Filmes de quitosana contendo o extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* na concentração de 1% (p/v); EEPC 2: Filmes de quitosana contendo o

extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* na concentração de 2,5% (p/v); EEPC 5: Filmes de quitosana contendo o extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* na concentração de 5% (p/v).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Após a incorporação do extrato, as soluções foram desgaseificadas utilizando o banho ultrassônico por 90 min em temperatura ambiente. Por fim, foram vertidos 12 mL de cada solução em placas de Petri de 9 cm de diâmetro e estas foram secas à 40 °C em estufa durante 18 h.

4.6 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EEPC

4.6.1 - Caracterização físico-química das soluções precursoras dos filmes de quitosana contendo EEPC

4.6.1.1 Determinação dos parâmetros reológicos das soluções precursoras dos filmes de quitosana contendo EEPC

O comportamento reológico das soluções precursoras dos filmes foi determinado por meio de um reômetro automatizado DHR1 da T.A. Instruments. Após a varredura da tensão de cisalhamento, medindo a viscosidade das soluções obtém-se a curva de fluxo e de viscosidade de cada amostras. Com esses parâmetros, é avaliado o perfil newtoniano ou não newtoniano das amostras. O experimento foi realizado utilizando geometria placa-placa, *gap* de 1000 μm , taxa de cisalhamento variando de 1 até 500 s^{-1} a 25 °C. O tratamento de dados foi executado com auxílio do software Microcal Origin 9.0[®] (LANNA *et al.*, 2015).

4.6.1.2 Determinação da condutividade elétrica e potencial zeta (PZ) das soluções precursoras dos filmes

A condutividade elétrica e o potencial zeta das soluções precursoras dos filmes de quitosana contendo EEPC foram avaliados segundo a técnica padrão Malvern velocimetria por laser doppler (*Laser Doppler Velocimetry*) acoplado com “M3-PALS análise de fase por espalhamento de luz (*Phase Analysis Light Scattering*)”. Utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries da Malvern (modelo Nano-ZS90), as amostras foram inseridas em uma cubeta capilar de polietileno acoplada a eletrodos, considerando um ângulo de espalhamento de luz de 173°. O tratamento de dados foi realizado no software Microcal Origin 9.0[®] e o valor de potencial zeta e de condutividade foi calculado com a média de cinco medidas independentes com cinco contagens cada (LANNA *et al.*, 2015).

4.6.1.3 Distribuição do tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das soluções precursoras dos filmes

Utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries da Malvern, foi determinado o tamanho dos agregados moleculares de cada solução precursora dos filmes, por meio de um módulo fotométrico de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Considerando uma temperatura de 25 °C, as amostras foram inseridas na cubeta de polietileno de 1 cm de caminho óptico e submetidas ao feixe de luz monocromático (Laser He-Ne de 4 mW e comprimento de onda de 633 nm) com intensidade de luz espalhada a um ângulo de 90°. Após dez medidas independentes com dez contagens cada, foi calculado a média e posteriormente, determinado o valor do diâmetro hidrodinâmico (Dh). O tratamento de dados foi executado com auxílio do software Microcal Origin 9.0® (LANNA *et al.*, 2015).

4.6.2 Caracterização físico-química dos filmes de quitosana contendo EEPC

4.6.2.1 Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de quitosana contendo EEPC

Os filmes de quitosana incorporados com EEPC nas diferentes concentrações e o filme de quitosana sem a incorporação de extrato foram recortados em quadrados de 1 x 1 cm e avaliados através da microscopia eletrônica de varredura. Utilizando o equipamento MEV (JEOL JSM-6390LV, Tóquio, Japão), os filmes foram fixados com fita de carbono no suporte do equipamento e analisados em baixo vácuo. Com o objetivo de avaliar a homogeneidade, bem como a presença de bolhas e aglomerados na superfície, os filmes foram avaliados utilizando um aumento de 200x e de 1000x. Além disso, foi possível observar a lateral de todos os filmes, considerando um aumento de 1500x.

4.6.2.2 Estudo de liberação dos filmes

A fim de entender sobre o processo de liberação dos constituintes da formulação, procedeu-se à realização do perfil de liberação dos filmes de quitosana contendo as diferentes concentrações de EEPC. Como veículo do experimento foi utilizado um fluido simulador de feridas constituído por 0,68 g de NaCl, 0,22 g de KCl, 2,5 g de NaHCO₃ e 0,35 g de NaH₂PO₄ em 100 mL de água destilada com pH 7,4. Tubos falcon foram utilizados como suporte, a fim de manter os filmes na superfície do líquido, com apenas uma face em contato (efeito unidimensional). Então, os filmes

foram recortados em tamanhos que cobriam completamente a abertura dos tubos e foram fixados de modo que ficassem estáveis (Figura 6).

Figura 6 - Imagem demonstrando o suporte com tubo falcon para análise dos filmes no sistema de liberação.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Com o objeto de determinar o volume necessário de fluido para que cada amostra consiga liberar os compostos de maneira íntegra, foi realizado o cálculo da condição *sink* para o extrato. Então, com o volume necessário para que a liberação aconteça de forma plena, os filmes permaneceram em contato com o líquido por um total de 480 min.

Durante esse intervalo de tempo, foram retiradas alíquotas a cada 20 min durante a primeira hora, a cada 30 min na segunda hora e, posteriormente, em intervalos de 1 h. Para manter as condições ideais, todo o sistema foi mantido em banho maria com a temperatura controlada a $34\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e agitada a uma velocidade constante de 500 rpm (Figura 7).

Figura 7 - Esquema ilustrado do estudo de liberação dos filmes de quitosana com extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* (EEPC).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Em cada coleta, foram retiradas alíquotas de 500 µL do béquer contendo o fluido simulador que estava em contato com o filme. Posteriormente, o mesmo volume retirado foi substituído por uma quantidade equivalente de fluido simulador de feridas fresco. Para diluição das alíquotas, adicionou-se um volume de 1500 µL do fluido simulador de feridas fresco. As amostras resultantes foram então submetidas à análise na faixa de espectro de 200 a 400 nm, utilizando um espectrofotômetro (ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2), com o objetivo de identificar possíveis compostos derivados de EEPC liberados no sistema.

Este procedimento foi realizado em triplicata, considerando três amostras diferentes dos filmes. Para a determinação da porcentagem de extrato liberada em cada alíquota, foi realizado uma curva padrão com o EEPC em diferentes concentrações e a partir da equação da reta obtida foram realizados os cálculos.

A fim de compreender mais sobre os compostos liberados durante o estudo de liberação, as alíquotas retiradas a cada coleta foram utilizadas no ensaio de doseamento de compostos fenólicos. O doseamento de compostos fenólicos foi realizado baseado na metodologia de Folin (1927), conforme realizado com o extrato bruto. A metodologia procedeu-se da mesma maneira que o item 4.3.1. Em substituição a amostra de extrato, foram utilizadas as alíquotas retiradas do estudo de

liberação referente a cada hora. Como branco do experimento foi utilizado o fluido simulador de feridas em substituição à amostra.

4.6.2.3 - Determinação do peso médio dos filmes

A determinação do peso médio dos filmes de quitosana foi realizada através da pesagem individual de dez amostras de cada filme, recortados em dimensões de 1,5 cm x 1,5 cm. Toda a pesagem aconteceu em balança eletrônica analítica modelo AY220. Os valores foram reportados em valor médio \pm desvio padrão (SHAH *et al.*, 2019).

4.6.2.4 Determinação da espessura dos filmes

Utilizando-se de um micrômetro digital Insize 3109-25 com 0-25 mm de precisão na faixa, foi determinada a espessura de todas as diferentes amostras de filmes. As análises foram realizadas com dez amostras de cada filme, recortados em dimensões de 1,5 x 1,5 cm, avaliando três pontos distintos no filme e o valor de espessura foi reportado em médio \pm desvio padrão (DEVI *et al.*, 2017).

4.6.2.5 Determinação da umidade

Utilizando um método gravimétrico, seguindo a metodologia proposta por Shah *et al.* (2019), a umidade dos filmes de quitosana foi determinada. Os filmes foram recortados em dimensões de 1,5 x 1,5 cm, pesados em balança analítica modelo AY22 (Pi) e em seguida, armazenados por 24 h em estufa de circulação forçada de ar à 105 °C. Passado as 24 h, os filmes foram pesados novamente (Pf). A porcentagem de umidade foi determinada através de uma equação e o experimento foi realizado em triplicata.

$$Umidade (\%): \frac{(P_i - P_f) * 100}{P_i}$$

Onde: Pi: peso inicial dos filmes e Pf: peso final dos filmes.

4.6.2.6 Determinação do grau de intumescimento e solubilidade dos filmes

O grau de intumescimento dos filmes foi avaliado seguindo a metodologia de Pansara *et al.* (2020), com algumas modificações. Inicialmente, os filmes foram recortados em dimensões de 1,5 x 1,5 cm e pesados em balança analítica modelo

AY22 (P0). Em seguida, foram submersos em um fluido simulador de feridas, mantido à temperatura de 32 °C, por um período de 8 h. Após a imersão, os filmes foram removidos da solução com auxílio de uma pinça, colocados sobre um papel de filtro por 1 min para retirar o excesso de água e, posteriormente, pesados novamente (Pi) em intervalos de tempo predefinidos: 1, 2, 4, 6 e 8 h. O experimento foi realizado em triplicata e o grau de intumescimento dos filmes foi calculado conforme a equação:

$$\text{Intumescimento (\%)}: \frac{P_i - P_0 * 100}{P_0}$$

Onde: Pi: peso dos filmes intumescidos e P0: peso inicial dos filmes.

Ao final da determinação do grau de intumescimento foi realizado a determinação do grau de solubilidade dos filmes, de acordo com a metodologia proposta por Escárcega e colaboradores (2018), com algumas modificações. Os filmes foram retirados do fluido e permaneceram durante 24 h na estufa de secagem à 60 °C. Ao completar as 24 h, todas as amostras foram pesadas novamente (Ps). O experimento foi realizado em triplicata e o grau de solubilidade foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Solubilidade (\%)}: \frac{(P_0 - P_s) * 100}{P_0}$$

Onde: P0: peso inicial dos filmes e Ps: peso dos filmes após a secagem.

4.6.2.7 Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TGA) dos filmes

O perfil térmico dos filmes de quitosana foi realizado em comparação com o extrato bruto (EEPC) e a quitosana pura, por meio da obtenção das curvas de TGA/DTA de cada amostra. Utilizando o analisador termogravimétrico simultâneo TGA/DTA (HITACHI modelo STA7200RV), com fluxo de ar de 300 mL/min, com razão de aquecimento de 30 °C/min, com massa de 2 mg aproximadamente e variando a temperatura desde a ambiente até 1000 °C. O tratamento de dados foi executado com auxílio do software Microcal Origin 9.0® (LANNA *et al.*, 2015).

4.6.2.8 Espectroscopia eletrônica vibracional na região do infravermelho dos filmes

Para avaliar as possíveis interações intermoleculares entre os componentes do extrato com a quitosana, utilizou-se o espectrofotômetro Bruker Alpha FTIR para realizar o ensaio de espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os filmes de quitosana foram avaliados no modo de refletância total atenuada. Foram obtidos os espectros após uma média de 64 varreduras consecutivas, com resolução de 4 cm^{-1} e intervalo de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . Os dados foram exportados e tratados com auxílio do software Microcal Origin 9.0®.

4.6.2.9 Análise dinâmico mecânica nos modos axial e rotacional dos filmes dos filmes

O comportamento reológico dos filmes foi avaliado baseado nas análises dinâmico mecânicas, utilizando um reômetro automatizado DH1 da T.A. Instruments acoplado ao acessório de DMA de fixação linear. Os filmes foram fixados ao acessório do equipamento e submetidos a uma tração com velocidade de 1000 $\mu\text{m/s}$ constante até a sua ruptura, para o ensaio de tração. Para o ensaio em modo tangencial, os filmes foram fixados no acessório com um gap de 3 cm e submetidos à uma rotação com velocidade angular de 1 rad/s. Os experimentos foram realizados em triplicata, construindo um gráfico de tensão x *gap* (modo axial) e tensão x ângulo (modo rotacional) de cada amostra em relação ao filme branco (sem extrato). Os dados foram tratados utilizando o software TRIOS e posteriormente exportados para software Microcal Origin 9.0® (ALTIOK *et al.*, 2010).

4.7 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EEPC

4.7.1 Determinação da atividade citotóxica dos filmes

4.7.1.1 Ensaio de redução metabólica do MTT em macrófagos

O ensaio de redução metabólica do MTT foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Monmann (1983), com o objetivo de avaliar a citotoxicidade dos filmes de quitosana com e sem EEPC. Foram utilizados macrófagos intraperitoneais de camundongos BALB/c, os quais foram cultivados nas mesmas condições descritas no item 4.4.1.1.1. Os filmes foram recortados em dimensões de

0,2 cm x 0,2 cm e acrescentados aos poços. Posteriormente, as placas foram reincubadas por mais 48 h e o experimento procedeu-se nas mesmas condições do item 4.4.1.1.2.

4.7.1.2 Ensaio de redução metabólica do MTT em fibroblastos

Foi realizado o ensaio de MTT, de acordo com a metodologia proposta por Monmann (1983), utilizando da linhagem L929 de fibroblastos com o objetivo de verificar a citotoxicidade das diferentes amostras de filmes sobre essas células. Inicialmente, os fibroblastos foram cultivados de acordo com o item 4.4.1.2.1. Todas as amostras de filmes foram recortadas em quadrados de 0,2 cm x 0,2 cm e acrescentados aos poços destinados aos tratamentos das células. Todo o experimento procedeu-se nas mesmas condições já descritas no item 4.4.1.2.2.

4.7.2 Determinação da atividade anti-inflamatória dos filmes

4.7.2.1 Ensaio de dosagem de óxido nítrico (NO)

Os filmes foram recortados em quadrados de 0,2 x 0,2 cm, com o objetivo de atingir a concentração de 1 mg de extrato no filme de maior concentração. Estes filmes foram utilizados para a determinação da produção de óxido nítrico baseado no método de Griess (SUN *et al.*, 2003), com adaptações. O experimento procedeu-se da mesma maneira que o item 4.4.2.1, substituindo a adição de EEPC no poço pelos filmes recortados. A quantificação de óxido nítrico (μM) foi determinada mediante comparação com uma curva padrão de diluição seriada de solução de nitrito de sódio (GUEVARA *et al.*, 1998).

4.7.2.2 Ensaio de dosagem de citocina pró-inflamatória Interleucina-6

A quantificação da citocina pró-inflamatória interleucina-6 (IL-6) foi realizada utilizando os filmes previamente cortado nas mesmas dimensões anteriores (0,2 x 0,2 cm). Macrófagos intraperitoneais foram transferidos para placas de cultura de 24 poços e submetidos ao tratamento com os filmes por um período de 6 h. Após essa etapa, o experimento procedeu-se da mesma maneira que o item 4.4.2.3. A concentração de IL-6 (pg/mL) foi determinada pela comparação das medidas de absorbância a 450 nm em um espectrofotômetro com a curva.

4.7.3 Determinação da atividade antioxidante dos filmes

4.7.3.1 Método de sequestro de radical livre DPPH•

De acordo com a metodologia proposta por Saadat e colaboradores (2022), com algumas alterações, foi determinada a atividade sequestrante de radicais DPPH pelos filmes de quitosana. Os filmes de quitosana foram recortados em quadrados de 0,4 x 0,4 cm (área correspondente a 1 mg de extrato considerando o filme de maior concentração) e armazenados em eppendorf. Em cada filme, foram adicionados 1500 µL de metanol e os eppendorfs permaneceram em repouso por 24 h à 35 °C. Passado as 24 h, foram retirados 100 µL do sobrenadante de cada amostra e adicionado em uma microplaca de 96 poços. Juntamente com o sobrenadante, foram adicionados mais 150 µL da solução reagente de DPPH à 20 µg/mL em metanol.

Para o controle do experimento, foram realizados poços com 100 µL de metanol e 150 µL da solução reagente de DPPH como o controle positivo. Poços com 100 µL do sobrenadante e 150 µL de metanol, como controle negativo da amostra. Além disso, foram realizados poços de controle negativo, com apenas 200 µL de metanol. A microplaca permaneceu incubada por 30 min, ao abrigo da luz e posteriormente realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (UV-Vis ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2) à 517 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e o experimento foi realizado em triplicata.

4.7.3.2 Método de redução do complexo de fosfomolibdênio

A fim de avaliar o potencial de redução do complexo fosfomolibdênio dos filmes de quitosana, a metodologia proposta por Prieto *et al.* (1999) foi adaptada. Os filmes de quitosana foram recortados em quadrados de 0,4 x 0,4 cm e armazenados em eppendorfs. Adicionou-se 750 µL de metanol e 750 µL de água em cada amostra e os filmes permaneceram em repouso por 24 h à 35 °C.

No dia seguinte, foi preparada a solução reagente composta por solução de fosfato, solução de molibdato e ácido sulfúrico. De cada eppendorf, foram retirados 400 µL do sobrenadante e adicionados 300 µL de água e 300 µL de metanol em cada amostra. Em seguida, em tubos de ensaio, foram adicionados 300 µL da solução preparada com o sobrenadante dos filmes e 2 mL da solução reagente.

Como controle da amostra, preparou-se o controle negativo da amostra, onde a solução reagente foi substituída por metanol e o controle negativo do experimento,

onde a amostra foi substituída por metanol e água. Os tubos foram fechados e aquecidos em banho maria por 90 min à 95 °C e em seguida, resfriados em banho de gelo.

Em seguida, todas as soluções foram adicionadas em placas de 96 poços e realizou-se a leitura em espectrofotômetro (UV-Vis ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2) à 695 nm. Todo o experimento foi realizado em triplicata, considerando todas as amostras de filme. Os valores foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante relativa (AAR%) ao ácido ascórbico, quercetina e rutina, considerando a média e o desvio padrão (NEGRI *et al.*,2009), determinada através da seguinte equação:

$$AAR\% = \frac{Abs (amostra) - Abs (branco amostra)}{Abs (controle positivo) - Abs (branco controle positivo)} \times 100$$

Onde, Abs (controle positivo): absorvância mensurada pelos controles positivos ácido ascórbico, quercetina e rutina; Abs(amostra): absorvância mensurada para as amostras; Abs(branco amostra): absorvância mensurada para o branco das amostras; e Abs(branco controle positivo): absorvância mensurada para o branco dos controles positivos.

4.7.4 Determinação da atividade antimicrobiana dos filmes

4.7.4.1 Linhagens bacterianas e fúngicas

A fim de verificar a atividade antimicrobiana do extrato das folhas de *Plinia cauliflora*, as seguintes linhagens de bactérias e de fungos foram selecionadas: *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 0016™; *Staphylococcus aureus* resistente aos antibióticos convencionais ATCC® 33591™; *Escherichia coli* ATCC® 10536™; *Candida albicans* sensível aos antifúngicos convencionais ATCC® 24433™ e *Candida albicans* resistente a anidulafungina, voriconazol, itraconazol e fluconazol ATCC® 10231™.

4.7.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes

Para verificar a atividade antimicrobiana dos filmes de quitosana, a metodologia proposta pelo CLSI (2017; 2018) de avaliação da concentração inibitória mínima foi adaptada. Inicialmente, as cepas de microrganismos foram repicadas e incubadas. Após esse processo, as suspensões dos microrganismos foram transferidas para os

tubos até obter uma densidade óptica compatível com a escala de McFarland para a preparação do inóculo, com o objetivo de obter um inóculo com 10³ UFC/mL em cada poço com fungos e 10⁵ UFC/mL em cada poço com bactéria.

Em microplaca de 96 poços, foram adicionados 100 µL de caldo RPMI ou MH, a depender dos microrganismos, uma amostra de filme recortada em círculos de 0,4 cm de diâmetro e 20 µL do inóculo. Como controle de crescimento do experimento foi feito um poço com apenas caldo RPMI ou MH, água estéril e microrganismo. Como controle positivo de tratamento, foram adicionados nos poços discos de nistatina para fungos e de ciprofloxacino para as bactérias. As placas foram incubadas por 24 h, sendo as que continham bactérias à 37 °C e as que continham fungos à 35 °C.

Após as 24 h, foram retiradas alíquotas de 150 µL de cada poço e transferidos para uma nova microplaca de 96 poços, seguindo a mesma localização de cada amostra. Essa transferência teve o objetivo de retirar os filmes dos poços para a futura leitura no espectrofotômetro. Ao finalizar, foi realizada a leitura da placa a 600 nm em um espectrofotômetro (UV-Vis ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2). Todo o experimento foi realizado em triplicata para cada amostra de filme.

Após a leitura em espectrofotômetro, as absorbâncias foram avaliadas de acordo com a metodologia descrita por Balkrishna e colaboradores (2022). O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento microbiano após o tratamento com os filmes foi realizado de acordo com a equação:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \frac{(Ac - At)}{Ac * 100}$$

Onde, Ac: Absorbância do controle de crescimento; At: absorbância do poço com amostra.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram submetidos à análise estatística, baseada no teste de análise de variância (ANOVA) e posteriormente avaliado no teste de Bonferroni, através do programa GraphPrism 5.0. Os resultados são apresentados em relação à média ± desvio padrão de cada experimento. Foi considerado significativo os resultados com $p < 0,05$, indicando um intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE EEPC

5.1.1 - Teor de fenóis totais, taninos e flavonoides

Através de relatos encontrados na literatura, acredita-se que EEPC seja rico em compostos fenólicos, taninos e flavonoides (NEVES *et al.*, 2021, DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2010). Os compostos como ácido gálico, a quercetina e a rutina são amplamente detectados nas folhas dessa espécie (GARCIA *et al.*, 2019). Esses compostos são de suma importância na espécie, pois são compostos que estão associados diretamente à atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2013; PAULA *et al.*, 2021; GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2019).

Compostos fenólicos são característicos e majoritários na espécie (GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2019). Souza Moreira e colaboradores (2010) determinaram que o conteúdo fenólico foi maior de 45% em extratos etanólico das folhas de EEPC. Conforme o resultado apresentado pelo EEPC (Tabela 2), verifica-se que todas as classes de compostos estão presentes no extrato de maneira significativa.

Tabela 2 - Dosagem de fenóis totais, taninos e flavonoides no extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*.

	Fenóis Totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ em equivalente de ácido tânico)	Taninos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ em equivalente de ácido tânico)	Flavonoides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ em equivalente de rutina)
EEPC	310,42 \pm 8,75	108,56 \pm 0,39	36,80 \pm 3,44

EEPC – Extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Diversos compostos já foram detectados e isolados nas folhas da espécie. Souza-Moreira e colaboradores (2010), identificaram a presença de diversos taninos, como o ácido gálico e elágico, representando 509 mg/g de taninos totais na folha. Além disso, o mesmo grupo identificou posteriormente a presença de casuarinina, um tanino hidrolisável no extrato das folhas e a presença de flavonoides glicosilados, como a quercetina e miricetina (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2013; 2018).

Através da cromatografia líquida de alta eficiência juntamente com espectrometria de massas, a composição fenólica do extrato das folhas dessa espécie já foi elucidada pelo nosso grupo de pesquisa. Foram identificados 22 compostos, dentre eles ácido quínico, gálico e elágico, castalagina e casuarictina. Além disso, flavonoides como a quercetina, miricetina e miricitrina também foram identificados (PAULA *et al.*, 2021).

Conforme relatado na literatura e encontrado nos resultados apresentados, o extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* é rico em compostos fenólicos, taninos e flavonoides.

5.2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE EEPC

5.2.1 Determinação da citotoxicidade

5.2.1.1 Análise da viabilidade celular *in vitro*

Para avaliar o potencial de segurança do EEPC em uso humano, é crucial determinar sua toxicidade em células do organismo. Independentemente do seu potencial biológico, uma substância promissora não deve ser tóxica para as células (ROGERO *et al.*, 2003). Para isso, realizou-se o ensaio de viabilidade celular com MTT em linhagens de macrófagos intraperitoneais de camundongos BALB/c e em fibroblastos L929.

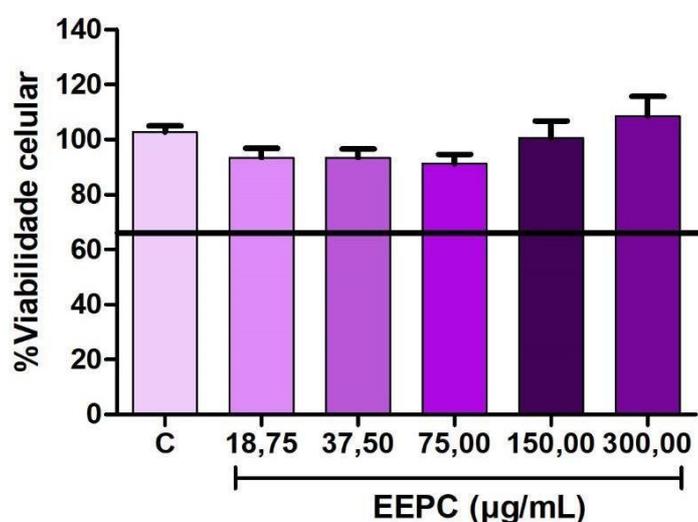
Este ensaio permite avaliar a sobrevivência celular, uma vez que apenas em células metabolicamente ativas acontece a redução do MTT em cristais de formazan (KUMAR *et al.*, 2018). De acordo com as diretrizes previstas pela Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization - ISO10993-5, 2009), no ensaio de MTT, considera-se um percentual de viabilidade celular aceitável quando os valores se situam acima de 70%.

As linhagens celulares escolhidas para a verificação da citotoxicidade de EEPC estão ligadas ao processo de cicatrização de feridas. Os macrófagos são indispensáveis ao longo de toda a fase inflamatória e os fibroblastos atuam ativamente na produção e degradação de colágeno durante a cicatrização de lesões (XAVIER, 2022). Portanto, compreender a toxicidade de EEPC frente à essas células, é indispensável para a sua utilização de maneira tópica.

De acordo com a Figura 8, podemos analisar que a viabilidade celular se manteve adequada frente aos macrófagos, independente das diferentes

concentrações testadas, que variaram entre 300,00 e 18,75 $\mu\text{g/mL}$. Indicando, portanto, que não houve toxicidade nas diferentes concentrações de EEPC frente aos macrófagos.

Figura 8 - Avaliação do perfil de viabilidade celular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* em diferentes concentrações frente a macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

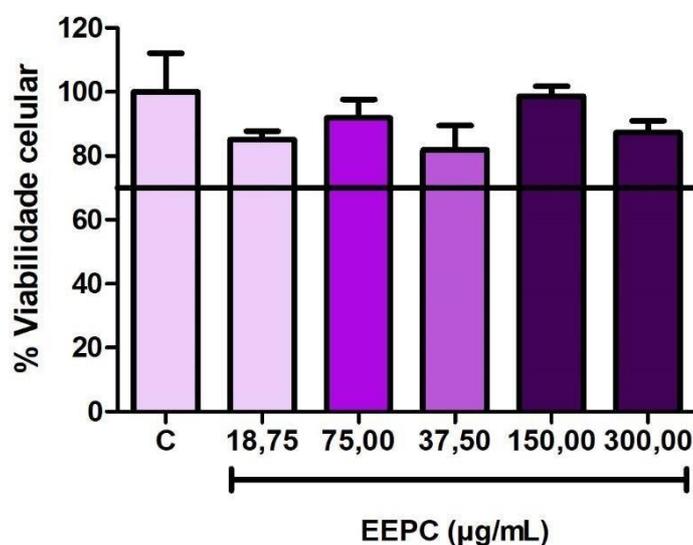


Cultura de macrófagos tratados com diferentes concentrações de EEPC (de 300,00 $\mu\text{g/mL}$ à 18,75 $\mu\text{g/mL}$), onde C= Controle e EEPC= Extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A figura 9 apresenta a porcentagem de viabilidade celular de fibroblastos L929 após entrar o tratamento com as diferentes concentrações de extrato. Observa-se que apesar das variações, a viabilidade celular se manteve adequada nas diferentes concentrações. Portanto, após o tratamento com todas as concentrações de EEPC, a porcentagem de viabilidade celular permaneceu acima de 70%, classificando o extrato como não tóxico à essa linhagem.

Figura 9 - Avaliação do perfil de viabilidade celular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* em diferentes concentrações frente fibroblastos L929.



Cultura de fibroblastos L929 tratados com diferentes concentrações de EEPC (de 18,75 µg/mL à 300,00 µg/mL), onde C= Controle e EEPC= Extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Paula e colaboradores (2023) encontraram resultados semelhantes no ensaio de MTT, onde EEPC apresentou uma viabilidade celular adequada frente a macrófagos. De acordo com as diretrizes previstas pela ISO10993-5 (2009), o ensaio de viabilidade celular é uma das etapas iniciais fundamentais na avaliação da biocompatibilidade de uma substância. É somente após a confirmação de sua baixa toxicidade que os estudos posteriores devem prosseguir. Portanto, com base nos resultados obtidos, pode-se inferir o EEPC não é tóxico para as linhagens testadas nas concentrações utilizadas, uma vez que a viabilidade celular permaneceu acima de 70%.

5.2.2 Determinação da atividade anti-inflamatória de EEPC

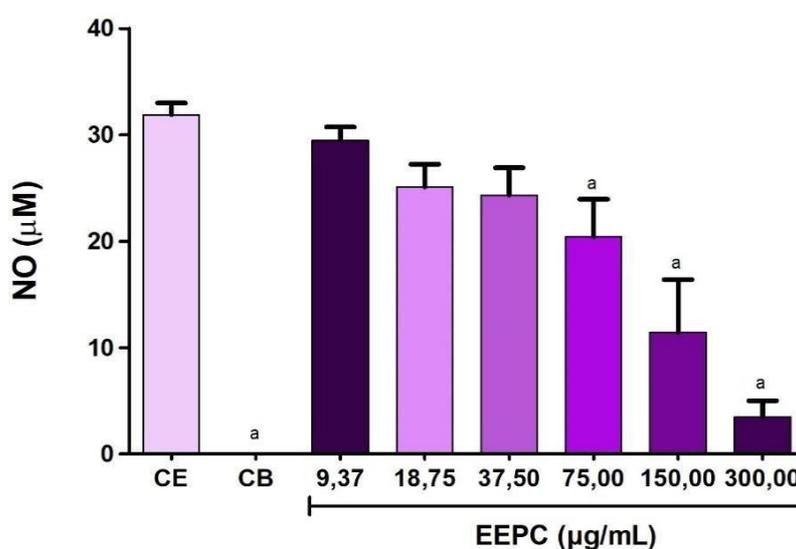
5.5.2.1 Ensaio de dosagem de óxido nítrico (NO)

Durante o processo inflamatório, muitas substâncias são produzidas a fim de mediar a inflamação, incluindo os radicais livres. Um exemplo notável é o óxido nítrico, formado a partir da L-arginina, geralmente sintetizado por macrófagos na fase inicial da cicatrização de feridas. O óxido nítrico desempenha um papel crucial na

inflamação, pois tem a capacidade de ativar enzimas ciclo-oxigenases 1 e 2, que, por sua vez, podem agravar ainda mais o processo inflamatório (WITTE *et al.*, 2002).

Para avaliar o potencial anti-inflamatório de EEPC, foi realizado o ensaio da dosagem de óxido nítrico utilizando as mesmas concentrações do extrato no ensaio de viabilidade celular. Os resultados obtidos (Figura 10) demonstram que EEPC, a partir da concentração de 9,37 $\mu\text{g/mL}$, é capaz de reduzir a produção de óxido nítrico quando comparado com o controle estímulo, porém apenas as concentrações de 300,00, 150,00 e 75,00 $\mu\text{g/mL}$ que tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$).

Figura 10 - Dosagem de óxido nítrico em macrófagos de camundongos BALB/c, após estímulo com LPS e IFN- γ e tratamento com extrato etanólico de *Plinia cauliflora* em diferentes concentrações.



Legenda: CE= Controle-estímulo; CB= Controle Basal e EEPC= Extrato etanólico de *Plinia cauliflora*. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à CE.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na figura 10, podemos observar que com 300,00 $\mu\text{g/mL}$ foi possível reduzir em 89% da produção de NO em relação ao grupo controle estímulo, enquanto com 150,00 $\mu\text{g/mL}$ reduziu 64% e 75,00 $\mu\text{g/mL}$ reduziu em 36%. Esses resultados corroboram com o alto valor de compostos fenólicos descritos anteriormente, pois sabe-se que esses compostos possuem uma potente atividade anti-inflamatória (PAULA *et al.*, 2021).

Além de revelar o potencial anti-inflamatório de EEPC, os resultados apresentados na figura 10 indicam também um possível efeito antioxidante desse

extrato, uma vez que o óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa. Sabe-se que extratos vegetais ricos em polifenóis possuem um amplo efeito antioxidante, visto que esses compostos possuem uma capacidade elevada de estabilizar esses radicais livres (COELHO, 2017).

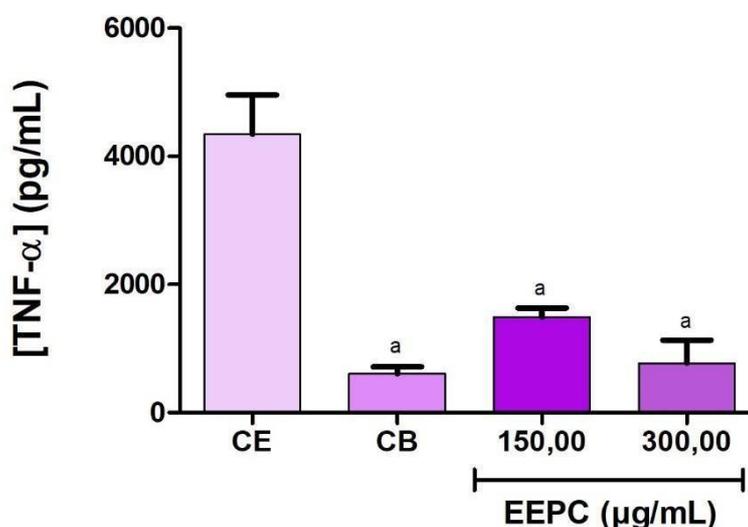
Considerando esses resultados promissores, as concentrações de EEPC com maior efeito na inibição de NO (300,00 e 150,00 µg/mL) foram escolhidas para serem utilizadas nos ensaios subsequentes.

5.5.2.2 Ensaio de dosagem de TNF α

O fator de necrose tumoral, também conhecido TNF α , é uma citocina pró-inflamatória, que atua nos processos de inflamação, proliferação, diferenciação e apoptose. É uma citocina expressa pelas células do sistema imune, como macrófagos, monócitos, células T e NK e encontrada principalmente na fase aguda de infecções, levando à ativação da cascata de produção de outras citocinas e aumentando a permeabilidade vascular. Por este motivo, é uma citocina de suma importância na resposta inflamatória (FERREIRA, 2015).

Portanto, uma das maneiras de avaliar o potencial anti-inflamatório de uma substância é através da dosagem da produção de TNF α *in vitro*. Os resultados (Figura 11) demonstram que todas as concentrações avaliadas reduziram significativamente ($p < 0.05$) a produção de TNF α em comparação com o grupo controle. A concentração de 300,00 µg/mL foi capaz de reduzir 74% o nível de produção de TNF α comparando com o controle, enquanto a concentração de 150,00 µg/mL reduziu aproximadamente 50%.

Figura 11 - Dosagem da produção de TNF α em macrófagos após estímulo com LPSe tratamento com extrato etanólico de *Plinia cauliflora* em diferentes concentrações.



Cultura de macrófagos tratados com diferentes concentrações de EEPC (300 µg/mL e 150 µg/mL), onde CE= Controle-estímulo; CB= Controle Basal e EEPC= Extrato etanólico de *Plinia cauliflora*. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à CE.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Acredita-se que o efeito apresentado pelo extrato acontece devido à sua composição rica em compostos fenólicos e flavonoides. Sabe-se que esses compostos apresentam um potencial efeito anti-inflamatório significativo devido à sua capacidade de atuar na inibição da produção de citocinas e enzimas pró-inflamatórias. Além de serem compostos potencialmente antioxidante e por consequência desse efeito atuar reduzindo os efeitos inflamatórios crônicos (PEREIRA *et al.*, 2021).

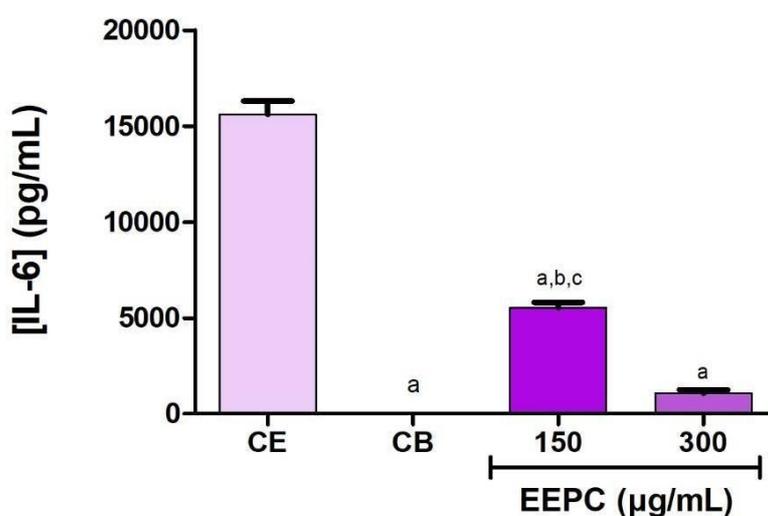
5.5.2.3 Ensaio de dosagem de citocina pró-inflamatória Interleucina 6

A interleucina 6 é uma citocina pró-inflamatória sintetizada pelos monócitos, fibroblastos e células endoteliais, que tem sua atuação principal durante a resposta imune inata e adaptativa. Por meio dela é possível controlar a produção de IL-1 e de TNF α . IL-6 está envolvida diretamente com atividades imunológicas, favorecendo a síntese de substâncias durante a fase aguda da inflamação (GOMES *et al.*, 2009).

Uma das maneiras de avaliar o potencial anti-inflamatório de uma amostra é por meio da mensuração de quanto essa substância pode reduzir a produção de IL-6. Com os resultados do ensaio de dosagem de IL-6 (Figura 12), pode-se observar que

nas duas concentrações o EEPC reduziu significativamente ($p < 0,05$) a produção dessa citocina em relação ao controle. Destaca-se a concentração de 300,00 $\mu\text{g/mL}$ que reduziu 95% a produção de IL6, quando comparado com o controle, enquanto a concentração de 150,00 $\mu\text{g/mL}$ reduziu 65% dessa produção.

Figura 12 - Dosagem da produção de IL-6 em macrófagos após estímulo com LPS e tratamento com extrato etanólico de *Plinia cauliflora* em diferentes concentrações.



Cultura de macrófagos peritoneais tratados com diferentes concentrações de EEPC (300 $\mu\text{g/mL}$ e 150 $\mu\text{g/mL}$), onde CE= Controle-estímulo; CB= Controle Basal e EEPC= Extrato etanólico de *Plinia cauliflora*. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à CE, b= diferença significativa em relação à CB e c= diferença significativa em relação à 300 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na literatura, muito se fala a respeito do potencial anti-inflamatório dos frutos dessa espécie. Em especial, a jabuticabina e ácido elágico possuem um grande potencial de inibição de citocinas pró-inflamatórias, como, por exemplo, a interleucina 8 (DASTMALCHI *et al.*, 2012). A quercetina, um dos componentes identificados dentre os flavonoides que compõe EEPC, possui amplos relatos na literatura do seu efeito potencial efeito anti-inflamatório, através da redução de IL-6 (OU *et al.*, 2020). Portanto, acredita-se que o efeito significativo na redução de IL-6 apresentado por EEPC aconteça em decorrência da grande quantidade de compostos fenólicos e flavonoides em sua composição.

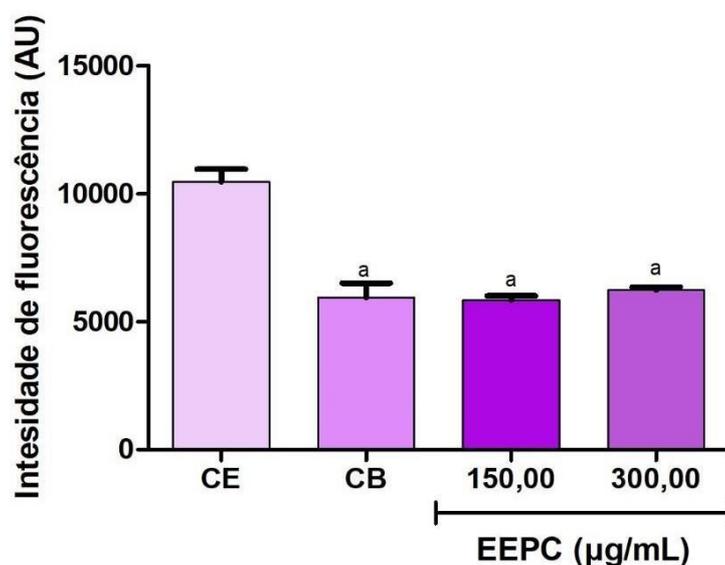
5.5.2.4 Ensaio de dosagem de corpúsculos lipídicos

Os corpúsculos lipídicos são organelas presentes nas células do organismo humano de forma fisiológica e desempenham um papel importante na sinalização celular, no metabolismo lipídico e na inflamação. Podem ser encontrados dentro dos leucócitos, em uma quantidade basal, mas caso essas células se envolvam em processos inflamatórios eles podem se tornar mais abundantes (SILVA *et al.*, 2014).

Por sua vez, essas organelas, além de se tornarem mais abundantes durante um processo inflamatório, possuem a função regulatória de vários eventos que acontecem durante a inflamação, promovendo a produção de outras citocinas e mediadores (VALLOCHI *et al.*, 2018). Portanto, uma das maneiras de favorecer o controle de um processo inflamatório pode acontecer por meio da redução do acúmulo dessas organelas.

A figura 13 apresenta a redução do acúmulo de corpúsculos lipídicos após o tratamento das células com EEPC. Pode-se observar que após o tratamento, as células reduziram significativamente ($p < 0,05$) o acúmulo de corpúsculos lipídicos nas duas concentrações testadas. A concentração de 300,00 $\mu\text{g/mL}$ reduz 40% o acúmulo de corpúsculos lipídicos, enquanto a concentração de 150,00 $\mu\text{g/mL}$ reduz 44%.

Figura 13 - Avaliação do acúmulo de corpúsculos lipídicos em macrófagos de camundongos BALB/c após estímulo com LPS e IFN- γ e tratamento com extrato etanólico de *Plinia cauliflora* em diferentes concentrações.



Cultura de macrófagos peritoneais tratados com diferentes concentrações de EEPC (300 $\mu\text{g/mL}$ e 150 $\mu\text{g/mL}$), onde CE= Controle-estímulo; CB= Controle Basal e EEPC= Extrato etanólico de *Plinia cauliflora*. Análise

estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à CE.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Observa-se que EEPC é capaz de reduzir significativamente a produção de corpúsculos lipídicos após o estímulo nas células, esses resultados corroboram com os resultados apresentados anteriormente. Sabe-se que compostos fenólicos e flavonoides atuam com uma atividade antioxidante e anti-inflamatória significativa, portanto, acredita-se que esses compostos sejam os responsáveis pelas atividades encontradas em todos os ensaios (PAULA *et al.*, 2021; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2013).

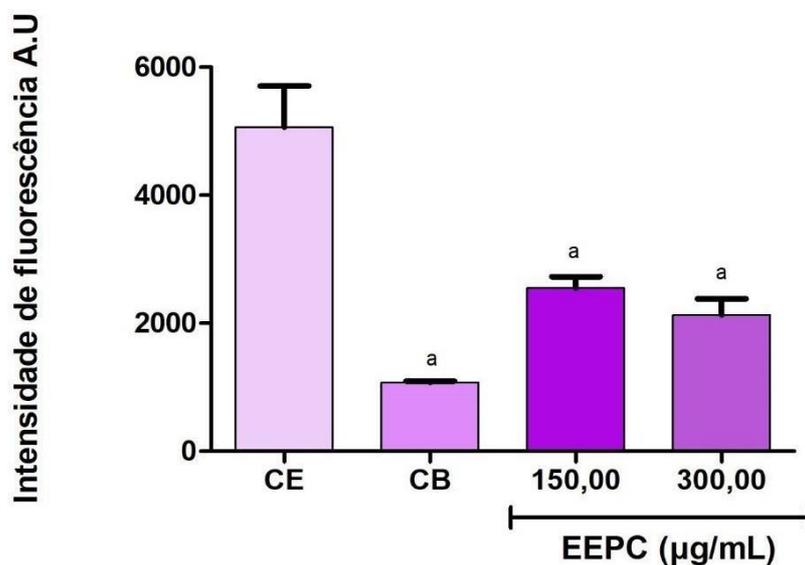
5.5.3 Determinação da atividade antioxidante de EEPC

5.5.3.1 Dosagem dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS)

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) é um processo fisiológico e contínuo no organismo humano. São essenciais e desempenham funções importantes no organismo, desde a geração de ATP à defesa durante processos inflamatórios (SEGAT, 2022). Porém, quando produzidas em excessos podem ser prejudiciais. Dessa forma, o organismo desenvolveu mecanismos de defesa antioxidante, a fim de limitar a sua produção e evitar possíveis danos (BARBOSA *et al.*, 2010). Quando a produção dessas espécies fica desbalanceada em contrapartida da presença de substâncias antioxidantes, acontece o processo de estresse oxidativo (IGHODARO *et al.*, 2018).

Portanto, uma das formas de avaliar o efeito antioxidante de determinada substância é através da avaliação da capacidade dessa substância de reduzir a produção de EROS. Na figura 14, pode-se observar a capacidade de EEPC em reduzir a produção de EROS. Nas concentrações de 300,00 e 150,00 $\mu\text{g/mL}$, EEPC conseguiu reduzir significativamente ($p < 0,05$) a produção de EROS pelas células após o estímulo com LPS e IFN- γ . Na concentração de 150,00 $\mu\text{g/mL}$ foi possível reduzir 56% a produção de EROS quando comparado ao grupo controle, enquanto em 300,00 $\mu\text{g/mL}$ reduziu 63% da produção.

Figura 14 - Dosagem da produção de EROS em macrófagos de camundongos BALB/c após estímulo com LPS e IFN- γ , e tratamento com extrato etanólico de *Plinia cauliflora* em diferentes concentrações.



Cultura de macrófagos peritoneais tratados com diferentes concentrações de EEPC (300,00 $\mu\text{g/mL}$ e 150,00 $\mu\text{g/mL}$), onde CE= Controle-estímulo; CB= Controle Basal e EEPC= Extrato etanólico de *Plinia cauliflora*. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à CE.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Com os resultados apresentados na figura 14 pode-se observar que EEPC apresenta um efeito antioxidante significativo. Assim como a atividade anti-inflamatória já descrita anteriormente, acredita-se que o efeito antioxidante tenha correlação direta com a composição do extrato. De acordo com a literatura, a presença de compostos fenólicos, principalmente de flavonoides e taninos, justifica esse resultado (SOUZA-MOREIRA, *et al.*, 2010; PAULA, *et al.*, 2021).

Além disso, os autores destacam que a presença de compostos fenólicos favorece a atuação do extrato como sequestradores de radicais de oxigênio (QUETTIER-DELEU *et al.*, 2000). Pode-se, inclusive, correlacionar a quantificação de polifenóis com o teor antioxidante de amostras (MEZA-MIRANDA *et al.*, 2022). Rice-Evans (1995) ainda afirma que a atividade antioxidante dos polifenóis, como os que estão presente em EEPC se manifesta em grande parte através da eliminação de espécies reativas de oxigênio.

5.5.3.2 Método de sequestro de radical livre DPPH• e método de redução do complexo de fosfomolibdênio

A capacidade de sequestrar radicais livres, ou seja, a capacidade de doar átomos de hidrogênio, é uma habilidade comum às substâncias que possuem atividade antioxidante. Um dos ensaios para avaliar o potencial de sequestro de radicais livres é o ensaio de DPPH. A substância DPPH é uma molécula considerada um radical livre de coloração violeta que produz um máximo de absorção próximo a 520 nm. Este, ao entrar em contato com uma substância que possua a capacidade de doar átomos de hidrogênio, será reduzido a DPPH-H, alterando sua cor para amarelado e produzindo feixes de menor intensidade de absorção (OLIVEIRA, 2014).

Considera-se que quanto maior for a redução de DPPH a DPPH-H, maior será o potencial antioxidante e menor será o valor da concentração inibitória de 50% (CI50). O valor de concentração inibitória de 50% indica a quantidade necessária da substância para inibir metade do poder oxidante do DPPH. Portanto, pode-se inferir com os nossos resultados (Tabela 3) que o EEPC possui uma atividade sequestrante potencial, visto que apresentou um valor de CI50 de $4,42 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$, enquanto os controles positivos, rutina apresentou uma CI50 de $1,71 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ e a quercetina de $0,33 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$, com diferença significativa ($p < 0,05$) entre eles.

Tabela 3 - Avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* através dos métodos de sequestro de radical livre DPPH• e da redução do complexo fosfomolibdênio

Amostra	DPPH – CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Complexo Fosfomolibdênio		
		AAR% relativa à quercetina	AAR% relativa à rutina	AAR% relativa à ácido ascórbico
EEPC	$4,42 \pm 0,91^{a,b}$	$122,05 \pm 1,43^{c,d}$	$199,72 \pm 2,34^{c,e}$	$41,44 \pm 0,48^{d,e}$
Rutina	$1,71 \pm 0,02$	---	---	---
Quercetina	$0,33 \pm 0,12$	---	---	---

EEPC = Extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*; DPPH – IC₅₀= Valor da concentração inibitória mínima de 50% de DPPH para o EEPC; AAR%= Porcentagem relativa à quercetina, rutina ou ácido ascórbico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação a rutina, b = diferença significativa em relação a quercetina, c= diferença significativa em relação à AAR% ácido ascórbico, d= diferença significativa em relação à AAR% rutina e e= diferença significativa em relação à AAR% quercetina.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Já o ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio é um método eficaz para avaliar a capacidade antioxidante de substâncias lipofílicas ou hidrofílicas, e, por esse motivo, é uma excelente opção para se analisar a capacidade total antioxidante de substâncias complexas, como o caso dos extratos brutos (PRIETO *et al.*, 1999). O resultado desse ensaio é demonstrado em porcentagens relativas (AAR%) de ácido ascórbico, quercetina e rutina e quanto mais próximo ou maiores 100%, mais promissor será a atividade da amostra avaliada.

Através da tabela 3, pode-se observar que EEPC apresentou uma AAR% à quercetina $122,05 \pm 1,43$, relativa à rutina de $199,72 \pm 2,34$ e relativa ao ácido ascórbico de $41,44 \pm 0,48$, possuindo diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os grupos. O valor mais baixo de AAR% relativa ao ácido ascórbico, acontece pelo fato de EEPC ter maior similaridade com a rutina e quercetina. Essas substâncias já foram encontradas na composição desse extrato e possuem características fenólicas (PAULA *et al.*, 2021). Portanto, com os resultados apresentados nota-se que EEPC possuem resultados antioxidantes promissores.

Souza-Moreira e colaboradores (2010) também encontraram resultados promissores, acima de 90% de inibição no ensaio de DPPH para o extrato das folhas dessa espécie. Existem relatos ainda do efeito antioxidante de EEPC pelo método de DPPH e de redução do complexo fosfomolibdênio, corroborando com os resultados descritos (PAULA, *et al.* 2021). Outros estudos também encontraram resultados promissores, mesmo avaliando outras partes da planta, como os ramos, cascas e os frutos da mesma espécie (WANG, *et al.*, 2014; PAULA *et al.*, 2021 DE SOUZA, *et al.*, 2017).

Portanto, através das duas metodologias avaliadas, pode-se considerar que EEPC possui um potencial antioxidante significativo, corroborando com outros dados da literatura. Acredita-se que esse efeito seja derivado da sua composição rica em substâncias fenólicas, as quais são notáveis pela sua capacidade antioxidante (LENQUISTE, *et al.* 2015).

5.5.3.3 Sistema β -caroteno / ácido linoleico

O método de avaliação da atividade antioxidante por meio do sistema β -caroteno/ácido linoleico acontece por um ensaio de co-oxidação, baseado na perda da coloração de uma emulsão. O ácido linoleico ao ser oxidado forma estruturas radiculares, que atacam as duplas ligações do β -caroteno, resultando na alteração da

sua coloração. Por isso, é considerado um método colorimétrico, que avalia a atividade antioxidante por meio de um espectrofotômetro a 470 nm. Quando compostos antioxidantes são adicionados no sistema, não acontece a peroxidação do ácido linoleico e por consequência a coloração do β -caroteno não é alterada (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

Na tabela 4, é possível observar os resultados apresentados por EEPC e os controles positivos, quercetina e rutina. Pode-se observar que EEPC uma porcentagem de inibição de 52,09%, enquanto a rutina 25,20% e a quercetina 64,43%. O EEPC apresentou uma diferença significativa em relação ao controle positivo rutina, indicando a sua ação antioxidante. Esses resultados corroboram com os outros ensaios já avaliados, onde o extrato exibe uma potente atividade antioxidante.

Tabela 4 - Avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* por meio do método de inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Amostra	β -Caroteno/ácido linoleico (38,46 μ g/mL)		
	Inibição (%)	F1	F2
EEPC	52,090 \pm 7,380 ^a	0,552 \pm 0,370	0,618 \pm 0,10
Quercetina	64,430 \pm 2,400	0,570 \pm 0,070	0,699 \pm 0,11
Rutina	25,200 \pm 0,900	0,590 \pm 0,009	1,630 \pm 0,32

Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação a rutina.

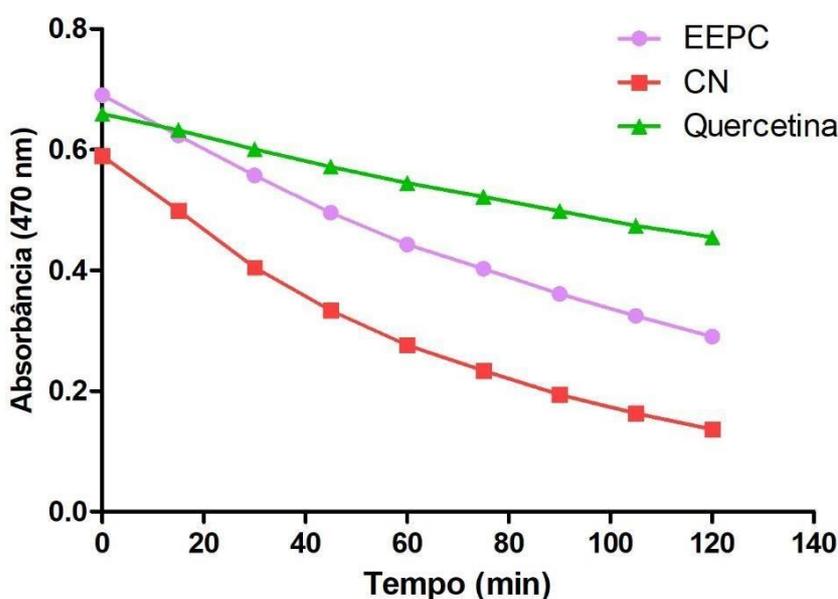
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O parâmetro F1 avaliado nesse sistema, fundamenta-se no bloqueio da formação de peróxidos no início da reação, entre 15 e 45 mi. Espera-se que a substância tenha resultados inferiores a 1 e próximos de 0 para possuir um efeito antioxidante significativo, esse mesmo parâmetro serve para F2 (NASCIMENTO *et al.*, 2010). Portanto, considerando esse parâmetro, é possível observar que o extrato se comportou de maneira muito semelhante com os controles positivos, indicando a sua eficácia no bloqueio da formação de peróxidos.

Já o parâmetro F2, avalia sobre a capacidade do composto de inibir outras substâncias que podem ser geradas durante o processo de oxidação, como produtos da decomposição de peróxidos, reações que acontecem entre 75 e 90 min (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Assim como em F1, o extrato apresentou resultado de 0,618 \pm

0,10, atingindo o objetivo de possuir resultados próximos de 0 e menor do que 1. Destaca-se ainda que o extrato apresentou resultados bem próximos ao controle quercetina.

Figura 15 - Curva de oxidação do β -caroteno, avaliando a absorvância em 470 nm, mostrando a preservação da sua coloração ao longo de 120 min de reação na presença do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*.



Legenda: EEPC: Extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* e CN= controle negativo

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na figura 15 é possível observar que durante o experimento houve degradação do ácido linoleico, devido ao decaimento contínuo da curva do controle negativo, indicando um bom funcionamento do sistema. Percebe-se ainda que EEPC é capaz de reduzir a oxidação ao longo dos 120 min de reação, mesmo não apresentando um efeito superior a quercetina.

5.5.3.4 Inibição da formação de malondialdeído

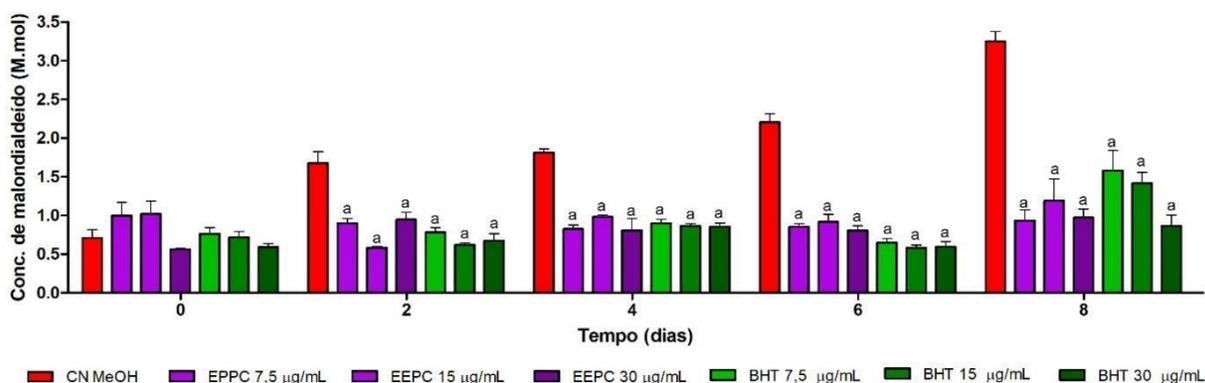
Durante um processo de peroxidação lipídica, uma série de radicais podem ser produzidos, dentre eles os peróxidos (LOOH). Essas substâncias são formadas a partir da interação de um radical livre produzido, um átomo de hidrogênio e outro ácido graxo (OLIVEIRA, 2021). Ao serem decompostos, podem favorecer a formação de substâncias reativas, as quais podem causar danos celulares (YDAV *et al.*, 2013). Um

dos produtos dessa reação é o malondialdeído (MDA), um biomarcador da peroxidação lipídica.

Uma das formas de verificar a formação de MDA, é através do monitoramento do processo de peroxidação lipídica que acontece em carnes. No ensaio de inibição da formação de malonaldeído, a carne será tratada com a amostra e através da complexação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), será possível quantificar a produção dessa substância reativa.

Caso a amostra tenha potencial antioxidante, a produção de malonaldeído será reduzida com o passar dos dias. Na figura 16, pode-se observar o efeito de EEPC na redução da produção de MDA. Destaca-se que a amostra apresenta um efeito significativo após o segundo dia de experimento, onde apresenta diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo.

Figura 16 - Gráfico de redução da produção de malondialdeído na presença extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* e de BHT nas concentrações de 7,5; 15,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$.



Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação ao controle negativo.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Observa-se que no segundo dia, EEPC conseguiu reduzir a concentração de MDA em 49%, 63% e 70%, nas concentrações de 7,5 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$ e 30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, em relação ao controle negativo. No último dia, o extrato conseguiu reduzir em 58%, 52% e 57%, nas mesmas concentrações respectivamente. Pode-se observar que à medida que a concentração de MDA aumenta no controle negativo, as amostras que foram tratadas com EEPC consegue manter níveis mais baixos desse biomarcador. Vale ressaltar que no oitavo dia, o extrato consegue reduzir mais a

produção de MDA do que o BHT (controle positivo). Esses resultados corroboram com a potente atividade antioxidante descrita nos testes anteriores em decorrência da composição rica em compostos fenólicos do extrato.

5.5.4 Determinação da atividade antimicrobiana de EEPC

5.5.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), da concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM)

No cenário atual, a busca por novas substâncias com potencial antimicrobiano é de extrema importância, dada a necessidade de desenvolver novos agentes capazes de controlar o crescimento microbiano (SANTOS *et al.*, 2022). Sabe-se que uma das principais causas de complicações em lesões de pele é a colonização por microrganismos. A colonização afeta financeiramente, prejudica a recuperação do paciente e ainda pode causar complicações, levando até mesmo à morte (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

De acordo com a literatura, os principais microrganismos que colonizam as feridas são *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *E. Coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *P. mirabilis* e *A. baumannii* (OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2021; LIMA, 2019). Além das bactérias já citadas, *C. albicans* aparece na literatura como uma das espécies fúngicas que são frequentemente encontradas colonizando feridas, especialmente aquelas derivadas de queimaduras (MORAIS, 2022).

Um dos métodos padronizados para avaliar a capacidade de uma substância de inibir o crescimento microbiano é o teste de determinação da concentração inibitória mínima, seguido pela determinação da concentração bactericida ou fungicida mínima (CLSI, 2018). De acordo com Simões e colaboradores (2009), uma amostra com potencial antimicrobiano promissor geralmente apresenta valores de CIM de até 1000 µg/mL. Classificando de forma mais detalhada, a inibição do crescimento microbiano é considerada forte quando o valor de CIM é até 500 µg/mL moderada quando CIM se situa entre 600 e 1500 µg/mL, e fraca quando CIM é abaixo de 1500 µg/mL.

Considerando os principais microrganismos colonizadores de feridas, o ensaio antimicrobiano foi realizado com *S. epidermidis*, *S. aureus* resistente aos antibióticos convencionais, *E. coli*, *C. albicans* resistente a anidulafungina, voriconazol, itraconazol e fluconazol e *C. albicans* sensível aos antifúngicos convencionais.

Observa-se na tabela 5 que EEPC demonstrou uma notável atividade antimicrobiana contra todas as cepas testadas. Frente às bactérias, EEPC apresentou uma CIM de 3,96 µg/mL para *S. epidermidis*, uma CIM de 500 µg/mL para *S. aureus* e uma CIM de 1000 µg/mL para *E. coli*. Frente às duas linhagens diferentes de *C. albicans* a CIM foi de 500 µg/mL.

Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM), efeito no valor da CIM e a concentração bactericida mínima (CBM) ou concentração fungicida mínima (CFM) do extrato etanólico de *Plinia cauliflora* frente as espécies bacterianas e fúngicas selecionadas.

Microrganismos	CIM (µg/mL)	Efeito no valor de CIM	CBM/CFM (µg/mL)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 0016™	3,96	Bacteriostático	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33591™	500	Bactericida	500
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 10536™	1000	Bactericida	1000
<i>Candida albicans</i> ATCC® 24433™	250	Fungicida	250
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™	250	Fungicida	250

Legenda: *Staphylococcus aureus* ATCC® 33591™: Resistente aos antibióticos convencionais; *Candida albicans* ATCC® 24433™: Sensível aos antifúngicos convencionais; *Candida albicans* ATCC® 10231™: Resistente a anidulafungina, voriconazol, itraconazol e fluconazol

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Considerando o efeito no valor da concentração inibitória mínima, observa-se que para *S. epidermidis*, o efeito foi bacteriostático, enquanto para as demais bactérias, EEPC exibe ação bactericida. No caso das espécies de *C. albicans*, os valores de CIM apresentam um efeito fungicida.

Na literatura já existem relatos da eficácia antimicrobiana de EEPC. Nos diferentes extratos das folhas de *Plinia cauliflora*, testados por Souza-Moreira et al., (2013), a atividade antimicrobiana foi considerada fraca frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E.* e *B. subtilis*. Porém, os mesmos autores, destacam uma forte atividade

contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, com MIC de 625 µg/mL para ambas as espécies. De acordo com Franzolin, *et al.* (2022), o extrato das folhas se mostrou mais eficaz contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans* quando comparado com o extrato proveniente dos frutos.

Os resultados apontados na literatura são coerentes com as observações descritas neste ensaio. Acredita-se que o grande potente efeito antimicrobiano, especialmente contra fungos, pode estar relacionado com a riqueza de compostos fenólicos em EEPC. Compostos como quercetina, ácido gálico, ácido elágico e elagitaninos possuem atividade antimicrobiana já reconhecida (FIDELIS, 2019; FRAZOLIN *et al.*, 2022).

5.6 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EEPC

Os filmes de quitosana são extremamente reconhecidos pela facilidade de obtenção e baixo custo de fabricação, tendo sido objeto de várias pesquisas na atualidade. Além de serem funcionais para o desenvolvimento de diversas formulações, esses filmes também demonstram potencial antimicrobiano e capacidade de acelerar a terapia celular (ESCÁRCEGA *et al.*, 2018). Dada a importância desses efeitos biológicos apresentados pelo polímero e dos resultados promissores encontrados para EEPC, optamos por unir esse modelo de formulação com o extrato bruto obtido.

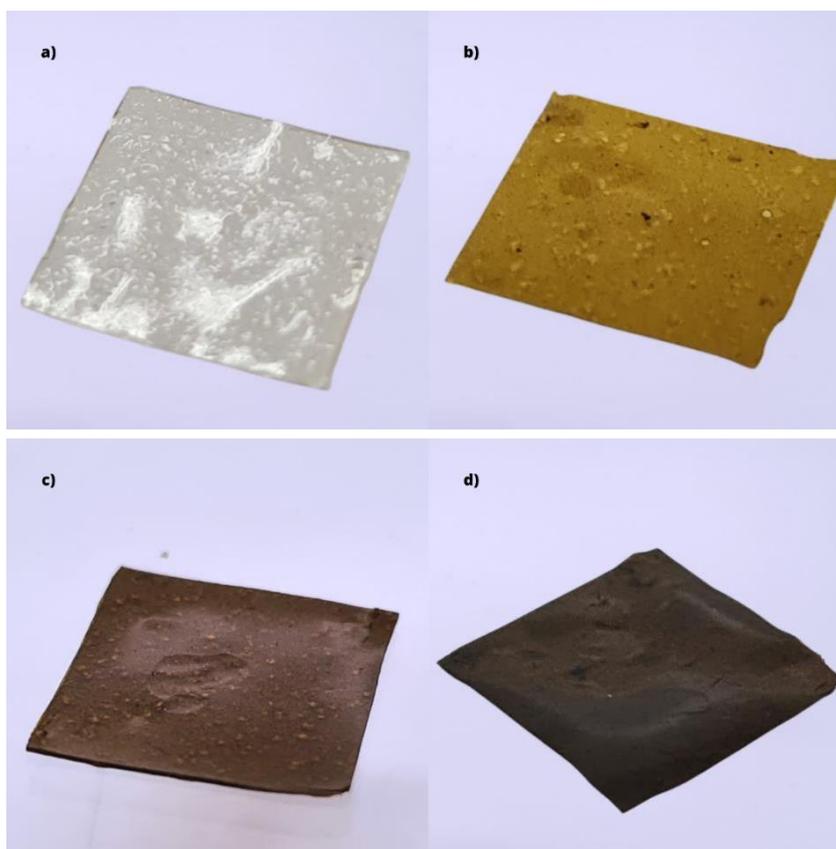
Além da escolha da quitosana como o polímero para o filme, é necessário complementar a formulação com um agente plastificante, com o objetivo de melhorar a aplicabilidade dos filmes. Por isso, optou-se por adicionar glicerina à formulação. A presença da glicerina confere maleabilidade e flexibilidade ao filme, características essenciais para a sua futura aplicação direta sobre a pele (ANDRADE *et al.*, 2023).

Várias técnicas estão disponíveis para a fabricação dos filmes, desde aquelas que envolvem alto custo, como a impressão 3D, até aquelas que requerem menos equipamentos, como o método de evaporação de solvente. Nesse contexto, a técnica escolhida foi a de evaporação de solvente, onde os componentes da formulação são incorporados por agitação mecânica e posteriormente, secos em estufa, para que o solvente utilizado seja evaporado (VIÉGAS, 2016).

A escolha da técnica e dos componentes da formulação foi realizada com o objetivo de garantir uma aplicação eficaz e segura, com baixo custo e de fácil

preparação. Ao final do processo de formulação e após a secagem dos filmes (Figura 17), obtivemos filmes com uma aparência plástica e flexível.

Figura 17 - Filmes de quitosana com extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* em diferentes concentrações, cortados em quadrados de 1 x 1 cm.



Legenda: a) Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* (SEEPC); b) Filmes de quitosana com a incorporação do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* a 1% (EEPC 1%); c) Filmes de quitosana com a incorporação do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* a 2,5% (EEPC 2,5%); d) Filmes de quitosana com a incorporação do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* a 5% (EEPC 5%). Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EEPC

5.7.1 Caracterização físico-química das soluções precursoras dos filmes

5.7.1.1 Determinação dos parâmetros reológicos das soluções precursoras dos filmes

Através da caracterização reológica das soluções precursoras, é possível avaliar as propriedades coloidais, de fluxo e de deformação das amostras em questão,

especialmente no que diz respeito à investigação de possível estrutura de interações intermoleculares ainda na fase líquida, que certamente irá interferir no comportamento dos materiais sólidos.

Com o objetivo de investigar tais interações, as soluções precursoras foram submetidas aos ensaios reológicos no modo oscilatório e no modo estacionário. No primeiro momento, as amostras foram avaliadas no modo oscilatório, onde é causado um estresse mecânico no material antes do seu limite de ruptura. Neste ensaio será possível avaliar a viscoelasticidade do material, considerando os parâmetros de viscosidade complexa (η^*), ângulo de fase (δ), módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') (SILVA, 2016).

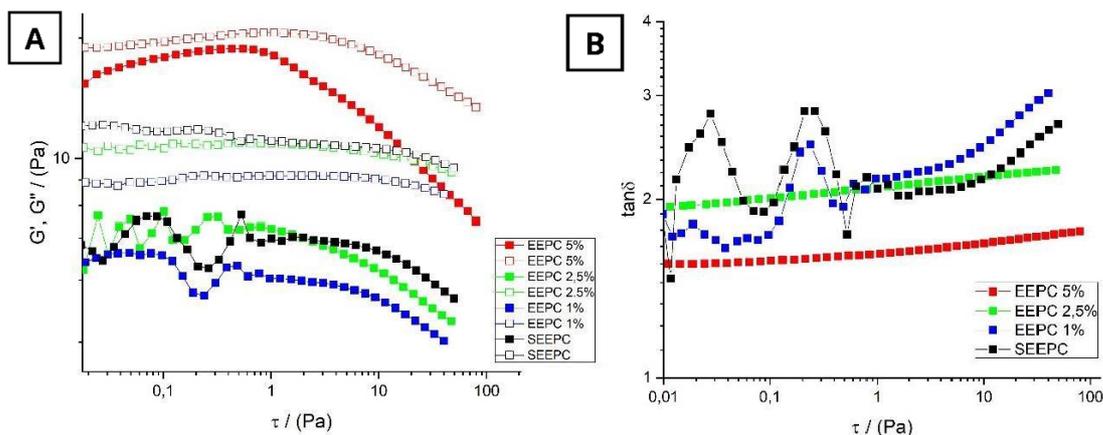
É importante destacar que no módulo elástico avalia-se o quão sólido é o material, enquanto o módulo viscoso é uma medida da capacidade de fluidez do material. Caso a amostra apresente valores de G'' maior do que G' considera-se que o material tem um comportamento mais fluido do que sólido. Caso G' for maior que G'' o material é considerado mais sólido do que fluido (MEZGER, 2014).

Uma forma prática de se avaliar o comportamento sólido ou fluido de um material é através da razão entre G'' e G' , denominado fator de amortecimento definida como a tangente do ângulo de fase (δ), tangente de delta ($\tan\delta$), conforme equação abaixo:

$$\tan\delta = \frac{G''}{G'}$$

Os resultados dessa equação podem variar entre zero e infinito. Sabe-se que quando o material tiver características mais sólidas, o valor de $\tan\delta$ será entre 0 e 1, e, quando o material for mais fluido o valor será entre um e infinito (SILVA, 2016). Na figura 18, observa-se os valores de G' , G'' e $\tan\delta$ de todas as amostras formuladas.

Figura 18 - Varredura de amplitude no ensaio oscilatório avaliando os parâmetros reológicos da solução precursora dos filmes de quitosana.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

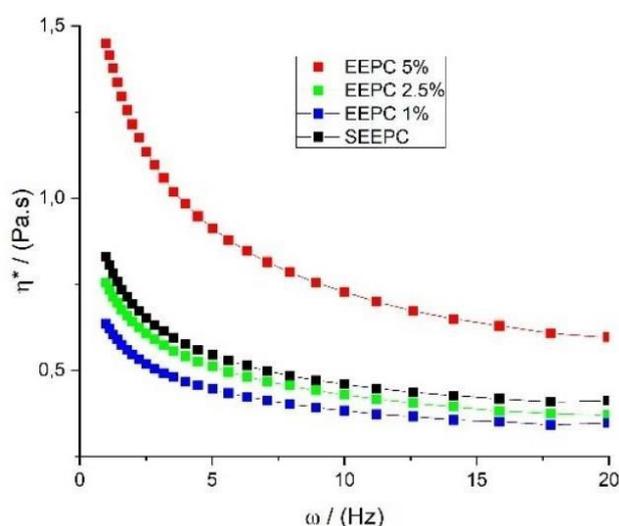
No gráfico A da figura 18 é possível observar que em todas as amostras os valores de G' são inferiores aos valores de G'' . Esse padrão permite considerar que as amostras são mais fluídas do que sólidas. Pode-se observar ainda que, inicialmente, ao adicionar 1% de EEPC na amostra o valor de G' reduz, em comparação ao SEEPC. Ao adicionar 2,5% de EEPC, o valor de G' se torna mais próximo do apresentado pelo SEEPC, porém ao adicionar 5% de EEPC, o valor de G' aumenta significativamente.

Essas alterações no valor de G' em decorrência do aumento de extrato indicam que, a medida em que acontece a adição de extrato, a solução ganha mais estrutura e por consequência se torna menos fluída. Porém, inicialmente, valores mais baixos de adição de extrato gera uma desestruturação na matriz polimérica. Parte dessa estruturação que acontece em EEPC 5%, pode acontecer pela maior presença de sólidos derivados do extrato no meio ou de componentes emulsificantes derivados do próprio extrato.

O mesmo comportamento pode ser observado considerando os resultados de $\tan \delta$, no gráfico B da figura 18. Observa-se que em uma tensão de cisalhamento acima de 1 Pa, EEPC1% apresenta valores de $\tan \delta$ maiores do que SEEPC, indicando que a amostra tem um comportamento mais fluído do que a amostra sem adição de extrato. Esse fato acontece devido a desestruturação causada pelos componentes do extrato na matriz polimérica. Já para EEPC 2,5%, os valores de $\tan \delta$ permanecem próximos de SEEPC. Enquanto EEPC 5% apresentam valores mais baixos de $\tan \delta$ em relação a todas as amostras, indicando seu comportamento mais sólido, atribuído a uma maior estruturação.

Na figura 19, é possível observar a variação da viscosidade complexa (η^*) das amostras em relação à variação da frequência de oscilação aplicada sobre as amostras. Como pode ser observado, os valores de η^* diminuem com a frequência de cisalhamento, indicando comportamento pseudoplástico, em que a rede de interações intermoleculares sofre ruptura com o cisalhamento. A maior taxa de variação para a amostra EEPC 5% bem como os maiores valores de viscosidade complexa são indicativos adicionais de que se trata de um material mais estruturado que os demais.

Figura 19 - Viscosidade complexa em relação a frequência aplicada no ensaio oscilatório dos parâmetros reológicos da solução precursora dos filmes de quitosana.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados de viscosidade complexa em função da frequência de oscilação apontam que pequenas adições de extrato (1%) reduzem a viscosidade complexa da solução precursora. O extrato em baixas proporções ocasiona um aumento da fluidez, deixando a amostra mais fluida que a própria matriz polimérica. Esse processo acontece devido a uma desestruturação que o extrato ocasiona quando adicionado em poucas quantidades.

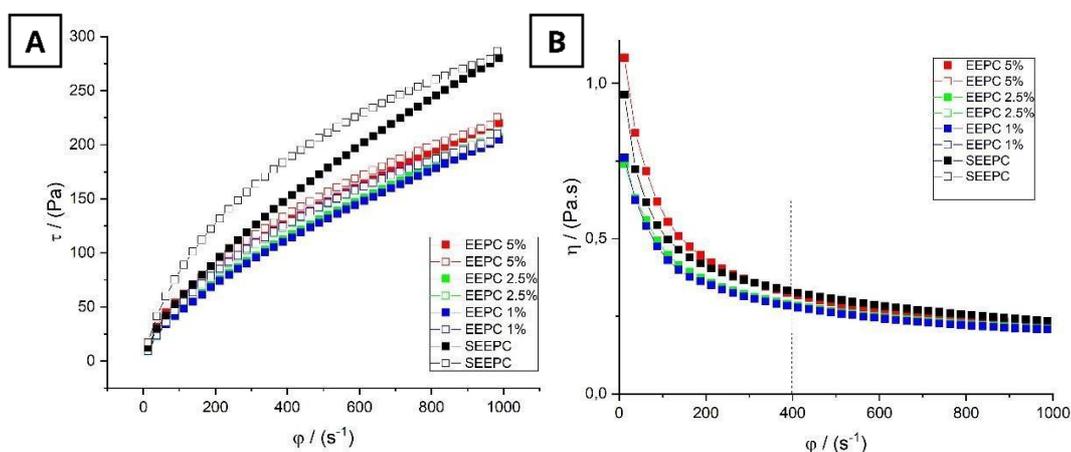
Porém, com a adição de maiores proporções, o extrato ocasiona um efeito de interação e sinergismo com a matriz polimérica de quitosana, diminuindo a fluidez e proporcionando maior estruturação entre os componentes. Essa ação favorece a atuação biológica e a homogeneidade dos compostos no meio, pois em um meio mais estruturado é menor a probabilidade de separação de fase. Sugere-se que em EEPC 5%, seja encontrado em maior quantidade algum determinado composto que permita

melhor emulsificação entre os compostos da matriz com o extrato, além de possuir maior concentração de sólidos, conferindo uma característica mais estruturada à amostra.

Considerando a composição rica em taninos já apresentada pelo extrato, sugere-se que essa ação emulsificante pode ser justificada pela presença desses componentes. Devido a sua estrutura rica em anéis hidrofóbicos aromáticos e grupos hidrofílicos hidroxila, os taninos além de possuírem uma boa atividade antioxidante, podem apresentar uma boa atividade superficial e por consequência atuar como emulsificante (FIGUEROA-ESPINOZA, et al., 2015).

Além da avaliação no modo oscilatório, as amostras também foram caracterizadas no modo rotacional. Nesse modelo, as interações intermoleculares são destruídas durante o experimento, perdendo a sua estruturação e passando a se comportar de modo livre. No final do ensaio, são geradas as curvas de fluxo e de viscosidade da amostra em questão, demonstradas na figura 20.

Figura 20 - Curva de fluxo e de viscosidade avaliados no ensaio rotacional dos parâmetros reológicos da solução precursora dos filmes de quitosana.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As figuras 20 A e B mostram respectivamente as curvas de fluxo e de viscosidade em função da taxa de cisalhamento. Como pode ser observado na figura 20 A, a amostra SEEPC apresenta um elevado valor de histerese de fluxo, sugerindo ocorrência de comportamento reológico não-newtoniano dependente do tempo. Esse resultado corrobora com os parâmetros esperados para soluções poliméricas (LEWANDOWSKA et al., 2022).

A Figura 20 B mostra a redução da viscosidade com a taxa de cisalhamento demonstrando novamente o comportamento pseudoplástico. Este comportamento é atribuído à quebra das interações intermoleculares durante o cisalhamento, concomitante com o alinhamento molecular junto ao campo de velocidade do rotor durante a execução do experimento.

Durante um processo de mistura na etapa de fabricação, é imposto às amostras um cisalhamento entre 10^2 e 10^3 (CARNICER et al., 2021). Pode-se observar que a partir de 400 s^{-1} , a viscosidade de todas as amostras se comporta de maneira aproximadamente constante, ou seja, a estrutura já está tão rompida que o material se comporta como fluido newtoniano.

Como já observado, os fluidos podem mudar a sua viscosidade em decorrência de alterações na taxa de cisalhamento. Considerando essa premissa, os fluidos são caracterizados em duas categorias. Fluidos com comportamento tixotrópicos, tem-se a sua viscosidade diminuída ao longo do tempo a uma taxa de cisalhamento constante. Já os fluidos reopéxicos, tem-se a viscosidade aumentada com o tempo quando submetido a uma taxa de cisalhamento constante (SILVA et al., 2019).

A classificação dos fluidos nessas categorias depende da diferença entre a área da curva ascendente e da área da curva descendente apresentado por ele na determinação da curva de fluxo. Na tabela 6 estão apresentados os valores de área da curva ascendente, descende e o cálculo da tixotropia referente a área de histerese de cada amostra.

Tabela 6 - Cálculo de tixotropia de cada amostra a partir da curva de fluxo apresentado pelas soluções precursoras dos filmes de quitosana

Amostra	Área da curva ascendente	Área da curva descendente	Cálculo da histerese
SEPC	163.745,62	186.885,30	- 23.139,7
EPC 1%	120.946,79	129.803,82	- 8.857,03
EPC 2,5%	123.403,34	129.443,40	- 6.040,06
EPC 5%	135.923,40	139.158,77	- 3.235,36

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

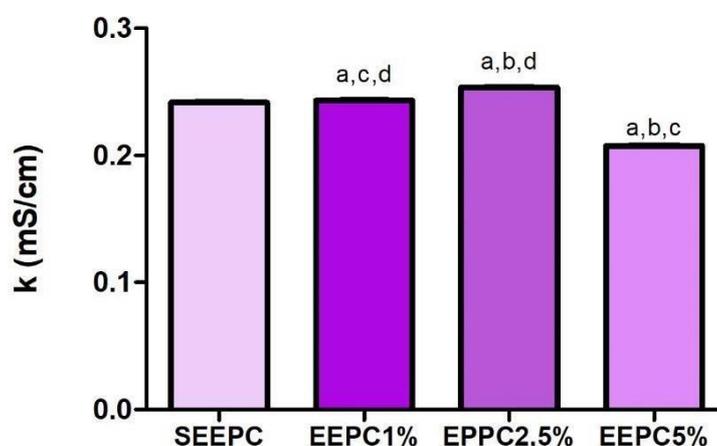
Resultado negativo no cálculo de histerese é um resultado característico do efeito de reopexia. Esse padrão é apresentado por todas as amostras, indicando que

o material se torna mais estruturado com o cisalhamento. Vale destacar que EEPC 5% apresenta um menor valor em módulo se comparado com as outras amostras, indicando que essa amostra necessita de menos cisalhamento para se tornar mais estruturada, por já conter uma maior concentração de interações intermoleculares.

5.7.1.2 Determinação da condutividade elétrica, potencial zeta (PZ) e do tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das soluções precursoras dos filmes

Devido à presença de alguns íons, determinados líquidos possuem a capacidade de conduzir corrente elétrica e a partir dessa fundamentação é avaliada a condutividade elétrica de soluções (OHLWELLER, 1981). A capacidade de condutividade elétrica é proporcional à concentração dos íons livres na solução. Na figura 21, pode-se observar os valores de condutividade elétrica da solução precursora dos filmes desenvolvidos.

Figura 21 - Valores de condutividade elétrica da solução precursora dos filmes de quitosana incorporados à EEPC nas diferentes concentrações.



Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à SEEPC, b= diferença significativa em relação à EEPC1%, c= diferença significativa em relação à EEPC2,5% e d= diferença significativa em relação à EEPC5%.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Com os resultados podemos considerar a solução precursora dos filmes de quitosana com EEPC uma solução eletrolítica, pois apresenta valores significativos de condutividade elétrica. Observa-se que em EEPC 5%, acontece uma redução da condução elétrica, a qual foi atribuída à neutralização das moléculas de quitosana por

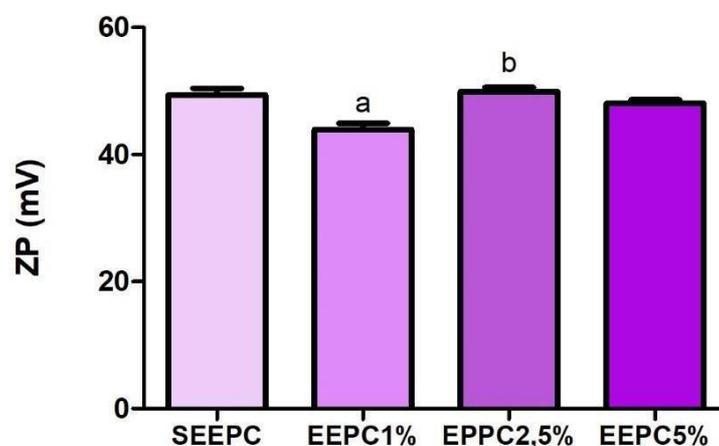
espécies aniônicas existentes no extrato. Acredita-se que essas espécies aniônicas estejam relacionadas com a presença de compostos fenólicos, como os taninos, que possuem uma boa capacidade de doação de prótons e por consequência uma forte capacidade de carregar carga elétrica. Sabe-se taninos condensados, por exemplo, após passarem por um processo reativo, pode-se adquirir um caráter catiônico, que por sua vez, possui uma capacidade intrínseca de doação de prótons (RESENDE, 2018).

Pode-se observar ainda que em EEPC5% acontece uma ligeira redução da condutividade em comparação com as outras amostras de filmes. Esse resultado indica que nessa amostra existem menos íons livres no meio e por consequência mais íons ligados entre si. A maior proporção de íons interligados nessa amostra, confere a ela uma maior estruturação, corroborando com os achados dos testes reológicos já citados.

A análise de potencial zeta avalia informações sobre a carga superficial de uma partícula. Através dela, podemos inferir sobre a estabilidade de uma partícula na solução (KIM *et al.*, 2019). Nessa análise, a amostra é submetida a um campo elétrico alternado o qual gera um fenômeno de microeletroforese, em que ocorre a migração de partículas na cubeta. Sabe-se que quanto maior for a frequência de oscilação das partículas no campo elétrico, maior será a carga elétrica, e, assim, maior será o potencial zeta desse composto.

A figura 22 mostra os valores de potencial zeta das soluções precursoras dos filmes de quitosana com e sem a incorporação de extrato. Observa-se que a presença do extrato na solução precursora pouco altera o potencial zeta da solução em comparação com SEEPC. Sabe-se que a presença dos grupamentos amino, derivados da quitosana, gera potencial zeta positivo, fato esse que justifica o resultado apresentado por SEEPC e provavelmente pelas outras amostras (CARVALHO *et al.*, 2019).

Figura 22 - Valores de potencial zeta da solução precursora dos filmes de quitosana incorporados à EEPC nas diferentes concentrações.

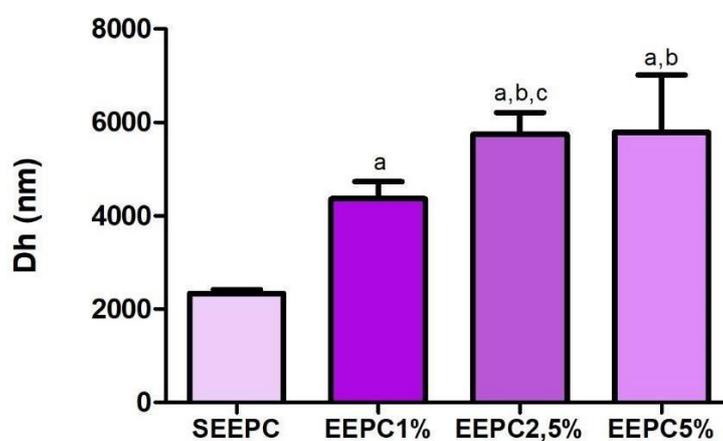


Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à SEEPC, b= diferença significativa em relação à EEPC1%.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Uma das maneiras de avaliar o tamanho das partículas nanométricas de uma solução é através do valor de diâmetro hidrodinâmico. Espera-se que formulações com quitosana apresente uma associação espontânea dos componentes em solução e forme emaranhados moleculares (rede tridimensional). Na figura 23 pode-se observar o valor de diâmetro hidrodinâmico das soluções precursoras dos filmes de quitosana na ausência e na presença de diferentes concentrações de EEPC.

Figura 23 - Valores de diâmetro hidrodinâmico da solução precursora dos filmes de quitosana incorporados à EEPC nas diferentes concentrações.



Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à SEEPC, b= diferença significativa em relação à EEPC1%, c= diferença significativa em relação à EEPC5%.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

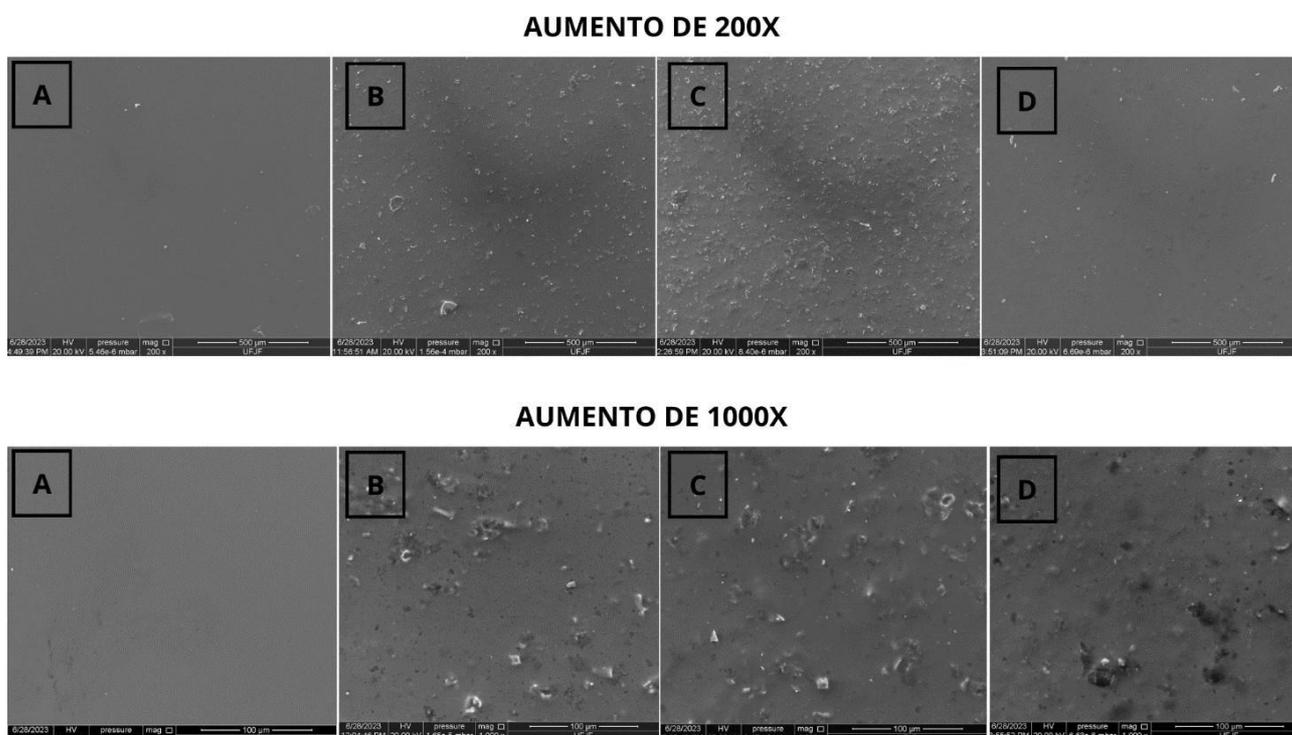
Com os resultados do tamanho de partícula, é possível observar que após a adição do extrato as partículas tendem a aumentar. A tendência de possuir partículas maiores nas amostras com maior proporção de extrato confere ao material uma maior viscosidade. Esse resultado também corrobora com os achados nos testes reológicos, onde as amostras com maior proporção de extrato apontam uma maior viscosidade.

5.7.2 Caracterização físico-química dos filmes

5.7.2.1 Microscopia eletrônica de varredura dos filmes

A utilização da microscopia eletrônica de varredura é uma abordagem avançada para análise dos filmes de quitosana permitindo uma avaliação detalhada sobre a uniformidade e distribuição dos componentes na matriz polimérica dos filmes. Assim, os filmes produzidos foram submetidos a essa técnica, avaliando a sua superfície e a sua borda. Na Figura 24 observamos a superfície dos filmes com o aumento de 200x e 1000x.

Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de quitosana incorporados à EEPC nas diferentes concentrações, considerando um aumento de 200x e 1000x.



Legenda: a) Filmes de quitosana sem a incorporação de EEPC; b) Filmes de quitosana com a incorporação de 1% de EEPC; c) Filmes de quitosana com a incorporação de 2,5% de EEPC; d) Filmes de quitosana com a incorporação de 5% de EEPC.

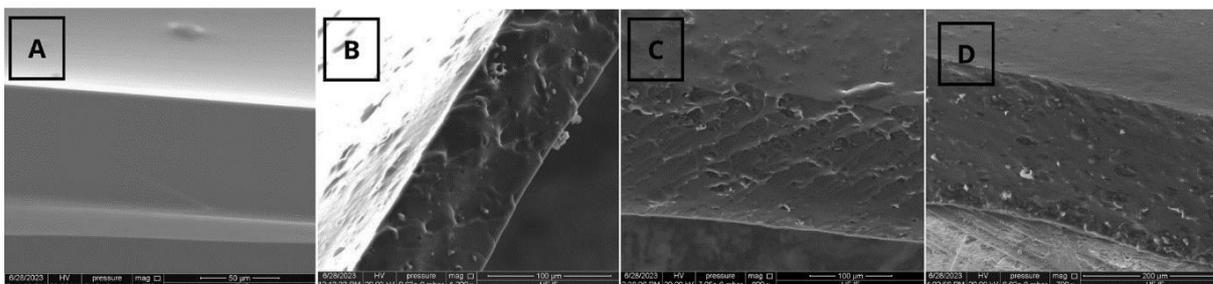
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As imagens retratam uma superfície homogênea e isenta de aglomerados no caso de SEEPC. No entanto, ao observar os filmes incorporados com EEPC (Figura 24, b, c, d), pode-se notar a presença de alguns aglomerados na superfície, principalmente em EEPC 1% e EEPC 2,5%. Acredita-se que esses aglomerados na superfície dos filmes representam uma parcela do extrato que não interagiu com a matriz polimérica do filme de forma adequada (BUENO, 2019).

Acredita-se que devido a maior proporção de componentes em EEPC5%, exista uma maior proporção de componentes emulsificantes, os quais conferem uma melhor integração do extrato no filme EEPC 5%. Essa ação emulsificante pode ser relacionada com a presença de taninos, os quais possuem uma estrutura com anéis hidrofóbicos aromáticos e grupos hidrofílicos hidroxila que indicam uma possível propriedade tensoativa, com capacidade de estabilizar emulsões (FUIGUEROA-

ESPINOZA, et al., 2015). Na Figura 25 observa-se uma visualização lateral de todos os filmes.

Figura 25 - Microscopia eletrônica de varredura transversal dos filmes de quitosana incorporados à EEPC nas diferentes concentrações.



Legenda: a) Filmes de quitosana sem a incorporação de EEPC; b) Filmes de quitosana com a incorporação de 1% de EEPC; c) Filmes de quitosana com a incorporação de 2,5% de EEPC; d) Filmes de quitosana com a incorporação de 5% de EEPC.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

É possível observar que SEEPC apresenta uma borda homogênea, sem a presença de aglomerados ou poros. No entanto, após a incorporação de EEPC, é evidente que os filmes passaram a adquirir aglomerados não apenas na sua superfície. Contudo, a 5% de extrato observa-se novamente uma homogeneização, corroborando com a hipótese da existência de componentes que passam a se sobressair, favorecendo a interação com a quitosana. Zhang e colaboradores (2019), encontraram características semelhantes as apresentadas, filmes sem a incorporação do extrato são lisos e uniformes e ao elevar a concentração de extrato a superfície se torna mais heterogênea e porosa.

5.7.2.2 Estudo de liberação dos filmes

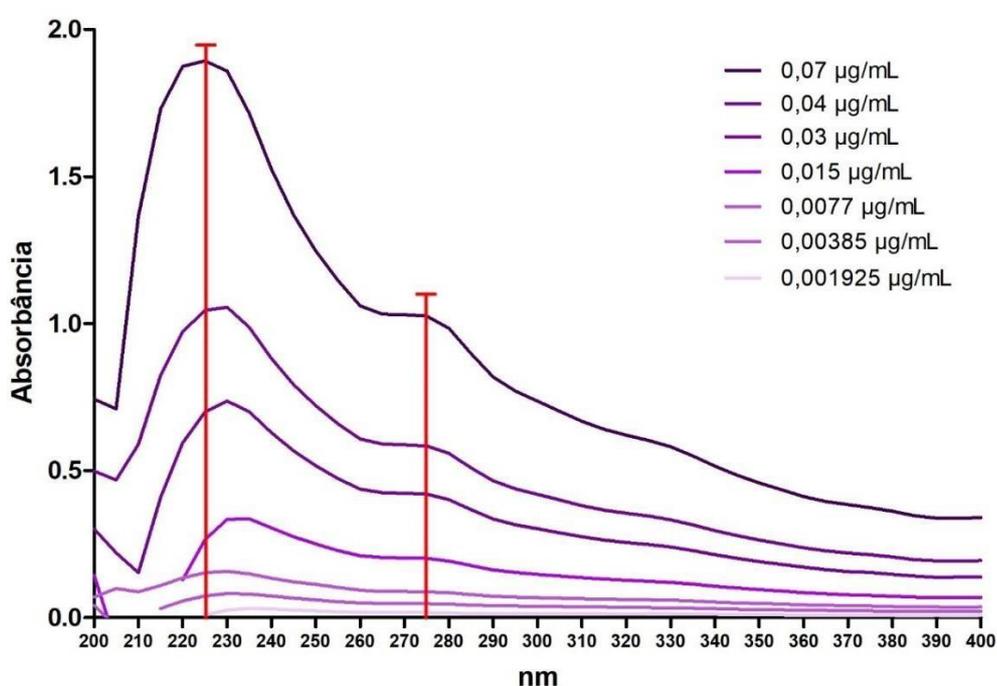
Para atingir o objetivo de entrega dos ativos no local de aplicação dos filmes de quitosana é necessário que aconteça um processo de liberação gradual para que os compostos atinjam concentrações plasmáticas ideais (WANDERLEY, 2019). No caso dos filmes de quitosana, é esperado que aconteça uma liberação controlada dos ativos, com o objetivo de prolongar e aperfeiçoar a administração dos ativos.

Com o propósito de avaliar a eficácia na liberação dos componentes do extrato pelos filmes de quitosana foi realizado o estudo de liberação. Logo, foi construído um sistema com o objetivo de mimetizar o contato dos filmes com o principal fluido

encontrado em feridas, o exsudato. Além disso, todo o sistema permaneceu em banho maria a 34 °C com o objetivo de mimetizar a temperatura corporal.

Para fins comparativos, foi elaborada a avaliação do espectro de absorção do extrato bruto. Esses dados serão norteadores para verificar o local específico de maior liberação dos constituintes desse extrato. Através da figura 26, é possível observar o espectro de absorção do EEPC em diferentes concentrações.

Figura 26 - Espectro de absorção do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* em diferentes concentrações.

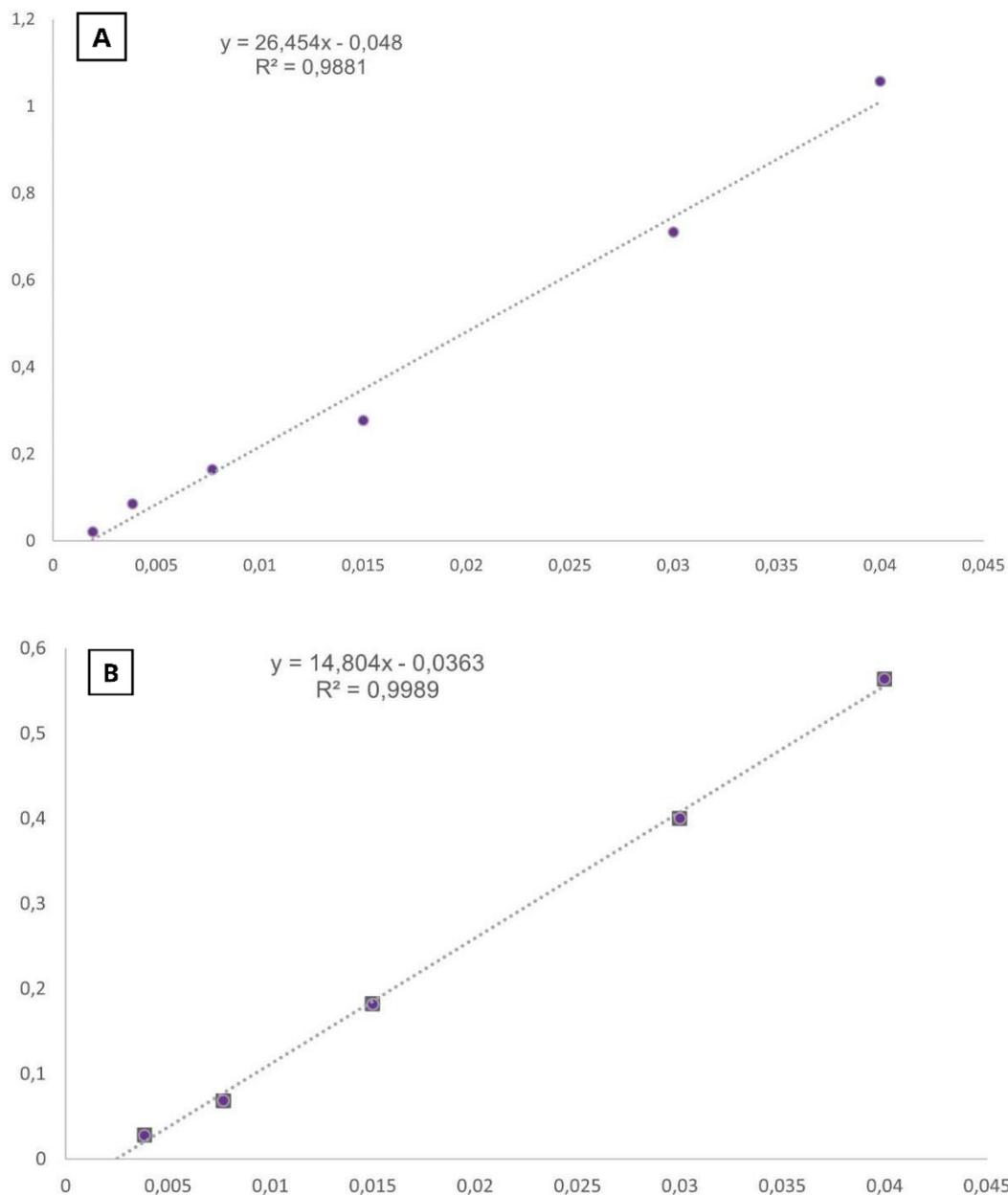


Curva padrão do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* variando nas concentrações de 0,07 µg/mL até 0,001925 µg/mL, conforme demonstrado no gráfico.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Nota-se, na figura 26, que o extrato exibe dois principais picos de absorbância máxima, um em 225 nm e outro em 275 nm. Sabe-se que entre 200 e 300 nm são identificados principalmente os compostos fenólicos, muito abundantes nessa espécie (MENEZES FILHO *et al.*, 2020; GARCIA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2018). Espera-se que em 225 nm referencie os flavonoides e em 275 os taninos e outros compostos fenólicos. Com base nesses dados, foi possível construir uma curva analítica (figura 27), relacionando a absorbância nos nanômetros específicos com a concentração de extrato.

Figura 27 - Curva analítica do extrato das folhas de *Plinia cauliflora* nas diferenças absorvâncias máximas.



a) Curva analítica elaborada a partir dos valores de absorvância à 225 nm do EEPC em diferentes concentrações. b) Curva analítica elaborada a partir dos valores de absorvância à 275 nm do EEPC em diferentes concentrações.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Com o propósito de determinar a quantidade adequada de fluido necessário para possibilitar uma liberação completa e sem saturação do meio, estabeleceu-se a condição *sink* para o extrato. Após a finalização do ensaio, constatou-se que são

necessários 6 mL do fluido simulador de feridas para realizar a dissolução completa de 19 mg de extrato, portanto, a concentração ideal é de 3,17 mg de extrato por mL de fluido.

É importante destacar que a placa empregada para o processo de secagem dos filmes possui uma área de 63,585 cm². Quanto à composição dos filmes, convém mencionar que, para EEPC 5%, emprega-se 600 mg de extrato/placa, 300 mg para EEPC 2,5% e 120 mg para EEPC 1%. Tendo em consideração esses dados e a concentração ideal de fluido obtida na condição *sink*, foi possível determinar a melhor escolha de suporte (falcon) para dar continuidade, bem como e o volume apropriado de fluido simulador no sistema.

Com o intuito de melhorar o funcionamento do sistema, utilizou-se o falcon com menor abertura (2,0096 cm²) para EEPC 5%, EEPC 2,5% e SEEPC, e com maior abertura (6,6019 cm²) para EEPC 1%, devido à menor concentração de extrato. O volume de fluido simulador a ser utilizado no sistema foi definido para cada concentração de filme de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Volume de fluido} = \frac{(Ct * \frac{Af}{At})}{Ccs}$$

Onde, Ct= concentração total de extrato no filme (EEPC 5%= 600; EEPC 2,5%= 300, EEPC 1%= 120); Af= área do falcon escolhido (Falcon maior= 6,6019, falcon menor= 2,0096); At= área total do filme seco (63,585); Ccs= Concentração no ensaio de condição *skin* (3,17)

Após a realização dos cálculos foi definido o volume de fluido necessário para o bom funcionamento do sistema conforme a tabela 7. Os diferentes valores serão considerados nos posteriores cálculos para definição da porcentagem de liberação do extrato em cada amostra de filme. Vale destacar, que para SEEPC, foram considerados os mesmos parâmetros que em EEPC 5%, visto que a amostra não possui concentração de extrato.

Tabela 7 - Relação de volume de fluido, área de filme e concentração de extrato em relação à cada filme

	Volume de fluido (mL)	Área do filme (cm ²)	Concentração de extrato (mg)
SEEPC	20	2,0096	-

EEPC 1%	12	6,6019	12,46
EEPC 2,5%	10	2,0096	9,48
EEPC 5%	20	2,0096	19,00

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Após a coleta de alíquotas do sistema de hora em hora, conforme descrito na metodologia e posterior leitura de todas as absorvâncias, os dados foram tratados utilizando a seguinte equação para determinação da porcentagem de extrato liberado em cada coleta.

Considerando a equação da reta do extrato bruto em 225 nm:

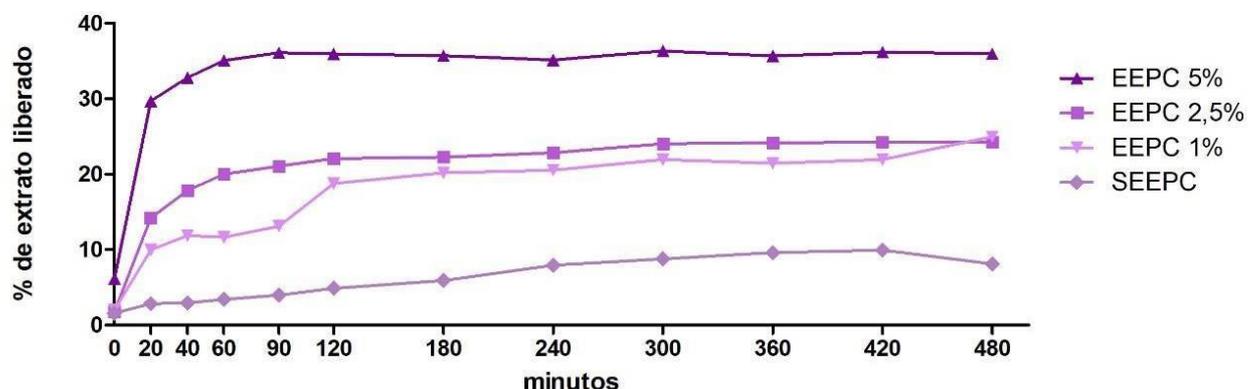
$$\% \text{ liberação } 225\text{nm} = \frac{\left(\left(\frac{ABS + 0,048}{26,454} \right) * 4 \right) * \text{Volume de fluido}}{\text{Concentração de extrato}} \cdot \frac{1}{h}$$

Considerando a equação da reta do extrato bruto em 275 nm:

$$\% \text{ liberação } 275\text{nm} = \frac{\left(\left(\frac{ABS + 0,0363}{14,804} \right) * 4 \right) * \text{Volume de fluido}}{\text{Concentração de extrato}} \cdot \frac{1}{h}$$

Ao analisar as absorvâncias a 225 nm, observa-se (figura 28) que em todos os filmes a liberação acontece de forma gradual e progressiva, em concordância com as premissas desse modelo de sistema (MATOS, *et al.*, 2020). Em média, após 120 min, todos os filmes alcançaram um platô na porcentagem de liberação, mantendo essa porcentagem inalterada ao longo das subseqüentes 8 h. Cabe ressaltar que o EEPC 5% exibe uma liberação mais substancial do extrato, fato esse que se justifica devido ao maior teor de extrato na formulação.

Figura 28 - Porcentagem de extrato liberado dos filmes de quitosana com EEPC, considerando $\lambda=225$ nm.

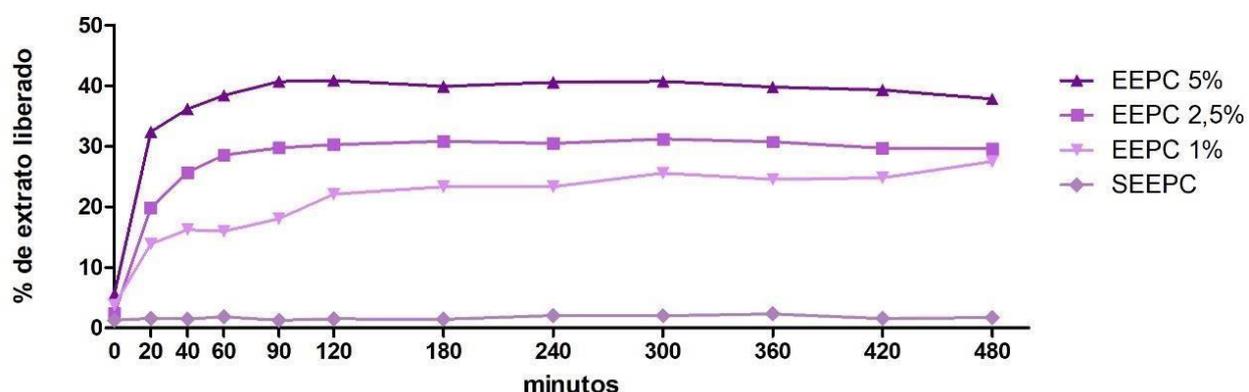


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Além disso, destaca-se que o SEEPC apresenta uma liberação reduzida, inferior a 10%, o que sugere que os valores apresentados nas outras amostras são atribuíveis à presença do extrato nas respectivas formulações. É importante mencionar que todas as amostras demonstram uma tendência de maior liberação em relação ao SEEPC, bem como entre as diferentes concentrações de filme, exceto EEPC 1% vs EEPC 2,5%.

Considerando o espectro de absorção em 275 nm (figura 29), é possível observar um padrão muito parecido com o de 225 nm. O filme EEPC 5% revela uma liberação mais expressiva, alcançando cerca de 38% de liberação do extrato após o platô de liberação, que acontece aos 90 min. Já EEPC 2,5% libera cerca de 22% do extrato após os 90 min de experimento e EEPC 1% cerca de 18% após a estabilização da liberação. Da mesma forma que em 225 nm, as amostras apresentaram uma tendência de maior liberação em relação ao SEEPC e entre as diferentes concentrações de filme, exceto EEPC 1% vs EEPC 2,5%.

Figura 29 - Porcentagem de extrato liberado dos filmes de quitosana com EEPC, considerando $\lambda=275$ nm.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

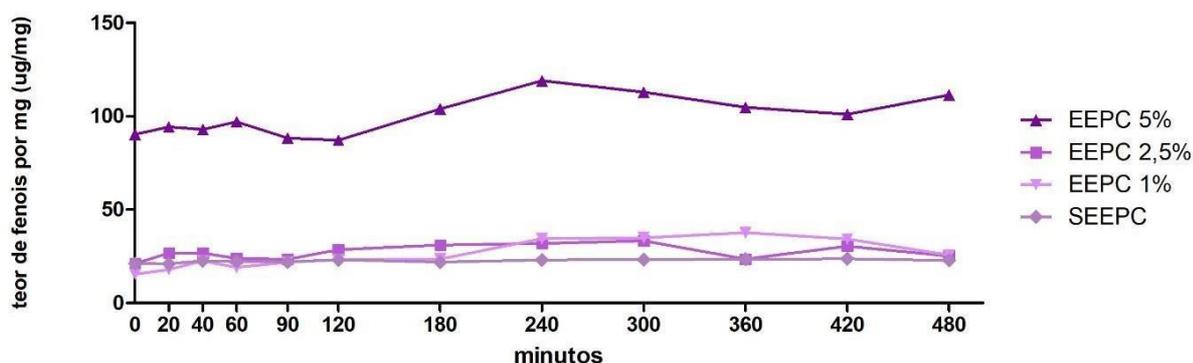
Os resultados do estudo de liberação, em ambos os espectros, corroboram com o modelo de formulação escolhido, onde os filmes geram um sistema de liberação controlada do ativo veiculado. Observa-se que após 90 min, em média, de contato com o fluido simulador de feridas, é determinado um platô de liberação dos constituintes do extrato, o qual é carregado até o final dos 480 min. Esse modelo de sistema caracteriza uma liberação mais assertiva, direcionada e segura, permitindo que os ativos cheguem diretamente ao local desejado e permaneçam em atuação por mais tempo (MATOS, *et al.*, 2020).

A liberação mais alta apresentada pelo EEPC 5%, em ambos os espectros de absorção, provavelmente se dá pela maior concentração de compostos do extrato na sua composição. Essa maior liberação permite com que o extrato atue de forma mais intensa e promova maiores benefícios ao local de aplicação. O mesmo padrão de liberação aqui encontrado é relatado por outros autores na literatura, filmes de maior concentração de extrato na composição com maior porcentagem de liberação de ativos e ainda identificação de um platô de liberação após um determinado ponto do estudo (PEREIRA, *et al.*, 2022; YASSUE-CORDEIRO, *et al.*, 2015).

Com as mesmas alíquotas retiradas durante o estudo de liberação, procedeu-se a dosagem de compostos fenólicos, a fim de determinar a concentração desses compostos liberados durante o estudo. Sabe-se que EEPC é rico em compostos fenólicos (PAULA *et al.*, 2021), portanto, se houver detecção dessa classe de compostos nas alíquotas retiradas pode-se correlacionar com a liberação desses

ativos. Na figura 30, observamos o resultado do teor de fenóis em $\mu\text{g}/\text{mg}$ em equivalentes de ácido tânico.

Figura 30 - Doseamento de compostos fenólicos presente nas alíquotas retiradas do estudo de liberação dos filmes de quitosana com EEPC.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Observa-se que os filmes SEEPC, EEPC1% apresentaram resultados semelhantes no doseamento, indicando que a presença desses compostos em ambas as amostras de filmes são baixas. No filme EEPC2,5% foi possível detectar um pouco mais desses compostos quando comparado com as duas outras amostras, porém os valores não chegam a $30 \mu\text{g}/\text{mg}$ de teor de fenóis. No entanto, no filme EEPC 5% foi possível detectar uma dosagem mais elevada, chegando a $100 \mu\text{g}/\text{mg}$. Esses resultados corroboram com os dados apontados durante o estudo de liberação e corrobora com a composição rica de EEPC em compostos fenólicos (PAULA *et al.*, 2021; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2013).

5.7.2.3 Determinação do peso médio e espessura dos filmes

A determinação de peso médio e da espessura é de extrema importância para avaliar os parâmetros de uniformidade dos filmes, o que, por sua vez, permite compreender sobre a distribuição homogênea dos constituintes em todo o filme (GUIMARÃES, 2019). No entanto, alcançar essa uniformidade através da metodologia escolhida pode representar um grande desafio. O processo de secagem por evaporação de solvente pode resultar em uma distribuição desigual dos compostos, impactando diretamente no peso médio e na espessura dos filmes (SOBRAL, 1999).

Na tabela 8, observa-se os resultados de peso médio e espessura obtidos pelos filmes formulados.

Tabela 8 - Peso médio e espessura dos filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações de EEPC

Filmes	Peso médio (g)	Espessura (mm)
SEEPC	0,037 ± 0,01	0,159 ± 0,11
EEPC 1%	0,038 ± 0,01	0,098 ± 0,03
EEPC 2,5%	0,044 ± 0,01	0,147 ± 0,03
EEPC 5%	0,045 ± 0,02	0,194 ± 0,10 ^a

Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à EEPC 1%.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Pode-se notar que o peso médio dos filmes variou entre 0,037 e 0,045 g. Contudo, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre nenhuma das amostras. No que se refere à espessura, observou-se uma variação entre 0,098 e 0,194 mm, sendo que somente entre os filmes EEPC 5% e EEPC 1% foi constatada uma diferença significativa ($p < 0,05$). Esse fato destaca a influência do aumento de extrato na composição dos filmes sobre a sua espessura.

De acordo com Jiménez *et al.* (2012), é essencial buscar uma uniformidade na espessura dos filmes, a fim de evitar problemas mecânicos e garantir a sua qualidade. Neste contexto, é relevante observar os baixos resultados de desvio padrão, sugerindo que as amostras analisadas exibem propriedades ideais quanto à uniformidade da espessura. Esta consistência na espessura é de suma importância, pois contribui para assegurar a sua resistência durante a utilização.

Filmes de quitosana preparados também pelo método de *casting* com a incorporação de ativos, apresentam resultados de espessura próximos aos obtidos nas amostras formuladas. Por exemplo, filmes de quitosana incorporados com extratos de folhas de manga reportaram espessura variando entre 0,143 e 0,209 mm (RAMBABU *et al.*, 2019).

Os autores relacionam o aumento da espessura dos filmes, quando incorporados com substâncias ativas, como extratos, à possível agregação desses

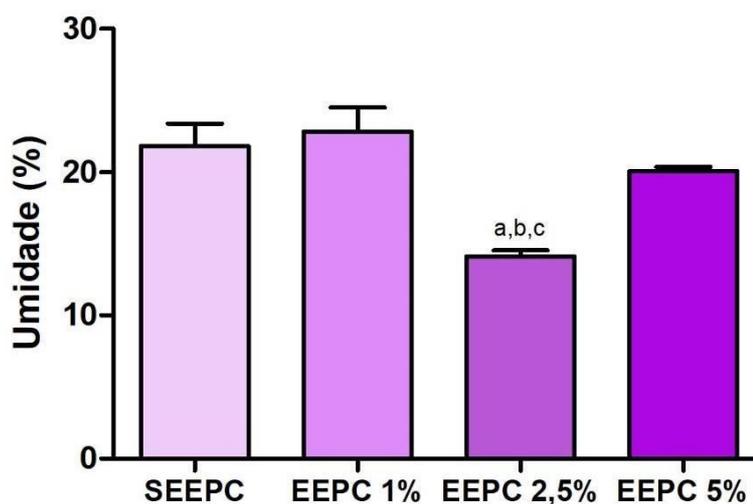
compostos na matriz polimérica. Essa agregação pode resultar em filmes mais espessos (ABREU, 2020). Essa correspondência na literatura corrobora com os resultados apresentados e sugere que a incorporação do extrato em nossa matriz de quitosana segue o padrão dos estudos anteriores.

5.7.2.4 Determinação da umidade

A avaliação da porcentagem de umidade nos filmes desempenha um papel crucial em seu desempenho eficaz. É essencial que os filmes possuam capacidade de manter e transportar a umidade em níveis adequados, a fim de evitar o ressecamento, e ao mesmo tempo, facilitar o processo de migração celular nos casos de feridas (MCCOLL *et al.*, 2007).

A figura 31 apresenta os resultados relativos à porcentagem de umidade em cada filme. Verifica-se que os filmes SEEPC, EEPC 1% e EEPC 5% mantiveram consistentemente uma porcentagem de umidade em torno de 20%, sem apresentar diferenças significativas. Porém, apenas o filme EEPC 2,5% apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a todos os outros filmes.

Figura 31 - Porcentagem de umidade dos filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações de EEPC.



Análise estatística realizada por ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Onde: a = diferença significativa em relação a SEEPC, b= diferença significativa em relação a EEPC 1% e c= diferença significativa em relação a EEPC 5%.

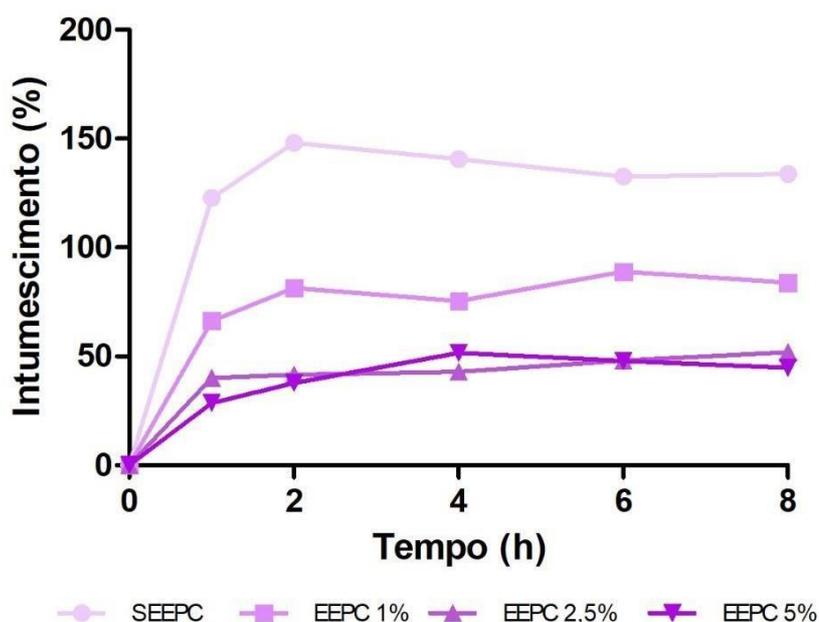
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Filmes de quitosana formulados pela técnica de *casting* e incorporando de 0,25 g a um 1 g de extrato de *Ximenia americana L*, apresentaram porcentagens de umidade entre 16,92% e 25,92% (COSTA, 2022). Por outro lado, Bueno (2019) formulou filmes de quitosana com 5, 10 e 20% de extrato de *A. oleracea* utilizando a técnica de *casting* e encontrou teores de umidade que variaram entre 9,13 e 15,35%. Valores mais elevados de umidade nos filmes sem a adição de extrato, são indicativos da notável capacidade da quitosana de absorver água. Todos esses resultados mostram que o teor de umidade apresentado pelos filmes formulados está de acordo com o esperado pela literatura.

5.7.2.5 Determinação do grau de intumescimento e solubilidade dos filmes

A capacidade de intumescimento dos filmes de quitosana está intrinsecamente relacionada à sua bioadesividade, à capacidade de retenção de exsudato e à liberação de ativos no meio (CIANCA *et al.*, 2020). Essas funções são fundamentais para a sua atuação enquanto filmes curativos, além de contribuir para a adesão no local de aplicação. Na figura 32, é possível visualizar a evolução da capacidade de intumescimento dos filmes ao longo de 8 h de experimento.

Figura 32 - Porcentagem de intumescimento dos filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações de EEPC.



As diferentes amostras não apresentaram diferença estatisticamente significativa, baseado no resultado do teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Ao término do experimento, constatou-se que todos os filmes mantiveram a sua integridade e permaneceram livres de rupturas. Na primeira hora de experimento, nota-se que todos os filmes experimentaram um aumento em sua porcentagem de intumescimento. Nos períodos subsequentes, essas porcentagens demonstraram variações mínimas. É importante ressaltar que, quando comparado com outras amostras de filme, os filmes EEPC 5% e EEPC 2,5% exibiram um grau de intumescimento mais baixo, provavelmente em decorrência da maior concentração de extrato nessas amostras.

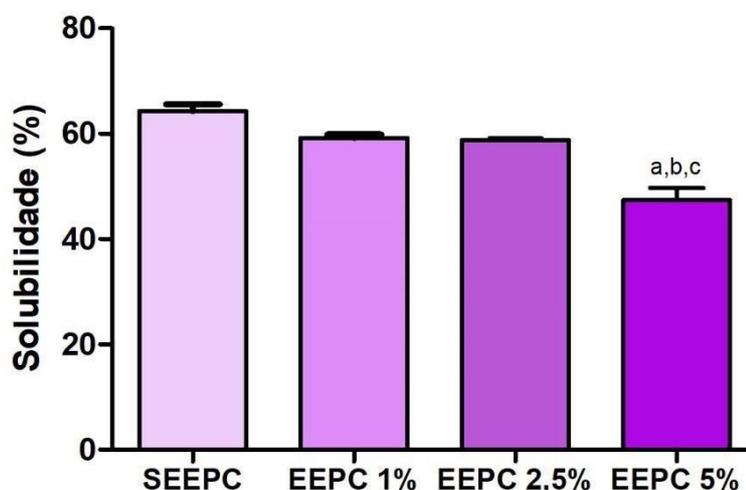
A capacidade de intumescimento dos filmes está diretamente relacionada à presença de grupamentos amino na quitosana, os quais possuem afinidade pela formação de ligações de hidrogênio com a água (SHAH *et al.*, 2019). Esta relação é refletida nos resultados obtidos, onde os filmes sem adição de extrato (SEEP) e o filme com menor concentração (EEPC 1%) apresentaram as maiores porcentagens de intumescimento.

Santos e colaboradores (2023) obtiveram um grau de intumescimento superior a 70% na primeira hora. Essa porcentagem permaneceu relativamente constante nas h subsequentes, alinhando-se com os resultados obtidos. Além disso, eles também notaram que os filmes com maior concentração de extrato tendem a reduzir a porcentagem de intumescimento, um fenômeno semelhante ao observado no filme EEPC 5%.

Acredita-se que a inclusão de determinados compostos nas formulações de quitosana pode diminuir a capacidade de formação de pontes de hidrogênio (BRÁS *et al.*, 2020). Portanto, as menores taxas de intumescimento nos filmes EEPC 5% e EEPC 2,5% podem ser atribuídas à maior presença de extrato na formulação.

Outro parâmetro crucial é a solubilidade, que desempenha um papel fundamental na compreensão da interação entre os componentes do filme quando estão em contato com um exsudato ou outros fluidos aquosos (JAISWAL *et al.*, 2019). Na figura 33, apresentamos os resultados obtidos ao avaliar a solubilidade dos filmes.

Figura 33 - Porcentagem de solubilidade dos filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações de EEPC.



Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à SEEPC; b= diferença significativa em relação à EEPC 1%, c= diferença significativa em relação à EEPC 2,5%.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O grau de solubilidade dos filmes formulados variou entre 70% e 45%. Destaca-se que os filmes com menor proporção de extrato apresentaram valores mais altos de solubilidade, assim como o SEEPC. Esse fato acontece devido à presença de uma maior proporção de extrato incorporado, o qual modifica as estruturas moleculares da solução base e acrescenta uma maior proporção de compostos insolúveis em água. É importante ressaltar que apenas o filme EEPC 5% apresentou uma diferença significativa em relação a todos os outros filmes ($p < 0,05$).

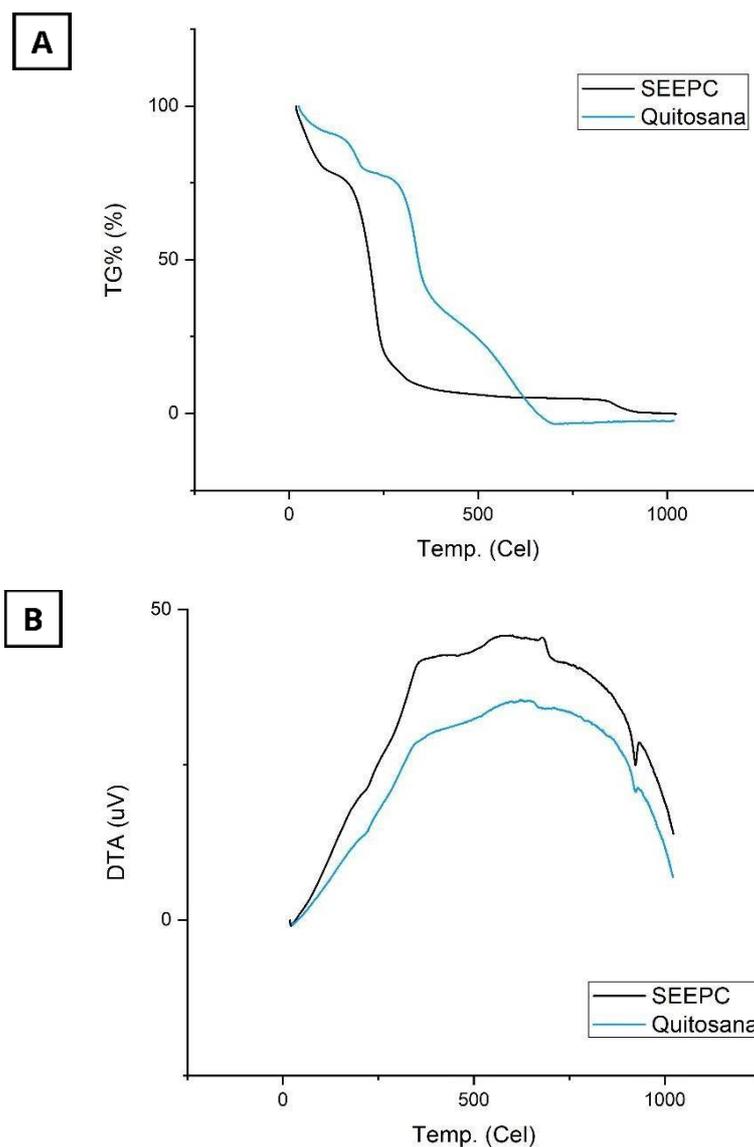
Essa redução da solubilidade dos filmes com o aumento da concentração do extrato é consistente com as observações feitas por Wang e colaboradores (2019). Em seus estudos sobre filmes de quitosana incorporados com extrato de *Herba Lophatheri*, os autores sugeriram que essa redução da solubilidade dos filmes após a incorporação de extratos, pode estar relacionada às interações entre os componentes do extrato e a quitosana, resultando em uma diminuição na afinidade dos filmes pela água (KALAYCIOĞLU, *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019).

5.7.2.6 Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TGA) dos filmes

Avaliar o comportamento térmico de uma formulação é de suma importância para entender sobre a sua estabilidade, por isso foram conduzidas as análises

termogravimétricas. Inicialmente, avaliou-se o comportamento do pó de quitosana puro e do filme de quitosana SEEPC por TGA e DTA (Figura 34). Pode-se observar que as curvas entre os dois compostos apresentam bastante similaridade, principalmente na massa final.

Figura 34 - Análise térmica da quitosana pura e do filme SEEPC.



A- Curva de TGA do pó de quitosana e do filme SEEPC. B- Curva de DTA do pó de quitosana e do filme SEEPC.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

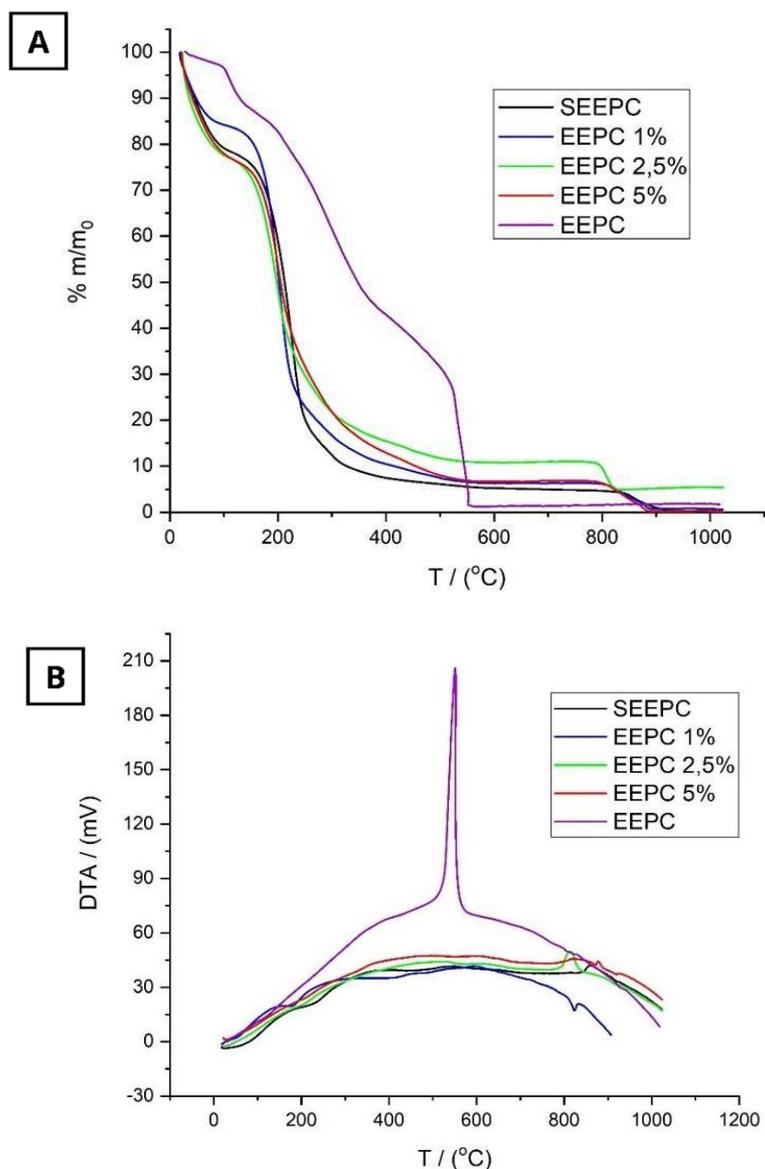
É possível observar no gráfico de TGA (Figura 34 - A) que SEEPC apresentou uma perda de massa mais rápida e mais pronunciada do que a quitosana pura. Esse fato se justifica pela presença de água residual do processo de formulação ainda nos

filmes. Em ambas as amostras, em torno de 200 e 350 °C, acontece uma redução de massa mais significativa indicando a despolimerização e decomposição do polissacarídeo, quitosana. Em 300 °C a quitosana pura perdeu 26% da sua massa total, enquanto o filme SEEPC já perdeu 86% da sua massa total.

Nas curvas de DTA (Figura 34 – B) podemos observar que próximo de 300 °C ambas as amostras apresentam o primeiro pico de decomposição. Sabe-se que filmes de quitosana apresenta uma perda de massa significativa entre 30 e 110 °C devido a perda da água adsorvida pela amostra e outra perda de massa entre 250 e 352 °C no processo de degradação térmica da amostra (SHAH, *et al.*, 2019).

Na figura 35, pode-se avaliar a análise térmica de todas as amostras de filme. Considerando os filmes elaborados com EEPC e a amostra sem a incorporação de nenhum extrato.

Figura 35 - Análise térmica do extrato puro e dos filmes de quitosana incorporados com EEPC.



A- Curva de TGA dos filmes com EEPC e do filme SEEPC. B- Curva de DTA dos filmes com EEPC e do filme SEEPC.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Como já determinado na literatura para esses modelos de formulação, em torno de 110 °C acontece uma perda de massa significativa devido a água residual nos filmes (SHAH, *et al.*, 2019). Nos gráficos de TGA, figura 35-A é possível observar com nitidez essa perda. Além disso, podemos observar que nas amostras com extrato essa perda é ainda mais significativa devido a presença de compostos voláteis entre os componentes do extrato.

Espera-se que compostos que serão comercializados não apresentem degradação térmica em até 40 °C para que possam ser armazenados fora de refrigeração e não sofram influência da temperatura ambiente (DABIRI *et al.*, 2016). Considerando os dados de estabilidade térmica das amostras, podemos considerar que as amostras não teriam problemas para serem armazenados e comercializados.

Com base na figura 35-A, pode-se averiguar que ao chegar nos 1000 °C, o extrato apresenta um valor de massa residual de 1,72%, enquanto os filmes incorporados com EEPC apresentam um valor de massa residual de 0,64% para EEPC1%, 0,43 para EEPC2,5% e de 0,17% para EEPC 5%. O valor de massa residual dos filmes demonstra uma diminuição à medida que mais extrato é incorporado. O valor mais elevado de massa residual de EEPC pode-se relacionar com a presença de espécies iônicas ionizáveis.

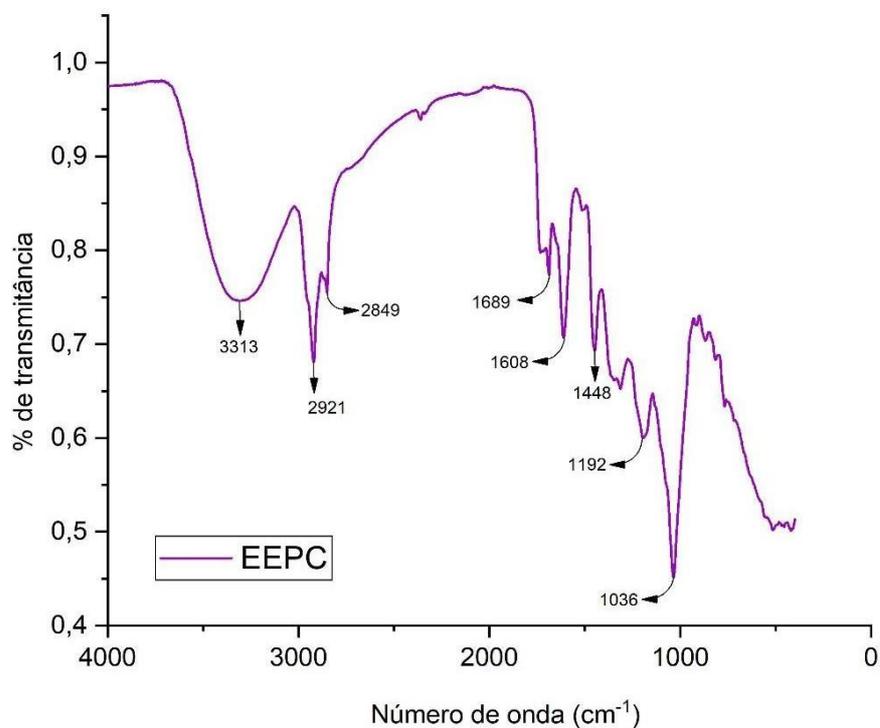
5.7.2.7 Espectroscopia eletrônica vibracional na região do infravermelho dos filmes

A técnica de espectroscopia eletrônica vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é fundamentada na incidência de radiação na região do infravermelho em uma amostra sólida. Sabe-se que a energia envolvida nos modos vibracionais das ligações é da mesma grandeza do infravermelho, e baseado nisso, a técnica é utilizada para monitorar ligações químicas de grupos funcionais.

Ao misturar diferentes compostos em uma formulação, diferentes moléculas podem interagir e por consequência gerar alterações nos modos vibracionais. Essas interações podem causar aumento, redução, restrição ou intensificação das bandas apresentadas pelas substâncias isoladas, ocasionando deslocamento, redução ou supressão de bandas (ARRAIS, 2012)

No espectro de EEPC (figura 36) são identificadas as principais bandas em 3313, 2921, 2849, 1689, 1608, 1448, 1192 e 1036, as quais estão correlacionadas diretamente aos compostos que são esperados na composição desse extrato.

Figura 36 - Espectros de infravermelho em conjunto do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*.



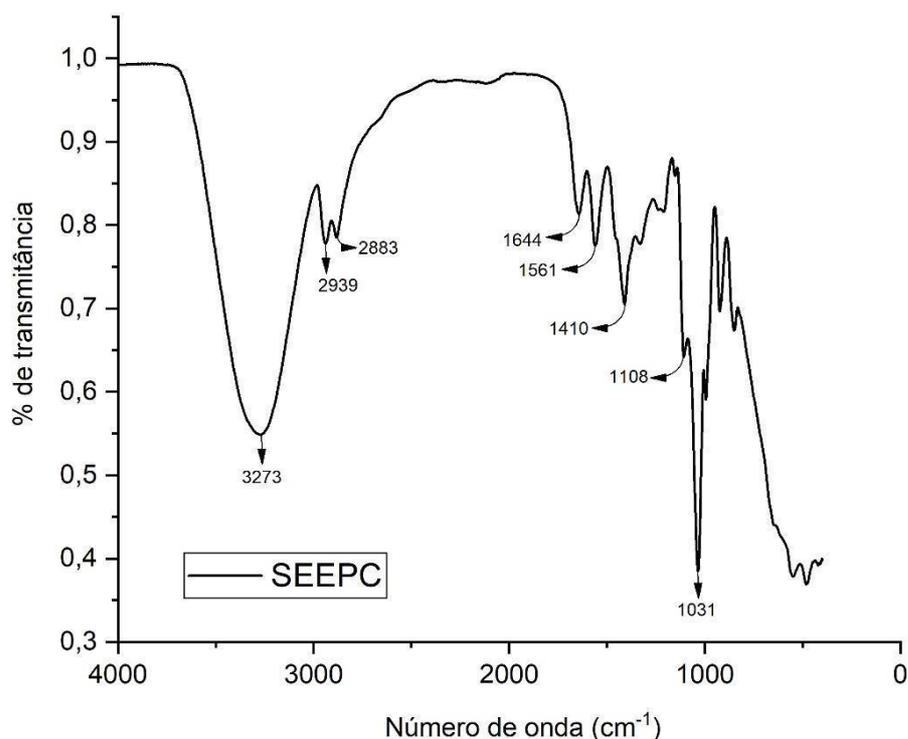
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Sabe-se que bandas fortes e amplas, na faixa de 3000 a 3600 cm^{-1} , correspondente a ligações de estiramento O-H devido a ligações de hidrogênio (NETALA *et al.*, 2016). No espectro observa-se uma banda de absorção em 3313 cm^{-1} , característica de compostos fenólicos, presentes nessa amostra. Os picos duplos em 2921 e 2849 cm^{-1} , são agudos e correspondem ao modo vibracional do alongamento de C-H (SAMPAIO *et al.*, 2016).

O pico em 1608 e 1689 cm^{-1} , corresponde ao modo vibracional de estiramento de C=C aromático, derivado de flavonoides (PAULA *et al.*, 2023). Picos em torno de 1060 cm^{-1} indica as vibrações de estiramento de C-O correspondendo à presença de álcool, ácido carboxílicos, éteres e ésteres (FRAZOLIN *et al.*, 2022; NETALA *et al.*, 2016).

Na figura 37, observa-se o espectro infravermelho do filme de quitosana sem nenhuma adição de extrato. Verifica-se que as principais bandas dessa amostra estão em 3273, 2939, 2883, 1644, 1561, 1410, 1108 e 1031 cm^{-1} .

Figura 37 - Espectros de infravermelho do filme de quitosana sem a incorporação de EEPC.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

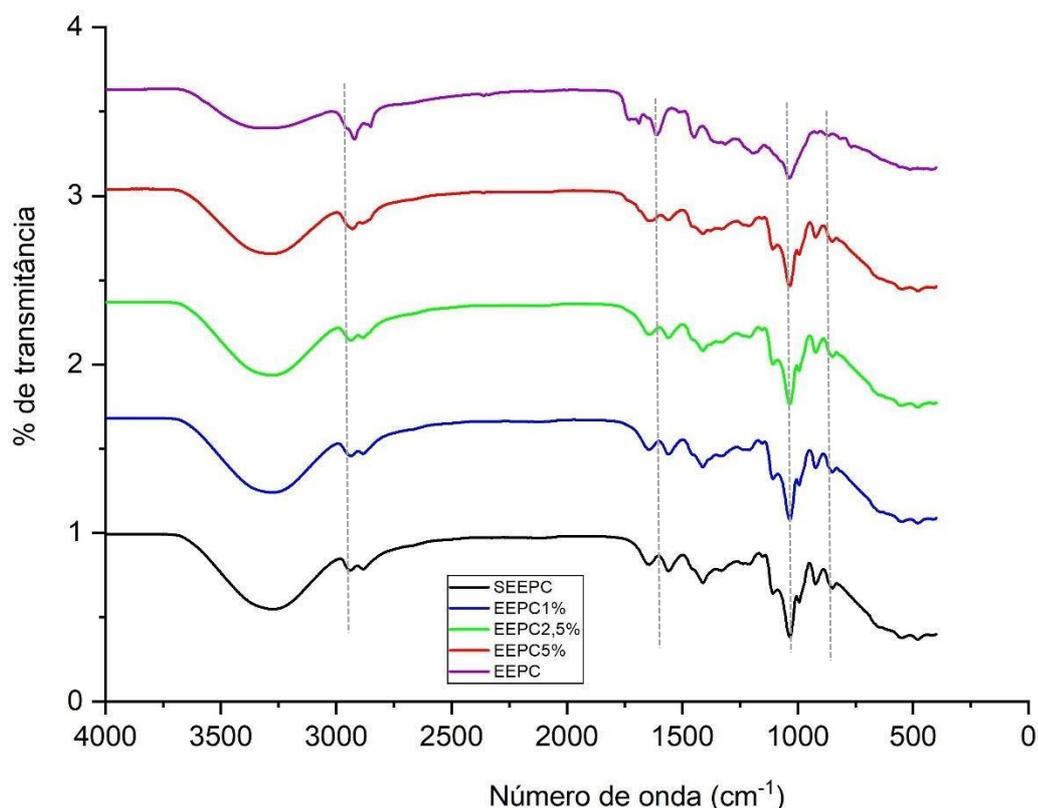
Bandas na região de 3000 e 3500 cm^{-1} correspondente as ligações N-H e as vibrações do grupamento O-H, representado pelo pico amplo em 3273 cm^{-1} . Ambos os grupos funcionais estão presente nos filmes SEEPC, devido a estrutura originária da quitosana e de grupamentos O-H derivados da glicerina. Picos nessa região também foi identificado por outros autores, os quais formulavam filmes de quitosana com a mesma metodologia aqui proposta (ESCÁRCEGA *et al.*, 2018; LECETA *et al.*, 2013; FRÁGUAS *et al.*, 2015)

O pico encontrado em 1640 cm^{-1} pode indicar o alongamento de C=O, derivado da amida I derivada da molécula da quitosana. Assim como o pico em 1561 cm^{-1} representa a amida II, devido a curvatura N-H e 1108 cm^{-1} a amida III pelo seu alongamento C-N (LECETA *et al.*, 2013). Os picos de 2939 e 2883 cm^{-1} são atribuídas aos grupos CH_2 das piranoses (FRÁGUAS *et al.*, 2015). Enquanto o pico em Pico 1410 cm^{-1} vibrações de ligações O-H (PAWLAK *et al.*, 2003). Já o pico em 1031 cm^{-1} é atribuído ao estiramento de C-O (BRÁS *et al.*, 2020).

Espera-se que após a adição do extrato na formulação aconteça alteração nas bandas apresentadas pelo filme SEEPC. A união de composto gera novas interações,

e por consequência, deslocando, aumentando ou diminuindo as bandas já apresentadas. Na figura 38 observa-se o espectro de todas as amostras de filme em comparação com o EEPC e com o filme SEEPC.

Figura 38 - Espectros de infravermelho dos filmes de quitosana incorporados com EEPC, do EEPC puro e do filme sem a incorporação de extrato.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A primeira alteração que pode ser percebida é o alongamento da banda na região de 3300 cm^{-1} apresentada pelo extrato após a incorporação com os constituintes do filme. Nessa mesma região já eram identificadas interações na amostra sem adição de extrato (SEEPC) porém, após a sua adição aconteceu uma intensificação. Essa região é característica do estiramento de ligações O-H, já identificadas nos compostos isolados, portanto, após a junção dos constituintes pode ter acontecido uma integração, representada no alongamento da região.

Em EEPC são identificados picos na região de 1600 cm^{-1} que são reduzidos após a junção com a solução base dos filmes. Nessa região são identificados

estiramento de C=C aromático, os quais provavelmente se transformaram em novas ligações químicas em outras regiões.

O leve pico apresentado em 1035 cm^{-1} pelo EEPC é intensificado após a inclusão com a solução base. Esse fato se dá por ser uma região de alta vibração de estiramento de C-O, já apresentados pelos filmes sem adição de extrato. Outra característica marcante é o aumento dos picos na região de 950 cm^{-1} , onde não era identificado ligações em EEPC puro.

Terrazas (2019) não encontrou deslocamento no espectro de FTIR ao comparar os seus filmes formulados com 0,1% do extrato das cascas dos frutos de jabuticaba com o filme controle. A autora relata que aconteceu uma pequena alteração na absorbância ao adicionar o extrato e justifica esse resultado com o aumento de ligações químicas na matriz dos filmes.

Rodrigues e colaboradores (2020), formularam filmes de quitosana com gelatina e extrato das cascas de jabuticaba. Os autores relatam que através do FTIR observaram ligeiras alterações no espectro em relação ao filme sem a adição de extrato. As alterações observadas são justificadas pela interação entre os polímeros e os constituintes do extrato.

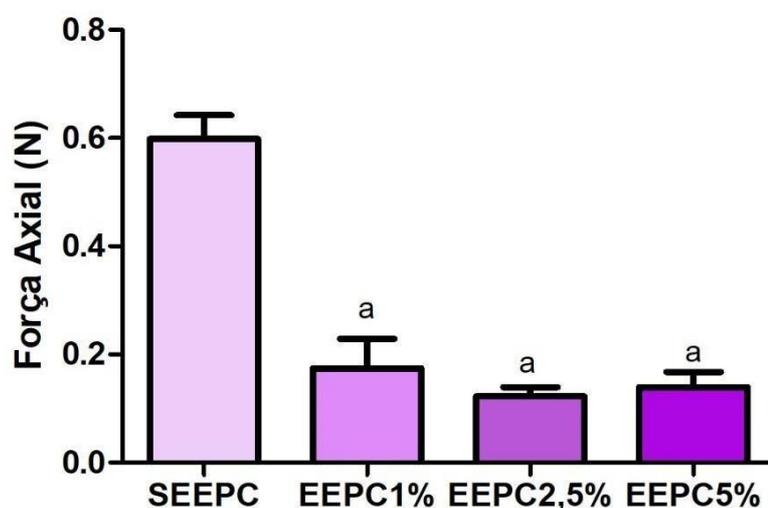
Assim como relatado na literatura, a incorporação do extrato gera alterações em diferentes regiões de onda. Essas modificações são positivas, pois indicam que de fato aconteceu a incorporação dos constituintes do extrato com os componentes dos filmes.

5.7.2.8 Análise dinâmico mecânica nos modos axial e rotacional dos filmes dos filmes

Um dos parâmetros essenciais para formulações de uso tópico é possuir resistência mecânica. No caso dos filmes, precisam suportar cargas mecânicas durante a aplicação no local, manuseio e transporte. É necessário que os filmes consigam manter a sua integridade durante todo o tratamento (SANTOS *et al.*, 2019).

Através do teste de ruptura axial e rotacional, foram avaliadas as propriedades mecânicas dos filmes de quitosana com e sem EEPC. Na figura 39, pode-se observar o comportamento dos filmes em relação ao teste de ruptura axial.

Figura 39 - Análise reológica de ruptura axial dos filmes de quitosana incorporados com EEPC.



Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação à SEEPC.

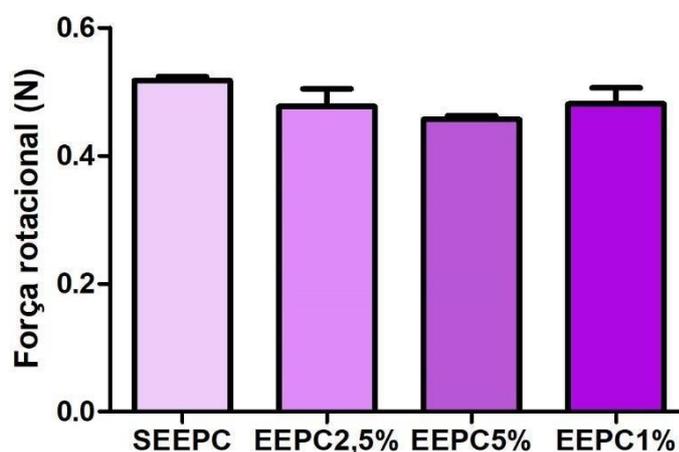
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

No teste de ruptura axial, foi avaliado o comportamento dos filmes em relação à ruptura por estiramento. Podemos observar que quanto a incorporação do extrato reduz significativamente a força necessária para que aconteça a ruptura do filme. Esse resultado indica que os filmes com a adição de extrato ficam menos rígidos quando comparado com o filme sem a incorporação de EEPC. Destaca-se ainda que apesar de não possuir diferença estatisticamente significativa no teste de ANOVA, a adição de extrato em maior proporção diminui ainda mais a força necessária para a sua ruptura.

Acredita-se que essa diferença em relação a SEEPC se dá pela maior presença de agregados sólidos derivados dos componentes do extrato. Após o processo de remoção do solvente durante a secagem, o material sofre uma reestruturação. Nas amostras com maior proporção de extrato, encontra-se uma maior presença de componentes sólidos e por consequência, mais agregados, os quais não se interagem muito bem entre si e por consequência conferem uma menor resistência, resultando em amostras mais quebradiças. Achados semelhantes são encontrados na literatura, onde filmes de quitosana com a incorporação de diferentes extratos apresentam menor resistência mecânica do que os filmes com sem esses ativos (BRÁS et al., 2020; DEBONE et al., 2019).

Além da análise de ruptura axial, os filmes foram submetidos também à ruptura rotacional, onde as amostras são torcidas até que aconteça o rompimento (figura 40).

Figura 40 - Análise reológica de ruptura rotacional dos filmes de quitosana incorporados com EEPC.



Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Diferente do teste de ruptura axial, pode-se observar (figura 40) que a força necessária para o rompimento das amostras não se difere muito do filme sem a incorporação de EEPC. Esses resultados apontam que independente da adição de extrato, a força necessária para que os filmes sejam rompidos não se altera com a adição de extrato.

5.8 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EEPC

5.8.1 Determinação da atividade citotóxica dos filmes

Identificação de novas substâncias e formulações assume uma significância de extrema relevância para o futuro da saúde, principalmente quando se trata de formulações direcionadas ao tratamento de feridas e dotadas de propriedades antimicrobianas. Entretanto, além do processo de desenvolvimento, a biocompatibilidade desses sistemas é de suma importância para a utilização na prática clínica (BRÁS *et al.*, 2020)

Com o propósito de avaliar a toxicidade dos filmes formulados, procedeu-se a realização de um ensaio de viabilidade celular por meio do ensaio de redução MTT em formazan. Sabe-se que a reação de redução acontece pela atividade mitocondrial

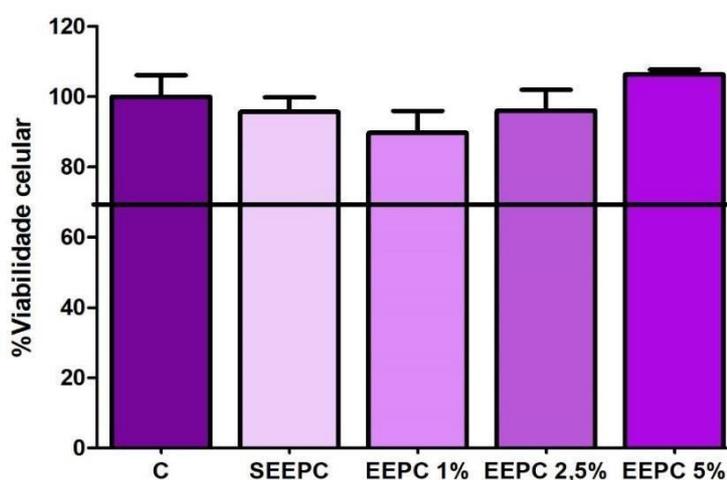
de células ativas, portanto, proporcionalmente à formação de formazan inferimos sobre a sobrevivência das células (XAVIER, 2021). Os macrófagos e os fibroblastos

foram as células escolhidas por estarem diretamente associados ao processo de recuperação de feridas, principalmente durante a fase inflamatória (SILVA *et al.*, 2019)

Conforme a ISO10993-5 (2009), o ensaio de MTT deve apresentar uma viabilidade celular acima de 70% para ser considerada apropriada. Dessa forma, com base nos resultados apresentados na figura 41, podemos afirmar que todos os filmes,

quando testados em macrófagos, conseguem manter a viabilidade celular em conformidade com os critérios estabelecidos, ou seja, acima de 70%.

Figura 41 - Avaliação da citotoxicidade dos filmes de quitosana com EEPC em macrófagos de camundongos BALB/c.

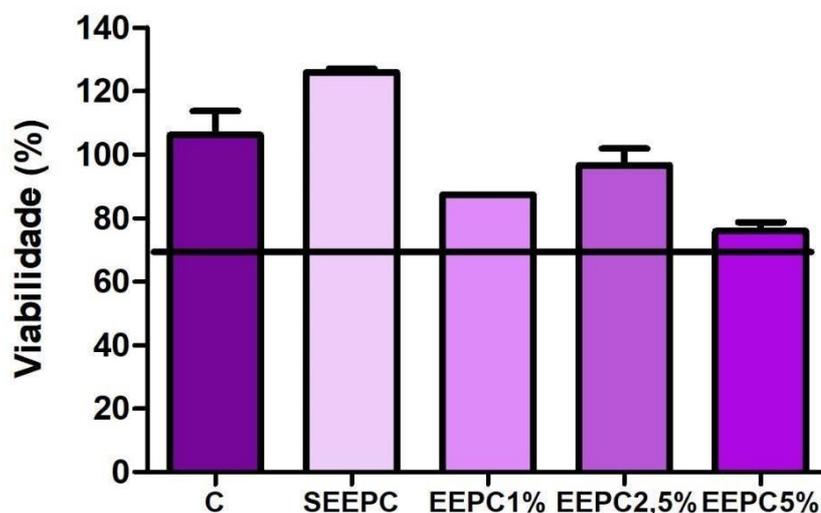


Legenda: C= células tratadas apenas com DMSO.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O teste de viabilidade celular também permite avaliar a biocompatibilidade da formulação com as células locais (ISO10993-5, 2009). Logo, os filmes desenvolvidos são apropriados para aplicação, uma vez que não evidenciam indícios de toxicidade. Tais descobertas estão em consonância, visto que a quitosana é reconhecida por ser um polímero biocompatível, e o EEPC puro também demonstra excelentes resultados de viabilidade celular. A fim de verificar o efeito citotóxico dos filmes também em fibroblastos foi realizado o mesmo ensaio com a linhagem L929 de fibroblastos (figura 42).

Figura 42 - Avaliação da citotoxicidade dos filmes de quitosana com EEPC em fibroblastos L929.



Legenda: C= células tratadas apenas com DMSO.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Pode-se observar que assim como em macrófagos, os filmes não se mostraram tóxicos aos fibroblastos dessa linhagem. Os filmes apresentaram uma viabilidade celular variando 75% e 100% frente as células avaliadas. De acordo com a ISO10993-5 (2009), a substância para ser considerada atóxica precisa apresentar uma viabilidade acima de 70%, como apresentado pelas amostras de filme. Portanto, podemos considerar que os filmes não são tóxicos às linhagens de macrófagos e de fibroblastos avaliadas.

5.8.2 Determinação da atividade anti-inflamatória dos filmes

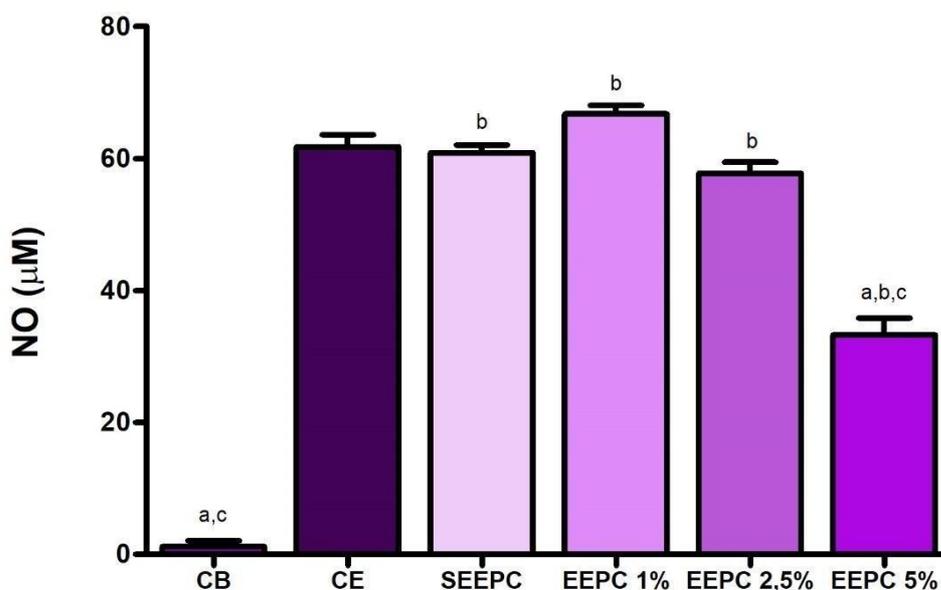
5.8.2.1 Ensaio de dosagem de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico é um radical produzido por macrófagos em células endoteliais através de ação enzimática, com capacidade de ativar enzimas ciclo-oxigenases e aumentar o nível de prostaglandinas, agravando, assim o processo inflamatório. Adicionalmente, ele age em conjunto com outros mediadores inflamatórios, promovendo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (MAN, *et al.*, 2022).

Com o propósito de avaliar o efeito anti-inflamatório dos filmes, foi realizado o ensaio de dosagem de óxido nítrico (NO). Os resultados (figura 43) indicam que somente o EEPC 5% foi capaz de reduzir de maneira significativa ($p < 0,05$) a produção

de NO em relação ao grupo controle. Em todas as outras amostras testadas não aconteceu a redução da produção desse radical.

Figura 43 - Dosagem de óxido nítrico em macrófagos de camundongos BALB/c, após estímulo com LPS, IFN- γ e tratamento com os filmes de quitosana incorporado com EEPC em diferentes concentrações.



Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação ao controle; b= diferença significativa em relação ao basal, c= diferença significativa em relação à SEEPC.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O filme EEPC5% conseguiu reduzir em 46% a produção de NO quando comparado com o grupo controle. Sugere-se que o efeito apresentado pelo filme EEPC 5% não se deve unicamente à presença da quitosana, mas sim à integração com os componentes do extrato. Outros ensaios já realizados demonstram melhor eficácia pelo filme EEPC 5%, possivelmente devido à melhor integração entre os compostos do extrato com a matriz polimérica. Além disso, EEPC 5% se destaca como a amostra que libera maior quantidade desses compostos, o que explica maior potência e significância do seu efeito observado.

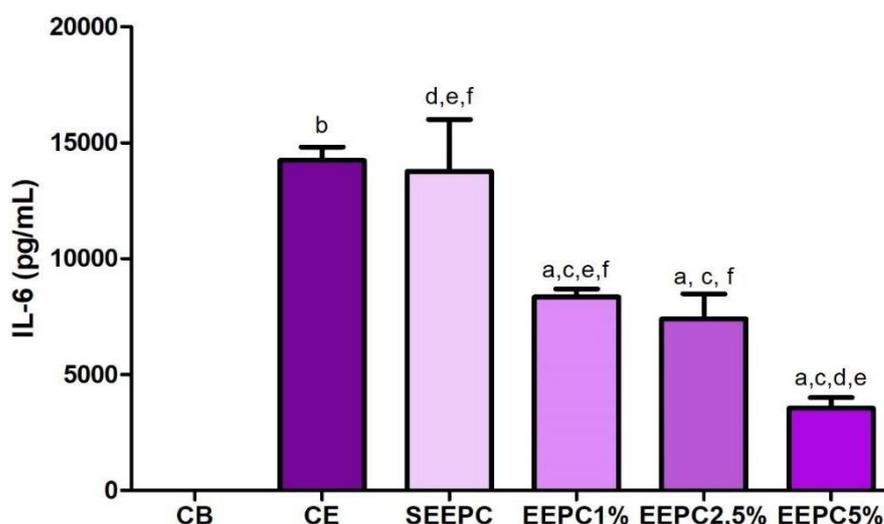
5.8.2.2 Ensaio de dosagem de citocina pró-inflamatória Interleucina-6

A modulação da expressão de citocinas pro-inflamatórias representa uma estratégia crucial para interromper e controlar uma resposta inflamatória. Por sua vez,

a interleucina 6 (IL-6), é um desses exemplos (WU *et al.*, 2019). Sintetizadas por monócitos, essa citocina atua na resposta imunológica ao controlar a síntese de outras citocinas, como TNF α e IL-1 favorecendo a síntese de substâncias na fase aguda da inflamação (GOMES *et al.*, 2009).

Ao avaliar a produção de IL-6 em macrófagos após o tratamento com os diferentes filmes, podemos observar (figura 44) todas as amostras apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) da produção dessa interleucina em relação ao grupo estímulo, exceto o filme SEEPC. O filme EEPC5% conseguiu inibir 75% a produção de IL-6 quando comparado com o grupo estímulo, o filme EEPC 2,5% reduziu 49% e EEPC 1% reduziu 41% dessa produção.

Figura 44 - Dosagem da produção de IL-6 em macrófagos após estímulo com LPS e tratamento com os filmes de quitosana incorporado com EEPC em diferentes concentrações.



Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação ao CE; b= diferença significativa em relação à CB, c= diferença significativa em relação à SEEPC, d= diferença significativa em relação à EEPC1%, e= diferença significativa em relação à EEPC2,5% e f= diferença significativa em relação à EEPC5%.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Acredita-se que a atividade anti-inflamatória apresentada pelos filmes se dá tanto pela composição do extrato, rica em fenóis e flavonoides, visto que o filme SEEPC não apresentou redução da produção de IL-6. No estudo de Brás e colaboradores (2020), o filme formulado apenas com quitosana e os que foram

incorporadas com extrato, foram capazes de reduzir a produção de IL-6 em fibroblastos estimulados com LPS.

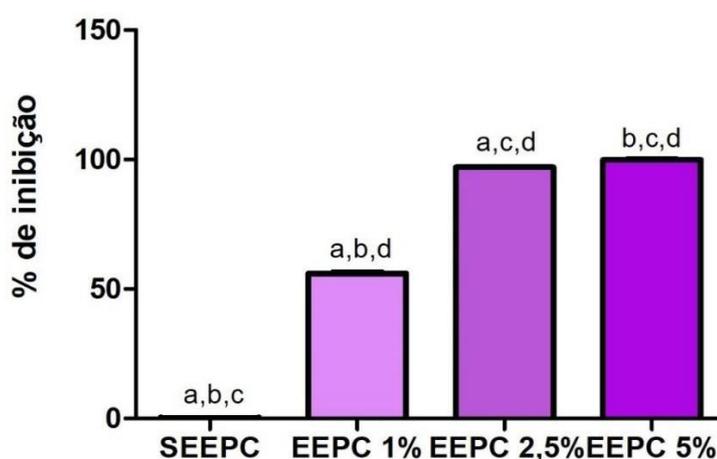
Com os resultados apresentados, pode-se observar que o filme EEPC5% apresenta um maior efeito inibitório, reduzindo mais da metade da produção de IL-6. Esse resultado corrobora com os achados anteriores, onde esse filme se demonstra mais eficiente e com maior capacidade anti-inflamatória, demonstrado no ensaio de óxido nítrico. Esse fato acontece devido à sua melhor performance na liberação e na melhor homogeneidade dos compostos, visualizado na avaliação reológica e na microscopia eletrônica de varredura.

5.8.3 - Determinação da atividade antioxidante dos filmes

5.8.3.1 - Método de sequestro de radical livre DPPH• e de redução do complexo de fosfomolibdênio

O radical livre DPPH tem a capacidade de avaliar o potencial de determinados compostos de eliminar radicais livres e assim, por consequência, inferir sobre a atividade antioxidante dos ativos. Observa-se com a figura 45, que ao aumentar a concentração de extrato, aumenta-se a porcentagem de inibição dos radicais DPPH, ou seja, aumenta-se a atividade antioxidante dos filmes.

Figura 45 - Avaliação do potencial antioxidante dos filmes de quitosana incorporado com EEPC através dos métodos de sequestro de radical livre DPPH.



Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$), onde a= diferença significativa em relação a EEPC5%; b= diferença significativa em relação à EEPC2,5%, c= diferença significativa em relação à EEPC1% e d= diferença significativa em relação à SEEPC.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Além da potente atividade antioxidante já relatada pelo EEPC, acredita-se que o efeito antioxidante apresentado pelos filmes se relacione com os grupamentos amino, derivados da quitosana (HAFSA *et al.*, 2015). Sabe-se que os radicais livres podem reagir com esses grupamentos amino livres residuais e formar radicais de macromoléculas estáveis (YEN *et al.*, 2008).

Wang e colaboradores (2019), encontraram achados que corroboram com os aqui relatados. Os autores observaram que ao aumentar a concentração do extrato nos filmes, a atividade antioxidante melhora significativamente. O estudo relata ainda que nos filmes com 5% do extrato utilizado, a atividade aumentou em cerca de 3,5 vezes mais em relação ao filme controle.

O método de avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio é uma metodologia indicada para a avaliação de substâncias mais complexas, por permitir avaliar a capacidade antioxidante tanto de substâncias lipofílicas quanto hidrofílicas (PRIETO *et al.*, 1999). De maneira complementar ao teste de redução do radical DPPH, a atividade antioxidante dos filmes foi avaliada também por esse método. Na tabela 9, podemos observar os resultados apresentados pelos filmes em relação a quercetina, rutina e ácido ascórbico.

Tabela 9 - Avaliação do potencial antioxidante dos filmes de quitosana incorporado com EEPC através da redução do complexo fosfomolibdênio.

Complexo Fosfomolibdênio			
Amostra	AAR% relativa à quercetina	AAR% relativa à rutina	AAR% relativa à ácido ascórbico
SEEPc	4,76 ± 1,00 ^{a,b,c}	8,79 ± 0,61 ^{a,b,c}	1,61 ± 0,34 ^{a,b,c}
EEPC 1%	8,11 ± 0,71 ^{a,b,d}	12,87 ± 0,65 ^{a,b,d}	2,75 ± 0,24 ^{a,b,d}
EEPC 2,5%	19,74 ± 0,74 ^{a,c,d}	32,31 ± 1,2 ^{a,c,d}	6,09 ± 0,87 ^{a,c,d}
EEPC 5%	43,79 ± 0,14 ^{b,c,d}	71,58 ± 0,17 ^{b,c,d}	15,21 ± 0,55 ^{b,c,d}

Legenda: AAR%= Porcentagem relativa à quercetina, rutina ou ácido ascórbico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$) onde a= diferença significativa em relação a EEPC5%; b= diferença significativa em relação à EEPC2,5%, c= diferença significativa em relação à EEPC1% e d= diferença significativa em relação à SEEPc.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Pode-se observar que a atividade antioxidante aumenta em relação ao aumento da concentração de extrato, assim como no ensaio de DPPH. Vale destacar o maior efeito apresentado pelo filme EEPC5% apresentando uma porcentagem relativa de 43,79% em relação a quercetina, de 71,58% em relação a rutina e de 15,21% em relação ao ácido ascórbico. Sendo essa, a amostra mais eficaz, assim como observado nos resultados anteriores. Corroborando com a hipótese de EEPC5% ser a amostra mais eficaz devido a maior homogeneidade dos compostos em sua formulação e por consequência ser passível de maior atividade biológica.

O efeito antioxidante apresentado pelo SEEPC se dá devido à presença dos grupamentos amino da quitosana. Porém, pode-se observar que esse efeito é significativamente potencializado após a adição do extrato nos filmes. Assim como os resultados apresentados pelo EEPC puro, os valores mais baixos em AAR% em relação ao ácido ascórbico, acontece pelo fato de o extrato possuir mais compostos fenólicos e por consequência apresentarem maior similaridade com a rutina e quercetina.

5.8.4 - Determinação da atividade antimicrobiana dos filmes

Uma aplicação fundamental dos filmes de quitosana na prática clínica envolve o seu uso como curativos modernos. Embora esses filmes possuíssem características promissoras para essa finalidade, não foi avaliado ainda a sua eficácia enquanto antimicrobiano. É de suma importância que os curativos atinjam a finalidade de protetor frente a microrganismos, visto que esta é uma das principais causas de complicações das lesões de pele (ABDO *et al.*, 2020).

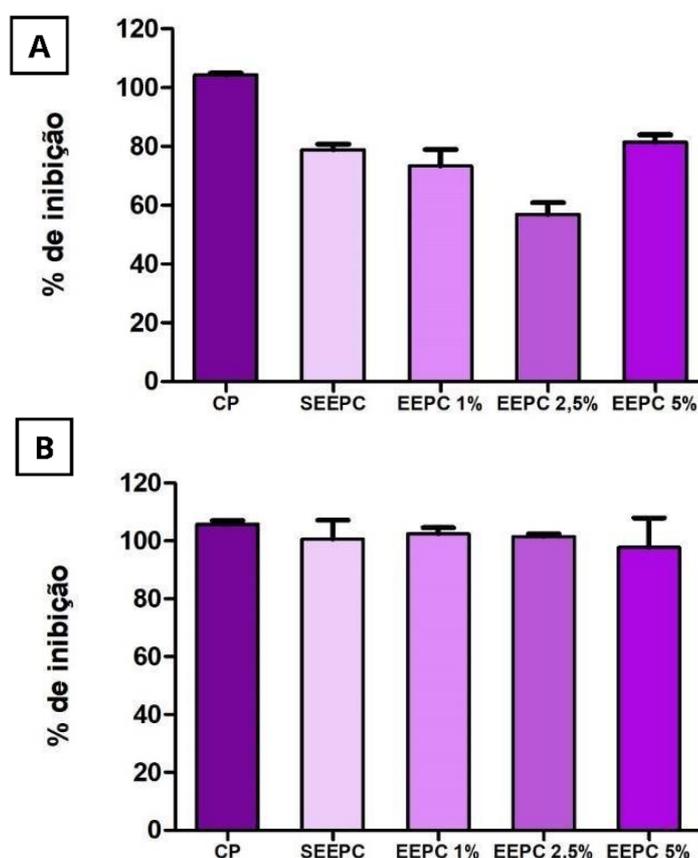
Sabe-se que os principais microrganismos colonizadores de infecções cutâneas são *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *E. Coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *P. mirabilis*, *A. baumannii* e *C. albicans* (OLIVEIRA *et al.*, 2021; MORAIS, 2022). Devido a composição rica em compostos fenólicos de EEPC e dos relatos do potencial antimicrobiano da quitosana (FIDELIS, 2019; XIA *et al.*, 2010), acredita-se que os filmes apresentem uma atividade antimicrobiana significativa.

Portanto, os filmes foram avaliados frente a sua atividade antimicrobiano em bactérias e fungos relacionados com a maior incidência de infecção de lesões de pele. Na figura 46, pode-se observar a porcentagem de inibição apresentada pelos filmes frente as diferentes linhagens de *C. albicans*.

Frente à *C. albicans* sensível aos antifúngicos convencionais (figura 46-A), o filme que apresentou maior porcentagem de inibição foi EEPC5%, inibindo cerca de 80% do crescimento desse fungo. Esse fato corrobora com todos os resultados anteriores, onde essa amostra atuou como um melhor anti-inflamatório e melhor antioxidante. Acredita-se que esse resultado se relacione com a maior homogeneidade dos compostos no filme e sua maior capacidade de liberação dos ativos.

Já para *C. albicans* resistente aos antifúngicos convencionais (figura 46-B), podemos observar que a inibição de todas as amostras permaneceu entre 90% e 100%, inclusive do controle positivo. Esse resultado, aponta a grande atividade antifúngica dos filmes de quitosana, indicando a capacidade dos filmes de inibir o crescimento desse fungo. Vale destacar o potente efeito de SEEPC que acontece devido aos grupamentos amino da quitosana.

Figura 46 - Porcentagem de inibição dos filmes de quitosana incorporados com EEPC em diferentes concentrações frente as cepas fúngicas selecionadas.

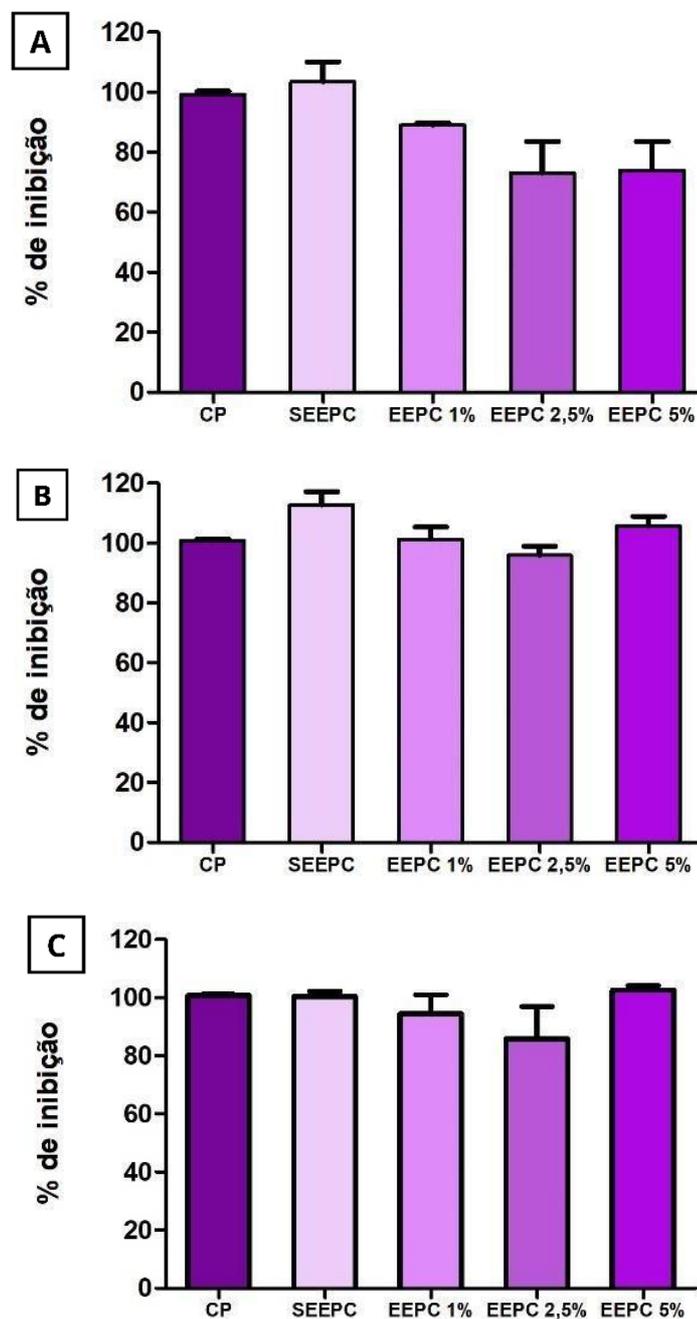


Legenda: A= Porcentagem de inibição dos filmes frente a *Candida albicans* sensível aos antifúngicos convencionais ATCC® 24433™; B= Porcentagem de inibição dos filmes frente a *Candida albicans* resistente a anidulafungina, voriconazol, itraconazol e fluconazol ATCC® 10231™.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na figura 47, pode-se observar o efeito dos filmes frente as diferentes espécies de bactérias.

Figura 47 - Porcentagem de inibição dos filmes de quitosana incorporados com EEPC em diferentes concentrações frente as cepas bacterianas selecionadas.



Legenda: A= Porcentagem de inibição dos filmes frente a *E. coli* ATCC® 10536™; B= Porcentagem de inibição dos filmes frente a *S. epidermidis* ATCC® 0016™; C= Porcentagem de inibição dos filmes frente a *S. aureus* resistente aos antibióticos convencionais ATCC® 33591™.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

É possível observar que a eficácia dos filmes foi menor para *E. coli* (figura 47-A) assim como o resultado apresentado pelo EEPC puro. Para *S. epidermidis* (figura 47-B) todas as diferentes concentrações apresentaram um efeito inibitório de 90 a 100%, indicando seu potencial efeito. A inibição para *S. aureus* resistente aos antibióticos convencionais (figura 47-C) permaneceu entre 80 e 100% nas diferentes amostras de filmes. Sabe-se que compostos fenólicos e taninos possuem uma atividade antimicrobiana bastante significativa, fato que corrobora com os resultados apontados. Castro e colaboradores (1999), já pontuou a atividade antimicrobiana de várias espécies bacterianas frente aos taninos, principalmente *S. aureus*.

Além do efeito antimicrobiano esperado por parte do extrato puro, a quitosana também apresenta atividade frente a bactérias e fungos, especialmente. Sabe-se que a quitosana produz uma carga superficial positiva em sua estrutura, e essa, por sua vez ataca a parede celular de microrganismos (NEVES, 2013). Os conhecidos grupamentos amino da quitosana, se protonam e se ligam a grupos aniônicos dos microrganismos, inibindo o seu crescimento.

Assim como os efeitos apresentados por essas amostras, no estudo de Wang e colaboradores (2020), o efeito antimicrobiano foi melhor ao aumentar a concentração de ativos.

Destaca-se que frente a *C. albicans* resistente, *S. aureus* e *S. epidermidis* o filme EEPC 5% demonstrou o maior efeito antimicrobiano, potencializando os resultados apresentados por SEEPC. Esse fato corrobora com todos as análises já apresentadas, onde demonstra melhor eficácia e atuação desse filme devido a sua maior proporção de extrato e maior homogeneidade dos compostos. Destaca-se ainda que esse filme possui uma maior liberação de ativos no meio, comprovado através do estudo de liberação, e por consequência performa melhor nos ensaios biológicos.

6- CONCLUSÃO

A partir do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* (EEPC), foi possível identificar uma notável concentração de compostos fenólicos, taninos e flavonoides. No teste de viabilidade celular, o extrato não se mostrou tóxico, independente das concentrações, quando testado em linhagens de macrófagos intraperitoneais de camundongos BALB/c e de fibroblastos L929.

No que tange à atividade anti-inflamatória, o EEPC revelou-se promissor nas concentrações de 300 e 150 ug/mL, reduzindo significativamente a produção de óxido nítrico, TNF α , IL-6 e corpúsculos lipídicos. Em relação a atividade antioxidante, o extrato se destacou em todas as metodologias realizadas, com resultados robustos nas diferentes formas de inibição da oxidação. Além disso, nos testes de atividade antimicrobiana, realizado em várias cepas de bactérias e de fungos, o EEPC demonstrou uma eficácia significativa, especialmente frente a *S.aureus*, *S. Epidermidis* e *C. Albicans*.

Na avaliação das propriedades físico-químicas das soluções precursoras, os resultados indicaram uma interação intermolecular entre os componentes da formulação e do extrato, notavelmente no caso do filme EEPC5% que apresentou melhor resultado de homogeneidade entre os componentes. Os filmes elaborados pela técnica de casting, apresentaram uma superfície íntegra e uniforme. Especialmente em EEPC 5%, foi possível observar uma superfície com poucos aglomerados de extrato, evidenciando uma melhor homogeneização dos constituintes.

Todos os filmes apresentaram uniformidade em relação ao seu peso e à espessura. Nos parâmetros de umidade, solubilidade e intumescimento os resultados se mostraram consistentes com o modelo de formulação. Cabe ressaltar que os filmes apresentaram estabilidade térmica acima de 40 °C e baixa taxa de ruptura na análise mecânica. A espectroscopia eletrônica evidenciou claramente as interações moleculares entre os componentes da matriz polimérica e do extrato.

No ensaio de liberação, foi possível observar que compostos fenólicos são liberados quando o filme entra em contato com uma solução semelhante ao exsudato, principalmente no filme EEPC 5%. Este filme demonstrou ser mais eficaz na liberação dos compostos, não apenas devido à sua maior porcentagem de extrato na

formulação, mas também à maior homogeneidade entre os seus constituintes, conforme constatado na microscopia eletrônica de varredura e nos ensaios reológicos.

Os filmes formulados não foram tóxicos às diferentes linhagens de macrófagos intraperitoneais e de fibroblastos L929. Nos ensaios de atividade anti-inflamatória, os filmes mostraram eficácia significativa na redução de interleucina 6. Entretanto, apenas EEPC 5% conseguiu reduzir a produção de óxido nítrico de maneira significativa.

No que tange à atividade antioxidante, todas as amostras apresentaram potencial redutor, sendo esse potencial diretamente proporcional à concentração de extrato. Portanto, EEPC 5% apresentou uma atividade antioxidante mais expressiva em comparação com as outras amostras.

Os filmes exibiram resultados significativos no ensaio antimicrobiano, revelando a sua capacidade de inibir o crescimento de *S.aureus*, *S. Epidermidis* e *C. Albicans*. É relevante observar que duas das cepas sensíveis aos filmes são consideradas resistentes aos antibióticos encontrados disponíveis no mercado.

Por fim, cabe destacar que este é o primeiro estudo de caracterização físico-química e biológica dos filmes desenvolvidos, o que aponta para a necessidade de estudos adicionais para confirmar o seu potencial terapêutico e explorar suas aplicações na prática clínica com maior profundidade.

7 – REFERÊNCIAS

ADAMU, B. F. et al. A review of medicinal plant-based bioactive electrospun nano fibrous wound dressings. **Materials and Design**, v. 209, 2021.

AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. **Achievements in the Life Sciences**. p. 1 – 10, 2016.

ALTIOK, D.; ALTIOK, E.; TIHMINLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, p. 2227-2236, 2010.

ANDRADE, C. L.S., et al. Desenvolvimento tecnológico de membranas de quitosana contendo extrato bruto de *arrabidaea chica* (humb&bonpl.) b. verlot (bignoniaceae). **Visão Acadêmica**, v.24, n.1, p. 4-25, 2023.

ANDRADE, D. M. L. et al. Atividade antioxidante, vasodilatadora e hipotensora da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 4, n. 1, p. 1-1, 2015.

ÁVILA FILHO, S.H. et al. Propriedades físico-químicas, atividades biológicas e resultados obtidos após utilização médica da quitosana e seus derivados. **Braz J. of Develop**. V.6, n. 12, p. 95250-270, 2020.

AY, H. F.; YESILKIR-BAYDAR, S.; CAKIR-KOC R. Synthesis characterisation and neuroprotectivity of *Silybum marianum* extract loaded chitosan nanoparticles. **J Microencapsul**, p. 1-8, 2023.

BANO, I.; ARSHAD, M.; YASIN, T.; GHOURI, M.A.; YOUNUS, M. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 380-383, 2017.

BARRETO, E.R.C. **Filme biopolimérico multicamada à base de quitosana incorporado com compostos bioativos da casca de jabuticaba (*Plinia cauliflora*)**. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Engenharia) – Universidade Federal do Pampa, Bagé, 2021.

BASHIR, D.J.; et al. Magnoflorine-Loaded Chitosan Collagen Nanocapsules Ameliorate Cognitive Deficit in Scopolamine-Induced Alzheimer's Disease-like Conditions in a Rat Model by Downregulating IL-1 β , IL-6, TNF- α , and Oxidative Stress and Upregulating Brain-Derived Neurotrophic Factor and DCX Expressions. **ACS Omega**, v. 8, p. 2227–2236, 2023

BASSELIN, M.; ROBERT-GERO, M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. **Parasitology Research**, v. 84, n. 1, p. 78-83, 1997.

BAZYLKO, A. et al. In vitro atividades antioxidante e antiinflamatória dos extratos de *Potentilla recta* e de seu principal elagitanino, a agrimoniina. **J. Etnofarmacol.** V.149, p. 222–227, 2013.

BOARI LIMA, A.D.J.; et al. Chemical characterization of the jabuticaba fruits (*Myrciaria cauliflora* Berg) and their fractions. **Arch. Latinoam. De Nutr**, v. 58, p. 416–421, 2008.

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

BRÁS, T.; et al. Development of bioactive films based on chitosan and *Cynara cardunculus* leaves extracts for wound dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.163, p.1707–1718, 2020.

BRITO, T. G. S. Atividades anti-inflamatória, hipoglicemiante, hipolipidêmica e analgésica do epicarpo de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (uva brasileira). **Revista de Etnofarmacologia**. V. 268, p. 1-11, 2021.

BRITO, T. G. S.; et al. Anti-inflammatory, hypoglycemic, hypolipidemic, and analgesic activities of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Brazilian grape) epicarp. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, n. 113611, p. 1-11, 2021.

CARNICER, V.; ALCÁZAR, C.; ORTS, M.J.; SÁNCHEZ, E.; MORENO, R. Microfluidic rheology: A new approach to measure viscosity of ceramic suspensions at extremely high shear rates. **Open Ceramics**. V. 5, P. 1-8, 2021.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and chemical toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CASTRO, H.G.; CASALI, V.W.D.; CECON, P.R. Crescimento inicial e épocas de colheita em seis acessos de *Baccharis myriocephala* DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.2, n.1, p.1-6, 1999.

CHOI, Y.M., Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT-Food Sci Technol**, v. 39, p. 756- 761, 2006.

CIANCA, L. O. A. et al. Caracterização físico-química de biocurativos dérmico-epidérmicos de Quitosana, Xantana e Beta-Glucana. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 3, p. 5631-5650, 2020.

D'SOUZA, O. J.; et al. Basella alba stem extract integrated poly (vinyl alcohol)/chitosan composite films: A promising biomaterial for wound healing. **Int J Biol Macromol**, v. 225; p. 673-686, 2022.

DA SILVA, J. K.; et al. Functional tea from a Brazilian berry: Overview of the bioactives compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 292–298, 2017.

DA SILVA, T.N.; et al. Chitosan-based films containing nanoemulsions of methyl salicylate: Formulation development, physical-chemical and in vitro drug release

characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2558–2568, 2020.

DABIRI, G.; DAMSTETTER, E.; PHILLIPS, T. Choosing a Wound Dressing Based on Common Wound Characteristics. **Wound Healing Society**, v.5, n.1, p.32-41, 2016.

DASTMALCHI, K.; et al. Myrciaria vexator fruits: Bioactive phenolics for potential COPD therapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 4549–4555, 2012.

DE OLIVEIRA, L.A.; et al. Design of antiseptic formulations containing extract of *Plinia cauliflora*. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 47, p. 525–533, 2011.

DE SOUZA, C.G.; et al. Radical Scavenger Capacity of Jabuticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) and Its Biological Effects in Hypertensive Rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p. 1-11, 2017.

DE SOUZA, T.M.; ARAÚJO, B.C.; LOPES, J.C. Carcinogenic or anticarcinogenic effect of aqueous extract of jabuticaba peel (*plinia cauliflora*): an integrative review. **Revista Ibero-Americana de Humanidades**, v. 8, n. 09, p. 421-437, 2022.

DEBONE, H.S.; et al. Anthocyanins-rich berry extracts directed formation of Ag NPs with the investigation of their antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Molecular Liquids**, v. 248, p. 1044-1049, 2017.

DEBONE, H.S, et al. Chitosan/Copaiba oleoresin films for wound dressing application. **International Journal of Pharmaceutics**, v.555, p.146–152, 2019.

DEVI, N.; DUTTA, J. Preparation and characterization of chitosan bentonitenanocomposite films for wound healing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.104, p.1897–1904, 2017.

DIARRA, M. S. et al. Antibacterial activities of a polyphenolic-rich extract prepared from American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) fruit pomace against *Listeria* spp. **Technologie**, v. 123, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109056>

DIAS, B.K. et al. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **J. Biotec. Biodivers.** V. 4, N.3, p. 184-191, 2013.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ESCÁRCEGA, A.A.G.G.; MACHADO, D.I.; CERVANTES, J.; SILVA, A.S.; SANTANA, T.M.J.; LOSADA, P.P. Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.16, p.472-481, 2018.

FELIPE, L. O.; RABELLO, E. N. O.; JÚNIOR, I. J. B. Quitosana: da química básica à bioengenharia. **Química Nova na escola**. v. 39, n. 4, p. 312-320, 2017.

FERREIRA L. B. **Prospecção científica e tecnológica sobre os curativos inteligentes**. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Graduação em Engenharia de Materiais) Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas. Belo Horizonte, p. 1-69, 2022.

FIDELIS M. **Otimização da extração de compostos fenólicos, atividade antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa de sementes de *Myrciaria dubia* (h.b.k.) mcvaugh e *Myrciaria cauliflora* (mart.) o.berg**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, p. 1-113, 2019.

FIGUEROA-ESPINOZA, M.C.; ZAFIMAHOVA, A.; ALVARADO, P.G.M.; DUBREUCQ, E.; PONCET-LEGRAND, C. Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant Properties. **Food Chemistry**. v. 178, p. 38–44, 2015.

FLECK, N., et al. Jaboticaba peel extract as an antimicrobial agent: Screening and stability analysis. **British Food Journal**, v. 124, n. 9, p. 2793-2804, 2021. <http://dx.doi.org/10.1108/BFJ-03-2021-0253>

FLECK, Nataís et al. Antimicrobial effect of phenolic-rich jaboticaba peel aqueous extract on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 26, p. 1-10, 2023. DOI <https://doi.org/10.1590/1981-6723.08722>.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, p. 627, 1927.

FRÁGUAS, R. M. et al. Caracterização química e efeito cicatrizante de quitosana, com baixos valores de massa molar e grau de acetilação, em lesões cutâneas. **Polímeros**. V. 25, n. 2, p. 205-211, 2015.

FRAZOLIN, M.R.; COURROL, D.S.; SILVA, F.R.O.; COURROL, L.C. Antimicrobial Activity of Silver and Gold Nanoparticles Prepared by Photoreduction Process with Leaves and Fruit Extracts of *Plinia cauliflora* and *Punica granatum*. **Molecules**, v. 27, n. 6860, p. 2-16, 2022.

GALVÃO, B. V. D. **Estudo etnofarmacológico da eficácia e segurança do extrato hidrometanólico da folha de *Myrciaria cauliflora* sobre o *Trypanosoma cruzi***. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biomedicina) Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro – RJ, p. 1-85, 2019.

GALVÃO, B.V.D., et al. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Jaboticaba) leaf extract: In vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity, toxicity assessment and phenolic-targeted UPLC-MSE metabolomic analysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 277, p. 1-12, 2021.

GASPAROTTO JUNIOR, A.; SOUZA, P.; LÍVERO, F.A.R. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel: A comprehensive ethnopharmacological review of a genuinely Brazilian species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 245, p. 1-45, 2019.

GEORGE, A.; Sanjay, M. R.; Srisuk, R.; Parameswaranpillai, J.; Siengchin, S. **Int. J. Biol. Macromol.** 2020, 154, 329–338.

GONZAGA V. A. M. **Desenvolvimento de membranas porosas à base de quitosana e laponita para tratamento de lesões de pele.** Tese (Instituto de química de São Carlos) Universidade de São Paulo. São Carlos, p. 1-77, 2018.

GUEVARA, I.; et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clinica Chimica Acta**, v. 274, n. 2, p. 177-188, 1998.

GUIMARÃES, C. **Desenvolvimento de blendas de acetato de celulose e quitosana incorporadas com óleo essencial de cravo da Índia (*Eugenia caryophyllus*).** Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 1-68, 2019.

HABITZREUTER, F. et al. **Biopolímeros, Processamento e Aplicações.** p. 91-132. In: Nanotecnologia Aplicada a Polímeros. São Paulo: Blucher, 2022.

HACKE, A. C. et al. Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) seeds: Chemical characterization and extraction of antioxidant and antimicrobial compounds. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 9, p. 2206-2217, 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.13405>

HAFSAA J. et al., Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing Eucalyptus globulus essential oil. **LWT**. V. 68, p. 356-364, 2016.

HASLAM, E. Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22–24, p. 2713-2721, 2007.

HOWLING, G.L. et al. The effects of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. **Biomaterials**. V 22, n 22, p. 2959-2966, 2001.

INADA, K.O.P.; NUNES, S.; MARTÍNEZ-BLÁZQUEZ, J.A.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. Effect of high hydrostatic pressure and drying methods on phenolic compounds profile of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel and seed. **Food Chemistry**, p. 1-29, 2019.

ISO, E.N. 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. **International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland**, 2009.

JAISWAL, L.; SHANKAR, S.; RHIM, J.H. Carrageenan-based functional hydrogel film reinforced with sulfur nanoparticles and grapefruit seed extract for wound healing application. **Carbohydrate Polymers**, v.224, p.115191, 2019.

JIMÉNEZ, A. et al., Edible and Biodegradable Starch Films: A review. **Food Bioprocess Technology**. V. 1, p. 0-0, 2012.

JIN, T.; LIU, T.; LAM, E.; MOORES, A. Chitin and chitosan on the nanoscale. **Nanoscale Horizons**, v. 6, n. 7, p. 505-542, 2021.

JONES, G. A. et al. Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 1374- 1378, 1994. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.60.4.1374-1378.1994>

KALAYCIOĞLU Z., et al. Antimicrobial and physical properties of chitosan films incorporated with turmeric extract. **Int. J. Biol. Macromol.** V. 101, p. 882–888, 2017.

KIM, M.Y.; et al. Manufacture and Physicochemical Properties of Chitosan Oligosaccharide/A2 β -Casein Nano-Delivery System Entrapped with Resveratrol. **Food Sci Anim Resour**, v.39, n.5, p831-834, 2019.

KUMAR P., et al. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harb Protoc.** p. 469-72, 2018.

L. WANG. Effect of Herba Lophatheri extract on the physicochemical properties and biological activities of chitosan film. **Int. J. Biol. Macromol.** V. 133, n. 15, p. 51-57, 2019.

LARANJEIRA, M.C.M. et al. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quim. Nova.** v. 32, p. 672-678, 2009.

LEWANDOWSKA, K; SZULC, M. Rheological and Film-Forming Properties of Chitosan Composites. **Int. J. Mol. Sci.** V. 23 (15), p. 8763, 2022.

LECETA I., et al. Functional properties of chitosan-based films. **Carbohydrate Polymers.** V. 93, p. 339– 346, 2013.

LENQUISTE, S.A. et al. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity model. **Food Research International.** v. 77, p. 1-10, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.023>

LIMA G. K. S. **Identificação de microrganismos para controle de infecção em feridas crônicas.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Enfermagem) Enfermagem Universidade Federal de Alagoas – UFAL. Maceió, p. 1-54, 2019.

LIU, X.; YOU, L.; TARAFDER, S.; ZOU, L.; FANG, Z.; CHEN, J.; LEE, C.H.; ZHANG, Q. Curcumin-releasing chitosan/aloe membrane for skin regeneration. **Chemical Engineering Journal,** v. 359, p.1111-1119, 2019.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M., SARTONI, S. Brazilian fruits & cultivated exotics (for consumin in natura). Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., São Paulo, 2006.

MAGINA. M.A. et al. Atividade antioxidante de três espécies de Eugenia (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy,** v. 29, n. 3, p. 376-382, 2010.

MALI, S. et al. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias,** Londrina, v. 31, nº 1, p. 137-156, 2010.

MARTINY, T. R. et al. Alternativas de extratos naturais em cosméticos: uma visão geral das oportunidades e desafios. **Revista da Jornada de Pós-graduação e Pesquisa**. v. 17, n. 17, 2021.

MATICA, M.A.; AACHMANN, F.L.; TØNDERVIK, A.; SLETTA, H.; OSTAFE, V. Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 5889, 2019.

MATOS, T. N. et al. Uso de Quitosana Aplicada à Liberação Controlada de Fármacos: Uma Revisão Sistemática. **Rev. Virtual Quim**. V. 12, N. 3, 2020.

MCCOLL, D.; CARLIDGE B.; CONNOLLY, P. Real-time monitoring of moisture levels in wound dressings in vitro: an experimental study. **Int J Surg**, v.5, n.5, p.316-22, 2007.

MELO, M.S.O.M.; MANCINI FILHO, J. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq). **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 25, n. 2, p.147-157, 1989

MENEZES FILHO, A. C. P., et al. Estudo fitoquímico, bioativo, fotoprotetor e físico-químico do extrato floral de algodãozinho do Cerrado [*Cochlospermum regium* Schrank. (Pilg.)] – Bixaceae. **Revista Arquivos Científicos**. v. 3, n. 2, p. 59-71, 2020.

MEZA-MIRANDA, E.R.; SAMUDIO, A.; GÓMEZ, R.; ROJAS, B.; FERNÁNDEZ, F.; PRIEGO-CAPOTE, F. Nutritional Composition, Phytochemical Performance, Total Content of Polyphenols, Antioxidant Capacity, and Bioactive Compounds of Yvapurú Fruits (*Plinia cauliflora*). **Int J Nutr Sci**, v. 7, n. 1, p. 50-57, 2022.

MEZGER, T. G. **The Rheology Handbook**. Ed. by Thomas G Mezger. 4. ed. Hanover: Vincentz Network, 2014. P. 432.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN-BEER, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 231-237, 2004.

MOEINI, A.; PEDRAM, P.; MAKVANDI, P.; MALINCONICO, M.; D'AYALA, G.G. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosanbased wound dressings: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 233, p. 115839, 2020.

MORAIS V. S. P. **Controle de infecções em tratamento de queimaduras: uma revisão da literatura**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Enfermagem) Escola de Ciências Sociais e da Saúde na Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, p. 1-40, 2022.

MORI, T. et al. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. **Biomaterials**. V. 18, n. 13, p. 947-951, 1997.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55- 63, 1983.

MOURA, Márcio H.C. et al. Long-term supplementation with phenolic compounds from jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) reduces adiposopathy and improves glucose, lipid, and energy metabolism. **Food Research International**, v. 143, p. 1-10, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110302>

NASCIMENTO, R.J.; ARAÚJO, C.R.; MELO, E.A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 209-16, 2010.

NEGRI, M.L.S.; POSSAMAI, J.C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 553-556, 2009.

NETALA, V.R., et al. Biogenesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Indigofera hirsuta* L. and their potential biomedical applications (3-in-1 system). **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 6, p. 1–11, 2016.

NEVES, N. A.; STRINGHETA, P.C.; SILVA, I.F.; GARCÍA-ROMERO, E.; GÓMES-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUITIÉRREZ, I. Identification and quantification of phenolic composition from different species of Jabuticaba (*Plinia* spp.) by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, v. 355, n. 129605, p. 1-10, 2021.

OKAMOTO, Y. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydr. Polym.** V. 49, p. 249–252, 2002.

OKAMOTO, Y. et al. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydrate Polymers.** V. 53, n. 3, p. 337-342, 2003.

OLIVEIRA F. T., et al. Microrganismos e Resistência Antimicrobiana em feridas complexas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. 1-9, 2021.

OLIVEIRA, A. F., OLIVEIRA FILHO, H. Microbiological species and antimicrobial resistance profile in patients with diabetic foot infections. **J Vasc Bras.** v. 13, n. 4, p. 289-293, 2014.

OLIVEIRA, A.C. **Ácido ascórbico associado ao ácido cafeico em formulações tópicas: avaliação da ação antioxidante e peroxidação lipídica.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 1-147, 2021.

OLIVEIRA, F. C. et al. Jabuticaba skin extracts: Phenolic compounds and antibacterial activity. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, n. 0, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.10817>

OSAWA, C.C; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005

OU, Q., et al., Impact of quercetin on systemic levels of inflammation: a meta-analysis of randomised controlled human trials. **Int J Food Sci Nut.** V. 71, N. 2, p. 152–163, 2020.

PAIVA, K.O.; OLIVEIRA, G. L.; FARIAS, D. F. A.; MULLER, T. S. Plantas medicinais utilizadas em transtornos do sistema geniturinario ´ por mulheres ribeirinhas, Caravelas, Bahia. **Rev. Fitos**, v.1, p. 92-98, 2017.

PALOZI, R. A.C.; et al. From general toxicology to DNA disruption: A safety assessment of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 258, n. 112916, p. 1-16, 2020.

PALUDO, M. C. **Brazilian jaboticabas: Phenolic characterization, capacity of deactivation of reactive species of oxygen and nitrogen and antiproliferative potential in prostate and breast tumor cells.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p 1-256, 2018.

PANSARA, C.; et al Formulation of chitosan stabilized silver nanoparticle-containing wound healing film: In-vitro and in-vivo characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.109, n. 7, p. 2196- 2205, 2020.

PAULA P. L. et al. Supramolecular complexes between *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel extracts and β -cyclodextrin: Physicochemical characterization and antioxidant and anti-inflammatory properties. **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** V. 84, 2023.

PAULA, P.L.; et al. Pharmacological investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities of leaves and branches extracts from *Plinia cauliflora* (Jaboticaba). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 280, n. 114463, p. 1-14, 2021.

PAWLAK A., MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. **Thermochimica Acta.** V. 396, p. 153–166, 2003.

PEREIRA, A. V.; FUNAKI, G.Y.U.; POSSA, G.O.K.; ANDRADE, R.A.; CHOPEK, S. Obtention and characterization of chitosan films incorporated with green própolis. **Revista Concilium**, v. 22, n. 3. p. 697 – 708, 2022.

PEREIRA, J. C. et al. Espécies medicinais do Brasil com potencial anti-inflamatório ou antioxidante: Uma revisão. **Res., Soc. Dev.** V. 10, n. 7, 2021.

PEREIRA, R.C.; SOUSA, M.V.S.; MACÊDO, M.O.C.; VIANA, V.G.F.; MACÊDO, H.R.A. Characterization of chitosana films produced with incorporation of anacardium microcarpum ducke extract. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.5, p. 51376-51394, 2021.

PRIETO, P.; PINEDA, M. E AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PRIMO, J. O. **Estudo visando à obtenção de micropartículas e géis de quitosana para liberação controlada de substâncias bioativas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) - Departamento Acadêmico de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão – PR, p. 1-90, 2015.

QUETTIER-DELEU, C.; GRESSIER, B.; VASSEUR, J.; DINE, T.; BRUNET, C.; LUYCKX, M.; CAZIN, M.; CAZIN, J.; BAILLEUL, F.; TROTIN, F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. **J Ethnopharmacol**, v. 72, p. 35-42, 2000.

RAMBABU, K.; et al. Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 1234-1243, 2019.

RESENDE, M.A. Uso do tanino associado ao sulfato de alumínio como coagulantes para o tratamento de efluente de lavanderia industrial. Trabalho de

Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG, p. 1-60, 2018.

RIBEIRO, J.C.V., et al. Versatility of chitosan-based biomaterials and their use as scaffolds for tissue regeneration. **Sci. World J.** 2017.

RICE-EVANS, C. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants?. **Biochem Soc Symp**, v. 61, p. 103-16, 1995.

RODRIGUES L. A avaliação biofísica da superfície cutânea: indicadores fisiológicos da funcionalidade epidérmica. **Rev Port Farm**, v. 45, n. 1, p. 52-59, 1995.

RODRIGUES, M.A.V.; BERTOLO, M.R.V.; MARANGON, C.A.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. Chitosan and gelatin materials incorporated with phenolic extracts of grape seed and jabuticaba peel: Rheological, physicochemical, antioxidant, antimicrobial and barrier Properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 769–779, 2020.

ROGEROA, S. O. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**. V, 6, n. 3, p. 317-20, 2003.

ROLIM, A. E. H., CARVALHO, F. A. A.; Costa, R. C. C.; Rosa F. P. Arcabouços de quitosana - propriedades físico-químicas e biológicas para o reparo ósseo. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 2, p. 211-228, 2018

ROSAS-BURGOS, E. C. et al. (2017). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as affected by cultivar. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 3, p. 802-810, 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7799>

SAADAT S. et al. Antibacterial activity of chitosan film containing *Syzygium aromaticum* (clove) oil encapsulated halloysite nanotubes against foodborne pathogenic bacterial strains. **Mater. Today Commun.** V. 32, 2022

SALVADOR, M.J. et al. Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae plants of the south of Brazil. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 977-982, 2011.

SANTOS, D.T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, A. A. Extraction of antioxidant compounds from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **J. Food Eng**, v. 101, p. 23–31, 2010.

SANTOS, E.P.; NICÁCIO, P.H.M.; BARBOSA, F.C.; SILVA, H.N.; ANDRADE, A.L.S.; FOOK, M.V.L.; et al. Chitosan/essential oils formulations for potential use as wound dressing: Physical and antimicrobial properties. **Materials** v.12, n.14, p. 2223, 2019.

SANTOS, J. L. et al. Uso de novas tecnologias na prospecção de novos antibióticos. **Ensaio UFSJ**. V.5, n.1, p. 37-46, 2021.

SANTOS, T. A. et al. Avaliação das características físico-químicas, atividade antioxidante e fenólicos totais da farinha do extrato da jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*). **Científica Multidisciplinary Journal**. V. 8, n. 2, p. 1 -13, 2020.

SENES, C. E. R.; et al. Determination of phenolic acids and flavonoids from *Myrciaria cauliflora* edible part employing vortex-assisted matrix solid-phase dispersion (VA-MSPD) and UHPLC-MS / MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 95, p. 1–8, 2021.

SHAH, A.; et al. The wound healing and antibacterial potential of triple-component nanocomposite (chitosan-silver-sericin) films loaded with moxifloxacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.564, p.22–38, 2019.

SILVA, D. M. et al. Plant extracts display synergism with different classes of antibiotics. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 2, 2019

SILVA, J. Y. R. **Hidrogéis Supramoleculares de Cor Sintonizável para Aplicações Tecnológicas**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais) Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 1-83, 2016.

SILVA., C.M., et al. Caracterização reológica de fluidos não Newtonianos e sua aplicabilidade na indústria. **Ciências exatas e tecnológicas**. V. 5, n. 2, p. 285-300, 2019.

SIMOES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. AS. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural product reports**, v. 26, n. 6, p. 746-757, 2009.

SIMÕES, V. N.; et al. Synthesis, characterization and study of the properties of a new mononuclear quercetin complex containing ga(iii) ions. **Quim. Nova**, v. 36, n. 4, p. 495-501, 2013.

SOBRAL, P.J.A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. **Ciência & Engenharia**, v. 8, n. 1, p. 60-67, 1999.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, V. 30, N. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, I. J. O.; et al. Estudo fitoquímico, avaliação da capacidade hemolítica e antimicrobiana de um extrato bruto da casca do caule de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 14, n. 4, p. 208-225, 2018.

SOUZA-MOREIRA, T. M. **Estudo da composição química, citotoxicidade e alvos da atividade antifúngica de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) e de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae)**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, São Paulo, 2010.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; et al. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 48–53, 2010.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; et al. Flavonoids from *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) with antifungal activity. **Natural Product Research**, v. 33, p.1–4, 2018.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; et al. Chemical and Antidiarrheal Studies of *Plinia cauliflora*. **Journal Of Medicinal Food**, v. 14, n. 12, p. 1590–1596, 2011.

STROPPIA, P.H.F.; et al. Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonenses*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3034–3045, 2017.

SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, p. 263-269, 2012.

SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, v.3, p. 276-284, 2003.

TERRAZAS M. B. **Desenvolvimento, caracterização e aplicação de filmes indicadores contendo antocianinas da casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba*)**. Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 1-59, 2019.

VALLOCHI, A. L. et al. Lipid Droplet, a Key Player in Host-Parasite interactions. **Front. Immunol.** V. 93, n. 9, p. 1 -18, 2018.

VARGAS, G.C.; BELLAVER, E.H. Study of the antioxidante activity of phenolic compounds in preventive medicina: literature review. **Visão Acadêmica**, v. 23, n. 1, p. 55- 64, 2022.

VIÉGAS L. P. **Preparação e caracterização de filmes biodegradáveis a partir de amido com quitosana para aplicação em embalagens de alimentos**. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, p. 1-90, 2016.

WANDERLEY, D.M.S. **Filmes poliméricos de quitosana com um derivado n-acilidrazônico para tratar lesões cutâneas**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual do Paraíba. Campina Grande, p. 1-97, 2019.

WANG D. Incorporation of apricot (*Prunus armeniaca*) kernel essential oil into chitosan films displaying antimicrobial effect against *Listeria monocytogenes* and improving quality indices of spiced beef. **Int. J. Biol. Macromol.** V. 162 p. 838–844, 2020.

WANG, Y.; Chen, L.; Yang, T.; Ma, Y.; McClements, D. J.; Ren, F.; Tian, Y.; Jin, Z. **Food Hydrocoll.** 2021, 113, 106543.

WANG, Y.J.; et al. Research progress of methods to improve the stability of procyanidins. **Journal of Guangdong Pharmaceutical University**, v. 30, p. 246-248, 2014.

WHITTE, M. B.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **AM J Surg**, v. 183, n. 4, p. 406-412, 2022.

WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E.J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. *Food Research International*, v. 54, n. 1, p. 148–159, 2013.

WU, S. et al. Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices. **J. Agric. Food Chem.** v. 60, p. 7513-7525, 2012. <https://doi.org/10.1021/jf301888y>

YANEVA, Z.; IVANOVA, D.; NIKOLOVA, N.; TZANOVA, M. The 21st century revival of chitosan in service to bio-organic chemistry. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 34, n. 1, p. 221-237, 2020.

YEN, M., et al., Antioxidant properties of chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymer.** V. 74, p. 840–844, 2008.

ZHAO, D.K.; et al. Jaboticabin and Related Polyphenols from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) with Anti-inflammatory Activity for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 1-8, 2019.