

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

**Allana Carvalho Silva**

**Incorporação de extrato de folhas de café (*Coffea arabica* L.) em filmes de quitosana: caracterização físico-química e avaliação das atividades antimicrobiana e cicatrizante *in vitro***

**ALLANA CARVALHO SILVA**

**Incorporação de extrato de folhas de café (*Coffea arabica L.*) em filmes de quitosana: caracterização físico-química e avaliação das atividades antimicrobiana e cicatrizante *in vitro***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai

Coorientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Pereira Rodarte

Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

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

Carvalho Silva, Allana.

Incorporação de extrato de folhas de café (*Coffea arabica* L.) em filmes de quitosana: : Caracterização físico-química e avaliação das atividades antimicrobiana e cicatrizante in vitro / Allana Carvalho Silva. -- 2022.

125 p.

Orientador: Ângelo Márcio Leite Denadai

Coorientadores: Mirian Pereira Rodarte, Guilherme Diniz Tavares  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. Polímero. . 2. *Coffea*. . 3. Antimicrobiana. . 4. Ferida. I. Márcio Leite Denadai, Ângelo , orient. II. Pereira Rodarte, Mirian, coorient. III. Diniz Tavares, Guilherme, coorient. IV. Título.

Allana Carvalho Silva

**Incorporação de extrato de folhas de café (*Coffea arabica* L.) em filmes de quitosana:  
Caracterização físico-química e avaliação das atividades antimicrobiana e cicatrizante *in vitro***

**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 23 de fevereiro de 2022.**

**BANCA EXAMINADORA**

**Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora**

**Dr. Guilherme Diniz Tavares - Coorientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora**

**Dra. Mirian Pereira Rodarte - Coorientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora**

Dr. Rodrigo Lassarote Lavall  
Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Karen Luise Lang  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 21/02/2022.



Documento assinado eletronicamente por Angelo Marcio Leite Denadai, Diretor (a), em 02/03/2022, às 17:32, 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 Guilherme Diniz Tavares, Professor(a), em 03/03/2022, às 11:48, 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 Mirian Pereira Rodarte, Professor(a), em 10/03/2022, às 11:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Karen Luise Lang, Professor(a), em 11/03/2022, às 17:00, 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 Lassarote Lavall, Usuário Externo, em 17/03/2022, às 08:11, 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](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 0687732 e o código CRC 7AA089EE.

*Dedico este trabalho a minha mãe, meu pai, bá e Luma, por me fazer enxergar os obstáculos como um incentivo, e sempre me apoiarem.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela saúde, força e coragem que me concede todos os dias.

Aos meus pais, Luís Henrique e Maria Angélica, meus maiores exemplos de superação, determinação e amor. E a minha irmã, Luma, por sempre estar presente, me apoiar e acreditar nos meus sonhos! Amo muito vocês!

A bá por sempre se preocupar comigo e me dar colo quando eu mais preciso.

Aos meus orientadores Dr<sup>a</sup>. Mirian Pereira Rodarte, Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai e Dr. Guilherme Diniz Tavares, por me acolherem e me conduzirem num caminho de ensinamentos e conselhos durante a elaboração desse trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos. Em especial gostaria de deixar o meu agradecimento ao Prof. Fabiano, por me ceder as folhas de café e me auxiliar durante toda a trajetória do mestrado. E aos professores Fernanda, Patrícia, Rodrigo e Jéferson por me cederem o uso de equipamentos e/ou me auxiliarem na formação de novos conhecimentos. Aos Técnicos-Administrativos Éder, Lorena e João, gostaria de agradecer por toda ajuda.

A toda minha família e amigos, por todo carinho e apoio durante essa etapa, e por compreenderem minhas ausências.

À Luma e ao Cris, por terem cuidado com tanta paciência das minhas folhinhas.

À Deyse, por assistir de perto todo o meu nervoso, choro e vitórias, obrigada pelo tanto carinho e atenção!

Ao Victor, pela compreensão nos momentos em que estive ausente, por todo amor e por me trazer tranquilidade, que tanto me ajudaram nessa caminhada.

Aos meus colegas de laboratório e mestrado, em especial a Julianna, Milena, Bia, Mirsiane e Ana Flávia, pelo companheirismo, troca de conhecimento, apoio e amizade demonstrada. Obrigada por chorarem, rirem e comerem coxinha junto comigo ao longo dessa jornada!

À CAPES, FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro

À banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição para esse trabalho.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho e para o meu crescimento profissional.

A todos, OBRIGADA!

*“Quando a vida decepcionar, qual é a solução?  
Continue a nadar. Continue a nadar. Continue a nadar...”*

Dory (Procurando Nemo, 2003)



## RESUMO

Curativos contendo polímeros naturais, como a quitosana, estão sendo amplamente aplicados na cicatrização de feridas cutâneas. Além de suas vantagens biológicas e estruturais, esse polímero permite a incorporação de compostos ativos propiciando uma nova abordagem para o reparo das feridas. As folhas de café são consideradas subprodutos da indústria cafeeira, as quais são geradas em quantidades significativas e possuem inúmeros compostos bioativos com benefícios à saúde, como propriedades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver filmes de quitosana adicionados com diferentes concentrações de extrato de folhas de *C. arabica* L., na perspectiva de se combinar as atividades biológicas do extrato e da quitosana, bem como melhorar propriedades físico-químicas do filme. As folhas foram pulverizadas e submetidas à extração assistida por ultrassom em uma solução hidroalcoólica de 70%. O ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) e a mangiferina foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência, bem como foram determinadas as atividades antioxidante, antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro* do extrato. Os filmes foram preparados pelo método de evaporação do solvente, com concentração de quitosana igual a 2% (p/v), na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de folhas de *C. arabica* L. (125 mg/cm<sup>3</sup> - Q-EFC1; 250 mg/cm<sup>3</sup> - Q-EFC2 e 500 mg/cm<sup>3</sup> - Q-EFC3). As soluções precursoras foram caracterizadas por potencial zeta, espalhamento de luz dinâmico e medidas reológicas, no intuito de se avaliar a existência de interações entre os componentes do extrato e a quitosana, ainda na fase líquida. Após a confecção dos filmes, parâmetros físico-químicos como espessura, peso médio, parâmetros ópticos, teor de umidade, grau de intumescimento, solubilidade e liberação *in vitro* foram determinados. Além disso, os mesmos foram caracterizados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho, análises térmicas (TGA e DTA) e por análises dinâmico mecânicas (DMA) nos modos axial e rotacional, no intuito de se avaliar a existência de interações no estado sólido, bem como as propriedades térmicas e mecânicas dos filmes. Finalmente, a citotoxicidade e as atividades antimicrobiana e cicatrizante *in vitro* foram avaliadas. O extrato obteve um IC<sub>50</sub> no ensaio do DPPH• de 13,5 ± 1,1 µg/mL, o poder de redução do fosfomolibdênio foi de 17,1 ± 0,6 de AAR% a quercetina e 54,8 ± 1,9 de AAR% a rutina e a porcentagem de inibição da peroxidação lipídica foi de 53,3 ±

2,9%. Os teores de 5-ACQ e mangiferina no extrato foram iguais a  $2,1 \pm 0,1$  g/100g e  $1,9 \pm 0,3$  g/100g, respectivamente. Os filmes de quitosana incorporados com extratos de folhas de café apresentaram uniformidade em relação ao peso e espessura. Eles também apresentaram resultados de teor de umidade, intumescimento e solubilidade favoráveis para aplicação em feridas cutâneas, bem como boa resistência térmica acima da temperatura corpórea, contudo baixa resistência mecânica. Por meio da análise de FTIR foi possível indentificar os grupos funcionais da quitosana e do extrato, bem como interações intermoleculares entre os compostos. Com relação aos ensaios biológicos, todos os filmes demonstraram atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e não demonstram citotoxicidade frente à linhagem celular L929. Além disso, os filmes Q-EFC1 e Q-EFC2 promoveram migração celular promissora no ensaio de cicatrização *in vitro*. Conclui-se que os filmes acrescidos de extratos das folhas de *C. arabica* L. apresentaram propriedades físico-químicas e biológicas satisfatórias e promissoras para aplicação no tratamento de feridas cutâneas.

**Palavras-chave:** Polímero. *Coffea*. Antimicrobiana. Ferida. Cicatrização.

## ABSTRACT

Wound dressings containing natural polymers such as chitosan are applied to wound healing. In addition to its biological and structural advantages, this polymer allows the incorporation of bioactive compounds, potentiating a new approach to wound repair. Coffee leaves are considered by-products of the coffee industry, generated in significant amounts, and have numerous bioactive compounds with health benefits, such as antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory properties. In this way, the objective of the present study was to develop chitosan films incorporated with different concentrations of *C. arabica* L. leaf extract, with the perspective of combining the biological activities of the extract and chitosan, as well as improving the physicochemical properties of the film. The leaves were pulverized and subjected to ultrasound-assisted extraction in a 70% hydroalcoholic solution. 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) and mangiferin were identified and quantified by high-performance liquid chromatography. Also, the extract's antioxidant activity, cytotoxicity, and antimicrobial activities were evaluated. The films were prepared by the solvent casting method, with 2% (w/v) of chitosan, in the absence (control) and the presence of different concentrations of hydroalcoholic extract of leaves of *C. arabica* L. (125 mg/cm<sup>3</sup> - Q-EFC1; 250 mg/cm<sup>3</sup> - Q-EFC2 e 500 mg/cm<sup>3</sup> - Q-EFC3). The precursor solutions were characterized by zeta potential, dynamic light scattering, and rheological measurements to evaluate the existence of interactions between the extract components with chitosan, still in the liquid phase. After making the films, physicochemical parameters such as thickness, average weight, optical parameters, moisture content, degree of swelling, solubility, and *in vitro* release were determined. Furthermore, the films were characterized by vibrational spectroscopy in the infrared region, thermal analysis (TGA and DTA), and dynamic mechanical analysis (DMA) in axial and rotational modes to evaluate the existence of solid-state interactions as well as the thermal and mechanical properties of the films. Finally, the cytotoxicity, antimicrobial and healing activities *in vitro* were evaluated. The extract obtained an IC<sub>50</sub> in the DPPH• assay of 13.52 ± 1.12 µg/mL, the reducing power of phosphomolybdenum was 17.08 ± 0.63 of AAR% to quercetin and 54.76 ± 1.91 of AAR% to rutin, and the percentage of inhibition of lipid peroxidation was 53.29 ± 2.98 %. The coffee leaf extract content was 2.05 ± 0.11 g/100g of 5-ACQ and 1.87 ± 0.30

g/100g of mangiferin. The chitosan films incorporated with coffee leaf extracts showed uniformity concerning weight and thickness. They also showed high moisture content, swelling, and solubilities favorable for the maintenance of skin wounds and good thermal resistance above body temperature but low mechanical resistance. Through the FTIR analysis, it was possible to verify the functional groups of chitosan and the extract and intermolecular interactions between the compounds. Regarding the biological assays, all films demonstrated antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* and the absence of cytotoxicity in L929 cell line. Also, Q-EFC1 and Q-EFC2 films promoted promising cell migration in the *in vitro* healing assay. We concluded that the films added with extracts from the leaves of *C. arabica* L. showed satisfactory and promising physicochemical and biological properties for application in the treatment of skin wounds.

**Keywords:** Polymer. *Coffee*. Antimicrobial. Wound. Healing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: As fases do processo de cicatrização .....	22
Figura 2: Representação do processo de desacetilação de quitina e formação da quitosana.....	26
Figura 3: Representação das folhas de <i>C. arabica</i> L.....	30
Figura 4: Estrutura química do ácido 5-cafeoilquínico.....	33
Figura 5: Estrutura química básica dos flavonoides. ....	34
Figura 6: Estrutura química da mangiferina.....	35
Figura 7: Estrutura química da cafeína.....	36
Figura 8: Estrutura química da trigonelina.....	37
Figura 9: Estruturas químicas do Kahweol e cafestol.....	37
Figura 10: Representação esquemática do desenvolvimento dos filmes. ....	49
Figura 11: Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade in vitro .....	56
Figura 12: Representação esquemática do ensaio de halo de inibição microbiana ..	57
Figura 13: Representação esquemática do ensaio de cicatrização in vitro .....	58
Figura 14: Processo de obtenção do material vegetal.....	59
Figura 15: Processo de obtenção do extrato de folhas de <i>C. arabica</i> .....	59
Figura 16: Cromatograma dos padrões 5-ACQ e mangiferina (A) e extrato das folhas de <i>C. arabica</i> L (B). ....	61
Figura 17: Porcentagem de inibição da lipoperoxidação das concentrações de 38,5 a 1,2 µg/mL do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. arabica</i> L. e do controle positivo rutina .....	65
Figura 18: Perfil de decaimento da absorbância do β-caroteno (Curva de oxidação) nas concentrações de 38,5 a 1,2 µg/mL para o extrato das folhas de <i>C. arabica</i> L., controle positivo rutina e controle negativo contendo a emulsão e o metanol. ....	65
Figura 19: Avaliação da citotoxicidade do extrato de folhas de <i>C. arabica</i> L. frente à linhagem celular L929 após 24h e 48h de exposição.....	67
Figura 20: Valores de condutividade elétrica para as amostras precursoras, a 25 °C, nas concentrações de 6,62 mg/mL, 13,25 mg/mL e 26,5 mg/mL de extrato de folhas de <i>C. arabica</i> L. ....	73
Figura 21: Valores de Potencial Zeta para as amostras precursoras, a 25 °C, nas concentrações de 6,62 mg/mL, 13,25 mg/mL e 26,5 mg/mL de extrato de folhas de <i>C. arabica</i> L.....	74

Figura 22: Valores de diâmetro hidrodinâmico para as amostras precursoras, a 25 °C, nas concentrações de 6,62 mg/mL, 13,25 mg/mL e 26,5 mg/mL de extrato de folhas de <i>C. arabica</i> L. ....	75
Figura 23: Curva de fluxo e viscosidade das soluções precursoras dos filmes, de 1 a 500 s <sup>-1</sup> , a a 25 °C.....	76
Figura 24: Curva de temperatura das soluções precursoras dos filmes, de 5 a 80 °C, a 5 s <sup>-1</sup> .....	76
Figura 25: Filmes desenvolvidos após o processo de secagem em estufas. ....	78
Figura 26: Parâmetro macroscópico da coloração dos filmes desenvolvidos. ....	80
Figura 27: Opacidade dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, QEFC2 e Q-EFC3 no comprimento de onda de 600nm .....	82
Figura 28: Porcentagem de umidade nos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2.....	83
Figura 29: Porcentagem de intumescimento dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2.....	85
Figura 30: Porcentagem de solubilização dos filmes Q-SEFC, QEFC1, Q-EFC2 .....	86
Figura 31: Análise térmica do pó de quitosana e filme Q-SEFC.....	87
Figura 32: Análise térmica do extrato de folhas de <i>C. arabica</i> L. e dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3 .....	88
Figura 33: Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). ....	90
Figura 34: Espectros de infravermelho em conjunto dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2, Q-EFC3, quitosana em pó e extrato de folhas de <i>C. arabica</i> L. ....	91
Figura 35: Análise reológica de ruptura axial dos filmes. ....	93
Figura 36: Análise reológica de ruptura rotacional dos filmes. ....	93
Figura 37: Cromatogramas referentes à quantificação de 5-ACQ e mangiferina no ensaio de liberação in vitro.....	95
Figura 38: Avaliação da citotoxicidade dos filmes desenvolvidos frente à linhagem celular L929 após 24h e 48h de exposição .....	96
Figura 39: Imagens dos halos de inibição para as linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	99
Figura 40: Imagens de migração de células L929 no tempo 0 e após 24h de tratamento com o controle (DMEM) e os filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3 .....	102
Figura 41: Imagens de migração de células L929 no tempo 0 e após 48h de tratamento com o controle (DMEM) e os filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3 .....	103
Figura 42: Porcentagem de fechamento da área da ranhura em linhagem celular L929 após 24 e 48h de exposição aos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3.....	104

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração dos constituintes das formulações nos filmes.....	50
Tabela 2: Avaliação da atividade antioxidante de extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. arabica</i> L. frente aos métodos de DPPH, redução do complexo fosfomolibdênio e inibição do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	64
Tabela 3: Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) do extrato das folhas de <i>C. arabica</i> L., ciprofloxacino, mangiferina e 5-ACQ.....	68
Tabela 4: Concentração bactericida mínima (CBM) do extrato das folhas de <i>C. arabica</i> L., ciprofloxacino, mangiferina e 5-ACQ.....	70
Tabela 5: Viscosidade e curva de fluxo das soluções precursoras dos filmes.....	77
Tabela 6: Peso médio e espessura dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3.....	79
Tabela 7: Análise colorimétrica dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3.....	81
Tabela 8: Valores dos halos de inibição dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1; Q-EFC2 e Q-EFC3.....	98

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ACQ-	Ácido 5-cafeoilquínico
AAR%	Atividade antioxidante relativa
Abs	Absorbância
ACQ-	Ácido cafeoilquínico
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração bactericida mínima
CEP-	Código de Endereçamento Postal
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
COX 2-	Ciclo-oxigenase 2
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
diACQ-	Ácido dicafeoilquínico
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMEM	Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH•-	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EAG	Equivalente de ácido gálico
EAT	Equivalente de ácido tânico
ERO-	Espécies reativas de oxigênio
FT-IR	Infravermelho com transformada de Fourier
H1N1	Influenza A subtipo H1N1
HIV-	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
KCl	Cloreto de potássio
MH	Mueller Hilton
MTT	{brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium]}
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monossódico
PZ	Potencial Zeta
TGA	Termogravimetria
TGF-β-	Fator de crescimento de transformação beta



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
2.1 ASPECTOS GERAIS DA CICATRIZAÇÃO .....	21
2.2 CURATIVOS .....	24
<b>2.2.1 Quitosana</b> .....	<b>25</b>
2.3 PRODUTOS NATURAIS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS .....	28
<b>2.3.1 Coffea arabica L.</b> .....	<b>29</b>
<b>2.3.2. Processamento dos frutos do cafeeiro</b> .....	<b>29</b>
<b>2.3.3 Bioativos presentes na folha de café</b> .....	<b>32</b>
2.3.3.1 <i>Compostos fenólicos</i> .....	32
2.3.3.2 <i>Alcaloides</i> .....	35
2.3.3.3 <i>Terpenos</i> .....	37
2.3.3.4 <i>Pigmentos</i> .....	38
2.3.3.5 <i>Fitoesteróis</i> .....	38
2.3.3.6 <i>Minerais</i> .....	38
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE CAFÉ .....	41
<b>4.1.1 Obtenção do material botânico</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1.2 Preparo do extrato</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1.3 Caracterização química do extrato</b> .....	<b>42</b>
4.1.3.1 <i>Determinação de compostos fenólicos</i> .....	42
4.1.3.2 <i>Identificação e determinação dos teores de 5-ACQ e mangiferina</i> .....	42

<b>4.1.4 Avaliação de atividades biológicas do extrato .....</b>	<b>43</b>
4.1.4.1 <i>Determinação da atividade antioxidante do extrato das folhas de C. arabica L.</i> .....	43
4.1.4.2 <i>Determinação da citotoxicidade do extrato das folhas de C. arabica L.</i> .....	46
4.1.4.3 <i>Determinação da atividade antimicrobiana do extrato das folhas de C. arabica L.</i> .....	48
<b>4.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE CAFÉ .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.1 Desenvolvimento dos filmes .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.2 Caracterização físico-química dos constituintes da solução precursora dos filmes .....</b>	<b>50</b>
4.2.2.1 <i>Determinação da Condutividade elétrica e Potencial Zeta (PZ)</i> .....	50
4.2.2.2 <i>Distribuição do tamanho de partícula por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)</i> .....	50
4.2.2.3 <i>Determinação dos parâmetros reológicos das soluções precursoras</i> .....	51
<b>4.2.3 Caracterização físico-química dos filmes .....</b>	<b>51</b>
4.2.3.1 <i>Determinação do peso médio</i> .....	51
4.2.3.2 <i>Determinação da espessura</i> .....	52
4.2.3.3 <i>Determinação das propriedades ópticas</i> .....	52
4.2.3.4 <i>Determinação da umidade</i> .....	53
4.2.3.5 <i>Determinação do grau de intumescimento e solubilidade</i> .....	53
4.2.3.6 <i>Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TGA)</i> .....	54
4.2.3.7 <i>Espectroscopia eletrônica vibracional na Região do Infravermelho</i> .....	54
4.2.3.8 <i>Caracterizações dos filmes por Análise Dinâmico Mecânica nos modos axial e rotacional</i> .....	55
4.2.3.9 <i>Determinação da liberação in vitro</i> .....	55
<b>4.2.4 Caracterização da atividade biológica dos filmes .....</b>	<b>56</b>
4.2.4.1 <i>Determinação da citotoxicidade in vitro</i> .....	56
4.2.4.2 <i>Determinação da atividade antimicrobiana in vitro</i> .....	56

4.2.4.3 <i>Determinação da atividade cicatrizante in vitro</i> .....	57
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	58
<b>5. RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DAS FOLHAS DE CAFÉ .....	59
<b>5.1.1 Rendimento do extrato</b> .....	<b>59</b>
<b>5.1.2 Caracterização química do extrato</b> .....	<b>60</b>
5.1.2.1 <i>Determinação dos compostos fenólicos</i> .....	60
5.1.2.2 <i>Identificação e determinação dos teores de 5-ACQ e mangiferina</i> .....	61
<b>5.1.3 Caracterização das atividades biológicas do extrato</b> .....	<b>63</b>
5.1.3.1 <i>Determinação da atividade antioxidante do extrato das folhas de C. arabica L.</i> .....	63
5.1.3.2 <i>Determinação da citotoxicidade do extrato das folhas de C. arabica L.</i> .....	66
5.1.3.3 <i>Determinação da atividade antimicrobiana do extrato das folhas de C. arabica L.</i> .....	68
5.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE CAFÉ .....	71
<b>5.2.1 Caracterização físico-química das soluções precursoras</b> .....	<b>72</b>
5.2.1.1 <i>Caracterização da condutividade elétrica, potencial zeta (PZ) e DLS</i> .....	72
5.2.1.2 <i>Caracterização reológica das soluções precursoras dos filmes.</i> .....	75
<b>5.2.2 Caracterização físico-química dos filmes</b> .....	<b>78</b>
5.2.2.1 <i>Determinação da espessura e peso médio</i> .....	79
5.2.2.2 <i>Determinação das propriedades ópticas</i> .....	80
5.2.2.3 <i>Determinação da umidade</i> .....	83
5.2.2.4 <i>Determinação do grau de intumescimento e solubilidade</i> .....	84
5.2.2.5 <i>Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TGA)</i> .....	87
5.2.2.6 <i>Espectroscopia eletrônica vibracional na Região do Infravermelho</i> .....	89
5.2.2.7 <i>Análise Dinâmico Mecânica dos filmes</i> .....	92

5.2.2.8 Avaliação da liberação <i>in vitro</i> .....	94
<b>5.2.3 Caracterização biológica dos filmes.....</b>	<b>96</b>
5.2.3.1 Determinação da citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	96
5.2.3.2 Determinação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	97
5.2.3.3 Determinação da atividade cicatrizante <i>in vitro</i> .....	100
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>106</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>107</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico multifacetado que relaciona interações coordenadas entre várias estruturas biológicas para restaurar a integridade tecidual (PANSARA et al., 2020) Ela é caracterizada como um fenômeno complexo que envolve várias fases incluindo inflamação, proliferação e maturação. Esse complexo processo, quando associado a circunstâncias diversas, como infecções, pode desenvolver complicações severas (ABBA et al., 2019).

Nas últimas décadas, o tratamento de feridas tem sido revolucionado, de modo que curativos convencionais, tais como ataduras sintéticas, algodão e gazes, foram substituídos por curativos bioativos, como filmes, esponjas e hidrocoloides. Esses curativos fornecem um ambiente ideal em torno da ferida e liberam ativos que auxiliam na hemostasia, contribuindo para o processo de cicatrização (BANO et al., 2017).

Os curativos modernos têm utilizado como matérias-primas polímeros naturais, biocompatíveis e absorvíveis, como o polissacarídeo catiônico quitosana. Como material funcional, a quitosana possui características e vantagens essenciais, incluindo biodegradabilidade, atividade hemostática, propriedades antimicrobiana, cicatrizante e anti-inflamatória (FRIEDMAN et al., 2013; DEVI et al., 2017; LI et al., 2019).

No decorrer da história da humanidade, diferentes plantas e/ou seus extratos têm sido amplamente utilizados na medicina tradicional com propriedades de cicatrização de feridas (COLOBATU et al., 2019). Dentre os tratamentos historicamente utilizados, destacam-se aqueles que utilizam extratos de grãos de café verdes ou de pó e óleos obtidos a partir dos grãos torrados (HAILEMESKEL et al., 2016; HUMARYANTO et al., 2019; LANIA et al., 2017). Esses produtos provenientes do cafeeiro, contém compostos fenólicos, alcaloides e terpenos que podem auxiliar na cicatrização de feridas na pele, devido às atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e analgésica (HUMARYANTO et al., 2019).

O café tem grande importância econômica e social, sendo a bebida consumida por um terço da população mundial (MATTA et al., 2018). Apesar do elevado consumo dessa bebida, os resíduos originados da indústria cafeeira, como as folhas, são poucos reaproveitados. Logo, esse subproduto pode ser utilizado como matéria-prima para a obtenção de produtos com fins terapêuticos, uma vez que é

gerado em quantidade significativa e com baixo valor agregado (CHEN et al., 2018).

As folhas de café têm sido usadas na etnomedicina para tratamento alternativo de várias doenças ou distúrbios. Isso pode ser devido à presença de compostos bioativos, como ácidos fenólicos, flavonoides e xantonas como a mangiferina, que contribuem com inúmeros benefícios à saúde, tais como propriedades antioxidantes, antibacteriana e redução nas condições inflamatórias (NGAMSUK et al., 2019; CHEN, 2019). Aliado a esse fato, já foi demonstrado que o ácido clorogênico e a mangiferina, devido às propriedades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória, estimulam a proliferação de fibroblastos e formação de colágeno, mecanismos que são fundamentais na cicatrização de feridas (BAGDAS et al., 2014; LWIN et al., 2021).

Diante do exposto, o presente trabalho propõe a incorporação do extrato hidroalcoólico de folhas de café (*Coffea arabica* L.) em filmes de quitosana, visando a associação dos efeitos antimicrobiano e cicatrizante do polímero com as atividades biológicas do extrato de folhas de café para utilização na cicatrização de feridas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS DA CICATRIZAÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo em média a 16% do peso corporal (ISAAC et al., 2010). Esse órgão recobre todo o corpo, atuando como barreira física contra o meio externo, evitando a desidratação, a penetração de micro-organismos e protegendo contra agressões mecânicas, químicas e térmicas (PEREIRA et al., 2016). Além disso, esse tecido garante a homeostasia corporal, por meio da termorregulação e do balanço de fluidos, atua na secreção de substâncias e na percepção sensorial do meio ambiente (MAVER et al., 2015). No entanto, por estar constantemente exposta à atmosfera externa, é vulnerável a diferentes tipos de lesões como úlceras, queimaduras e ferida cutânea (PEREIRA et al., 2016).

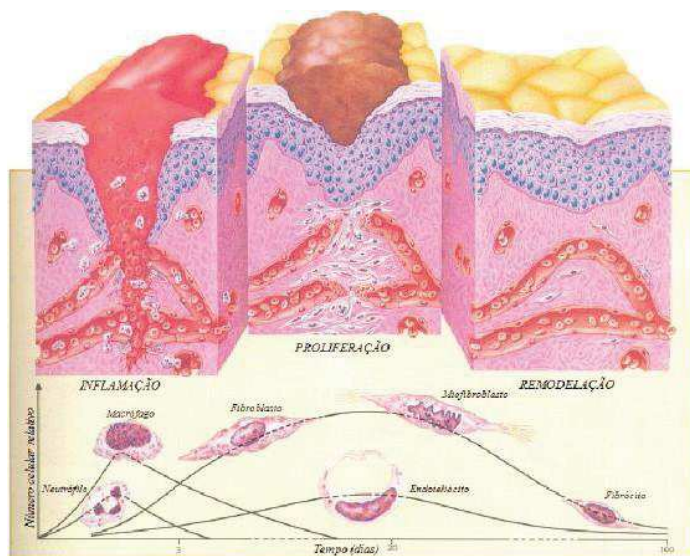
As feridas podem ser definidas como uma lesão no tecido vivo, no qual ocorre a descontinuidade da organização epitelial e interrupção da função do tecido anatômico, normalmente resultante de um processo patológico físico, químico, térmico, microbiano ou imunológico (MAVER et al., 2015). As feridas podem ser causadas por razões distintas e apresentarem diferentes tamanhos, profundidades e formas (DHIVYA et al., 2015).

Mediante o exame físico e o histórico clínico, elas podem ser classificadas de acordo com o tempo e o estado de cicatrização, em feridas agudas ou crônicas (PATRULEA et al., 2015). As agudas podem abranger desde um simples arranhão até uma lesão traumática ou queimaduras que conseguem cicatrizar completamente com ausência ou pequenas formações de cicatrizes, em um período de três meses. Por outro lado, feridas crônicas, como certos tipos de úlceras ou feridas diabéticas, se desenvolvem quando não ocorre o processo de cicatrização após um tempo mínimo de três meses. Dessa forma, as feridas crônicas são caracterizadas por não progredirem por meio dos estágios normais de cura, não sendo restaurada de maneira ordenada e oportuna (DHIVYA et al., 2015; PATRULEA et al., 2015).

A fim de restaurar a integridade do tecido danificado, o organismo induz um processo fisiológico denominada cicatrização, que por sua vez é um processo coordenado em que eventos celulares, moleculares e bioquímicos interagem de forma sincronizada para que ocorra a reconstituição tecidual (CAMPOS et al., 2007). Embora o processo de cura do ferimento seja contínuo, do ponto de vista conceitual, é

arbitrariamente dividido em três fases para auxiliar na compreensão dos processos fisiológicos que está ocorrendo na ferida e no tecido circundante (VELNAR et al., 2009). Na Figura 1, está demonstrado o processo caracterizado em três fases definidas como inflamatória, proliferativa e de remodelação.

Figura 1: As fases do processo de cicatrização.



Fonte: ISAAC et al., 2010

Após a injúria do endotélio, ocorre uma sequência de eventos, iniciada pela exposição do colágeno no tecido danificado, no qual as plaquetas se aderem a eles e promovem a ativação e deposição de plaquetas, formando a agregação plaquetária. Concomitantemente, ocorrem estímulos à liberação de fatores de coagulação, no qual o fibrinogênio é convertido pela trombina resultante das vias de coagulação, em uma rede de fibrina (ISAAC et al., 2010; ORSTED et al., 2011). Ambos processos, formam um trombo rico em plaquetas, fibrinogênio, fibrina e colágeno, que provisoriamente tampona a lesão endotelial, restabelecendo a hemostasia, formando uma barreira contra a invasão de agentes exógenos e organizando a matriz provisória necessária para o início da organização da ferida (OLIVEIRA et al, 2012).

Na fase inflamatória, os neutrófilos juntamente com os macrófagos promovem a fagocitose de corpos estranhos, de micro-organismos e células dendrites, por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que eliminam patógenos, e pela liberação de proteases que degradam a matriz extracelular preexistente desvitalizada na área da ferida (MANDELBAUM et al., 2003; REINKE et al., 2012).

A fase proliferativa é constituída por três etapas fundamentais a fibroplasia, a



angiogênese, e a reepitelização. Ambos com o objetivo de reparação do tecido conjuntivo e do epitélio (WALLACE et al., 2020).

O processo denominado fibroplasia, fornece uma matriz provisória contendo colágeno tipo III, glicosaminoglicanos, ácido hialurônico e fibronectina que garante sustentação para adesão e organização celular (REINKE et al., 2012; KANGAL et al., 2020). O estágio fibroblástico está intimamente relacionado à angiogênese por meio de reciprocidade e dinamismo, uma vez que o suprimento sanguíneo adequado é um requisito crucial para a matriz extracelular (KANGAL et al., 2020). Nesse contexto, os eventos da angiogênese representam o crescimento de novos vasos a partir da proliferação de vasos pré-existentes adjacentes a borda da ferida, no qual ocorre ativação e proliferação das células endoteliais, formação da estrutura tubular do vaso e reconstrução da sua membrana basal (REINKE et al., 2012). Paralelamente aos eventos mencionados, as células de revestimento por meio da ação de citocinas e fator de crescimento estimulam a migração, proliferação e diferenciação de células epiteliais para o processo de reepitelização, ocasionando o fechamento das superfícies da lesão e fornecendo uma camada protetora contra perda de fluidos e invasão bacteriana (OLIVEIRA et al., 2012).

A fase de remodelação, também conhecida como maturação, é o estágio final e mais prolongado do reparo tissular. Essa fase se caracteriza pelo equilíbrio na produção e degradação ordenada de fibras colágenas, estabelecidas pela ativação e inibição de proteases, com o objetivo de aumentar a força de tensão e recuperar a estrutura tecidual normal (WALLACE et al., 2020). Ela pode demorar de meses a anos, e ao final dela, a cicatriz se apresenta de forma pálida, uma vez que a regeneração de melanócitos é deficiente, os anexos da pele (folículos pilosos e glândulas) ganham regeneração limitada ou estão ausentes, porém, o colágeno permanece conferindo resistência satisfatória, formando o tecido cicatricial (BALBINO et al., 2005).

O objetivo do tratamento de feridas é reduzir o tempo necessário para curar ou minimizar as consequências nas cicatrizes. Muitas variáveis podem influenciar nesse longo e complexo processo, dentre os principais comprometimentos destacam-se as infecções bacterianas (MAVER et al., 2015).

As infecções bacterianas são consideradas problemas cruciais que influenciam na eficiência da cicatrização. Nesse sentido, o tratamento de feridas pode ser considerado desafiador para saúde pública, uma vez que após o trauma, as feridas podem ser infectadas rapidamente obstruindo o processo de cura e desenvolvendo

complicações (ABBA et al., 2019; KAMINIDEVI et al., 2018).

A redução da carga bacteriana pode ser um dos requisitos necessários para melhorar o tratamento, uma vez que reduz a inflamação local e conseqüentemente evita o comprometimento do tecido. Um tratamento ideal deve prevenir infecção por meio de atividade antimicrobiana, bem como estimular o crescimento celular normal sem danificar o tecido saudável (MAVER et al., 2015).

Aliado a esse fato, a inflamação da ferida ocasiona um influxo coordenado de neutrófilos ao local que, quando ativados no tecido, produzem radicais livres resultando em estresse oxidativo e danos significativos aos ácidos nucleicos, fatores de crescimento e à angiogênese, dificultando o processo de cicatrização (MAVER et al., 2015). Logo, a utilização de curativos antioxidantes, elimina ERO livres no estágio inicial, podendo auxiliar na cicatrização (ABBA et al., 2019).

## 2.2 CURATIVOS

Os curativos são recursos que recobrem a ferida com o intuito de protegê-la contra agressões externas, sendo eficazes na reparação de feridas, pois mantêm o ambiente úmido e fornecem um microambiente para a migração celular, bem como depuração da infecção (MANDELBAUM et al., 2003; ZHAO et al., 2018).

Nos dias atuais, são conhecidos inúmeros tipos de curativos utilizados para proteger as superfícies das lesões como gaze, ataduras e algodão. Contudo, esses materiais apresentam algumas desvantagens no processo de cicatrização, como cobertura insuficiente da ferida, lesão secundária proveniente de sua aderência à ferida, além de não atuarem na preservação da umidade (JAISWAL et al., 2019). Portanto, embora exista uma vasta diversidade de produtos disponíveis no mercado, ainda existe dificuldade em encontrar materiais que sejam ideais para tratar cada tipo de lesão (DHIVYA et al., 2015).

Segundo estudos, um curativo eficaz não pode agir apenas na proteção da ferida contra ambientes externo, mas também auxiliar no processo de cura, proporcionando um microambiente hidratado e com isolamento térmico. Deve ainda, ser capaz de prevenir infecção, remover sangue e excesso de exsudatos, ser biocompatível e permitir a troca gasosa (DHIVYA et al., 2015). Além disso, também deve apresentar características como elasticidade, atoxicidade e ser facilmente removível sem causar trauma e dor (ALTIOK et al., 2010; JAYAKUMAR et al., 2011).

Curativos podem ser obtidos por prévia combinação com diversos materiais naturais ou sintéticos (BANO et al., 2017). Dentre os materiais disponíveis, os polímeros vem ganhando destaque nos últimos anos por apresentam formas como filmes, espumas e hidrogéis (JAYAKUMAR et al., 2011).

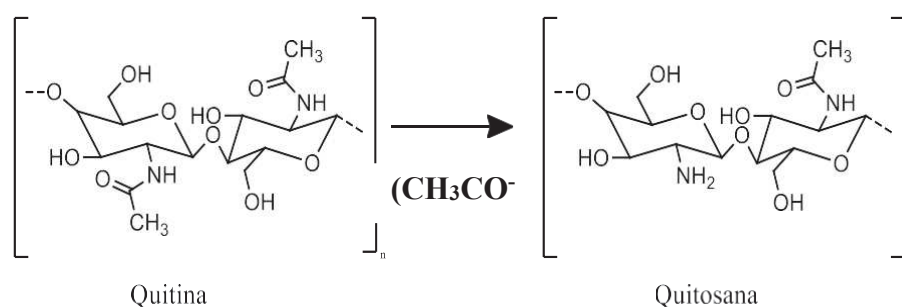
Os filmes de cicatrização são folhas finas, elásticas e auto-adesivas que oferecem vantagem sobre outras formas farmacêuticas, devido à facilidade de aplicação, por não ocorrer extravasamento de exsudato, por manterem o ambiente úmido, por permitirem trocas gasosas, além de atuarem como barreira para de micro-organismos (DABIRI et al., 2016; POWERS et al., 2013). Alguns desses materiais ainda são transparentes o que permite a visualização da ferida, além de serem facilmente compatíveis com ângulos e formas complexas (POWERS et al., 2013).

Nos curativos originais, a base dos filmes é composta por material derivado de nylon com polietileno. Contudo, o nylon tem uma capacidade limitada de absorver os exsudatos da ferida e ainda podem acarretar maceração da pele, provocando infecção (DHIVYA et al., 2015). Nesse sentido, a busca por filmes constituídos por outros materiais, sobretudo polímeros naturais, foi intensificada (BANO et al., 2017). Atualmente, inúmeros polímeros naturais apresentam atividades biológicas de interesse no processo de cicatrização, tais como as propriedades antimicrobiana e anti-inflamatória (LI et al., 2019).

### **2.2.1 Quitosana**

A quitosana é um copolímero formado por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glucosamina e N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosamina ligadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (KAMINIDEVI, et al., 2018; ESCÁRCEGA et al., 2018). Esse polímero foi descoberto em 1859 por meio de reação de desacetilação de quitina (Figura 2). A quitina é o segundo polímero natural mais abundante na natureza, atrás apenas da celulose, sendo encontrada em exoesqueletos de crustáceos, cutículas de insetos e paredes celulares de fungos. Dessa forma, a quitosana pode ser considerada um produto de fácil acesso e de disponibilidade mundial (HAMED I et al., 2018).

Figura 2: Representação do processo de desacetilação de quitina e formação da quitosana.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

A quitina, quando submetida ao processo de desacetilação, rompe a ligação N-acetil, formando grupamentos amínicos livres. Em meio ácido, os grupos glicosamina encontram-se protonados ( $R-NH_3^+$ ), conferindo à quitosana propriedades catiônicas (Figura 2). A estrutura do polímero não é uniforme, uma vez que a remoção das acetilas não é total, ou seja, a molécula é parcialmente desacetilada (DAMIAN et al., 2005; HAMED I et al., 2018).

A procura por esse polímero pode ser justificada por sua ampla disponibilidade na natureza, baixo custo e segurança ambiental, sendo ecologicamente interessante (KAMINIDEVI et al., 2018). Aliado a essas vantagens, a quitosana ainda é considerada um material promissor para vários processos biológicos, devido à sua característica de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (THEIN-HAN et al., 2004).

Na área farmacêutica, a quitosana tem sido amplamente utilizada no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada. Segundo Ammar et al. (2008), a quitosana apresenta a característica de mucoadesão e auxilia no transporte dos fármacos por meio de aberturas nas junções oclusiva de células epiteliais, contribuindo na absorção por vias paracelulares. Além disso, o composto tem demonstrado propriedades biológicas importantes, incluindo atividades antioxidante, hemostática, anticoagulante, antiolesterolêmica, antitumoral, antimicrobiana e cicatrizante (ESCÁRCEGA et al., 2018; DEVI et al., 2017).

Com relação à cicatrização de feridas, a quitosana e seus derivados foram utilizados pela primeira vez na década de 1980 na pele e região nasal, e a partir de então tem provado ser uma candidata promissora na diminuição substancial no tempo de cicatrização em animais e seres humanos (PATRULEA et al., 2015). Esse polímero

tem demonstrado auxiliar no processo de cicatrização de feridas por meio de mais de um mecanismo. Na fase inicial do processo inflamatório, o grupo amino na quitosana atuam como anticoagulante, no qual a sua carga positiva interage com a carga negativa da membrana celular dos glóbulos vermelhos (GUPTA et al., 2019). Além disso, o polímero ainda promove a ativação, proliferação e infiltração de células polimorfonucleares e fibroblastos, permitindo a formação de tecido fibroso e reepitelização (PATRULEA et al., 2015; ZOU et al., 2017).

Baxter e colaboradores (2013) ressaltam que a quitosana é capaz de aumentar a expressão da produção de TGF- $\beta$ 1 e colágeno, acelerando o processo de regeneração tecidual. A quitosana também apresenta atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos (RANJBAR et al., 2018). A atividade antimicrobiana da quitosana ocorre pelo mecanismo de interação com as membranas (SAHARIAH et al., 2017). Em meio ácido, os grupos glicosamina estão protonados ( $R-NH_3^+$ ), levando a uma interação eletrostática com as membranas bacterianas aniônicas, resultando na redução da estabilidade osmótica, ruptura da membrana e vazamento de constituintes intracelulares, com consequente morte celular (FRIEDMAN et al., 2013). Essa interação também bloqueia a entrada de nutrientes e oxigênio no interior da célula, inviabilizando processos metabólicos do micro-organismo (LI et al., 2019). Outro mecanismo destacado por Friedman et al. (2013), envolve a ligação da quitosana ao DNA microbiano e a inibição de síntese de RNAm e proteínas.

Portanto, curativos à base de quitosana tendem a promover efeito antimicrobiano, que por sua vez pode ser potencializado pela incorporação de outros compostos, como antimicrobianos sintéticos, partículas metálicas ou extratos de produtos naturais (KRAVANJA et al., 2019; FRIEDMAN et al., 2013).

Kausar e colaboradores (2021), elaboraram filmes de quitosana incorporados com vancomicina na tentativa de fornecerem novas preparações para o tratamento de traumas cutâneos e queimadura. Como resultado, os autores atestaram que os filmes apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), eficácia na cicatrização de feridas em modelo animal, bem como resultados promissores na resistência à tração e intumescimento, apresentando um potencial na abordagem terapêutica em queimaduras.

Adicionalmente, estudos relacionados à incorporação de extratos de folhas de *Cynara Cardunculus* em filmes de quitosana para o tratamento de feridas cutâneas

foram conduzidos por Brás e colaboradores (2020). Os resultados obtidos neste estudo abriram a possibilidade de utilizar com sucesso filmes de quitosana com extratos naturais, uma vez que foram avaliados resultados satisfatórios demonstrando baixa toxicidade e relevante atividade anti-inflamatória e cicatrizante *in vitro*.

### 2.3 PRODUTOS NATURAIS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Durante milhares de anos, o uso de produtos naturais foi o principal recurso terapêutico para cuidar dos problemas de saúde dos indivíduos. Essa prática contribui, para aumentar o acesso da população aos cuidados de saúde, principalmente em populações rurais e países em desenvolvimento (PEREIRA et al., 2016).

Esse tratamento alternativo, ou comumente denominado de "complementar", se baseia na prática e conhecimento de diferentes países, envolvendo o uso de organismos vivos e recursos naturais obtidos de uma ampla variedade de fontes (plantas e fungos) para o tratamento de doenças (PEREIRA et al., 2016).

O emprego de plantas e seus extratos na recuperação de doenças tem evoluído ao longo dos tempos, abrangendo desde o uso de preparados mais simples até as formas mais elaboradas. Os fitoquímicos presentes são capazes de reagir com grupos de oxigênio ou outras macromoléculas biológicas para instigar efeitos e combater doenças humanas (THANGAPAZHAM et al., 2016).

O uso de produtos naturais na prevenção e/ou tratamento de uma série de doenças como como câncer, atividade anti-inflamatória e antimicrobiana, já é reconhecido há séculos, bem como seus benefícios para a cicatrização de feridas, queimaduras e regeneração da pele (COLOBATU et al., 2019; THANGAPAZHAM et al., 2016; KUMAR et al., 2007).

O uso de plantas para o reparo tecidual no tratamento de feridas pode ser realizado através de diferentes preparações de uso tópico. Entre os principais agentes cicatrizantes presentes em extratos vegetais destacam-se os alcaloides, óleos essenciais, flavonoides, terpenos, saponinas, ácidos graxos e compostos fenólicos (BAHRAMSOLTANI et al., 2014).

O conhecimento tradicional pode ser associado com práticas clínicas modernas e/ou biomateriais, permitindo o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que atendam a necessidades médicas, como o controle de infecções e a redução do tempo de cicatrização de feridas (PEREIRA et al., 2016).

### 2.3.1 *Coffea arabica* L.

Os cafeeiros são plantas pertencentes à família *Rubiaceae* e ao gênero *Coffea*, compreendendo mais de 100 espécies (GÓMEZ et al., 2018). Dentre as numerosas espécies, duas apresentam grande destaque comercialmente na produção do café, são elas: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* (GÓMEZ et al., 2018; NUHU, 2014).

Os cafeeiros são arbustos lenhosos, com caule cilíndrico, branco amarelado e de raízes extensas, que atinge o comprimento em média de 2 a 4 metros. Apresentam um dimorfismo de ramos, no qual os ramos verticais, denominado ortotrópicos, se estendem do tronco principal e, a partir deles ocorre a ramificação dos troncos horizontais, denominado plagiotrópicos (DAVIS et al., 2006; FERRAZ, 2013).

*C. arabica* L. é um arbusto que se desenvolve preferencialmente em altas altitudes, de 1600 a 2800 m acima do nível do mar, em clima ameno, de 15 a 20 °C. Normalmente essa espécie é cultivada entre os trópicos, e possuem maior suscetibilidade a doenças e pragas (MATTA et al., 2018).

Após a germinação das sementes, o arbusto de café pode demorar aproximadamente três anos para florescer e conseqüentemente gerar frutos. Esse gênero é considerado de dias curtos, necessitando do período da noite para iniciar a floração (FERRAZ, 2013; ROSS, 2005). As inflorescências são representadas por botões em série nas axilas dos ramos plagiotrópicos, de coloração branca, sendo sustentadas por um pedúnculo e por um cálice rudimentar de cinco pétalas, e anteras curtas (WINTGENS, 2013).

O período de florescimento ocorre após intenso ciclos de chuvas, com grandes volumes de precipitação, seguido por um período de seca. Após esse ciclo, os frutos se desenvolvem pelos 7 a 10 meses subsequentes, e sua colheita deve ser efetuada no máximo 2 a 3 meses após o amadurecimento do fruto, uma vez que após a maturação inicia-se a senescência do fruto e a seca gradativa da mucilagem (KLEIN et al., 2003; WINTGENS, 2013).

### 2.3.2. Processamento dos frutos do cafeeiro

A colheita dos frutos do café pode ser realizada pelos métodos manual ou mecanizado. O primeiro consiste em promover a derriça manual dos ramos contendo

os frutos maduros. O mecanizado por sua vez, é um método caracterizado pela utilização de derriçadeiras portáteis, promovendo a remoção dos ramos do cafeeiro (FERREIRA-JUNIOR et al., 2016).

Ao final de todo processo, é gerada uma grande quantidade de cascas, polpa, caules e folhas ricas em compostos orgânicos, que são considerados resíduos no meio agroindustrial, no entanto somente uma pequena parcela é reaproveitada (PANDEY et al., 2000). Para minimizar o impacto ambiental, os resíduos podem ser reutilizados como matérias-primas para a produção de bioprodutos, agregando maiores valores na produção (CHEN et al., 2018).

Nesse sentido, o aproveitamento das folhas do cafeeiro possui grande potencial para aplicação em diversos setores industriais, uma vez que são ricos em compostos bioativos, estão disponíveis em quantidades significativas e com baixo valor agregado, se comparados aos grãos (CHEN et al., 2018).

As lâminas foliares do cafeeiro são cerosas, onduladas e delgadas, com forma entre elíptica e lanceolada (Figura 3) que crescem nas laterais do principal caule e galhos em pares opostos (DAVIS, et al., 2006).

Dependendo da etapa do desenvolvimento, sua coloração pode variar entre verde clara, verde-escura ou bronze, e ainda podem ser categorizadas em três tipos, de acordo com o estágio de desenvolvimento: brotos (ou jovens), folhas maduras e folhas envelhecidas (CHEN, 2019).

Figura 3: Representação das folhas de *C. arabica* L.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

As folhas do cafeeiro persistem na planta após o amadurecimento do fruto ou envelhecimento das flores, tendo um tempo de vida de aproximadamente 7 a 10 meses nas espécies *C. Canephora* e *C. arabica* L. (CHEN, 2019). Quando madura



atinge aproximadamente 15 a 30 cm de comprimento e 5 a 15 cm de largura, contendo em média 7 a 10 veias (ROSS, 2005).

O nível de radiação que os arbustos são expostos pode afetar as características morfológicas, anatômicas e fisiológicas da folha, e conseqüentemente, interferir no desenvolvimento, estrutura foliar e processo fotossintético (NASCIMENTO et al., 2006). A absorção de luz é controlada principalmente pela plasticidade morfológica e anatômica, como variação da inclinação na área foliar (CAMPA et al., 2017). Além disso, possuem camadas de células externas revestidas por ceras cuticulares, que auxiliam na redução da perda de água e protegem os tecidos (DAVIS et al., 2006). Os compostos fenólicos ainda fornecem defesa contra herbívoros e protegem as folhas aos danos fotográficos (CAMPA et al., 2017).

Tradicionalmente, o consumo de chás das folhas do cafeeiro tem sido utilizado em inúmeros países, e apresentam efeitos benéficos para tratar e amenizar várias doenças ou distúrbios (NGAMSUK et al., 2019). Na Etiópia, o processo de infusão das folhas café foi descrito como medicamento laxativo; na Uganda utiliza-se para o controle do HIV; na Nicarágua, o uso das folhas é mencionado no tratamento de dor de estômago e dores de cabeça; no Peru a ingestão do chá auxilia no alívio da tosse associada à gripe; no México utiliza-se para tratar febre e estimular a produção de prolactina; no Haiti seu uso é citado para o tratamento de anemia, edema e astenia (CHEN et al., 2018; MESS et al., 2018).

A aplicação etnofarmacológica é principalmente devido às folhas do cafeeiro conterem fitoquímicos ativos como: compostos fenólicos, alcaloides, terpenos, xantonoides, fitoesteróis e carotenoides (CHEN et al., 2019; MONTEIRO et al., 2020).

Segheto e colaboradores (2018), investigaram as folhas de *C. arabica* L. proveniente dos resíduos agrícolas a fim de identificar e quantificar compostos químicos presentes nas mesmas, bem como avaliar atividades antioxidante e anti-inflamatória utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*. Como resultado, constatou-se a presença de compostos fenólicos, incluindo ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) e mangiferina no extrato metanólico de folhas de *C. arabica* L. e frações, bem como as atividades farmacológicas do extrato e frações demonstraram resultados promissores na atividade antioxidante, interrompendo os processos que geram radicais livres, assim como propriedade inflamatória, indicando novas possibilidades para o tratamento de distúrbios envolvendo dano oxidativo imediato.

Contudo, estudos relacionados à bioatividade das folhas de café são

escassos. Segundo Chen (2019), existem 45 patentes relacionadas a aplicação da folha do café, sendo a China e o Japão os principais países portadores destas. Dentre as patentes pode ser destacado as folhas do cafeeiro na área de: ração animal, substituto do tabaco, desodorizante, limpador facial, material de embalagem, extrato de chá ou bebida de folha de café, fungicida orgânico, dentre outros.

### **2.3.3 Bioativos presentes na folha de café**

O perfil químico e a bioatividade das folhas de café são influenciados de acordo com a espécie, região de cultivo, condições ambientais, estágio de desenvolvimento, época de coleta, e métodos de processamento. Os métodos de extração e processamento para obtenção do chá ou extrato podem ainda afetar o perfil fitoquímico e a bioatividade (CHEN et al., 2018).

#### *2.3.3.1 Compostos fenólicos*

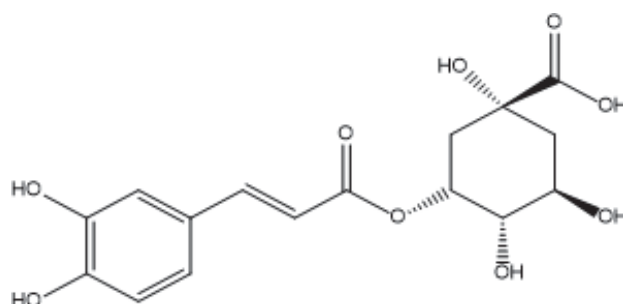
Os compostos fenólicos compreendem um grande grupo de metabólitos que apresentam elevado potencial antioxidante. Esse grupo inclui uma variedade de classes de metabólitos secundários, destacando-se dentre eles os flavonoides e os ácidos fenólicos (MONTEIRO et al., 2020).

Nos vegetais essas substâncias formam um sistema de defesa contra fatores bióticos ou abióticos (MELO et al., 2006). São amplamente encontrados em frutas, café, chá e vinho. Apresentam grande interesse comercial devido aos seus benefícios para a saúde humana, especialmente na prevenção de doenças degenerativas, cardiovasculares e distúrbios metabólicos (MONTEIRO et al., 2020).

#### *Ácido clorogênico*

O ácido clorogênico é formado a partir da esterificação de ácidos transhidroxicinâmicos e ácido quinínico (LOADER et al., 2017). Nas folhas de café o ácido 5-cafeoilquinico (5-ACQ) demonstrado na Figura 4, representa 80-94% do ácido clorogênico na maioria das espécies *Coffea* (CHEN, 2019).

Figura 4: Estrutura química do ácido 5-cafeoilquínico.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

O ácido clorogênico é considerado excelente candidato para a formulação de suplementos alimentares e produtos farmacêuticos (GÓMEZ et al., 2018), por exibir atividade antimutagênica, anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, hipoglicemiante, além de ser eficaz na prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (TAJIK et al., 2017; GÓMEZ et al., 2018).

A reação anti-inflamatória proveniente do ácido clorogênico é influenciada pela inibição de interleucinas relacionadas ao processo inflamatório, reduzindo consequentemente o grau de inflamação (TAJIK et al., 2017). Santos et al. (2006), observaram que o ácido clorogênico inibe a formação do edema e dor após a indução de reação inflamatória em ratos, demonstra atividades anti-inflamatórias e analgésicas. No tratamento de osteoartrite, o 5-ACQ exerce efeito anti-inflamatório, por suprimir a prostaglandina 2 por meio da inibição da COX-2 em condrócitos (CHEN et al., 2014).

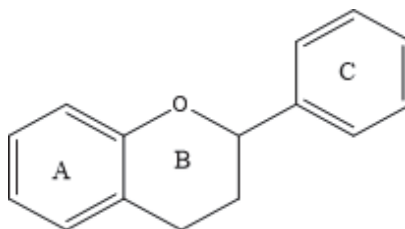
Outro efeito biológico benéfico na saúde dos seres humanos é seu potencial antioxidante, no qual age na neutralização de radicais livres, quelação de metais e modulação de atividades enzimáticas (SANTOS et al., 2006). Aliado a atividade antioxidante, no mecanismo da terapia de cicatrização de feridas, o ácido clorogênico têm demonstrado um potencial na atividade curativa, por meio de mecanismos como aumento da densidade capilar e produção de colágeno, bem como seu efeito antioxidante (BAGDAS et al., 2014).

### *Flavonoides*

Os flavonoides são uma classe de metabólitos secundários que compõem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6 (Figura 5), sendo composta por mais de

9000 moléculas individuais encontradas em inúmeros tecidos e órgãos, no reino vegetal (HERNANDEZ et al., 2009).

Figura 5: Estrutura química básica dos flavonoides.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

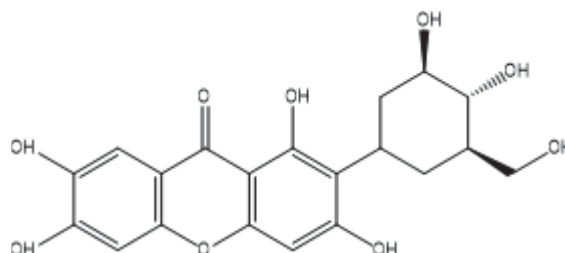
As folhas de café abrangem uma grande diversidade de flavonoides, com diferentes grupos, incluindo catequinas (como as catequinas, epicatequina, galato de epigalocatequina); antocianina (como delphinidina 3,5-diglucosídeo); miricetina, luteolina, apigenina, rutina e quercetina (CHEN, 2019; RATANAMARNO et al., 2017).

Nas folhas do cafeeiro, os flavonoides auxiliam na triagem de raios ultravioletas, sendo abundantes em folhas expostas à luz solar (DOMINGUES-JÚNIOR et al., 2012). Em contraste, apesar de não serem consideradas essenciais para a nutrição humana, os flavonoides apresentam potencial com atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e auxiliam na prevenção de doenças degenerativas e cardiovasculares (GADKARI et al., 2015; CHEN, 2019).

### *Mangiferina*

A mangiferina, também conhecida por mangostina, é uma xantona C-glicosilada altamente resistente à hidrólise, descrita quimicamente como 1,3,6,7-tetra-hidroxi-xantona-C2- $\beta$ -glucosídeo, como apresentada na Figura 6 (TREVISAN et al., 2016). Foi isolada pela primeira vez da mangueira (*Mangifera indica* L.), família *Anacardiaceae* (CAMPA et al., 2012).

Figura 6: Estrutura química da mangiferina



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

A mangiferina é uma substância com diversas atividades farmacológicas, como antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica, antitumoral, hipoglicemiante, hipocolesterolêmica, hipotensora, imunomoduladora, neuroprotetora e hepatoprotetora (DU et al., 2018; VYAS et al., 2012).

No cafeeiro localizam-se nas folhas em regiões como paliçada, parênquima esponjoso e cutícula, já nos frutos jovens situa-se no exocarpo e mesocarpo, contudo seu teor decresce com a maturação dos frutos (CAMPA et al., 2012).

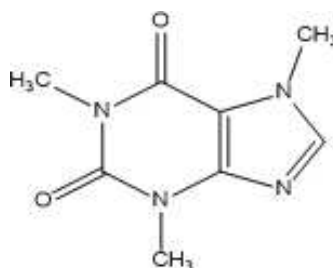
### 2.3.3.2 Alcaloides

Cafeína e trigonelina, são os principais alcaloides presentes na folha do cafeeiro (CHEN, 2019; MONTEIRO et al., 2020).

#### *Cafeína*

A cafeína é um metabólito secundário descoberto em 1820, identificado como metilxantinas, quimicamente conhecido como 1,3,7- trimetilxantina, demonstrada na Figura 7 (NUHU, 2014; STEFANELLO et al., 2019). Esse composto foi detectado em aproximadamente 60 espécies de plantas tropicais distribuídas especialmente nos gêneros: *Coffea* (café), *Theobroma* (cacau), *Paullinina* (guaraná) e *Camellia* (chá) (HECKMAN et al., 2010).

Figura 7: Estrutura química da cafeína.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

No cafeeiro, o maior teor de cafeína se encontra nos frutos, e este sofre poucas variações durante o processo de torração, apresentando uma estabilidade considerável (STEFANELLO et al., 2019). As folhas do cafeeiro apresentam um teor menor quando comparadas às folhas de chá verde (*Camellia sinensis*) e grãos de café, no entanto são consideradas uma fonte alternativa de cafeína (CHEN, 2019).

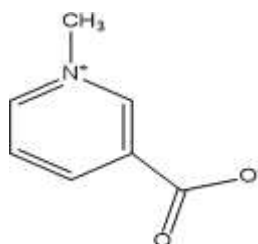
Nos seres humanos, os principais efeitos promovidos pela cafeína são oriundos de sua ação como antagonista dos receptores de adenosina 1 e A2 (HECKMAN et al., 2010). Ambos mecanismos desencadeiam a estimulação do sistema nervoso central promovendo a percepção aprimorada, redução de fadiga e efeitos positivos na consolidação da memória (LUDWIG et al., 2014).

A capacidade antioxidante proveniente da cafeína e seus metabólitos, teobromina e xantinas, por sua vez exercem mecanismo de prevenção a oxidação lipídica por meio da captação de radicais hidroxila e oxigênio singlete e reação com elétrons (CHEN, 2019). Além disso, a cafeína aumenta a taxa metabólica e termogênica, auxiliando na perda de peso e reduzindo o risco de desenvolver síndrome metabólica (LUDWIG et al., 2014).

### *Trigonelina*

A trigonelina é um composto nitrogenado proveniente da metilação do átomo de nitrogênio à ácido nicotínico, sendo quimicamente denominada ácido N-metil nicotínico, representado na Figura 8 (NUHU, 2014).

Figura 8: Estrutura química da trigonelina.



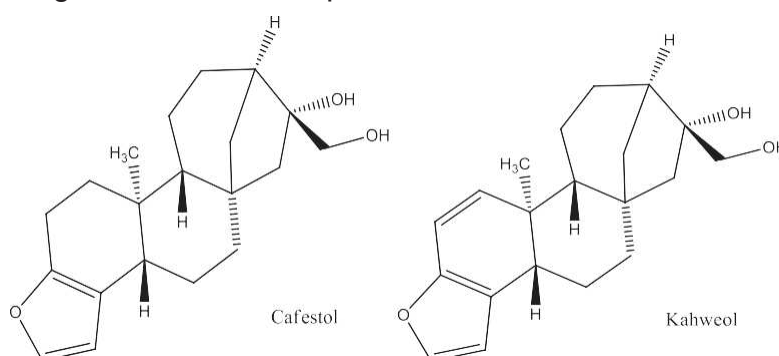
Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

Nas plantas, a trigonelina auxilia no processo de regulação do ciclo celular (ASHIHARA et al., 2015). Em contraste, no organismo humano, esse composto promove alterações fisiológicas benéficas, tendo efeito hipoglicemiantes, neuroprotetora e atividade antibacteriana ASHIHARA et al., 2015).

### 2.3.3.3 Terpenos

Kahweol e cafestol são terpenos produzidos nas plantas do gênero *Coffea* (AZEVEDO et al., 2008). A diferença entre o kahweol e o cafestol é a insaturação dos carbonos C1-C2 do diterpeno, como pode ser observado na Figura 9 (NOVAES et al., 2018).

Figura 9: Estruturas químicas do Kahweol e cafestol.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

Os diterpenos esterificados foram investigados pela primeira vez por Kaufmann e Hamsagar, em 1962 (NOVAES et al., 2018). Anos seguintes, os diterpenos como cafestol, kahweol e 16-O-metilca-festol foram identificados no café, inclusive nas folhas do cafeeiro (KÖLLING-SPEER et al, 1997).

Recentemente, o cafestol e o kahweol têm demonstrado uma ampla variedade de atividade farmacológica benéfica, incluindo propriedades: anti-inflamatórias, antidiabética, antioxidante e anticarcinogênica (CAVIN et al., 2002; REN et al., 2019).

#### 2.3.3.4 Pigmentos

Os pigmentos apresentam a função fotoprotetora e antioxidante nas folhas de café. Compostos como carotenoides e xantofilas, incluindo neoxantina, luteína, violaxantina, antheraxantina e zeaxantina foram descritas em folhas maduras de *C. arabica* L. (POMPELLI et al., 2010).

No organismo humano, alguns pigmentos podem promover alterações fisiológicas benéficas. As xantonilas, como a luteína e a zeaxantina, podem contribuir na saúde dos olhos e da pele (MA et al., 2010). O  $\beta$ -caroteno por sua vez apresenta boa atividade antioxidante demonstra propriedades benéfica relacionada a prevenção de doenças cardiovasculares e câncer (RAO et al., 2007).

#### 2.3.3.5 Fitoesteróis

Dentre os fitoesteróis identificados em folhas de café, o sitosterol apresenta estrutura similar ao colesterol, sendo capaz de reduzir os níveis de colesterol no sangue, auxiliando no declínio da concentração do colesterol no plasma sanguíneo (RUDKOWSKA et al. 2008), além de conter estudos associados a atividade no tratamento de hiperplasia prostática benigna (KIM et al. 2012).

#### 2.3.3.6 Minerais

A absorção de nutrientes no cafeeiro varia de acordo com o órgão vegetal. Minerais como cálcio, potássio, nitrogênio, dentre outros, estão presente em maiores teores nas folhas do café (MAZZAFERA, 1999; CHEN, 2019).

O nitrogênio é o nutriente mais exigido durante o crescimento vegetativo, e apresenta alta exportação para os grãos do café. Ele age ativando rota de síntese de lignina e de metabólitos secundários (MARTINEZ et al., 2014). O cálcio corresponde a 12% dos nutrientes, ele apresenta funcionalidade nos estágios de desenvolvimento, auxilia na resistência das paredes celulares e no crescimento de pêlos radiculares



contribuindo na absorção de nutrientes (RAMALHO et al., 1995). O potássio desempenha papel importante no metabolismo de compostos nitrogenados e carboidratos, sendo primordial para a ativação enzimática, dessa forma, sua deficiência, promove a inibição de síntese de compostos de alto peso molecular, como amido, proteínas e celulose. Quanto aos microminerais, no Brasil, o boro, ferro, manganês, cobre e zinco são considerados os de maior importância para o crescimento e produção do cafeeiro (MARTINEZ et al., 2014).

Nos seres humanos, os minerais são fontes essenciais para um bom funcionamento do organismo. O cálcio é responsável pela propulsão de impulsos nervosos, contrações musculares, coagulação do sangue e na estrutura e força dos ossos (UUSI-RASI et al., 2013). Já o zinco, desempenha funções catalíticas, estruturais e reguladoras (ROOHANI et al., 2013). Contudo, sabe-se que somente a ingestão de chás de folhas de café, não contribui significativamente para a dose diária recomendada de elementos (CHEN, 2019).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e avaliar as características físico-químicas e farmacológico *in vitro* de filmes de quitosana contendo extrato de folhas de *C. arabica* L. para o potencial uso tópico em cicatrização de feridas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato hidroalcoólico de folhas de café e caracteriza-lo quanto ao teor de fenólicos totais.
- Identificar e quantificar a mangiferina e o ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) no extrato hidroalcoólico de folhas de café por cromatografia líquida de alta eficiência.
- Determinar o potencial antioxidante, a citotoxicidade e atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de folhas de *C. arabica* L.
- Preparar filmes de quitosana na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólicos de folhas de *C. arabica* L.
- Avaliar o efeito do extrato no processo de agregação da quitosana por condutividade, medidas de Potencial Zeta (PZ) e Diâmetro Hidrodinâmico (Dh).
- Avaliar o efeito da incorporação do extrato nas propriedades reológicas da quitosana em fase líquida por reologia.
- Caracterizar os filmes com base nos parâmetros de peso médio, espessura, parâmetros ópticos, umidade, grau de intumescimento, solubilidade, estabilidade térmica e porcentagem de liberação de constituintes do extrato a partir dos filmes.
- Verificar a ocorrência de interações intermoleculares entre componentes do extrato com a quitosana, por espectroscopia na região do infravermelho.
- Avaliar o efeito da incorporação do extrato nas propriedades mecânicas do filme de quitosana por análise Dinâmico Mecânica (DMA).
- Avaliar a citotoxicidade e as atividades antimicrobiana e cicatrizante *in vitro* dos filmes de quitosana contendo ou não o extrato hidroalcoólico de folhas de *C. arabica* L.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE CAFÉ

#### 4.1.1 Obtenção do material botânico

As folhas de *C. arabica* L. foram coletadas na Fazenda Campo do Meio, no município de Candeias-MG, CEP 37280-000, com as coordenadas geográficas: latitude 20°49'36,6" S; longitude 45°08'15.4" W, em fevereiro de 2021. Sua exsicata está depositada no Herbário Leopoldo Krieger do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, sob o número CESJ73046.

Após a coleta, as folhas foram submetidas à secagem em estufa (Famen, modelo 002CB) a 35 °C (CECHINEL et al., 1998). Posteriormente, as folhas foram trituradas em moinho de faca (Solab, modelo SL30) e o material vegetal obtido foi peneirado em tamis nº 25 e pesado (ZOU et al., 2014).

#### 4.1.2 Preparo do extrato

Para a obtenção do extrato das folhas de café, adicionou-se 20 g do material vegetal seco e tamisado em 200 mL (1:10) de solução hidroalcoólica na proporção 70% de etanol:água. A extração foi realizada em ultrassom (Unnique, modelo Ultracleaner 1400) durante 45 minutos, frequência de 42 kHz, em temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, o extrato obtido foi filtrado a vácuo, utilizando o papel filtro, tipo milex, 11 µm. Por fim, o extrato foi concentrado sob vácuo em evaporador a 40 °C, congelando a -80 °C e liofilizado (JJCientífica, modelo LJJ04) por 24 h (ZOU et al., 2014). Após a liofilização o extrato foi pesado e mantido no dessecador em frascos identificados e hermeticamente fechados. O rendimento do extrato foi obtido usando a equação abaixo:

$$R\% = \frac{\text{massa do extrato obtido} \times 100}{\text{massa das folhas secas}}$$

Sendo:

- R%: Rendimento (em porcentagem)

### **4.1.3 Caracterização química do extrato**

#### *4.1.3.1 Determinação de compostos fenólicos*

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de *Folin–Ciocalteu*, com pequenas modificações (DOWD, 1959; FOLIN, 1927). O ácido tânico foi utilizado como padrão. A curva de calibração foi preparada, com concentrações que variaram de 7,5 a 350 µg/mL de uma solução metanólica de ácido tânico (500 µg/mL). Para o doseamento do extrato de folhas de *C. arabica* L. foi preparada uma solução estoque a 500 µg/mL em metanol. Poços somente com amostra e metanol foram utilizados como branco do teste. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 120 µL do reagente *Folin Ciocalteu* 20%, 30 µL da amostra e 100 µL de carbonato de sódio 4%. Decorridos 30 minutos de incubação ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 770 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e a média ± desvio padrão foi utilizada para o cálculo do teor de fenóis. O conteúdo total de fenólicos totais foi expresso em mg/g de extrato vegetal, em equivalentes de ácido tânico (EAT).

#### *4.1.3.2 Identificação e determinação dos teores de 5-ACQ e mangiferina*

Para identificar e quantificar os compostos ácido clorogênico (5-ACQ) e mangiferina foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseada na metodologia desenvolvida por Segheto et al. (2018). A análise foi realizada em um cromatógrafo marca Waters®, constituído por um sistema Alliance® composto pelo módulo de separação e2695 com detecção pelo detector PDA2998.

A análise cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa de sílica Promosil C18 de dimensões 150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm, marca Agela Technologies. Os reagentes utilizados na fase móvel foram metanol (Química contemporânea Ltda, grau HPLC), ácido acético (JT. Baker, grau HPLC) e água ultrapurificada em sistema Direct-Q® 3UV (Millipore). Os solventes foram filtrados em membrana de 0,45 µm com o auxílio de um sistema acoplado a bomba de vácuo e

degaseificados durante 15 minutos sob vácuo e ultrassom.

A fase móvel foi preparada com água ultrapurificada e ácido acético na proporção 98:2 (Solvente A), e metanol, água e ácido acético na proporção 90:5:5 (Solvente B). A coluna foi equilibrada com a fase móvel, composta 82% do solvente A e 18% do solvente B. Após a injeção (50 µL) do extrato e padrões, a eluição dos compostos ocorreu em um sistema gradiente de concentração dos solventes de forma que a concentração do solvente B aumentou de 18% para 25% em 2 minutos e de 25% para 36% em 13 minutos, retornando a 18% de solvente B e permanecendo nessa condição por 10 minutos. O fluxo de eluição foi de 0,6 mL/min, a coluna foi mantida a 40 °C no forno de aquecimento durante todo o processo e as amostras foram mantidas a 25 °C no sistema de injeção.

Os padrões de 5-ACQ (pureza  $\geq 95\%$ ) e mangiferina (pureza  $\geq 98\%$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Ambos foram diluídos em 100% de metanol (Química contemporânea Ltda, grau HPLC). A curva de calibração foi elaborada a partir do preparo das soluções nas concentrações de 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,6 µg/mL. O extrato foi diluído em metanol: água (95:5 v/v), na concentração de 5 mg/mL. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e a leitura dos padrões e extrato foram realizadas no comprimento de onda 330 nm. Após a análise cromatográfica, os dados foram coletados e processados utilizando o software Empower®3.

#### **4.1.4 Avaliação de atividades biológicas do extrato**

##### *4.1.4.1 Determinação da atividade antioxidante do extrato das folhas de C. arabica L.*

##### *Determinação da atividade antioxidante por meio do método de sequestro de radicais livres (DPPH•)*

A atividade sequestrante de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•) foi determinada pelo método descrito por Brand-Williams et al. (1995). Foram transferidos para um poço de uma placa de 96 poços, 100 µL de uma solução a 1 mg/mL do extrato. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas 1:2 em metanol e adicionados 150 µL de solução de DPPH a 20 µg/mL em metanol, obtendo-se as concentrações de 250 a 0,5 µg/mL. A placa foi incubada ao abrigo da luz e após 30

minutos a absorvância foi mensurada a 517 nm. O branco foi preparado da mesma maneira, utilizando-se metanol no lugar da solução de DPPH. Procedeu-se também à medida da absorvância do DPPH sem as amostras (controle negativo). Os testes foram realizados em triplicata e a porcentagem (%) de inibição de oxidação do extrato de folhas de *C. arabica* L. foi calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{Inibição} = \frac{(Abs_{DPPH} - Abs_{amostra}) \times 100}{Abs_{DPPH}}$$

Sendo:

- $Abs_{DPPH}$ : Absorvância mensurada para o radical DPPH em 20 µg/mL
- $Abs_{amostra}$ : Absorvância mensurada para as amostras.

Após calcular as porcentagens de atividade antioxidante da amostra e padrão, foi determinada a concentração inibitória de 50% ( $CI_{50}$ ) em µg/mL, que é a quantidade necessária da amostra para reduzir em 50% a ação oxidante do DPPH. O controle positivo utilizado foi a rutina cuja concentração variou de 250 a 0,0005 µg/mL.

#### *Determinação da atividade antioxidante total pelo método do poder de redução do complexo fosfomolibdênio*

O ensaio foi baseado no método proposto por Prieto et al. (1999). O extrato de folhas de *C. arabica* L. e os controles positivos, rutina e quercetina, foram diluídos em etanol 70%, obtendo-se a concentração de 500 µg/mL. Tubos de ensaio contendo 300 µL da amostra em solução etanólica e 2 mL da solução reagente (1,12 mL da solução de fosfato, 0,48 mL de molibdato, 0,40 mL de  $H_2SO_4$ ) foram fechados hermeticamente e colocados em banho-maria a 95 °C por 90 minutos. A leitura das soluções foi realizada em espectrofotômetro UV a 695 nm, utilizando como branco para cada amostra, 300 µL de solução estoque das mesmas e 2 mL do solvente (hidroalcoólico 70 %). Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante relativa (AAR%), sendo a capacidade antioxidante do extrato de folhas de *C. arabica* L. expressa em relação aos padrões de quercetina e rutina. A equação para o cálculo da AAR% encontra-se abaixo (NEGRI et al., 2009; ZOCOLER et al., 2009). Todo o experimento foi realizado em triplicata.

$$AAR\% = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{B-amostra}) \times 100}{Abs_{SCP} - Abs_{B-CP}}$$

Sendo:

- $Abs_{amostra}$ : Absorbância mensurada para as amostras;
- $Abs_{SCP}$ : Absorbância mensurada para os controles positivos;
- $Abs_{B-amostra}$ : Absorbância mensurada para o branco da amostra;
- $Abs_{B-CP}$ : Absorbância mensurada para o branco do controle positivo.

#### *Determinação da atividade antioxidante pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico*

A atividade de inibição de peroxidação lipídica foi avaliada pelo método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico descrito por Melo e colaboradores (1989), com algumas modificações. No preparo do extrato de folhas de *C. arabica* L. e do controle positivo (rutina), o mesmo procedimento foi realizado. Foram preparadas soluções estoque de 1 mg/mL em metanol e diluídas para obter as concentrações de 1000 a 31,3  $\mu$ g/mL. A emulsão contendo o  $\beta$ -caroteno e o ácido linoleico foi preparada adicionando a um erlenmeyer, 30  $\mu$ L de ácido linoleico, 265  $\mu$ L de Tween 40, 500  $\mu$ L de diclorometano e 100  $\mu$ L da solução  $\beta$ -caroteno a 10 mg/mL em diclorometano. Em seguida, a mistura passou pelo processo de evaporação completa do diclorometano em nitrogênio gasoso. No erlenmeyer, foi adicionado 30 mL de água destilada previamente saturada com oxigênio durante 1 h, agitou-se vigorosamente e adicionou-se água até ajustar a leitura da emulsão entre 0,6 e 0,7 de absorbância em 470 nm. Preparada a emulsão, foram adicionados 250  $\mu$ L da emulsão e 10  $\mu$ L das soluções da amostra e do controle a serem testados nos poços da microplaca (obtendo-se as concentrações finais nos poços da microplaca de 38,46 a 1,20  $\mu$ g/mL). O controle negativo foi realizado com 250  $\mu$ L desta emulsão e 10  $\mu$ L de metanol para determinar o 100% de oxidação.

A placa foi incubada a 45 °C para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descoramento do  $\beta$ -caroteno. As absorbâncias foram obtidas em leitor de Elisa a um comprimento de onda de 470 nm. As leituras foram obtidas em tempo zero e intervalos de 15 minutos até completar 120 minutos de reação. Os resultados foram mensurados por meio do cálculo de porcentagem de inibição, calculada em relação ao decaimento da absorbância do controle negativo ( $Abs_{CN}$ ), devendo ser menor que 0,2 para que se considere 100% de oxidação do ácido linoleico após 120 minutos de reação. A queda

da absorvância da amostra ( $Abs_{amostra}$ ) foi relacionada à queda da absorvância do controle negativo, obtendo-se a porcentagem de inibição da lipoperoxidação (%I), representada na fórmula abaixo. Foi avaliada a curva de oxidação entre o controle negativo, a amostra e o controle positivo rotina, utilizando o cálculo de tangente para encontrar os valores de F1 (capacidade de bloqueio da formação de peróxidos) entre 15 e 45 minutos após o início da reação e F2 (capacidade de inibir outras reações durante o processo oxidativo, que produzem espécies radicalares que aceleram a oxidação) entre 75 e 90 minutos após início da reação (ALMEIDA et al., 2006). O experimento foi realizado em triplicata.

$$Abs_{CN} = Abs_I - Abs_F$$

$$F1 = \frac{TgAbs_{amostra}}{Abs_{CN}}$$

$$Abs_{amostra} = Abs_I - Abs_F$$

$$F2 = \frac{TgAbs_{amostra}}{Abs_{CN}}$$

$$\%I = \frac{(Abs_{CN} - Abs_{amostra}) \times 100}{Abs_{CN}}$$

Sendo:

- $Abs_{CN}$ : Absorvância mensurada para o controle negativo;
- $Abs_{amostra}$ : Absorvância mensurada para a amostra;
- $Abs_I$ : Absorvância inicial;
- $Abs_F$ : Absorvância final;
- Tg: Tangente.

#### 4.1.4.2 Determinação da citotoxicidade do extrato das folhas de *C. arabica* L.

##### *Cultivo celular*

As células da linhagem L929 provenientes de fibroblastos de camundongo *Mus Musculus* foram mantidas em garrafas de cultura celular com meio *Dulbecco's modified Eagle médium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 1% de antibiótico penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 UI/mL). As garrafas contendo as células foram incubadas em estufa (Panasonic, COM-18ACL, EUA) a 37 °C em atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram semeadas na densidade de 5 x 10<sup>3</sup> células por garrafa e submetidas a transferência a cada 48 h em



fluxo laminar.

Para o experimento as células inicialmente foram tripsinizadas e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspense em 1 mL de meio DMEM. O número de células viáveis foi avaliado por meio do método de exclusão do Azul de Tripán. Foram escolhidas as culturas de células com ao menos 95% de viabilidade celular (FRESHNEY, 1987).

#### *Avaliação da Viabilidade celular*

Culturas de células L929 com alta viabilidade foram escolhidas e semeadas em 100 µL de meio DMEM a uma densidade de  $5 \times 10^3$  de células por poço em placa estéril de 96 poços e incubadas *overnight* a 37 °C em 5% CO<sub>2</sub>. A solução estoque de extrato de folhas de *C. arabica* L. foi preparada em diluições em série de 500, 250, 100, 50, 10 e 5 µg/ml em água ultrapurificada e posteriormente acrescentadas aos poços (n = 6). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h e 48 h. Após o tempo de incubação, os meios de culturas foram removidos e o MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} (10 µL; 5 mg/mL) foi adicionado, e as placas foram novamente incubadas por 4 h nas condições anteriores. Após esse período, a solução de MTT foi cuidadosamente removida e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado para solubilizar os cristais de formazan precipitados. A absorbância foi medida em espectrofotômetro Spectramax 190 (Molecular Devices, California, USA) em comprimento de onda 540 nm, após 24 h e 48 h de tratamento e analisados usando o Prism versão 6.00®. Para o controle positivo foi utilizado uma solução de DMSO 5%. O controle contendo apenas meio de cultura DMEM foi considerado como 100% de células viáveis e comparado aos tratamentos, sendo os resultados expressos em porcentagem. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a porcentagem de viabilidade celular foi calculada utilizando a equação:

$$\% Viabilidade = \frac{Abs_{amostra} \times 100}{Abs_{CN}}$$

Sendo:

- Abs<sub>amostra</sub>: Absorbância da amostra
- Abs<sub>CN</sub>: Absorbância do controle negativo

#### 4.1.4.3 Determinação da atividade antimicrobiana do extrato das folhas de *C. arabica* L.

##### *Concentração inibitória mínima*

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de folhas de *C. arabica* L. foi determinada por técnicas de microdiluição em caldo Mueller Hinton (MH) conforme descrito (CLSI, 2014). As linhagens *Staphylococcus aureus* (ATCC 25904), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 0016) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) foram cultivadas a 37 °C durante 24 h em caldo MH. A solução estoque de extrato de folhas de *C. arabica* L. foi diluída para a faixa de concentração de 4000 a 31,25 µg/mL. Dessa forma, 100 µL de caldo Mueller Hinton e 20 µL de 10<sup>8</sup> CFU/mL (de acordo com os padrões de turbidez de 0,05 McFarland) de suspensões bacterianas foram inoculadas em microplacas, e o teste foi realizado em um volume final de 200 µL. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Os experimentos foram realizados simultaneamente para os padrões de mangiferina e 5-ACQ (200–1,56 µg/mL), bem como para o controle positivo (ciprofloxacino; 200–1,56 µg/mL) (KUETE, 2017). A CIM foi definida com a menor diluição capaz de inibir o crescimento bacteriano detectado visualmente. O experimento foi realizado em duplicata.

##### *Concentração bactericida mínima*

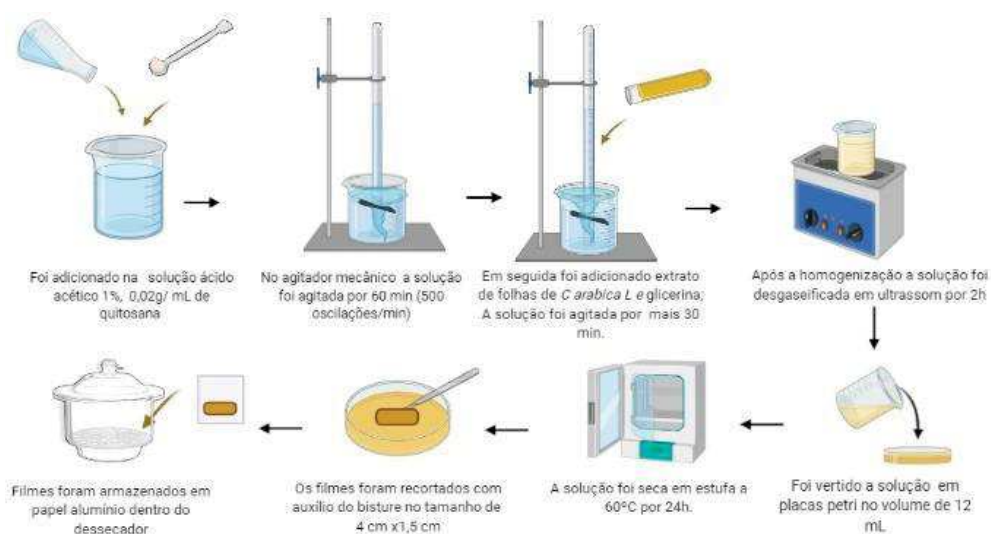
A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada por uma modificação do método de Spencer et al (2004). Amostras (10 µL) de cada poço que não apresentou crescimento visível no ensaio CIM foram inoculadas em placas petri contendo ágar MH recém preparadas, e incubadas a 37 °C por 24 h. A concentração bactericida mínima foi determinada considerando a menor concentração da amostra capaz de impedir o crescimento bacteriano visível quando repicado.

## 4.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE CAFÉ

### 4.2.1 Desenvolvimento dos filmes

Os filmes de quitosana foram obtidos pela técnica de evaporação de solvente segundo a metodologia de Escárcega et al., (2018), com algumas modificações. A solução precursora dos filmes foi constituída por uma solução de quitosana a 2% (p/v), preparada em ácido acético 1% (v/v). Essa solução foi agitada em agitador mecânico (Fisatom®) a 500 oscilações/min durante sessenta minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados o plastificante (glicerina 5%) e o extrato seco de folhas de *C. arabica* L. (em diferentes concentrações demonstrado na tabela 1) e a agitação prosseguiu por mais trinta minutos. As soluções resultantes foram degaseificadas utilizando banho ultrassônico (Unnique, modelo Ultracleaner 1400), por duas horas. Por fim, as soluções foram vertidas em placas petri (diâmetro de 9 cm) em volumes de 12 mL e secas a 60 °C em estufas (Tecnal, modelo TE-371) por 24 h. Após a secagem, os filmes foram recortados com auxílio de um bisturi em tamanhos fixos de 4 cm x 1,5 cm, embalados em papel alumínio e armazenados em um dessecador contendo sílica gel para as análises posteriores (Figura 10). A espessura média dos filmes foi de 0,01 mm.

Figura 10: Representação esquemática do desenvolvimento dos filmes.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Para fins de comparação, além dos filmes contendo o extrato de folhas de *C. arábica* L. foram preparados filmes brancos (sem adição do extrato). As concentrações das diferentes formulações estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Concentração dos constituintes das formulações nos filmes.

<b>Amostras</b>	<b>Quitossana (g/mL)</b>	<b>Glicerina (% v/v)</b>	<b>Conc. extrato na solução (mg/mL)</b>	<b>Conc. extrato no filme (mg/cm<sup>3</sup>)</b>
Q-SEFC	0,02	5	-	-
Q-EFC1	0,02	5	6,62	125
Q-EFC2	0,02	5	13,25	250
Q-EFC3	0,02	5	26,5	500

Q-SEFC: Filmes de quitossana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitossana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitossana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitossana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato. Espessura média do filme: 0,01 cm (determinado por análise micrométrica).

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

## **4.2.2 Caracterização físico-química dos constituintes da solução precursora dos filmes**

### *4.2.2.1 Determinação da Condutividade elétrica e Potencial Zeta (PZ).*

A medida do potencial zeta foi determinado a 25 °C, utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries da Malvern (modelo Nano-ZS90), por meio da 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)”, a um ângulo de espalhamento de luz a 173°. As amostras foram inseridas em uma cubeta capilar de polietileno acoplada a eletrodos. O valor final de potencial zeta foi calculado como a média de cinco medidas independentes com cinco contagens cada, e o tratamento dos dados executado com o auxílio do programa Microcal Origin 9.0® (LANNA et al., 2015).

### *4.2.2.2. Distribuição do tamanho de partícula por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)*

O tamanho dos agregados moleculares das soluções precursoras foi determinado por meio de um módulo fotométrico de medidas de espalhamento de luz

dinâmico (DLS) utilizando equipamento Zetasizer Nanoseries da Malvern (modelo Nano-ZS90), a 25 °C. As amostras foram inseridas em cubeta de polietileno de 1 cm de caminho óptico, padrão Malvern, e submetidas a um feixe de luz monocromático (Laser He-Ne de 4 mW e comprimento de onda de 633 nm), com intensidade de luz espalhada medida a um ângulo de 90°. Valores de diâmetro hidrodinâmico (Dh) foram determinados pela média de cinco medidas independentes, sendo cada uma delas obtida a partir da média de cinco contagens (LANNA et al., 2015). As medidas foram realizadas com amostras em diferentes concentrações e o tratamento dos dados foi executado com o auxílio do programa Microcal Origin 9.0®.

#### *4.2.2.3 Determinação dos parâmetros reológicos das soluções precursoras*

O comportamento reológico das soluções precursoras foi investigado por reologia estacionária em um reômetro automatizado DHR1 da T.A. Instruments. A avaliação do perfil newtoniano ou não newtoniano foi obtida por meio da avaliação de curvas de fluxo e de viscosidade, através de varredura da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, isotermicamente; e medindo-se a viscosidade em função da temperatura, isorrotacionalmente. Os experimentos de fluxo foram realizados utilizando geometria placa-placa, gap de 1000 µm, taxa de cisalhamento variando de 1 até 500 s<sup>-1</sup>, a 25 °C (controlado via placa peltier). Os experimentos em função da temperatura foram realizados varrendo-se ciclicamente a temperatura de 5 °C a 80 °C, numa taxa de cisalhamento constante de 5 s<sup>-1</sup> (LANNA et al., 2015).

### **4.2.3 Caracterização físico-química dos filmes**

#### *4.2.3.1 Determinação do peso médio*

A determinação do peso médio dos filmes foi realizada por meio da pesagem de dez amostras individuais de cada filme em balança eletrônica (Marte, modelo AUW220D). Os valores foram reportados com o valor médio ± desvio padrão (SHAH et al., 2019).

#### 4. 2.3.2 Determinação da espessura

As espessuras dos filmes foram medidas com a utilização de um micrômetro digital portátil (DGIMESS, modelo IP65) com 0,001 mm de precisão na faixa de 0–25 mm. As análises foram realizadas em triplicata avaliando quatro medições em pontos distintos para cada amostra de filme, e posteriormente a espessura foi reportado com o valor médio  $\pm$  desvio padrão (DEVI et al., 2017).

#### 4.2.3.3 Determinação das propriedades ópticas

A determinação das propriedades ópticas dos filmes foram realizados por meio da medição de cor e estimativa de opacidade. A análise instrumental do perfil colorimétrico dos filmes foi realizada utilizando o colorímetro (Chroma Meter, modelo CR-400/410). Uma placa de cor branca padrão ( $L = 97,39$ ;  $a = -0,33$ ;  $b = 3,54$ ) foi usada para calibração do equipamento e como background para as medidas de cor, com leitura direta da reflectância das coordenadas  $L^*$ ;  $a^*$  e  $b^*$ . A leitura de todas as amostras foi realizada em triplicata, analisando cinco medições de cada formulação, e posteriormente submetido ao cálculo da média aritmética (DEBONE et al., 2019). A partir dos dados das coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , foram determinados os parâmetros de croma ( $C^*$ ) e tonalidade ( $H^\circ$ ), conforme a equação abaixo:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \qquad H = \text{Tan}^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

A opacidade dos filmes foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Escárcega et al. (2018), com algumas modificações. As amostras dos filmes foram recortadas em formato retangular (4 cm x 1 cm), e posteriormente posicionadas no local da cubeta de modo perpendicular ao feixe de luz. Uma célula de teste vazia foi usada como a referência. A leitura de todas as amostras foi realizada em triplicata, no comprimento de onda de 600 nm no espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1800), e a opacidade, calculada conforme a equação abaixo:

$$\text{Opacidade} = \frac{-Abs_{600}}{E}$$

Sendo:

- Abs<sub>600</sub>: Absorção da amostra a 600 nm
- E: Espessura do filme em mm.

#### 4.2.3.4 Determinação da umidade

A porcentagem de umidade de todos os filmes foi determinada pelo método gravimétrico, de acordo com Shah et al (2019). Os filmes foram pesados em balança analítica ( $P_i$ ) (Marte, modelo AUW220D), e em seguida acondicionadas por 24 h em estufa Nova ética (modelo 440/4ND), com circulação forçada de ar a  $105 \pm 2$  °C. Após este período, os filmes foram novamente pesados, identificando sua massa final ( $P_f$ ). As análises foram realizadas em triplicata, e a porcentagem de umidade foi determinada pela equação abaixo:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(P_i - P_f) \times 100}{P_i}$$

Sendo:

- $P_i$ : Peso inicial dos filmes
- $P_f$ : Peso final dos filmes

#### 4.2.3.5 Determinação do grau de intumescimento e solubilidade

Para determinar o grau de intumescimento, os filmes foram armazenados por 24 h em dessecador contendo sílica, a fim de retirar a umidade presente nas amostras. Após esse período, os filmes foram pesados ( $P_0$ ) em balança analítica (Marte, modelo AUW220D) e, em seguida, submersos em fluido de ferida simulado (constituído por 0,68 g de NaCl, 0,22 g de KCl, 2,5 g de NaHCO<sub>3</sub> e 0,35 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 100 mL de água destilada a pH 7,4), durante 24 h à 37 °C. As amostras foram retiradas do fluido de ferida simulada com o auxílio de uma pinça, e depositada sob papel filtro por 1 minuto, com o intuito de retirar o excesso de água. As amostras foram pesadas novamente ( $P_i$ ) no tempo 1 h, 2 h, 3 h, 6 h e 24 h. A capacidade de intumescimento dos filmes foi determinada em triplicata por meio da equação abaixo (PANSARA et al., 2020).

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{P_I - P_0 \times 100}{P_0}$$

Sendo:

- $P_0$ : Peso inicial dos filmes
- $P_I$ : Peso dos filmes intumescidos

A fim de avaliar a solubilidade, os filmes, após o ensaio de intumescimento foram inseridos em estufas de secagem (Tecnal, modelo TE-371), a 60 °C por 24 h e posteriormente pesados (ESCÁRCEGA et al., 2018). Todas as análises foram realizadas em triplicata, e a solubilidade dos filmes foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Solubidade (\%)} = \frac{(P_0 - P_S) \times 100}{P_0}$$

Sendo:

- $P_0$ : Peso inicial dos filmes
- $P_S$ : Peso dos filmes após o processo de secagem

#### 4.2.3.6 *Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TGA)*

Para avaliação do perfil térmico dos filmes, em comparação com os precursores (pó de quitosana e extrato de folhas de *C. arabica* L.), foram obtidas curvas TGA/DTA das amostras. Os experimentos foram realizados em um analisador termogravimétrico simultâneo TGA/DTA, da marca HITACHI (modelo STA7200RV), com fluxo de ar de 300 mL/min, com razão de aquecimento de 30 °C/min, variando desde a temperatura ambiente até 1100 °C, com massa aproximada de 2 mg em cadinho de alumina (LANNA et al., 2015).

#### 4.2.3.7 *Espectroscopia eletrônica vibracional na Região do Infravermelho*

Para identificar possíveis interações intermoleculares entre os componentes do extrato de folhas de *C. arabica* L. com a quitosana foi realizado o ensaio de espectroscopia vibracional na região do infravermelho por meio de um Espectrofotômetro Perkin-Elmer (modelo Spectrum Two).



As amostras (filmes, quitosana em pó e extrato de folhas de *C. arabica* L.) foram analisadas utilizando o modo de Reflectância Total Atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos com média de 16 varreduras consecutivas, com resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$  e intervalo de onda de 4000 a 700  $\text{cm}^{-1}$ . Posteriormente, os dados foram exportados para o Microcal Origin 9.0<sup>®</sup> (LANNA et al., 2015).

#### *4.2.3.8 Caracterizações dos filmes por Análise Dinâmico Mecânica nos modos axial e rotacional*

O comportamento reológico dos filmes foi avaliado por meio de Análises Dinâmico Mecânicas, utilizando-se o reômetro automatizado DHR1 da T.A. Instruments acoplado ao acessório de DMA de fixação linear, à temperatura de 26 °C. Durante os ensaios de tração, os filmes foram fixados no acessório e submetidos a uma tração com velocidade constante de 25  $\mu\text{m/s}$ , até a ruptura. Para os experimentos no modo tangencial, os filmes foram fixados no acessório, com um gap de 3 cm e submetidos à rotação a uma velocidade angular de 1 rad/s.

Os experimentos foram realizados em triplicata, construindo um gráfico de tensão x gap (para o modo axial) ou tensão x ângulo (para o modo rotacional) para cada filme na presença e na ausência de extrato, para fins de comparação (ALTIOK et al., 2010). Inicialmente todos os dados foram manipulados usando o programa TRIOS e subsequentemente foram exportados para o Microcal Origin 9.0<sup>®</sup>.

#### *4.2.3.9 Determinação da liberação in vitro*

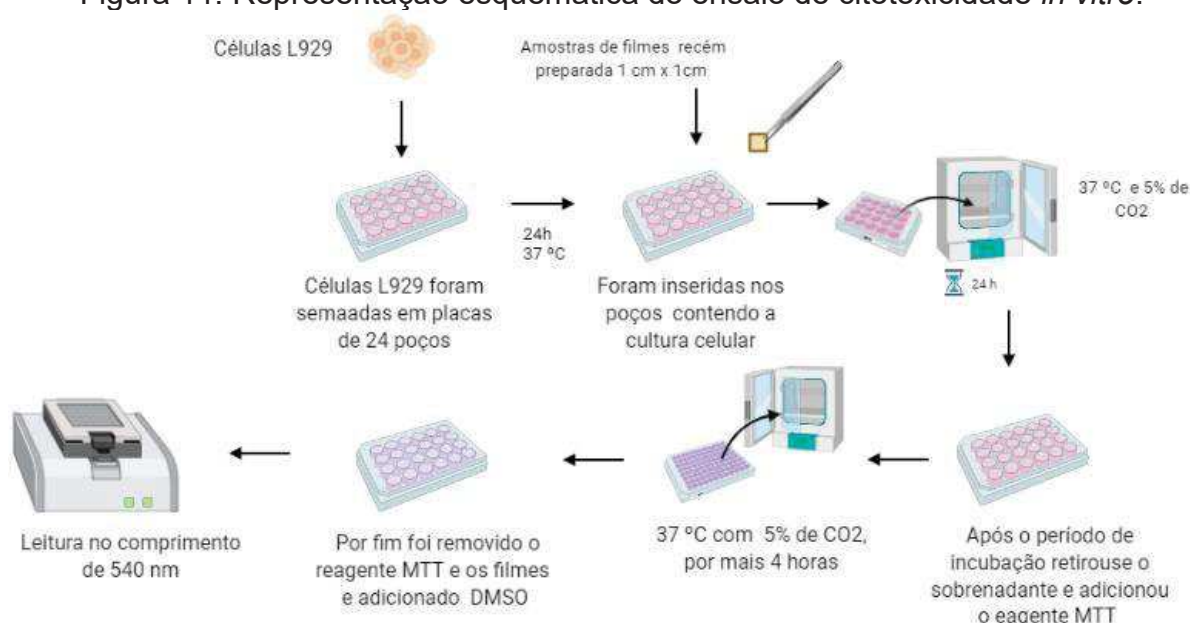
O estudo de liberação dos compostos 5-ACQ e mangiferina a partir dos filmes foi realizado inserindo parte dos filmes (tamanho de 1 cm x 1 cm) em frascos contendo 5 mL de solução salina. Os frascos foram mantidos em agitador orbital Shake (Glenlab, modelo CE 725/R) com agitação (200 rpm) a  $37 \pm 0,5$  ° C por um período de 24 h (CHEN et al., 2019). Em seguida, a porcentagem de liberação de 5-ACQ e mangiferina foi avaliada no meio extrator por meio da quantificação desses marcadores por CLAE, conforme descrito anteriormente (*item 4.1.3.2*).

## 4.2.4 Caracterização da atividade biológica dos filmes

### 4.2.4.1 Determinação da citotoxicidade *in vitro*

Células L929 foram semeadas a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placa de cultura contendo 24 poços com meio DMEM, sendo mantida à 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Posteriormente, e os filmes foram recortados no tamanho de 1 cm x 1 cm, adicionados aos poços (n = 4) e as placas foram novamente incubadas por 24 e 48 h. Após o período de incubação, os filmes foram retiradas com auxílio de uma pinça e a viabilidade celular foi avaliada de acordo com a metodologia descrita no item 4.1.4.2, conforme representado na Figura 11.

Figura 11: Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade *in vitro*.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

### 4.2.4.2 Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*

A atividade antimicrobiana dos filmes foi determinada, pelo método de difusão em ágar, segundo Santos et al., 2019, com algumas modificações.

Primeiramente, os filmes foram recortados no tamanho de 1 cm x 1 cm e inseridos em diferentes tubos de polipropileno contendo 5 mL de solução salina e o sistema foi mantido sob agitação constante (200 rpm) durante 24 h, a 37° C. Posteriormente, uma alíquota do líquido extrator foi utilizada para o ensaio de

atividade antimicrobiana.

As cepas empregadas neste estudo foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25904), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 0016) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) importantes na microbiota de feridas da pele. Esses micro-organismos foram repicados e incubados em ágar MH a 37 °C durante 24 h. Após esse período, as suspensões bacterianas foram transferidas, separadamente, para tubos contendo solução salina esterilizada para obter uma densidade óptica de 0,5 Mac Farland ( $10^8$  UFC/mL). Com o auxílio do swab foram inoculadas uniformemente sobre a superfície de uma placa Petri contendo meio de cultura MH. 50 µL das amostras foram inseridas em poços previamente preparados, e as amostras foram incubadas a 37 °C, por 24 h. O teste foi realizado em triplicata, tendo o disco do antimicrobiano ciprofloxacino como controle positivo. Após o tempo de incubação, foi determinado a zona de inibição, medindo-se o halo formado com o auxílio de uma régua graduada, conforme representado na Figura 12.

Figura 12: Representação esquemática do ensaio de halo de inibição microbiana.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

#### 4.2.4.3 Determinação da atividade cicatrizante *in vitro*

O ensaio de cicatrização *in vitro* simula a proliferação e migração de células durante a lesão da ferida. As células L929 foram semeadas a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL em placas de 24 poços e incubadas em meio DMEM, a 37 °C, e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a confluência das células, foi feita uma ranhura no centro de cada poço com o auxílio de uma ponteira estéril de 200 µL. Os poços foram lavados com PBS para remover os resíduos celulares que resultaram dos arranhões, e em seguida, as células foram tratadas com os filmes (Q-SEFC; Q-EFC1; Q-EFC2 e Q-EFC3)

recortados no tamanho de 1 cm x 1 cm (Figura 13). As imagens dos arranhões em cada poço foram capturadas em 0, 24 e 48 h após a incubação, utilizando uma câmera microscópica digital (AmScope MU1000) conectada a um microscópio invertido integrado (SOUBHAGYA et al., 2020). A espessura da área de risco foi medida e analisada utilizando o software ImageJ. A porcentagem de fechamento das ranhuras foi calculada utilizando a equação abaixo, descrita por Yue, et al, 2010:

$$\% \text{ Fechamento} = \frac{(A_{t=0h}) - A_{t=\Delta h}}{(A_{t=0h})} \times 100$$

Sendo:

- $A_{t=0h}$ : A medida da área da ranhura imediatamente após sua realização.
- $A_{t=\Delta h}$ : A medida da área da ranhura após 24 ou 48 h de incubação com as amostras.

Figura 13: Representação esquemática do ensaio de cicatrização *in vitro*.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para medir o grau de significância para  $p < 0,05$ , utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc).

## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DAS FOLHAS DE CAFÉ

#### 5.1.1 Rendimento do extrato

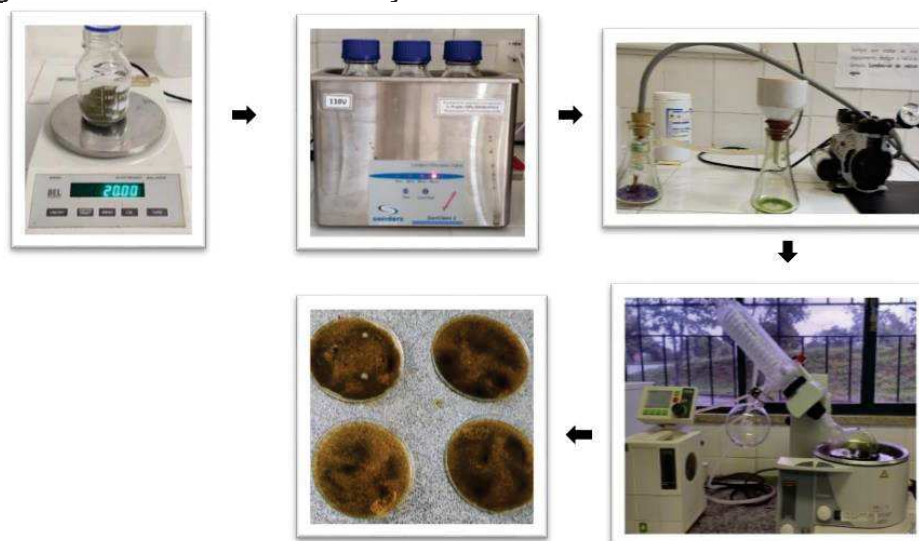
Ao final do processo de secagem e moagem, as folhas de *C. arabica* L. foram pesadas e obteve-se 336,3 g do material vegetal (Figura 14). Em seguida, após a extração pelo método de ultrassom em uma solução hidroalcoólica, e secagem do extrato em rotaevaporador e liofilizador (Figura 15), foram obtidos 38,7 g de extrato de folhas de *C. arabica* L., equivalente a um rendimento percentual de extração de 11,5 %.

Figura 14: Processo de obtenção do material vegetal.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

Figura 15: Processo de obtenção do extrato de folhas de *C. arabica* L.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

## 5.1.2 Caracterização química do extrato

### 5.1.2.1 Determinação dos compostos fenólicos

A análise de teor de fenólicos totais do extrato de folhas de *C. arabica* L. equivalentes em ácido tânico confirmou a presença dessas substâncias na composição do extrato. Os resultados demonstraram que cerca de 7,4% da composição total do extrato é representado por substâncias fenólicas ( $73,9 \pm 2,7$  mg/g EAT).

O resultado está de acordo a literatura acerca do processo de extração na obtenção de compostos fenólicos em soluções polares (DOMINGUES-JÚNIOR et al., 2012). Compostos fenólicos presentes em extratos, como ácido clorogênico e mangiferina, demonstram grande afinidade aos solventes etanol e água, sendo estes capazes de extraí-los (PANUSA et al., 2013; HUMARYANTO et al., 2019; SAHA et al., 2016).

Corroborando com o supracitado, Segheto e colaboradores (2018) confirmou a eficiência de extração dos compostos fenólicos de folhas de *C. arabica* L. em diferentes solventes obtendo variações de 1,7 a 20,6 g/100 g EAG de compostos fenólicos no extrato, sendo a fração de acetato de etila a que apresentou maior teor de compostos fenólicos totais.

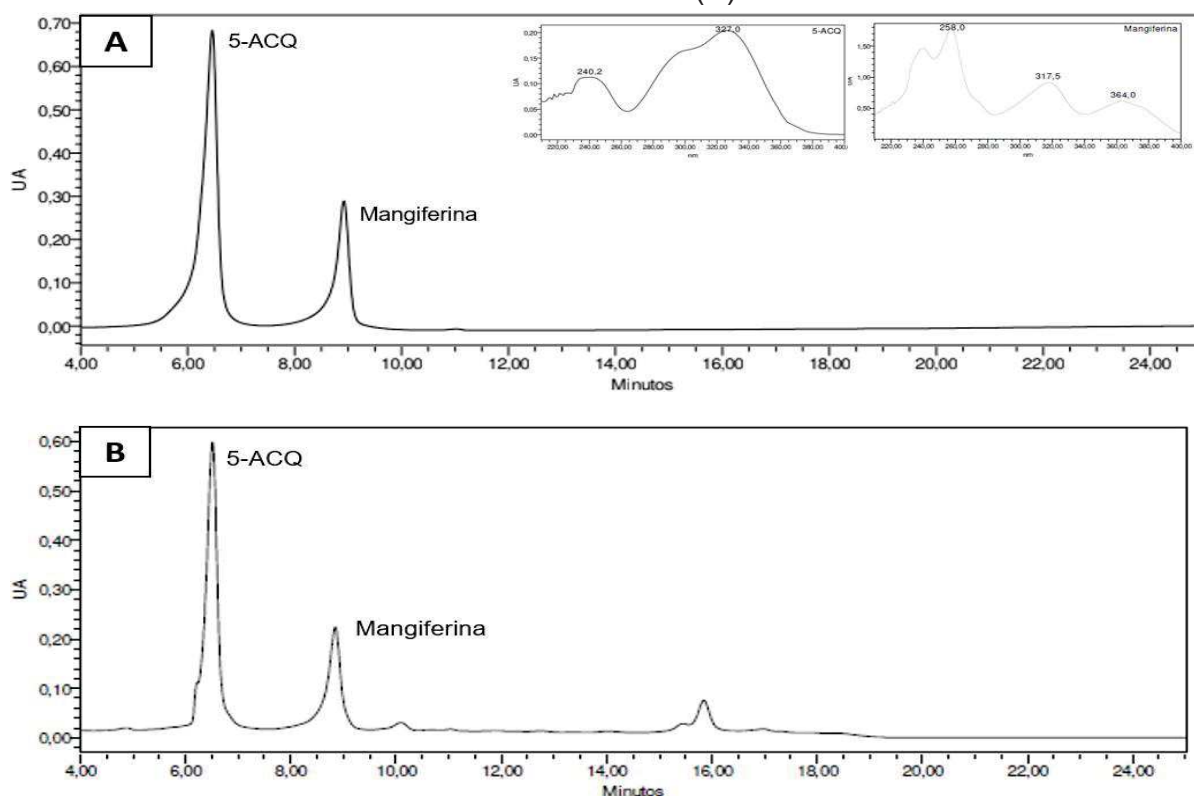
Os resultados obtidos no presente estudo apresenta-se próximo ao intervalo  $67,6 \pm 0,8$  mg/g EAT de compostos fenólicos, citado por Chen e colaboradores (2014), que avaliaram extratos de folhas de café jovens não fermentadas, bem como no estudo de extratos de folhas de *C. arabica* L. realizada por Acidri et al., (2020) com intervalo entre 65,1 a 71,5 mg/g EAT, variando de acordo com o estágio de desenvolvimento foliar. Constatou-se, portanto, que o extrato de folhas de *C. arabica* L. apresenta teores significativos desses compostos.

A investigação de substâncias fenólicas presentes nas folhas de café está constantemente associada a avaliação de mecanismos de defesa para fatores bióticos e abióticos (CAMARGO et al., 2010; CHEN, 2019). Logo, estudos associados ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos que utilizam extratos de folhas de café são pouco desenvolvidos.

### 5.1.2.2 Identificação e determinação dos teores de 5-ACQ e mangiferina

A identificação do ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) e mangiferina no extrato hidroalcoólico das folhas de *C. arabica* L. foi realizada por meio das análises cromatográficas, sendo confirmada pelo tempo de retenção das substâncias pelos cromatogramas e pelas sobreposições dos padrões de 5-ACQ e mangiferina. A Figura 16 demonstra os cromatogramas dos padrões e extrato de folhas de *C. arabica* L. no comprimento de onda de 330 nm, respectivamente.

Figura 16: Cromatograma dos padrões 5-ACQ e mangiferina (A) e extrato das folhas de *C. arabica* L (B).



Legenda: O ensaio foi realizado com a fase Estacionária composta por uma coluna C18 e fase movel em gradiente; Leitura no comprimento de onda de 330 nm. A- Cromatograma dos padrões 5-ACQ e mangiferina; B- Cromatograma do extrato das folhas de *C. arabica* L.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

Conforme os cromatogramas, torna-se perceptível que houve um aumento da área dos bandas após a coinjeção com os padrões de 5-ACQ e mangiferina. O tempo

de retenção (TR) dos padrões coincidiu com o tempo de retenção das amostras. Com relação ao padrão de 5-ACQ, o TR foi de 6,49 minutos. A amostra por sua vez, também apresentou resultado similares com o TR identificado em 6,51 minutos. Para o padrão de mangiferina obteve-se um TR de 8,81 minutos, resultado semelhante ao obtido pela amostra que exibiu o TR de 8,83 minutos.

Após a identificação dos compostos na amostra, os teores de 5-ACQ e mangiferina presente no extrato hidroalcoólico das folhas de *C. arabica* L. foram quantificados a partir das curvas de calibração dos respectivos padrões. Após a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, foram obtidas as equações da reta, sendo  $y = 91700x + 486000$ , com coeficiente de correlação  $R^2 = 0,999127$  para o 5-ACQ; e  $y = 49100x + 166000$ , com  $R^2 = 0,996055$  para a mangiferina, onde  $y$  corresponde o teor do compostos e  $x$  a área correspondente do banda da amostra. Diante dos dados, os teores de 5-ACQ e mangiferina presente no extrato das folhas de *C. arabica* L. foram de  $2,1 \pm 0,2$ g/100g de extrato e  $1,7 \pm 0,3$  g/100g de extrato, respectivamente.

A comparação quantitativa do teor de 5-AGC e mangiferina no extrato de folhas de café em diferentes estudos é uma análise desafiadora, uma vez que o processo de biossíntese dos metabólitos secundários depende das espécies, região de colheita, época da colheita, estágio de desenvolvimento foliar e condições ambientais em que estão inseridas (MONTEIRO et al., 2020). Adicionalmente, fatores como tempo de extração, temperatura e solvente podem obter maiores ou menores teores dos compostos bioativos (HUMARYANTO et al., 2019). Desse modo, foi abordado diferentes vertentes dos resultados já dispostos na literatura.

A variabilidade no teor de ambos compostos em relação as condições ambientais é ressaltada por Almeida et al. (2019) que ao analisarem o teor de 5-ACQ e mangiferina observaram variações no teor de acordo com a região brasileira, sendo Minas gerais a que demonstrou maiores teores. Com relação às espécies, Monteiro et al. (2020) observaram que o conteúdo de 5-ACQ em folhas jovens, variaram de 3,57 a 8,08 g/100g de matéria seca entre as espécies *C. arabica*, *C. eugenioides*, *C. canephora* e *C. racemosa*, sendo as duas primeiras espécies as que apresentaram maiores teores do 5-ACQ.

Outro fator determinante no teor de ambas substâncias presentes nas folhas de café é o estágio de desenvolvimento foliar. Acidri e colaboradores (2020), observaram que o teor de 5-ACQ, trigonelina e mangiferina foi superior em folhas



jovens (0,39; 0,067 e 0,009 g/100g, respectivamente) quando comparada as folhas maduras (0,248; 0,047 e 0,006 g/100g, respectivamente). Corroborando com o mesmo contexto, Trevisan et al. (2016) também evidenciaram que a concentração de mangiferina nos extratos de metanol em folhas de café variaram de 0,048 a 0,417 g/100g, sendo superiores em folhas jovens e obtidas de árvores crescendo em plantações sob incidência de luz solar.

Por fim, Segheto e colaboradores (2018), reitera que o teor de 5-ACQ e mangiferina alteram de acordo com o solvente utilizado na extração e frações, apresentando valores que variaram de 2,3 a 5,5 g/100g de 5-ACQ no extrato e 1,5 a 4,0 g/100g de mangiferina no extrato, resultados próximos ao disposto trabalho.

### **5.1.3 Caracterização das atividades biológicas do extrato**

#### *5.1.3.1 Determinação da atividade antioxidante do extrato das folhas de *C. arabica* L.*

O DPPH é caracterizado como um radical orgânico estável que apresenta um átomo de nitrogênio em sua estrutura, contendo uma coloração púrpura e absorção máxima na faixa de 515-520 nm. Na presença de uma substância doadora de hidrogênio, o radical orgânico é reduzido para a coloração amarela, e com isso a intensidade de sua absorção diminui (ALMEIDA et al., 2006).

No ensaio de DPPH• do presente estudo, os resultados foram expressos em  $Cl_{50}$  (Tabela 2). Dessa forma, quanto maior o consumo de DPPH• pela amostra, maior é a capacidade antioxidante, e menor é o  $Cl_{50}$ . Neste ensaio, o extrato das folhas de *C. arabica* L. apresentou  $Cl_{50}$  de  $13,5 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ . As análises estatísticas revelaram diferença significativa do valor de  $Cl_{50}$  encontrado entre o extrato das folhas de *C. arabica* L. e o controle positivo rutina ( $p < 0,05$ ).

O ensaio do complexo fosfomolibdênio é determinado por meio da capacidade da substância antioxidante formar um complexo verde caracterizado pela redução do complexo fosfomolibdênio (ORHAN et. al., 2006; MALAFRONTTE et al., 2009). Os resultados encontrados na atividade antioxidante de extrato das folhas de *C. arabica* L. nesse ensaio (Tabela 2), foi avaliada em relação à semelhança de atividade antioxidante relativa (AAR%) da quercetina e rutina (controles positivos), sendo o resultado expresso em porcentagem relativa de cada substância. Dessa forma, o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. arabica* L. apresentou atividade antioxidante

relevante ( $54,8 \pm 1,9$  de AAR% a rutina) quando comparada à rutina e um menor efeito antioxidante quando comparada com a quercetina ( $17,1 \pm 0,6$  de AAR% a quercetina).

Tabela 2: Avaliação da atividade antioxidante de extrato hidroalcoólico das folhas de *C. arabica* L. frente aos métodos de DPPH, redução do complexo fosfomolibdênio e inibição do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

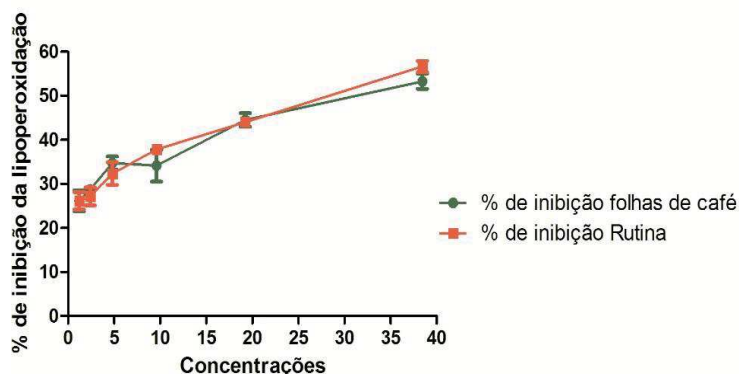
Amostras	DPPH -		CAT		$\beta$ -caroteno/ácido linoleico (38,46 $\mu\text{g/mL}$ )	
	CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	AAR% quercetina	AAR% rutina	Inibição (%)	F1	F2
Extrato de <i>C. arabica</i> L.	$13,5 \pm 1,1$ <sup>a</sup>	$17,1 \pm 0,6$ <sup>b</sup>	$54,8 \pm 1,9$ <sup>b</sup>	$53,3 \pm 2,9$	$0,4 \pm 0,0$ <sup>c</sup>	$0,6 \pm 0,2$
Rutina	$0,5 \pm 0,3$	---	---	$56,7 \pm 2,2$	$0,1 \pm 0,0$	$1,3 \pm 0,4$

CI<sub>50</sub>, concentração inibitória de 50%. **a**, indica que houve diferença estatística entre os valores de CI50 para extrato hidroalcoólico das folhas de *C. arabica* L. e o controle positivo rutina. **b**, indica diferença estatística em relação aos controles positivos rutina e quercetina. **c**, indica diferença estatística entre extrato das folhas de *C. arabica* L. e rutina em relação ao bloqueio de radicais livres formados na primeira fase da lipoperoxidação (F1). Resultados expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão  
Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Por fim no ensaio  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, a oxidação do ácido linoleico, proveniente da remoção de átomos de hidrogênio de seu grupo metileno origina os radicais livres. Esses radicais livres promovem a oxidação do  $\beta$ -caroteno, ocasionando descoloração do meio. Contudo, quando ambos estão inseridos em um meio contendo substâncias antioxidantes ocorre a conservação da coloração alaranjada do  $\beta$ -caroteno, devido à capacidade de neutralizar tais radicais livres (HATAMI et al., 2014).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo é observado pela curva de decaimento, na qual é mostrada a conservação da absorbância do  $\beta$ -caroteno quando tratado com o extrato de folhas de *C. arabica* L e o controle rutina. Os resultados da porcentagem de inibição de extrato das folhas de *C. arabica* L. e de rutina na maior concentração utilizada, 38,5  $\mu\text{g/mL}$ , junto também da sua eficiência antioxidante (F1 e F2) estão disponibilizados na Tabela 2 e Figuras 17 e 18.

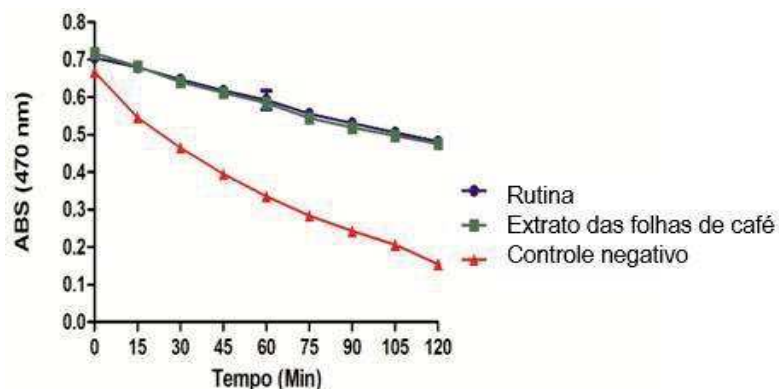
Figura 17: Porcentagem de inibição da lipoperoxidação das concentrações de 38,5 a 1,2  $\mu\text{g/mL}$  do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. arabica* L. e do controle positivo rutina.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Os resultados demonstram que o extrato das folhas de *C. arabica* L. apresentou uma porcentagem de inibição da oxidação do ácido linoleico promissora, ao inibir cerca de  $53,3 \pm 2,9$  % da peroxidação deste ácido graxo, sendo considerado estatisticamente semelhante ao controle positivo rutina ( $p > 0,05$ ). Os valores de F2 também foram considerados estatisticamente semelhantes, quando comparado o extrato das folhas de *C. arabica* L. e rutina. A Figura 18 demonstra o potencial antioxidante do extrato das folhas de *C. arabica* L., ao preservar a coloração do  $\beta$ -caroteno no comprimento de onda de 470nm ao longo do tempo de 120 minutos ( $p > 0,05$ ).

Figura 18: Perfil de decaimento da absorvância do  $\beta$ -caroteno (Curva de oxidação) nas concentrações de 38,5 a 1,2  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato das folhas de *C. arabica* L., controle positivo rutina e controle negativo contendo a emulsão e o metanol.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Os ensaios antioxidantes descritos elucidaram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. arabica* L. apresenta uma promissora atividade antioxidante, uma vez que obteve um IC<sub>50</sub>  $13,5 \pm 1,1$  µg/mL para o sequestro do radical DPPH, bem como uma inibição de peroxidação lipídica  $53,3 \pm 2,9\%$ . Estudos anteriores já evidenciaram as propriedades antioxidantes nas folhas de café, utilizando o teste do sequestro do radical DPPH e co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico, encontrando valores que variaram entre  $7,4 \pm 0,1$  a  $122,7 \pm 1,4$  µg/mL e  $32,9 \pm 0,5$  a  $52,5 \pm 0,5\%$  respectivamente. Neste caso as frações que utilizaram solventes polares foram as que apresentaram maiores atividades antioxidantes (SEGHETO et al., 2018).

Acidri e colaboradores (2020) estudaram a composição química e a capacidade antioxidante de distintas partes do cafeeiro como sementes, folhas, caules e raízes, bem como em distintos estágios de desenvolvimento. Neste caso, observou-se que as folhas de café foram as que apresentaram maior atividade antioxidante, e embora não existisse diferença significativa entre os estágios de desenvolvimento das folhas, houve uma diminuição consistente das capacidades antioxidantes induzidas pela senescência das mesmas.

As espécies reativas de oxigênio são uma forma de radicais livres proveniente do metabolismo celular e reativo a organismos invasores. Durante a cicatrização eles são importantes mediadores no processo de sinalização celular e inflamação, promovendo atividades quimiotáticas de fatores de crescimento e induzindo indiretamente a metalopeptidase na matriz extracelulares. Contudo, embora esse mecanismo seja fisiológica, uma produção excessiva de ERO, causada por fatores diversos, pode ocasionar danos prejudicial aos tecidos (FITZMAURICE et al., 2011).

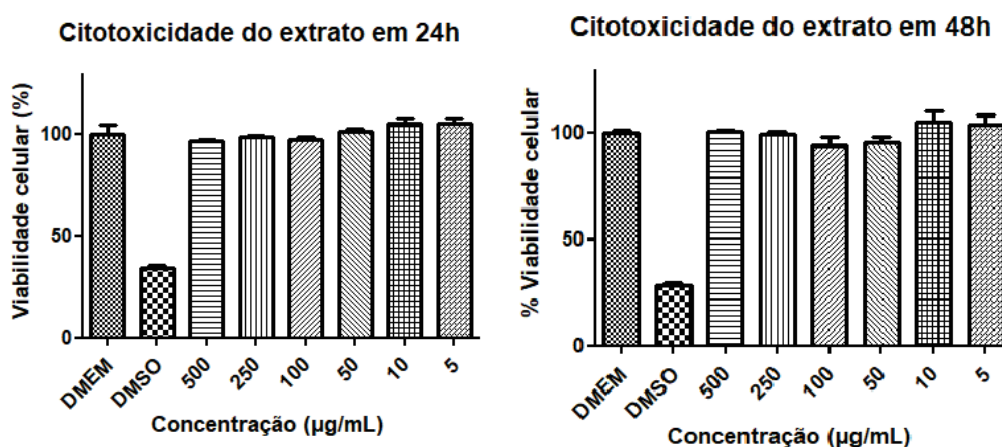
O estresse oxidativo pode comprometer o processo de cicatrização por danos nas membranas celulares, ácidos nucléicos e proteínas. Adicionalmente, ainda pode desencadear a morte de fibroblastos. Dessa forma, compostos antioxidantes são importantes mediadores na regulação dos danos celulares promovidos por ERO, reduzindo os efeitos adversos das feridas provenientes do processo inflamatório (FITZMAURICE et al., 2011; SÜNTAR et al., 2012).

### 5.1.3.2 Determinação da citotoxicidade do extrato das folhas de *C. arabica* L.

A fim de analisar a segurança do uso tópico do extrato das folhas de *C. arabica* L. visando o tratamento das feridas, o perfil citotóxico do mesmo frente à linhagem de

fibroblastos foi avaliado por meio do ensaio do sal de tetrazólio (MTT) (COLOBATU et al., 2019). Esse método colorimétrico consiste na quantificação da formação de cristais de formazan, em consequência da redução do anel tetrazolio do MTT, pela ação das enzimas succinato desidrogenase, presentes nas mitocôndrias. Dessa forma, os cristais de formazan originado quando solubilizados com DMSO, formam uma solução púrpura a qual é quantificada em espectrofotômetro. Portanto, a viabilidade celular é proporcional à formação dos cristais de formazan (LOBNER, 2000; PATEL et al., 2018). Os dados de viabilidade celular do extrato das folhas de *C. arabica* L. em diluições de 500, 250, 100, 50, 10 e 5 µg/mL, bem como dos controles meio DMEM e DMSO 5% estão apresentados na Figura 19.

Figura 19: Avaliação da citotoxicidade do extrato de folhas de *C. arabica* L. frente à linhagem celular L929 após 24h e 48h de exposição.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

De acordo com a norma ISO 10993-5: 2009, a viabilidade celular acima de 70% é considerada não citotóxica para as células. Por outro lado, existem relatos de que, para um produto químico ser considerado irritante para a epiderme humana, a viabilidade celular mensurada pelo ensaio do MTT deve ser menor ou igual a 50% (MARQUES et al., 2017; OECD, 2010).

Durante a exposição do extrato no período de 24h as amostras nas concentrações de 500, 250, 100, 50, 10 e 5 µg/mL apresentaram viabilidades celulares de 108,6%, 98,5%, 97,5%, 101,1%, 104,8%, 104,9%, respectivamente. Nesse caso, não houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações e o grupo controle ( $p > 0,05$ ). Em contraste, o DMSO 5% reduziu a viabilidade celular

para 34,5%. Para a exposição de 48h, nas concentrações de 500, 250, 100, 50, 10 e 5 µg/ mL do extrato de folhas de *C. arabica* L. e DMSO 5% as viabilidades celulares foram 100,7%, 99,9%, 94,3%, 105,0%, 103,9%, 104,9%, e 28,6%, respectivamente, não havendo diferença significativa entre as concentrações do extrato e o grupo controle (meio DMEM) ( $p > 0,05$ ).

Portanto, com base nos resultados obtidos, o extrato de folhas de *C. arabica* L. não apresentou potencial citotóxico em nenhuma das concentrações testadas, independentemente do tempo de exposição à linhagem celular de fibroblastos. Esses dados indicam uma possível segurança em relação à utilização tópica do mesmo.

### 5.1.3.3 Determinação da atividade antimicrobiana do extrato das folhas de *C. arabica* L.

A concentração inibitória mínima (CIM) visa avaliar a concentração de antimicrobiano necessária para inibir o crescimento bacteriano. Dessa forma, quanto mais baixo o valor de MIC, mais susceptível o micro-organismo ao tratamento (CLSI, 2014). As concentrações inibitórias mínimas do extrato de folhas de *C. arabica* L., ciprofloxacino (controle positivo), mangiferina e 5-ACQ foram determinadas e os valores encontram-se dispostos na Tabela 3.

Tabela 3: Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) do extrato das folhas de *C. arabica* L., ciprofloxacino, mangiferina e 5-ACQ.

	CIM (µg/mL)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Extrato de folhas de <i>C. arabica</i> L.	500	1000	4000
5-ACQ	>200	>200	>200
Mangiferina	3,12	3,12	200
Ciprofloxacino	1,56	1,56	3,12

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Considera-se, com base no resultado exposto, que a mangiferina apresentou resultados antimicrobianos relevantes bem próximos ao controle positivo

ciprofloxacino para as linhagens de bactérias Gram-positivas testadas. A atividade antimicrobiana relativa a mangiferina está de acordo com dados na literatura, no qual evidencia-se que a mangiferina pode atuar contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pumilus* e *Salmonella typhi* (KIM et al., 2006; HANNAN et al., 2013; MAZLAN et al., 2019). Além disso, a mangiferina demonstra potencial antimicrobiano contra *Enterococci* e *Mycobacterium tuberculosis*, bem como efeitos antifúngicos contra *Trichoderma reesei*, *Aspergillus flavus* e *Thermoascus aurantiacus* (XIAO et al., 2008; WAUTHOZ et al., 2007).

No presente estudo, o 5-ACQ não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas, com valor de CIM superior a 200 µg/mL. Esse resultado corrobora com o estudo de Bajko et al. (2016) os quais evidenciaram presença de atividade antimicrobiana para esse composto somente em concentrações mais elevadas (CIM de 10 mg/mL) contra *S. aureus*, *E. faecium*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

Simões e colaboradores (2009) ressaltam que os extratos são classificados como antimicrobianos quando a concentração inibitória mínima encontra-se abaixo de 1000 µg/mL e os compostos puros quando os valores são inferiores a 10 µg/mL. Adicionalmente, Aligiannis et al. (2001) propõem uma classificação para extratos com base nos testes de suscetibilidade da seguinte forma: inibidores fortes - CIM até 500 µg/mL; inibidores moderados - CIM entre 600 e 1500 µg/mL; inibidores fracos - CIM acima de 1600 µg/mL. De acordo com essa classificação, o extrato de folhas de *C. arabica* L demonstra potencial antimicrobiano para bactérias Gram-positivas, uma vez que pode ser classificado como inibidores fortes para *S. aureus* e moderado para *S. epidermidis*.

A atividade antimicrobiana pode ser atribuída ao sinergismo dos compostos bioativos presentes nas folhas de *C. arabica* L., uma vez que as plantas apresentam uma variedade de substâncias relacionados a mecanismos de defesa, incluindo atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de micro-organismos (SIMÕES et al., 2009). Assim, no caso do extrato em estudo, é possível inferir que a mangiferina, por ter apresentado CIM abaixo de 10 µg/mL contra as bactérias Gram-positivas, possa, juntamente com outros compostos, ter contribuído para a atividade antimicrobiana.

Com relação à atividade antimicrobiana frente as bactérias Gram-negativas os extratos vegetais normalmente são menos suscetíveis devido as paredes celulares

atuarem como uma barreira permeável, limitando a penetração de moléculas, o que retarda a difusão interna de substâncias (SIMÕES et al., 2009). Esse dado pode justificar a classificação do extrato de folhas de *C. arabica* L. como inibidores fracos frente à *P. aeruginosa*.

Estudos realizados com grãos de café torrado e resíduos de extratos de café também evidenciaram que para as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*) foram necessárias quantidades menores de extratos de café para inibir o crescimento bacteriano (MONENTE et al., 2015). Do mesmo modo, pesquisas relacionadas à atividade antimicrobiana do extrato de grãos de *C. arabica* L., também demonstraram que bactérias Gram-positivas apresentaram maior suscetibilidade aos extratos em relação às Gram-negativas, sendo o extrato eficaz contra o crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis*, com valores de CIM de 2 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente (RUNTI et al., 2015).

A partir da concentração inibitória mínima foi determinada a concentração bactericida mínima do extrato, ciprofloxacino, mangiferina e 5-ACQ, com o objetivo de analisar se os compostos apresentavam atividade bactericida ou bacteriostática. Os resultados estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4: Concentração bactericida mínima (CBM) do extrato das folhas de *C. arabica* L., ciprofloxacino, mangiferina e 5-ACQ.

	CBIM (µg/mL)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Extrato de folhas de <i>C. arabica</i> L	500	> 4000	> 4000
5-ACQ	> 200	> 200	> 200
Mangiferina	6,25	12,5	> 200
Ciprofloxacino	1,56	1,56	> 12,5

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Com base nos dados obtidos, observa-se que o extrato apresentou concentração bactericida de 500 µg/mL para *S. aureus*. Com relação ao *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, não foi possível estabelecer a concentração bactericida do extrato,



demonstrando apenas o efeito bacteriostático.

Com relação ao padrão 5-ACQ não foi possível estabelecer a concentração bactericida/bacteriostática mínima, uma vez que o valor de CIM é superior a 200 µg/mL para todos os micro-organismos testado. Em contraste, para a mangiferina foi possível estabelecer o efeito bactericida para o *S. aureus* e *S. epidermidis* na concentração de 6,25 e 12,5 µg/mL, respectivamente e apenas efeito bacteriostático para *P. aeruginosa*.

Dessa forma, este estudo revelou resultados promissores da atividade antimicrobiana do extrato de folhas de café frente a bactérias Gram-positivas. O sinergismo de compostos bioativos presentes nas folhas de café pode ser, pelo menos em parte, responsáveis pela atividade antimicrobiana relatada neste estudo.

Com base na promissora atividade antimicrobiana e considerando relatos que os constituintes dos extratos de folhas de *C. arabica* L., sobretudo a mangiferina e o 5-ACQ apresentarem atividade cicatrizante (BAGDAS et al., 2014; ALLAW et al., 2020; LWIN et al., 2021), foi proposto avaliar a incorporação do extrato de folhas de *C. arabica* L. em filmes de quitosana visando a obtenção de um produto para cicatrização de feridas cutâneas.

## 5.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA CONTENDO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE CAFÉ

Filmes à base de quitosana vêm sendo amplamente investigados para o desenvolvimento de curativos bioativos (LI et al., 2019). Tais filmes podem ser obtidos por processos simples e de baixo custo, além de apresentarem a capacidade de acelerar a proliferação celular, bem como demonstraram atividade antimicrobiana (ESCÁRCEGA et al., 2018). Nesse sentido, esse polímero foi escolhido para a incorporação do extrato de folhas de café com vistas a uma possível associação de efeitos biológicos, objetivando um maior potencial para o tratamento de feridas.

Diversas metodologias podem ser empregadas para o preparo dos filmes poliméricos, tais como *Hot Melt Extrusion*, impressão 3D e evaporação de solvente. No entanto, o método de evaporação do solvente apresenta as vantagens de dispensar equipamentos específicos e de alto custo, além de permitir condições mais brandas para o preparo dos filmes (FERNANDES, 2017). Dessa forma, foi o método empregado para a preparação dos filmes em estudo. Para o desenvolvimento da

formulação, além do polímero e do extrato de folhas de *C. arabica* L., a glicerina foi selecionada devido às suas propriedades plastificantes (RAMBABU et al., 2019) visando ao aumento da flexibilidade dos filmes.

Com o objetivo de um melhor entendimento das interações entre os constituintes da formulação, primeiramente foi investigado as características da solução precursoras dos filmes. Em seguida, após o processo de secagem e obtenção dos filmes, os mesmos foram caracterizados do ponto de vista físico-químico e biológico *in vitro*. Os resultados estão descritos a seguir.

### **5.2.1 Caracterização físico-química das soluções precursoras**

As composições líquidas precursoras dos filmes elaborados, formadas pelos componentes em solução aquosa (antes da secagem para obtenção dos filmes), foram caracterizadas sob o ponto de vista coloidal e reológico, com o objetivo de investigar as interações entre as espécies químicas, desde a etapa de mistura.

É válido salientar que a quitosana é um polímero catiônico, capaz de sofrer agregação em meio aquoso, especialmente na presença de espécies aniônicas. Por exemplo, Carvalho et al. (2019) demonstraram que a quitosana, na presença de tripolifosfato de sódio (TPP), pode sofrer diferentes níveis de agregação, desde a formação de agregados discretos até uma rede tridimensional emaranhada, dependendo das concentrações relativas entre quitosana/TPP. Observaram também que o diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta, e viscosidade são fortemente dependentes das concentrações relativas entre as espécies.

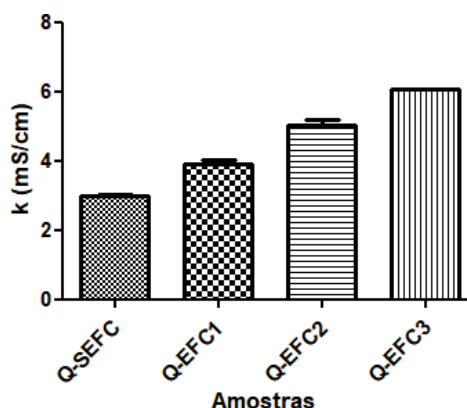
Dessa forma, no presente trabalho foram utilizadas técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas, velocimetria doppler com análise de fase para medida de potencial zeta, condutimetria para determinação da condutividade elétrica e reologia estacionária para determinação da viscosidade ( $\eta$ ).

#### **5.2.1.1 Caracterização da condutividade elétrica, potencial zeta (PZ) e DLS.**

A análise de condutividade elétrica em solução se fundamenta em avaliar a capacidade de um determinado líquido conduzir corrente elétrica em decorrência da presença de íons, sendo proporcional à concentração de íons livres em solução

(OHLWELLER, 1981). A Figura 20 demonstra os valores de condutividade elétrica para as soluções precursoras dos filmes.

Figura 20: Valores de condutividade elétrica para as amostras precursoras, a 25 °C, nas concentrações de 6,62 mg/mL, 13,25 mg/mL e 26,5 mg/mL de extrato de folhas de *C. arabica* L.



Q-SEFC: Solução do filme de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Solução do filme de quitosana com 6,62 mg/mL de extrato; Q-EFC2: Solução do filme de quitosana com 13,25 mg/mL de extrato; Q-EFC3: Solução do filme de quitosana com 26,5 mg/mL de extrato.

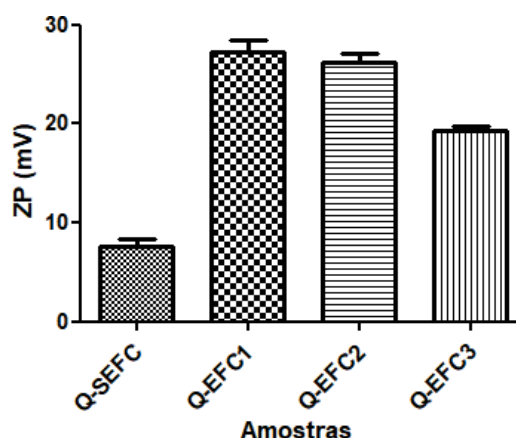
Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Os dados de condutividade demonstram que a solução de quitosana pura em ácido acético 1% é uma solução eletrolítica, pois apresenta condutividade elétrica em torno de 3 mS/cm. Na presença de extrato, é possível evidenciar que a condutividade elétrica aumenta gradativamente e de forma linear, indicando que o extrato deve ser composto por espécies ionizáveis, ou ainda, compostos inorgânicos solúveis. Como se sabe que o extrato é rico em ácido clorogênico parte da condutividade elétrica pode ser associada à presença desse composto.

A análise de potencial zeta é de suma importância para avaliar informações sobre a magnitude da carga superficial de uma partícula e, portanto, sobre a estabilidade da partícula em um meio contínuo (KIM et al., 2019).

A análise se fundamenta na medida da frequência da oscilação da luz espalhada na presença de um campo elétrico alternado, medida por um contador de fótons situado num ângulo de 173°. Nesse contexto, o campo elétrico alternado cria um fenômeno de microeletroforese, ocorrendo a migração das partículas na cubeta. Quanto maior a carga elétrica das partículas, maior será a frequência de oscilação das partículas na presença do campo elétrico alternado gerado pela diferença de potencial alternada (DDP) e maior será o potencial zeta do composto. O potencial zeta das soluções precursoras dos filmes são apresentados na Figura 21.

Figura 21: Valores de Potencial Zeta para as amostras precursoras, a 25 °C, nas concentrações de 6,62 mg/mL, 13,25 mg/mL e 26,5 mg/mL de extrato de folhas de *C. arabica L.*



Q-SEFC: Solução do filme de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Solução do filme de quitosana com 6,62 mg/mL de extrato; Q-EFC2: Solução do filme de quitosana com 13,25 mg/mL de extrato; Q-EFC3: Solução do filme de quitosana com 26,5 mg/mL de extrato.

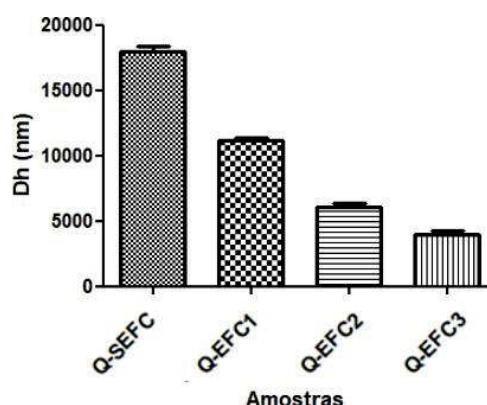
Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Como observado, as moléculas de quitosana exibiram valores de potencial zeta positivo, atribuído à presença de seu agrupamento amino (CARVALHO et al., 2019; PRATEEPCHANACHAI et al., 2017). Adicionalmente, pode ser analisado que os componentes do extrato de folhas de café intensificaram os valores de potencial zeta da quitosana, provavelmente, deslocando o equilíbrio de ionização e por consumir ânions na superfície da macromolécula. Entretanto, observa-se que, após determinada adição de extrato, os valores de PZ diminuem. Tal redução pode ser associada à neutralização das moléculas de quitosana em decorrência da presença de espécies aniônicas no extrato, como ácido clorogênico e compostos inorgânicos.

Acredita-se que este comportamento, em que o potencial zeta aumenta e volta a diminuir, seja devido ao fato de que na solução de quitosana pura, as macromoléculas encontram-se estiradas, com máxima capacidade de estabelecimento de interações intermoleculares, formando uma rede tridimensional de interações. Mediante adição de extrato, os componentes promovem neutralização parcial das macromoléculas, gerando agregados discretos, que se comportam de maneira diferente do emaranhado macromolecular. Tais agregados, ao interagirem com concentrações gradativamente maiores de componentes aniônicos do extrato, sofrem redução de potencial zeta por neutralização das superfícies (CARVALHO et al., 2019).

O diâmetro hidrodinâmico caracteriza-se como uma medida de tamanho para caracterizar espécies nanométricas em suspensão. No presente estudo, essa técnica foi utilizada para descrever o tamanho das estruturas presentes nas soluções precursoras dos filmes na presença e ausência do extrato das folhas de *C. arabica* L. A Figura 22 representa os valores de Dh das soluções precursoras.

Figura 22: Valores de diâmetro hidrodinâmico para as amostras precursoras, a 25 °C, nas concentrações de 6,62 mg/mL, 13,25 mg/mL e 26,5 mg/mL de extrato de folhas de *C. arabica* L.



Q-SEFC: Solução do filme de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Solução do filme de quitosana com 6,62 mg/mL de extrato; Q-EFC2: Solução do filme de quitosana com 13,25 mg/mL de extrato; Q-EFC3: Solução do filme de quitosana com 26,5 mg/mL de extrato.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

É importante reforçar que, moléculas de quitosana sofrem associação espontânea em solução, formando emaranhados moleculares discretos ou contínuos (rede tridimensional), a depender da concentração (CARVALHO et al., 2019).

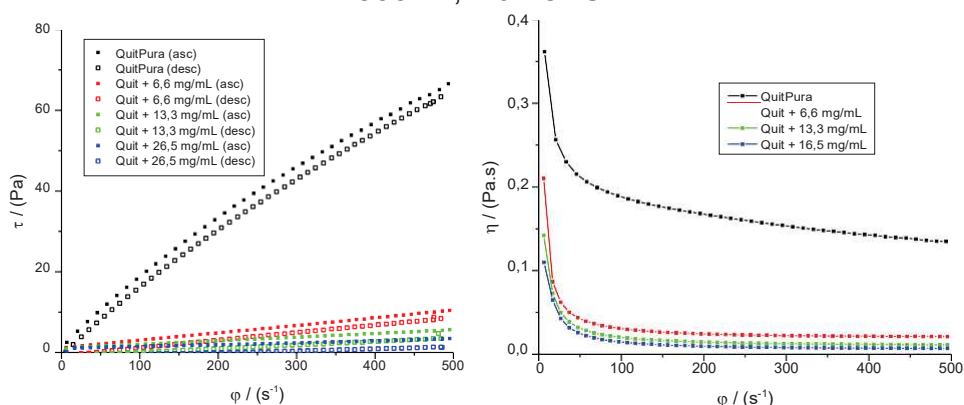
A adição de extrato à quitosana, como citado, leva a uma série de efeitos iônicos tanto no meio líquido quanto na superfície das partículas. O resultado de uma maior condutividade elétrica no meio, é a redução do tamanho das macromoléculas, que se correlaciona melhor com os valores de condutividade elétrica do que de potencial zeta, sugerindo que o meio se torna mais hidrofílico e menos propenso à formação de agregados.

#### 5.2.1.2 Caracterização reológica das soluções precursoras dos filmes.

A reologia é a ciência que se dedica ao estudo das propriedades de fluxo e deformação da matéria como um todo. No presente trabalho, as soluções precursoras

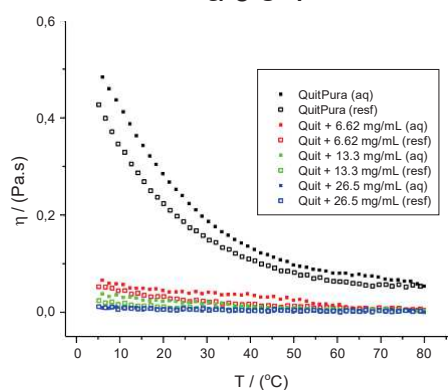
das amostras de filmes foram submetidas a ensaios reológicos com o objetivo de se obter o perfil de fluxo, bem como analisar o efeito dos componentes nas interações intermoleculares. As Figuras 23 e 24 demonstram as curvas de fluxo e viscosidade, bem como a curva de viscosidade em função da temperatura, para as soluções precursoras.

Figura 23: Curva de fluxo e viscosidade das soluções precursoras dos filmes, de 1 a 500  $s^{-1}$ , a a 25 °C.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Figura 24: Curva de temperatura das soluções precursoras dos filmes, de 5 a 80 °C, a 5  $s^{-1}$ .



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

As curvas de fluxo e de viscosidade demonstram que a solução de quitosana sem extrato é a que apresenta maior valor de viscosidade. Este dado é condizente com os maiores tamanhos de partícula demonstrados no experimento de DLS. Contudo, ao se adicionar os componentes do extrato, percebe-se uma nítida redução da viscosidade, o qual foi atribuída à redução do tamanho de partícula. Em decorrência do menor tamanho de partícula, tem-se a redução do atrito entre cadeias de quitosana, culminando em uma menor viscosidade da solução.

Além disso, as soluções contendo extrato de folhas de *C. arabica* L apresentam uma dependência com a temperatura muito menor, quase que linear, diferente do comportamento exponencial do tipo Arrhenius (BARNES et al., 1998), observado para a solução de quitosana pura. A maior dependência com a temperatura para a solução de quitosana pura, foi atribuída à existência dos emaranhados tridimensionais, onde a concentração e intensidade de interações intermoleculares do tipo íon-íon, íon-dipolo e ligações de hidrogênio, são muito maiores. Na presença do extrato, conforme discutido anteriormente, tem-se a formação de agregados discretos, que interagem menos com o solvente e, conseqüentemente, apresentam menor dependência da viscosidade com a temperatura, conforme discutido por Oliveira et al. (2017) em lamelas formadas por óxidos de ferro.

Na Tabela 5 estão compilados todos os parâmetros obtidos dos experimentos reológicos de fluxo isotérmicos e isorotacionais, tais como tensão de escoamento ( $\tau_0$  – parâmetro que mede a tensão necessária para induzir o escoamento de um material), índice de consistência ( $K_c$  – parâmetro análogo à viscosidade, definido no modelo de Herschel-Bulkley) e índice de comportamento ( $n$  – parâmetro que mede o desvio do comportamento newtoniano, sendo  $n = 1$  para fluido newtoniano,  $n < 1$  para fluido pseudoplástico e  $n > 1$  para fluido dilatante), mediante modelagem das curvas via modelo de Herschel-Bulkley, onde  $\tau$  e  $\dot{\gamma}$  são, respectivamente, a tensão e taxa de cisalhamento, baseada na equação abaixo.

$$\tau = \tau_0 + K_c \dot{\gamma}^n$$

Tabela 5: Viscosidade e curva de fluxo das soluções precursoras dos filmes.

	$\tau_0 / (\text{Pa})$	$K_c (\text{Pa.s}^n)$	$n$	$\eta_{500} / (\text{Pa.s})$
Q-SEFC	-	0.53	0.77	0.1348
Q-EFC1	0.018	0.0855	0.77	0.0210
Q-EFC2	0.009	0.1168	0.61	0.0114
Q-EFC3	0.005	0.1466	0.50	0.0069

Q-SEFC: Solução do filme de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Solução do filme de quitosana com 6,62 mg/mL de extrato; Q-EFC2: Solução do filme de quitosana com 13,25 mg/mL de extrato; Q-EFC3: Solução do filme de quitosana com 26,5 mg/mL de extrato.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

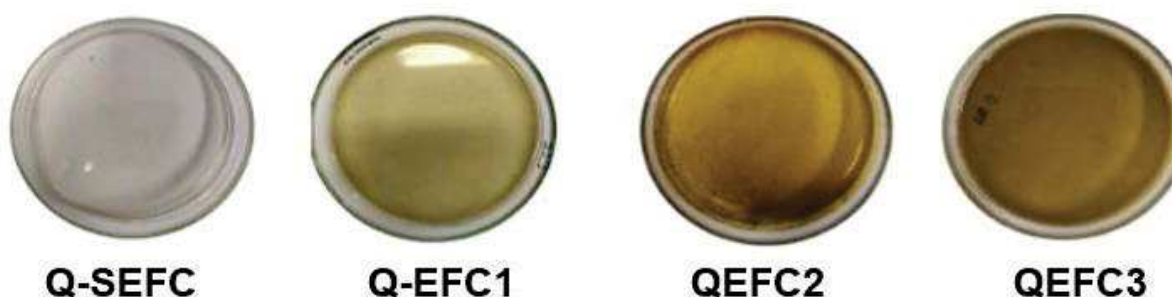
De acordo com a Tabela 5, os parâmetros inerentes à resistência ao escoamento, ou seja, a tensão de escoamento, índice de consistência e viscosidade a  $500 \text{ s}^{-1}$  ( $\eta_{500}$ ), apresentaram comportamento decrescente com a concentração de extrato, corroborando com a discussão acima. Além disso, a adição de extrato tornou os fluidos menos newtonianos, conforme valores de índice de comportamento  $n$ , indicando um aumento na pseudoplasticidade com o aumento da concentração do extrato.

### 5.2.2 Caracterização físico-química dos filmes

Conforme discutido, as soluções precursoras foram depositadas em placa petri (9 cm de diâmetro) em um volume de 12 mL e submetidas à secagem, até que fossem obtidos os filmes no estado sólido.

Os filmes foram avaliados do ponto de vista físico-químico, em relação ao peso médio, espessura, parâmetros ópticos, teor de umidade, grau de intumescimento, solubilidade, caracterizados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise térmica (termogravimetria e análise térmica diferencial), análise dinâmico mecânica e perfil de liberação. A Figura 25 apresenta os filmes desenvolvidos após o processo de secagem em estufa os quais, por meio de avaliação visual, demonstraram aspecto homogêneo.

Figura 25: Filmes desenvolvidos após o processo de secagem em estufas.



Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com  $125 \text{ mg/cm}^3$  de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com  $250 \text{ mg/cm}^3$  de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com  $500 \text{ mg/cm}^3$  de extrato.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).



### 5.2.2.1 Determinação da espessura e peso médio

Na Tabela 6 é possível observar a média e o desvio padrão da espessura e peso médio dos filmes desenvolvidos.

Tabela 6 Peso médio e espessura dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3.

<b>Filmes</b>	<b>Espessura (mm)</b>	<b>Peso médio (g)</b>
<b>Q-SEFC</b>	0,089 ± 0,006	0,102 ± 0,007
<b>Q-EFC1</b>	0,093 ± 0,005	0,106 ± 0,005
<b>Q-EFC2</b>	0,10 ± 0,01 *	0,109 ± 0,016 *
<b>Q-EFC3</b>	0,11 ± 0,01 *	0,12 ± 0,02 *

Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato. \* Espessa a diferença significativa em relação ao filme Q-SEFC  
Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

A uniformidade na variação de peso e espessura pode indicar que os constituintes estão igualmente distribuídos pelos filmes. Esse parâmetro é considerado um desafio, sobretudo nos filmes desenvolvidos pelo método empregado, onde a secagem ocorre por evaporação do solvente (SOBRAL, 1999).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 6, observa-se que na análise de peso médio houve diferença significativa entre o filme Q-SEFC e os filmes Q-EFC2 e Q-EFC3 ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, em relação à espessura também foi observado diferença significativa entre o filme Q-SEFC e os filmes Q-EFC2 e Q-EFC3 ( $p < 0,05$ ), demonstrando que a concentração dos bioativos incorporados influenciam nessas propriedades físicas.

Alguns estudos relacionam o aumento da espessura com a concentração de polifenólicos, uma vez que eles podem promover agregação com a matriz de quitosana, formando filmes mais complexos e de maior espessura (SIRIPATRAWAN et al., 2010). Estudos apresentados por Rambabu et al. (2019), demonstraram diferenças significativas na espessura dos filmes de quitosana incorporados com extratos de folhas de manga com valores entre 0,143 ± 0,00 a 0,209 ± 0,02 mm. Resultado semelhante foram igualmente relatados por Escárcega et al. (2018) no qual a incorporação de mel na matriz de quitosana à 2% promoveu um aumento na

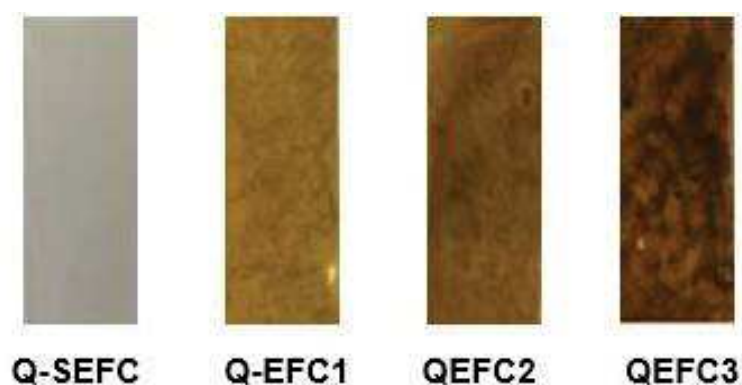
espessura dos filmes.

Os curativos cutâneos destinados ao tratamento de feridas normalmente apresentam espessura semelhante à da epiderme humana (entre 0,05 e 2 mm) (MORAIS et al., 2013). Dessa forma, os resultados obtidos para esse parâmetro indicam que os filmes desenvolvidos apresentam-se adequados para utilização como curativos cutâneos, uma vez que apresentaram espessura compatível com a epiderme.

#### 5.2.2.2 Determinação das propriedades ópticas

As propriedades de cor e opacidade são importantes para a aparência do filme, o que, por sua vez, pode influenciar a aceitação do consumidor. Ambos parâmetros estão relacionados com as matérias primas utilizadas na formulação dos filmes (PEREDA et al., 2012). As diferenças entre as colorações dos filmes produzidos podem ser evidenciadas na Figura 26.

Figura 26: Parâmetro macroscópico da coloração dos filmes desenvolvidos.



Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

A cor é um atributo visual resultante da luz emitida, transmitida ou refletida pelo produto (OJAGH, et al., 2010). Dessa forma, com base na Tabela 7 observa-se a influência da adição do extrato de folhas de *C. arabica* L. na coloração dos filmes à base de quitosana.

Tabela 7: Análise colorimétrica dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3.

Filmes	L*	a*	b*	C*	H°
Q-SEFC	91,23 ± 0,14	-1,38 ± 0,08	16,3 ± 1,26	16,36 ± 1,25	94,85 ± 0,17
Q-EFC1	56,49 ± 1,44*	4,22 ± 0,52*	37,84 ± 0,83 *	38,66 ± 1,02 *	82,89 ± 0,83 *
Q-EFC2	50,71 ± 3,21 *	6,93 ± 1,04*	37,39 ± 0,99 *	38,04 ± 0,85 *	79,42 ± 1,77 *
Q-EFC3	37,61 ± 0,51*	9,78 ± 0,77*	37,42 ± 1,24 *	39,26 ± 1,40 *	68,67 ± 0,86 *

Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato. \* Espressa a diferença significativa em relação ao filme Q-SEFC. Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Os filmes de quitosana puro apresentaram a coloração transparente, com tons suaves de amarelo. Contudo com a incorporação do extrato de folhas de *C. arabica* L. houve variações nas tendências cromáticas e opacidade nos filmes.

As coordenadas cromáticas apresentam parâmetro a\* que varia de verde a vermelho, o parâmetro b\* que varia de azul a amarelo, e o parâmetro L\* que varia de preto a branco (DEBONE et al., 2019). Para o parâmetro a\*, a adição de extrato promoveu o aumento nos valores, o que indica uma tendência à coloração mais avermelhada dos filmes. Em contraste, no parâmetro b\* observou maior tendência para a coloração amarelada a medida em que houve o aumento da concentração do extrato nos filmes. Os valores da coordenada C\* e H° variaram de forma semelhante às coordenadas cromáticas a\* e b\*, evidenciado um aumento na saturação e tonalidade dos filmes. Dessa forma, todos os filmes adicionados de extratos de folhas de *C. arabica* L. exibiram uma diferenças significativas nas alterações de cromaticidade a\*, b\*, C\* e H° ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao filme sem extrato.

Ainda, torna-se perceptível que a incorporação do extrato de folhas de *C. arabica* L. nos filmes reduziu notavelmente os valores L\*, com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), evidenciando que quanto maior a concentração do extrato, maior a tendência à coloração escura, o que reflete no parâmetro da opacidade.

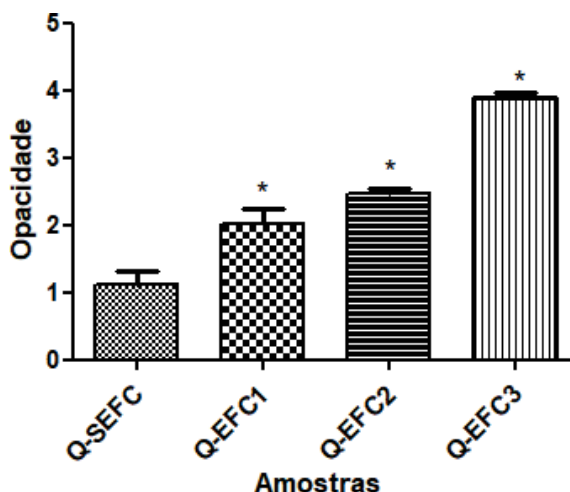
Resultados similares à cromaticidade do presente estudo foram relatadas nos filmes de quitosana após incorporação de outros aditivos, como o extrato de chá verde (COLOBATIUI et al., 2019) e filmes de quitosana incorporados com *Aloe vera* (ABRAS et al., 2012).

Adicionalmente, estudos desenvolvidos com subprodutos de café também obtiveram resultados similares para parâmetros de coloração. Jaisan et al (2016), relataram que as colorações dos filmes de quitosana aumentaram conforme o aumento da concentração do extrato da polpa de café, fornecendo uma tendência para avermelhado e amarelado.

De acordo com Rambabu e colaboradores (2019), a mudança de coloração relacionada aos filmes contendo extratos pode ser devido a quantidade de carotenóides e compostos fenólicos presentes, o que promove a dispersão e refração da luz, resultando em filmes mais escuros.

Com relação aos parâmetros de opacidade os filmes são caracterizados como transparente quando a luz incidente o atravessa com um mínimo de reflexão, ou em filme opaco no qual reflete toda a luz nele incidente (OJAGH, et al., 2010). Na Figura 27, pode ser observados os parâmetros de opacidade dos filmes com base na leitura 600 nm no espectrofotômetro.

Figura 27: Opacidade dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3 no comprimento de onda de 600nm.



Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato. \*Espressa a diferença significativa em relação ao filme Q-SEFC  
Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Os filmes exibiram um aumento na opacidade como consequência da adição dos extratos de folhas de *C. arabica* L. quando comparado ao filme controle (sem extrato). Nesse sentido, a opacidade aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração do extrato.

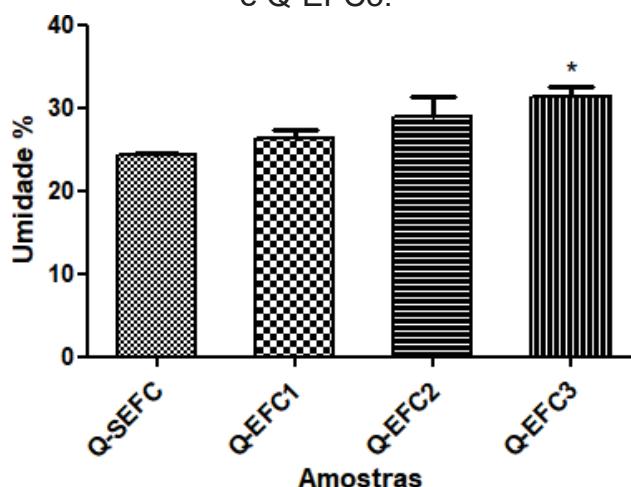
Os resultados demonstraram similaridade com o relatado por Debone et al (2019) que elaboraram filmes de quitosana incorporados com óleo de copaíba, assim com Escárcega et al (2018) ao elaborarem matrizes de quitosana incorporado com mel e glicerol, atestando que a opacidade aumenta proporcionalmente a quantidade de ativos adicionados.

Embora exista um grande interesse em filmes poliméricos transparentes para o tratamento de ferida, uma vez que possibilitam o monitoramento do processo cicatricial, bem como a detecção de infecções, não existe na literatura recomendação de parâmetros ópticos ideais de cor e opacidade para curativos, existindo desde curativos transparentes a opacos.

### 5.2.2.3 Determinação da umidade

A análise de umidade quantifica a fração de água que está inserida entre as moléculas da microestrutura dos filmes (CERQUEIRA et al., 2012). Essa determinação é essencial, uma vez que o filme deve ser capaz de reter e transportar a umidade em níveis apropriados, evitando o ressecamento, bem como influenciando nos mecanismos de adesão, crescimento e migração celular (MCCOLL et al., 2007). As determinações do conteúdo de umidade dos filmes desenvolvidos estão dispostas na Figura 28.

Figura 28: Porcentagem de umidade nos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3.



Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato. \*Espessa a diferença significativa em relação ao filme Q-SEFC  
Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

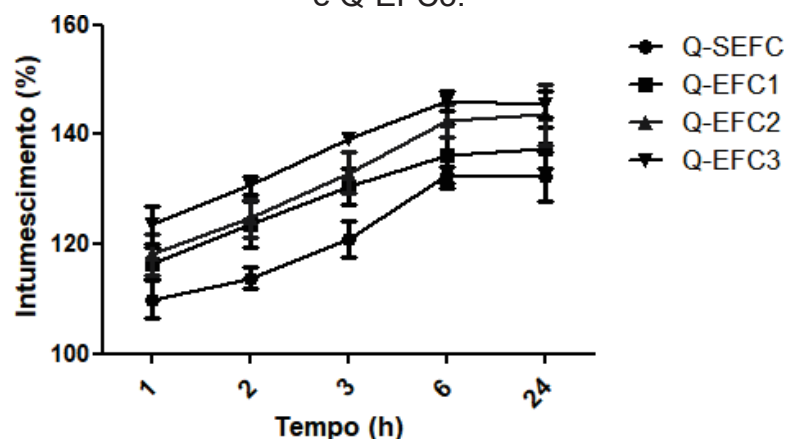
De acordo com os resultados, o teor de umidade aumentou de  $24,32 \pm 0,26\%$  (filmes sem extrato) para  $30,68 \pm 1,90\%$  (filmes contendo a maior concentração de extrato). Contudo, apenas os filmes Q-EFC3 demonstraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no teor de umidade em relação ao grupo controle. Nesse sentido, existem relatos da literatura de que a incorporação de compostos fenólicos em filmes poliméricos pode contribuir para o aumento do teor de umidade, devido as suas características hidrofílicas (HAN et al., 2020).

Filmes de pectina incorporados com extratos de folhas de sálvia elaborados por Han et al (2020) demonstraram resultados semelhantes ao apresentado, com o teor de umidade variando de  $20,92 \pm 0,45\%$  a  $23,87 \pm 1,06\%$  de acordo com o aumento na concentração do extrato. De maneira semelhante, Shah et al (2019), apresentam uma porcentagem máxima de umidade de  $23,07 \pm 0,35\%$  em seus filmes de quitosana incorporados com nanocompostos de prata e serina, o que, segundo os autores, foi suficiente para manter uma condição úmida na área da lesão. Diante disso, os resultados podem indicar que os filmes desenvolvidos apresentam potencial em fornecer um ambiente úmido para promover a cicatrização de feridas.

#### *5.2.2.4 Determinação do grau de intumescimento e solubilidade*

A determinação do intumescimento dos filmes é de grande relevância, uma vez que esse parâmetro contribui para a capacidade de bioadesividade dos mesmos (COSTA et al., 2014), bem como com a propriedade de absorver e reter exsudatos (KAMINIDEVI et al., 2018; DEVI et al., 2017). Dessa forma, a porcentagem de intumescimento dos filmes desenvolvidos no presente estudo foi calculada e está apresentada na Figura 29.

Figura 29: Porcentagem de intumescimento dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3.



Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

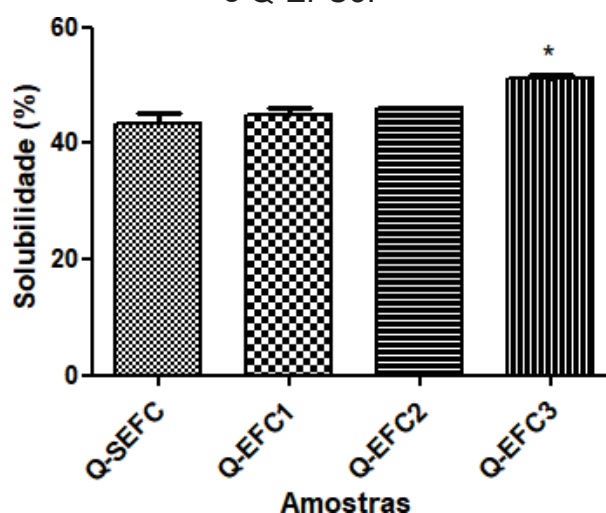
Todos os filmes mantiveram sua forma estrutural após as 24 h de análise. Os filmes apresentaram alta capacidade de absorção do meio nas primeiras 6 h de aplicação, e posteriormente atingiram um estágio de estabilidade. Conforme apresentado, a porcentagem de intumescimento dos filmes aumentou de acordo com o aumento da concentração do extrato, sendo que apenas os filmes Q-EFC2 (144%) e Q-EFC3 (146%) apresentaram diferença significativa quando comparados ao filme Q-SEFC (132%) ( $p < 0,05$ ). Filmes derivados de quitosana incorporados com diferentes óleos antioxidantes (gengibre, chá verde, alecrim, sálvia, tomilho) demonstraram porcentagem de intumescimento semelhante ao presente trabalho, variando de 70 a 200% (SOUZA et al., 2017).

O intumescimento dos filmes de quitosana pode ser atribuído à presença de grupos amino caracterizados por ligações (N–H), que favorecem a formação de ligações de hidrogênio com a água. Além disso, a propriedade hidrofílica do extrato pode permitir a interação e absorção do meio, (SHAH et al., 2019; SANTOS et al., 2019) o que pode explicar o aumento do intumescimento dos filmes. De modo oposto, a literatura aponta que a incorporação de elevadas concentrações de compostos hidrofóbicos em filmes de quitosana é capaz de diminuir a porcentagem de intumescimento, já que ocorre a diminuição da hidrofiliabilidade do polímero (BRÁS et al., 2020).

A partir do cálculo da porcentagem de solubilidade, é possível investigar a solubilização dos compostos presentes nos filmes, bem como a integridade do mesmo

quando em contato com exsudatos da ferida ou fluidos aquosos (JAISWAL et al., 2019). Na Figura 30 estão dispostos os valores de porcentagem de solubilidade dos filmes desenvolvidos.

Figura 30: Porcentagem de solubilização dos filmes Q-SEFC, QEFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3.



Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato. \*Espressa a diferença significativa em relação ao filme Q-SEFC  
Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

De acordo com os resultados, a solubilidade dos filmes foi intensificada com o aumento da incorporação dos extratos de folhas de *C. arabica* L. Entretanto, apenas o filme Q-EFC3 apresentou diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Comportamento semelhantes foram observadas em filmes de quitosana incorporados com óleo de *Aloe vera* (ABRAS et al., 2012), no qual o aumento da concentração do extrato foi diretamente proporcional à porcentagem de solubilidade (49,2% a 59,9%).

De acordo com Khan et al (2012) a capacidade de retenção de água depende principalmente das características dos constituintes da formulação dos filmes. Dessa forma, a presença de grupamentos hidrofílicos presentes na quitosana, no plastificante (glicerina) e de substâncias hidrofílicas no extrato contribuem para a solubilidade dos filmes. Assim, no caso dos filmes contendo maiores concentrações do extrato, a porcentagem de solubilidade tende a ser significativamente maior.

Em conjunto, esses resultados demonstram que os filmes tendem a permanecer íntegros por um período adequado de tempo (pelo menos 24 h) e, além disso, apresentam elevada capacidade de intumescimento quando em contato com

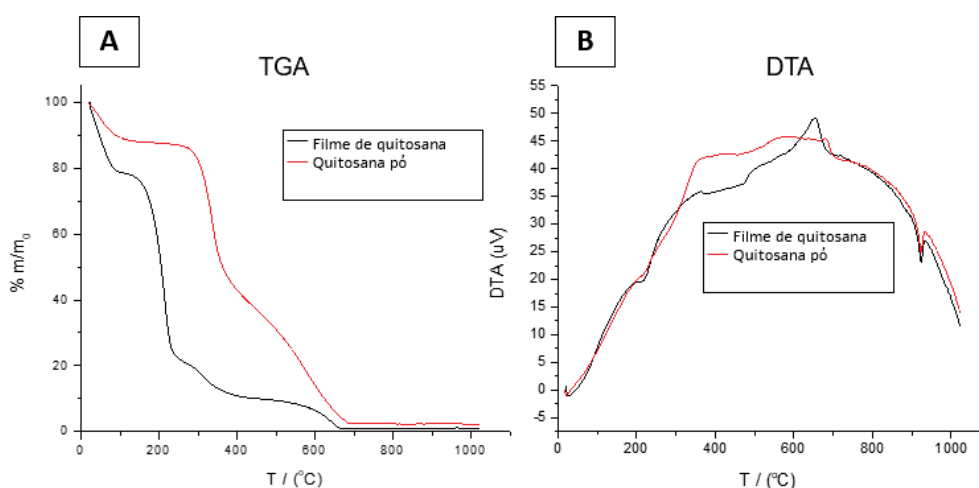


fluidos aquosos, o que poderia indicar a possibilidade de bioadesividade e absorção/retenção de exsudatos.

### 5.2.2.5 Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TGA)

As análises termogravimétricas foram conduzidas para analisar a estabilidade térmica dos filmes elaborados, bem como o teor de matéria inorgânica, por meio da análise da massa residual. Primeiramente, o comportamento térmico do pó de quitosana puro e do filme de quitosana sem adição do extrato (Q-SEFC) foram investigados por TGA e DTA, e os resultados são apresentados na Figura 31.

Figura 31: Análise térmica do pó de quitosana e filme Q-SEFC.



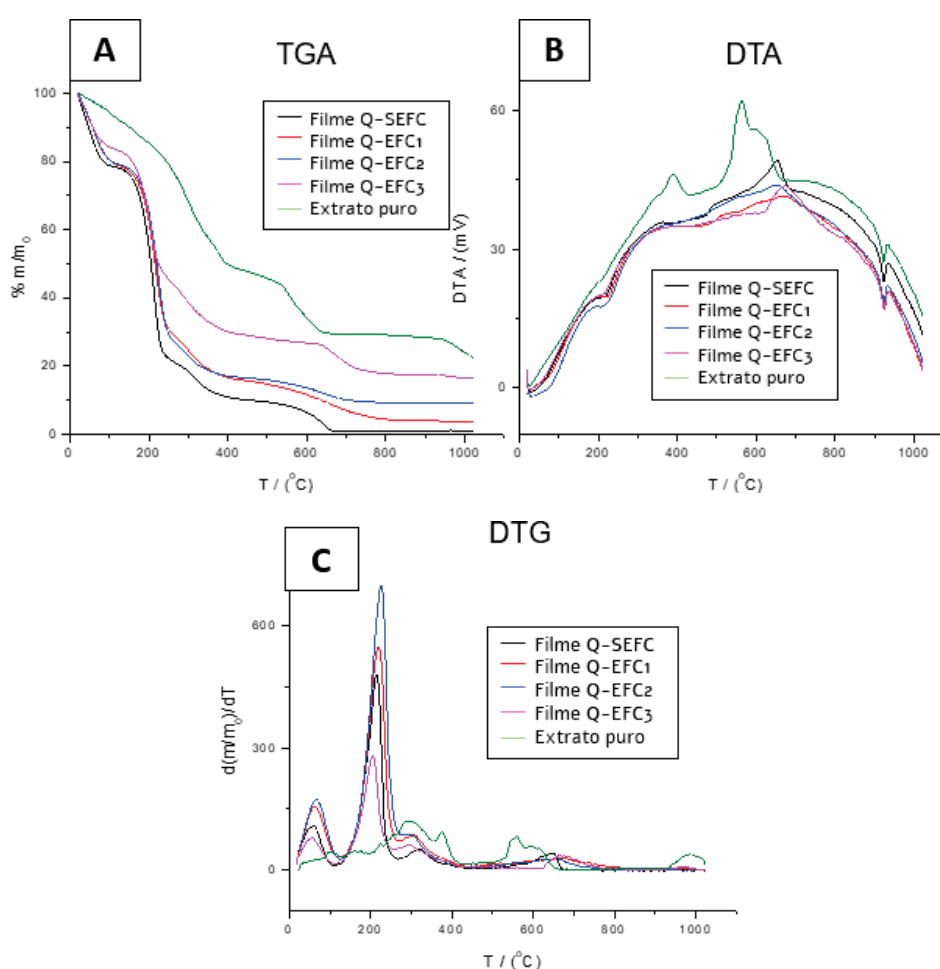
A- Curva de TGA do pó de quitosana e filme Q-SEFC; B- Curva de DTA do pó de quitosana e filme Q-SEFC. Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Conforme analisado, as curvas de TGA e DTA demonstram grande similaridade entre a quitosana pura (pó) e a quitosana na forma de filme, especialmente nas principais transições e na massa final. A quitosana na forma de filme, entretanto, apresenta uma região de perda de massa mais pronunciada até próximo de 100 °C, sendo justificada pelo fato dos filmes passarem por uma fase aquosa, o que leva a uma maior incorporação de água que não foi removida por secagem. Ainda é possível observar uma segunda perda no peso entre 200 °C e 350 °C indicando a despolimerização e decomposição do polissacarídeo, e uma última fase com cauda longa e sem eventos distintos ocorrendo após 700 °C. Os eventos na DTA são praticamente os mesmos.

Resultados similares são evidenciados por Shah e colaboradores (2019), no qual os filmes de quitosana elaborados apresentaram um perda de massa significativa entre 30 a 110 °C, no qual o estudo atribuí à perda de água adsorvida, e ainda uma perda entre 250 °C a 352 °C indicando a degradação térmica da amostra.

A Figura 32 apresentam respectivamente as curvas de TGA, DTA e DTG do extrato de folhas de *C. arabica* L. e filmes elaborados.

Figura 32: Análise térmica do extrato de folhas de *C. arabica* L. e dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3.



A- Curva de TGA do extrato de folhas de *C. arabica* L. e dos filmes elaborados; B- Curva de DTA do extrato de folhas de *C. arabica* L. e dos filmes elaborados; C- Curva de DTG do extrato de folhas de *C. arabica* L. e dos filmes elaborados.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

Como pode ser observado na análise TGA do extrato, há uma perda de massa constante desde o início do aquecimento, podendo ser proveniente da perda de água e de compostos voláteis. Ainda com base nos dados dispostos é possível averiguar que o extrato apresentou um valor de massa residual de 22,5%, demonstrando que é

rico em matéria inorgânica. Este dado condiz com os dados de condutividade elétrica, onde foi sugerido a presença de espécies iônicas inorgânicas. Além disso, os filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3 apresentaram valores de massa residual de 1,1%, 3.5%, 9.4%, 16.4% respectivamente, mostrando um aumento da massa residual de acordo com a incorporação do extrato.

Considerando que os valores de massa residual foram obtidos a temperatura de 1000 °C, onde a presença de compostos orgânicos é pouco provável, tais valores foram atribuídos à presença de matéria inorgânica. Portanto, nos estudos anteriores em fase líquida, podemos atribuir parte do processo de neutralização das macromoléculas por interação com componentes aniônicos inorgânicos.

De acordo com a análise de DTG, é possível analisar ainda que o ponto máximo de degradação química ocorreu próximo a 200 °C em todos os filmes elaborados. Essa análise é crucial para a determinação dos pontos característicos da degradação térmica de material a ser desenvolvido. É desejável que produtos comerciais não apresente degradação térmica até 40° para ser mantido fora de refrigeração, permitindo que não sofra influência da temperatura ambiente (DABIRI et al., 2016; SPADA et al., 2014). Dessa forma, considerando a aplicação final como curativo para feridas, a análise térmica revelou que a 40 °C, não foi observada nenhuma perda significativa de peso para os filmes, apoiando sua adequação para aplicação no tratamento de feridas cutâneas.

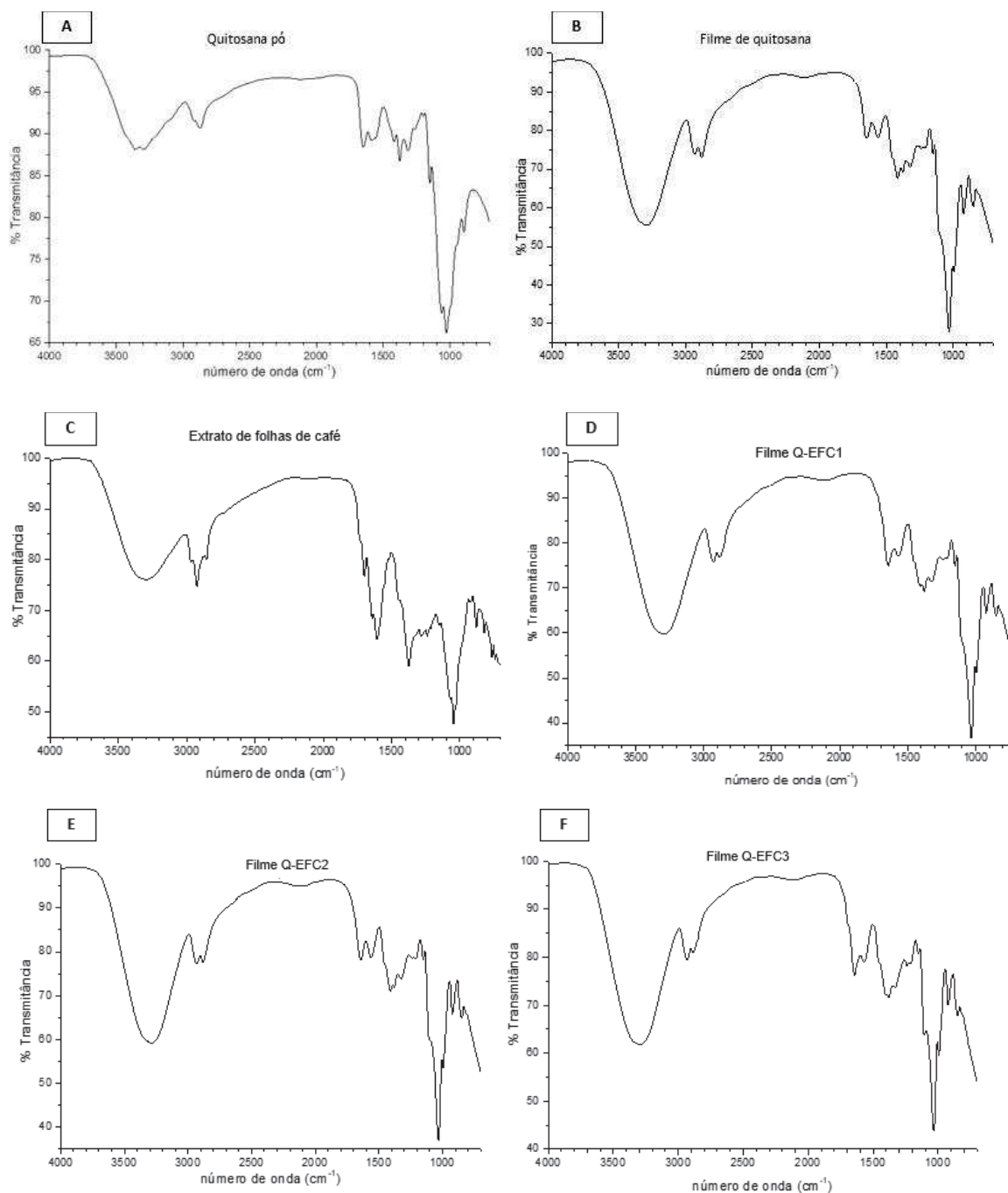
#### *5.2.2.6 Espectroscopia eletrônica vibracional na Região do Infravermelho*

No momento em que a radiação de infravermelho interage com uma molécula orgânica ocorre uma alteração no modo vibracional e rotacional da mesma. Para que determinada vibração promova a absorção da radiação na região do infravermelho, é necessário que ocorra alteração no momento dipolo das ligações, com a finalidade medir diferentes tipos de vibrações entre os átomos de acordo com as ligações interatômicas (BARBOSA, 2011).

Dessa forma, as análises de espectroscopia de infravermelho foram realizadas para determinar e identificar os grupos funcionais presentes nas amostras uma vez que cada grupo absorve em uma frequência característica de radiação na região do IR, bem como verificar a formação de possíveis interações intermoleculares entre a quitosana e o extrato de folhas de *C. arabica* L., uma vez que no processo de

interação as bandas presentes nas molécula incluída normalmente são deslocadas ou têm intensidades alteradas. As Figuras 33A-F e 34 apresentam os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) na faixa de comprimento de onda de 4000-700  $\text{cm}^{-1}$ .

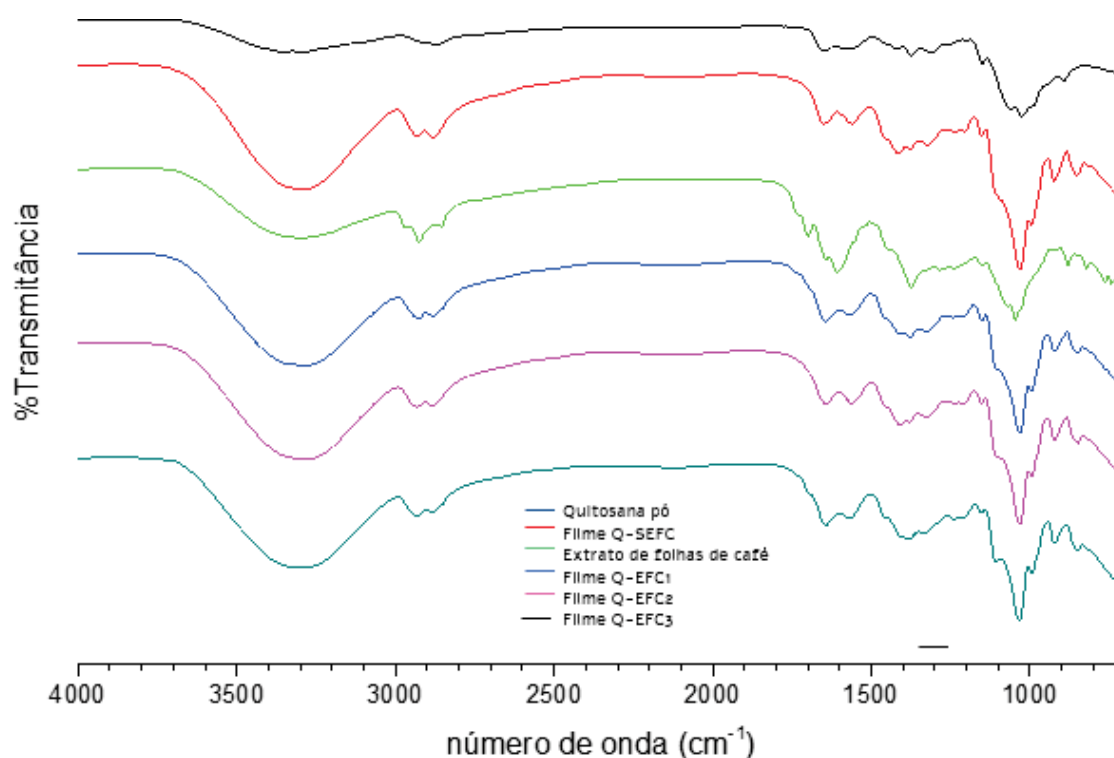
Figura 33: Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).



A: FT-IR do pó de quitosana; B: FT-IR filmes de Q-SEFC; C: FT-IR do extrato de folhas de *C. arabica* L.; D: FT-IR filmes de Q-EFC1; E: FT-IR filmes de Q-EFC2; F: FT-IR filmes de Q-EFC3

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

Figura 34: Espectros de infravermelho em conjunto dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2, Q-EFC3, quitosana em pó e extrato de folhas de *C. arabica* L.



FT-IR do pó de quitosana; filmes de Q-SEFC; extrato de folhas de *C. arabica* L.; filmes de Q-EFC1; filmes de Q-EFC2 e filmes de Q-EFC3.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

No primeiro espectro (Figura 33A) que pertence à amostra de quitosana em pó pura é possível evidenciar bandas características da quitosana, no qual destaca-se as ligações entre 3500 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ , correspondendo a N-H e às vibrações de alongamento do grupo -OH da estrutura principal de quitosana. Outras bandas característicos da quitosana foram registrados em números de onda de 1650  $\text{cm}^{-1}$  (amida I, C=O alongamento), 1550  $\text{cm}^{-1}$  (amida II, curvatura N-H), 1150  $\text{cm}^{-1}$  (amida III, C-N alongamento) e 1030  $\text{cm}^{-1}$  (vibração de alongamento C-O). Ambos os resultados colaboram com dados da literatura ao analisarem a quitosana (BRÁS et al., 2020; SIRIPATRAWAN et al., 2010).

Os espectros correspondentes aos filmes de quitosana sem a adição do extrato de folhas de *C. arabica* L. (Figura 33B) foi semelhante a amostra de quitosana pura, houve algumas alterações devido às interações moleculares provenientes da adição da glicerina na matriz do filme em solução aquosa de ácido acético a 1%. O aumento na intensidade da banda O-H entre 3500 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuído à formação de novas ligações de hidrogênio entre as moléculas, explicando o

deslocamento de grupos funcionais (SUÁREZ et al., 2014).

Comportamentos semelhantes no deslocamento das bandas O-H foram evidenciados com a adição do glicerol nos filmes de quitosana incorporados com capsaicina e filmes de quitosana incorporado com mel (AKYUZ et al., 2018; ESCÁRCEGA et al., 2018).

No espectro relacionado aos extratos de folhas de *C. arabica* L. evidenciam bandas características de ligações fenólicas por meio do estiramento do grupo hidroxila (O-H) entre 3600 e 3200  $\text{cm}^{-1}$ , bem como a banda em 1700  $\text{cm}^{-1}$  correlacionado ao alongamento de carbono para carbono (C-C) dentro o anel aromático, que indica o grupo funcional de compostos fenólicos. Aliado a esses dados, as bandas na região entre 1800 e 1500 $\text{cm}^{-1}$  são indicativos de ácido clorogênico, e bandas entre 3500-3200, 1095 e 830 indicativos de mangiferina (Figura 33C) (MONJE et al., 2019; PIPATTANAWAROTHAI et al., 2019).

Conforme observado na Figura 34, os espectros de filmes de quitosana incorporados com extrato de folhas de *C. arabica* L. demonstraram intensidade de bandas diferente das características do extrato como 3000 e 2950  $\text{cm}^{-1}$  referente a C-H alifático, 2900 e 2800  $\text{cm}^{-1}$  referente a  $\text{CH}_3$ , 1750 a 1700  $\text{cm}^{-1}$  e 1700  $\text{cm}^{-1}$  referente a C=O de ácidos carboxílicos, 1610  $\text{cm}^{-1}$  referente C=C aromático e 1100-1050  $\text{cm}^{-1}$  referente a C-O de álcool e fenóis. Desse modo, as alterações na intensidade de bandas características do extrato de folhas de *C. arabica* L. nos filmes sugere a ocorrência de interações intermoleculares entre grupos ativos de extrato com os grupos funcionais da quitosana.

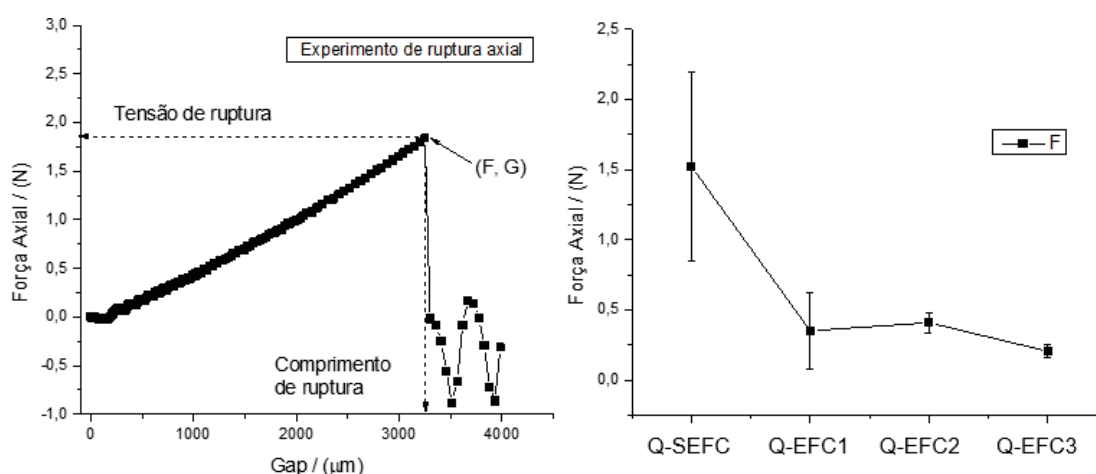
#### 5.2.2.7 Análise Dinâmico Mecânica dos filmes

A resistência mecânica é um requisito essencial para a determinação do desempenho dos materiais com funcionalidade para uso tópico no tratamento de feridas. Os filmes devem ser capazes de suportar as cargas mecânicas durante sua operação, transporte e manuseio, com o objetivo de manter sua integridade durante todo o tratamento da ferida (SANTOS et al., 2019). Além disso, essa análise permite levantar parâmetros importantes acerca do efeito de constituintes na composição final.

As propriedades mecânicas dos filmes de quitosana sem e com extrato foram analisadas e os resultados dos experimentos de ruptura axial e rotacional são apresentados nas Figuras 35 e 36, respectivamente. Na Figura 35 o parâmetro F

corresponde a força necessária para promover a ruptura do filme em função do Gap, em contraste na Figura 36 a análise reológica é a força (F) com relação ao ângulo de ruptura ( $\theta$ ).

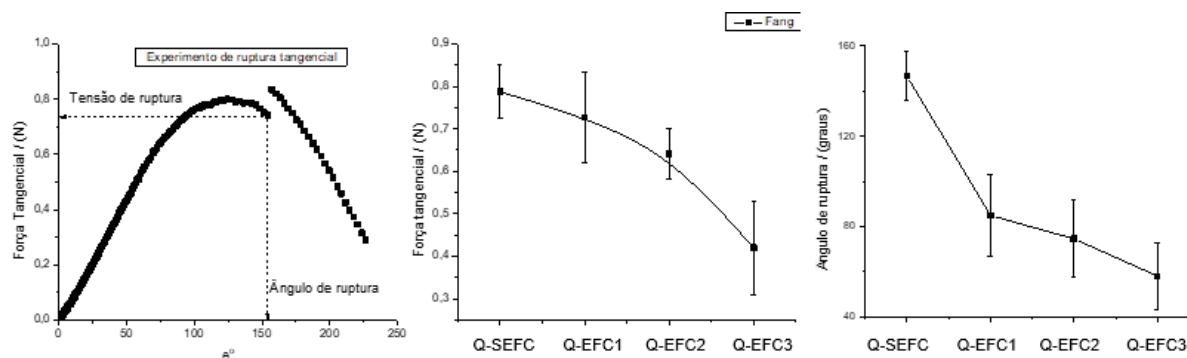
Figura 35: Análise reológica de ruptura axial dos filmes.



Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Figura 36: Análise reológica de ruptura rotacional dos filmes.



Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Nos ensaios de análises de ruptura axiais, tem-se a ruptura por estiramento enquanto que nos ensaios rotacionais, ruptura por rasgo. Dessa forma, nos ensaios rotacionais, a medida do ângulo de ruptura também é um indicativo de resistência do material pois quanto maior for o ângulo de ruptura, mais o material pode se esticar (torcer) antes de rasgar.

Conforme observado, tanto os ensaios tangenciais quanto os ensaios axiais demonstram que o aumento da concentração de extrato diminui a rigidez do material. Provavelmente pelo colapso da estrutura macromolecular, conforme discutido nos ensaios reológicos em fase líquida e na caracterização coloidal.

A redução nos ensaios de rupturas dos filmes incorporados de extrato de folhas de *C. arabica* L. pode ser atribuída às alterações na organização estrutural do filme causadas pela incorporação do extrato de café. Fenômenos semelhantes foram relatados em filmes de quitosana incorporados com capsaicina, filmes de quitosana incorporados com óleo de copaíba a 1%, bem como filmes de quitosana incorporados com extrato de folhas de *Cynara cardunculus*, onde os ensaios de ruptura e resistência mecânica tiveram um declínio com o aumento da concentração do extrato e/ou ativos (AKYUZ et al., 2018; BRÁS et al., 2020; DEBONE et al., 2019).

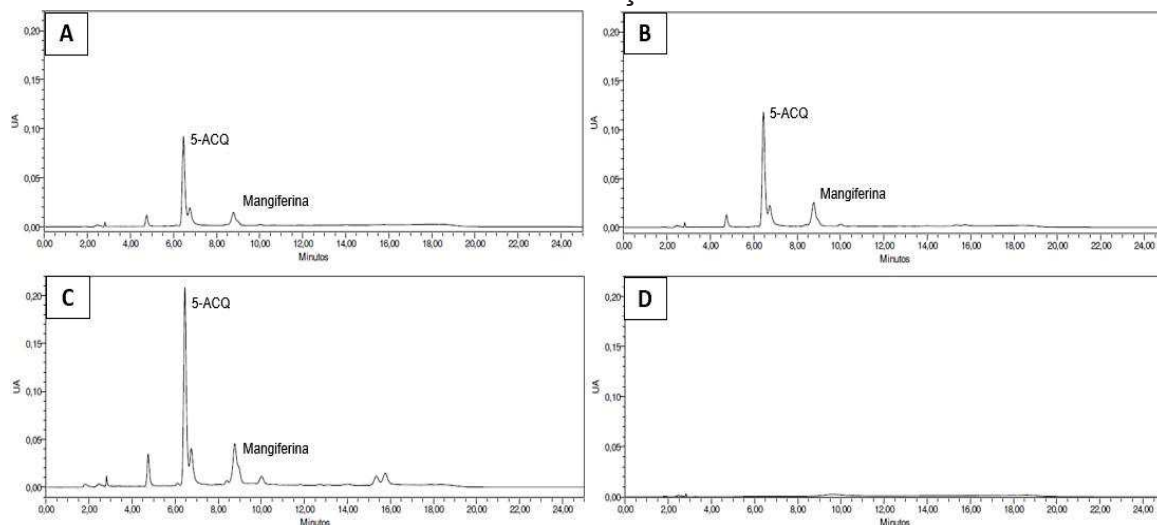
Evidencia-se que todas as amostras exibiram padrão de ruptura semelhante e baixos no presente estudo, sendo considerados frágeis. Provavelmente ocorreu uma transferência muito curta da região elástica para a plástica, seguida de rompimento do filme.

#### 5.2.2.8 Avaliação da liberação *in vitro*

O processo de cicatrização das feridas cutâneas é gradativo e contínuo e, dessa forma, curativos desenvolvidos para a liberação gradual dos constituintes ativos têm sido considerados estratégia promissora (MENGATTO et al., 2012; REIDY et al., 2013). A análise de liberação *in vitro* é uma importante ferramenta analítica utilizada com o objetivo de investigar e estabelecer o comportamento das formulações desenvolvidas (SOUZA, 2014). Partindo desse princípio, a liberação *in vitro* dos constituintes do extrato (5-ACQ e mangiferina) foi avaliada após 24 h de contato dos filmes com solução salina (37 °C, pH 7,4). Os resultados estão dispostos na Figura 37.



Figura 37: Cromatogramas referentes à quantificação de 5-ACQ e mangiferina no ensaio de liberação *in vitro*.



A: Cromatograma do filme Q-EFC1; B: Cromatograma do filme Q-EFC2; C: Cromatograma do filme Q-EFC3; D: Cromatograma do filme Q-SEFC.  
 Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

Conforme apresentado na Figura 37, todos os filmes contendo a incorporação do extrato de *C. arabica* L. demonstraram a liberação dos compostos 5-ACQ e mangiferina. Nos filmes Q-EFC1 ocorreu a liberação de  $65,6 \pm 6,8\%$  para o 5-ACQ e  $19,2 \pm 0,8\%$  para a mangiferina, em contraste nos filmes Q-EFC2 foi encontrado uma liberação de  $58,8 \pm 3,7\%$  de 5-ACQ e  $39,8 \pm 5,8\%$  de mangiferina, por fim, os filmes Q-EFC3 apresentaram liberação de  $65,4 \pm 6,0\%$  para 5-ACQ e  $52,2 \pm 5,04\%$  para mangiferina.

Não foi observada diferença significativa em relação à liberação do 5-ACQ a partir das diferentes formulações ( $p > 0,05$ ). Nesse caso, sugere-se que esse comportamento possa ser devido ao elevado grau de ionização do 5-ACQ em valores de pH próximos a 7 (TOMAC et al., 2014). Com isso, é possível que haja uma maior difusão dessa substância em favor do meio externo (solução salina, pH 7,4), independente da formulação avaliada.

Por outro lado, para a mangiferina, houve diferença significativa entre os filmes Q-EFC1 e Q-EFC3 ( $p < 0,05$ ). É possível que essa diferença seja devido a maior porcentagem de intumescimento dos filmes Q-EFC3, o que acarreta em maior interação e absorção de líquido (solução salina) com o filme, propiciando o aumento da difusão da mangiferina em direção ao meio externo. Essa teoria vai ao encontro do postulado por Turbiani e colaboradores (2011), os quais relatam que o aumento da absorção de água leva a uma relaxação na estrutura dos filmes, ocasionando maior

facilidade de solubilização e difusão de solutos presentes nos mesmos.

Os dados obtidos podem ser considerados promissores, uma vez que sugerem o controle da liberação do 5-ACQ e da mangiferina a partir dos filmes, durante o tempo de 24 h. De fato, dados da literatura comprovam uma liberação controlada de ativos incorporados em filmes de quitosana (PATEL et al., 2018).

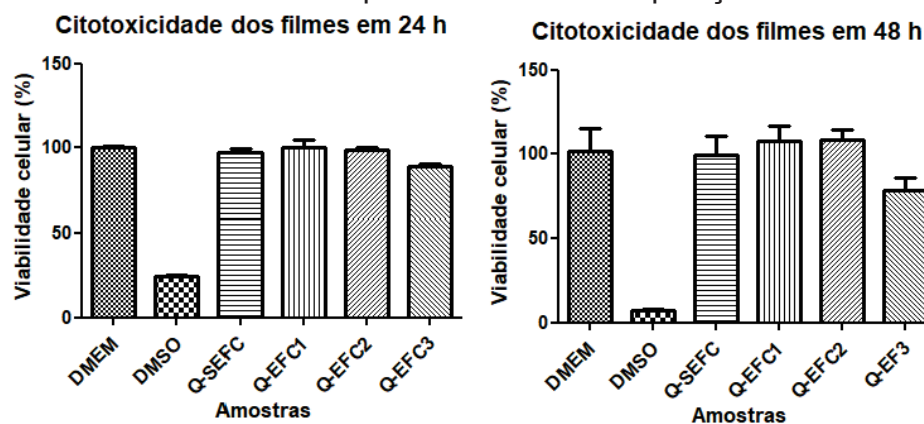
É importante ressaltar que o 5-ACQ apresenta atividades antioxidante e anti-inflamatória, além de atuar no aumento de densidade capilar, o que pode auxiliar no processo de cicatrização. Aliado a isso, a mangiferina apresenta grande relevância no processo de cicatrização de feridas cutâneas uma vez que está relacionada às atividades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana. Dessa forma, a liberação desses constituintes a partir dos filmes poderia auxiliar no tratamento da ferida.

### 5.2.3 Caracterização biológica dos filmes

#### 5.2.3.1 Determinação da citotoxicidade *in vitro*

A biocompatibilidade, é um fator essencial para que um material seja adequado na aplicação tópica da cicatrização (BRÁS et al., 2020). Assim, a citotoxicidade dos filmes desenvolvidos foi avaliada pelo ensaio de MTT, utilizando células L929. Na Figura 38, estão dispostos os resultados da citotoxicidade dos filmes em células L929 após exposição de 24 h e 48h, respectivamente.

Figura 38: Avaliação da citotoxicidade dos filmes desenvolvidos frente à linhagem celular L929 após 24h e 48h de exposição.



Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Após o tempo de exposição de 24h a viabilidade celular foi de 100%, 24,4%, 97,1%, 100,4%, 98,4%, 94,2% para meio DMEM, DMSO 5%, Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3, respectivamente. Em contrapartida, nos tratamentos de 48h a viabilidade celular foi de 100%, 7,6%, 99,8%, 107,8%, 108,4% e 82,2% para meio DMEM, DMSO 5%, Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3, respectivamente. Em ambos os tempos de exposição, não foram observadas diferenças significativas entre a viabilidade das células expostas aos filmes em comparação ao grupo controle (meio DMEM) ( $p > 0,05$ ).

Nesse sentido, após 24 h e 48 h de exposição foram encontrados valores de viabilidade celular na faixa de 70-100%, revelando que os filmes desenvolvidos não apresentam indícios de toxicidade frente à linhagem celular empregada no ensaio. Esses resultados corroboram o que foi observado no ensaio de citotoxicidade do extrato de folhas de *C. arabica* L. é condizente com dados da literatura, os quais evidenciam que a quitosana é um polímero de baixa toxicidade (CHARERNSRIWILAIWAT et al., 2013; DEVI et al., 2017). Dessa forma, esses dados indicam que os filmes desenvolvidos podem ser seguros para aplicação tópica.

Estudos realizados com filmes de quitosana incorporados com lupeol também demonstraram elevada viabilidade em linhagem celular de fibroblastos, assim como estudos realizados com filmes de quitosana incorporados com extrato de folhas de *Cynara cardunculus* (PATEL et al., 2018; BRÁS et al., 2020).

#### 5.2.3.2 Determinação da atividade antimicrobiana in vitro

As feridas cutâneas fornecem um ambiente propício para o crescimento de micro-organismos, desencadeando a infecção e conseqüentemente comprometendo o processo natural de cicatrização da ferida (DEVI et al., 2017). Dessa forma, os efeitos antibacterianos dos filmes desenvolvidos foram analisados com o objetivo de investigar a eficácia dos mesmos para aplicação na cicatrização de feridas.

Nesse sentido, a escolha dos agentes patogênicos foi baseada entre os principais micro-organismos relacionados as feridas agudas, sendo o *Staphylococcus aureus* o patógeno de maior relevância clínica. Em feridas crônicas, a liberação de exsudato pode proporcionar um crescimento de diversas bactérias aeróbicas, justificando a escolha de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas frequentemente

associada à pele, como o *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* (SOUZA et al., 2016). O valor do halo de inibição das amostras testadas contra os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* está apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Valores dos halos de inibição dos filmes Q-SEFC, Q-EFC1; Q-EFC2 e Q-EFC3.

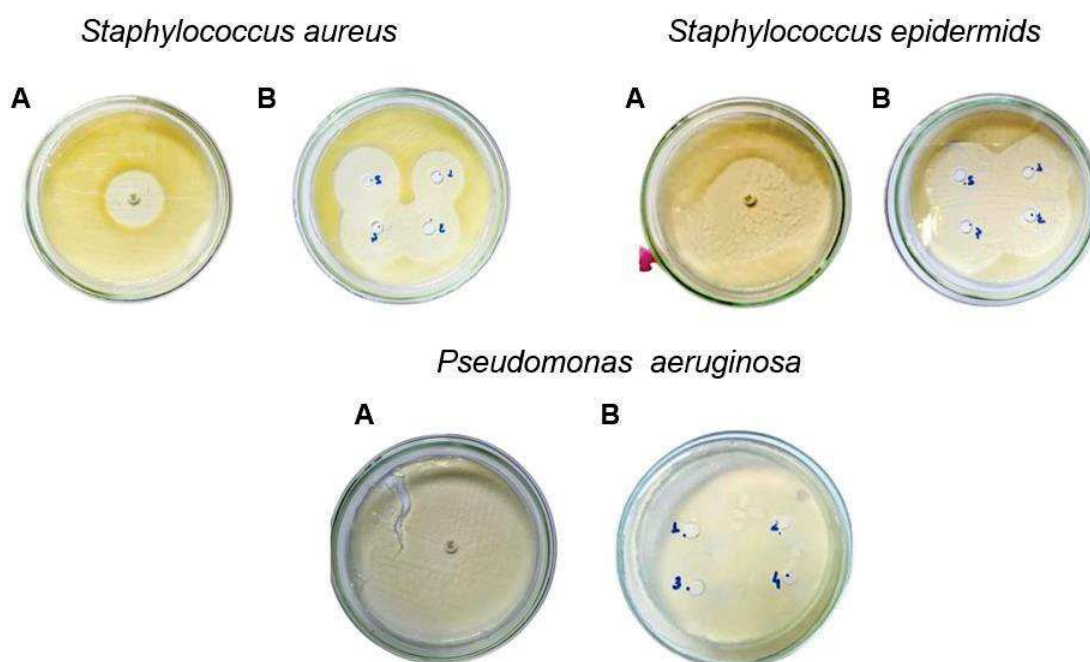
	Halo de inibição (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Q-SEFC	29,00 ± 1,73 <sup>a</sup>	33,00 ± 1,41 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00
Q-EFC1	35,00 ± 2,30 <sup>b</sup>	34,00 ± 0,00 <sup>a,b</sup>	0,00 ± 0,00
Q-EFC2	35,00 ± 3,05 <sup>b</sup>	38,00 ± 0,00 <sup>b,c</sup>	0,00 ± 0,00
Q-EFC3	38,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	39,00 ± 3,05 <sup>c</sup>	0,00 ± 0,00
Ciprofloxacino	29,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	44,00 ± 0,00 <sup>d</sup>	24,00 ± 0,00

Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato. Médias com letras iguais, em cada coluna, não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ )

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

Todas as formulações de filmes foram capazes de inibir de maneira satisfatória o crescimento das bactérias Gram-positivas. Contudo, não apresentaram inibição eficaz contra *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa). Esses resultados podem ser visualizados na Figura 39.

Figura 39: Imagens dos halos de inibição para as linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*.



A) Halo de inibição referente ao ciprofloxacino; B) Halos de inibição referentes a: 1- Q-SEFC; 2- Q-EFC1; 3- Q-EFC2 e 4- Q-EFC3

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022)

O resultado está de acordo com a literatura, a qual evidencia que as bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis à atividade antimicrobiana da quitosana em decorrência da interação eletrostática do ácido teicóico carregado negativamente em sua parede celular e grupos amino carregados positivamente na quitosana, ocasionando danos estruturais, e culminando na morte celular (BANERJEE et al., 2018; DÍEZ-PASCUAL et al., 2015; KHARAZIAN et al., 2019).

Além disso, a incorporação do extrato de folhas de *C. arabica* L. aos filmes de quitosana promoveu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos halos de inibição frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3) e *Staphylococcus epidermidis* (Q-EFC2 e Q-EFC3) quando em comparação aos filmes sem o extrato (Tabela 8). Esses resultados corroboram com a propriedade antimicrobiana do extrato e de seus constituintes isolados, especificamente a mangiferina, os quais exibiram atividade contra esses micro-organismos (Tabela 3).

Com relação à bactéria Gram-negativa, em estudo com filmes de quitosana incorporados com extratos de *Aloe vera* não foi observada atividade antimicrobiana contra as bactérias *P. aeruginosa* (CHABALA et al., 2017). A justificativa pode ser

dada em decorrência da parede celular presente nas bactérias Gram-negativas impedirem a penetração de substâncias e consequentemente dificultar a atividade antimicrobiana (SIMÕES et al., 2009).

O antibacteriano ciprofloxacino, utilizado como controle no presente estudo, é considerado de amplo espectro. Nesse sentido, a maioria das bactérias Gram-negativas são altamente suscetíveis e muitas bactérias Gram-positivas são suscetíveis ou moderadamente suscetíveis a esse fármaco (DAVIS et al, 1996; RICHARDS et al., 1988). Ao compararmos os valores dos halos de inibição desse antimicrobiano com os valores encontrados para os filmes incorporados com extrato de folhas de *C. arabica* L., observa-se que, para *S. aureus*, os filmes apresentaram resultados superiores, com diferenças significativas para as três formulações ( $p < 0,05$ ). Ademais, os resultados obtidos para os filmes sem adição de extrato foram estatisticamente semelhantes aos obtidos para o ciprofloxacino ( $p > 0,05$ ).

Esses resultados são particularmente importantes, principalmente devido à crescente ocorrência de resistência bacteriana à antimicrobianos sintéticos, incluindo o ciprofloxacino (ZHANG et al., 2018). Em contraste, para o *S. epidermidis*, o ciprofloxacino apresentou maior valor de halo de inibição, com diferença significativa para todas as amostras testadas. Apesar disso, consideramos que os resultados de eficácia dos filmes frente a esse micro-organismo foram satisfatórios, já que os valores dos halos de inibição mostraram-se próximos ao do fármaco sintético. Por fim, o *P. aeruginosa* foi suscetível ao tratamento com ciprofloxacino, comprovando a eficácia desse fármaco para bactérias Gram-negativas.

Analisados em conjunto, os resultados obtidos indicam que a associação entre a quitosana e o extrato de folhas de *C. arabica* L. pode constituir uma abordagem terapêutica promissora visando ao efeito antibacteriano no processo de tratamento de feridas.

### 5.2.3.3 Determinação da atividade cicatrizante *in vitro*

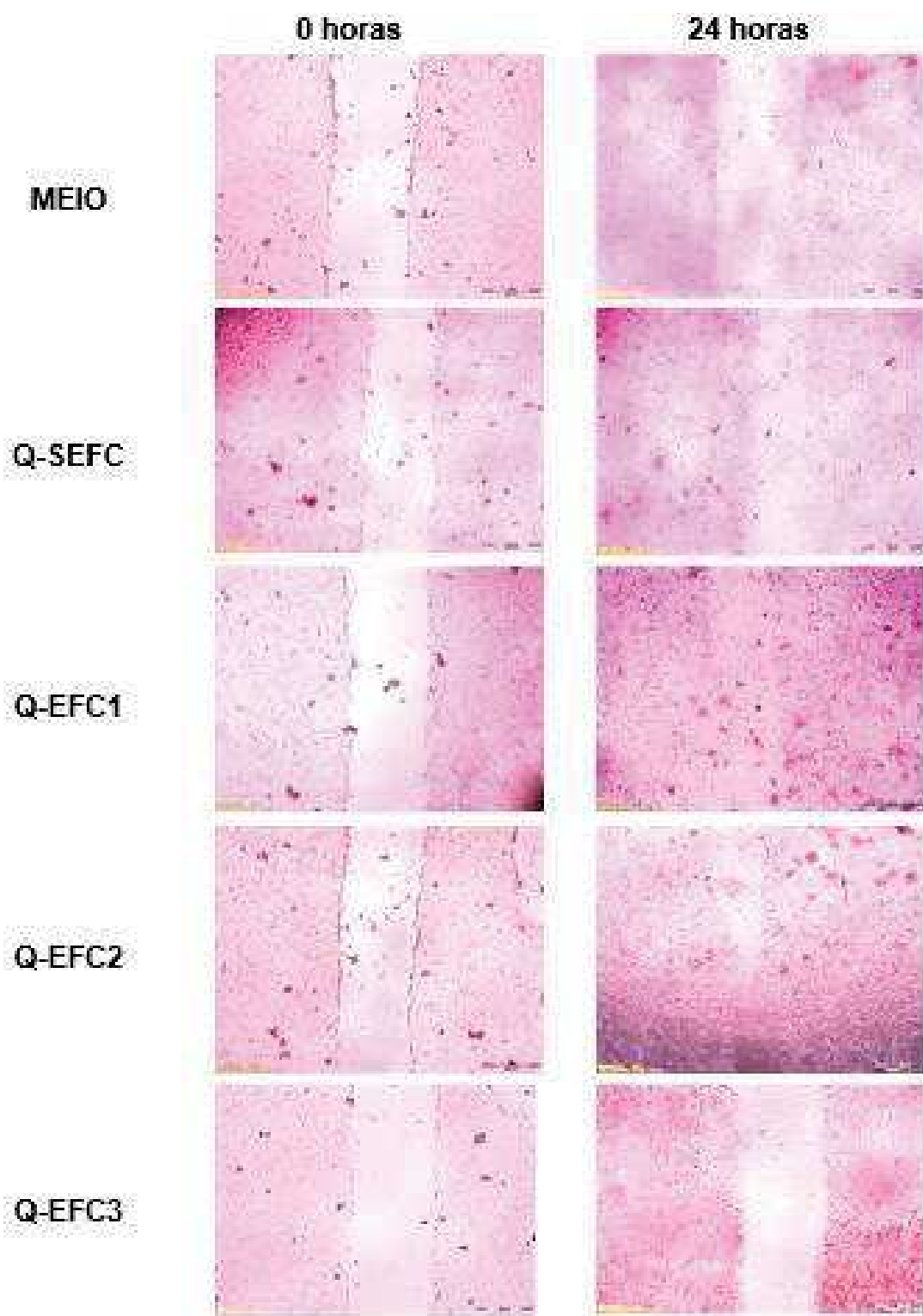
No decorrer do processo de cicatrização da ferida, a migração de fibroblastos provoca a contração da ferida, etapa essencial para desencadear o processo da cura. Desse modo, é de grande relevância investigar a migração de fibroblastos epidérmicos para a avaliação de novas terapias visando a cicatrização de feridas (COSTA et al., 2020).

No processo de cicatrização, a migração celular é decorrente de eventos coordenados que acarreta a regeneração do tecido lesado devido a diferenciação de alguns fibroblastos para miofibroblastos (BALBINO et al., 2005). A produção de actinmiosina nos miofibroblastos, induz o mecanismo de contração das feridas, resultando na redução da área de superfície da lesão (GONZALEZ et al., 2016). Além disso, os fibroblastos são responsáveis pela síntese de colágeno e elastina, bem como pela organização dos componentes da matriz extracelular (TRACY et al., 2016).

O *scratch assay* é caracterizado como um ensaio *in vitro* utilizado para avaliar a migração celular, o qual mimetiza-se uma ferida por meio de uma fricção mecânica em uma monocamada de células desenvolvida em placa de cultura. Em seguida, ocorre o monitoramento migratório das células e o possível fechamento da “ferida” com a exposição de substâncias ou formulações. Assim, é considerado um método vantajoso por evitar ensaios em animais, ser de fácil planejamento experimental, não exigir equipamentos robustos, além de permitir a obtenção de resultados em um curto período de tempo (COSTA et al., 2020; LIANG et al., 2007).

Nas figuras 40 e 41 são apresentadas as imagens comparativas referentes ao processo de migração celular da linhagem L929 no tempo 0 e após 24h e 48h de tratamento com os filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3, bem como para o controle (meio DMEM).

Figura 40: Imagens de migração de células L929 no tempo 0 e após 24h de tratamento com o controle (DMEM) e os filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3.

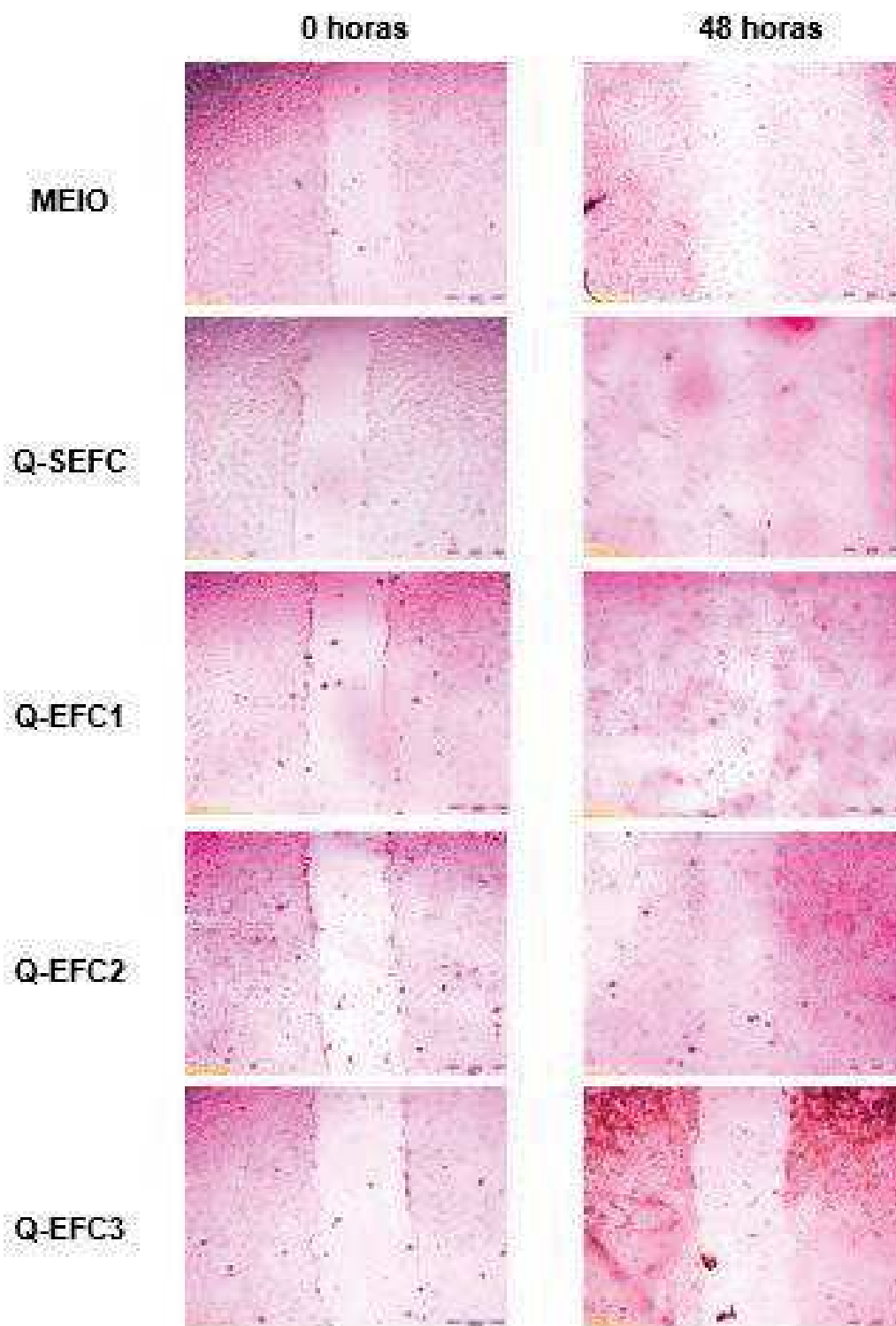


Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).



Figura 41: Imagens de migração de células L929 no tempo 0 e após 48h de tratamento com o controle (DMEM) e os filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3.

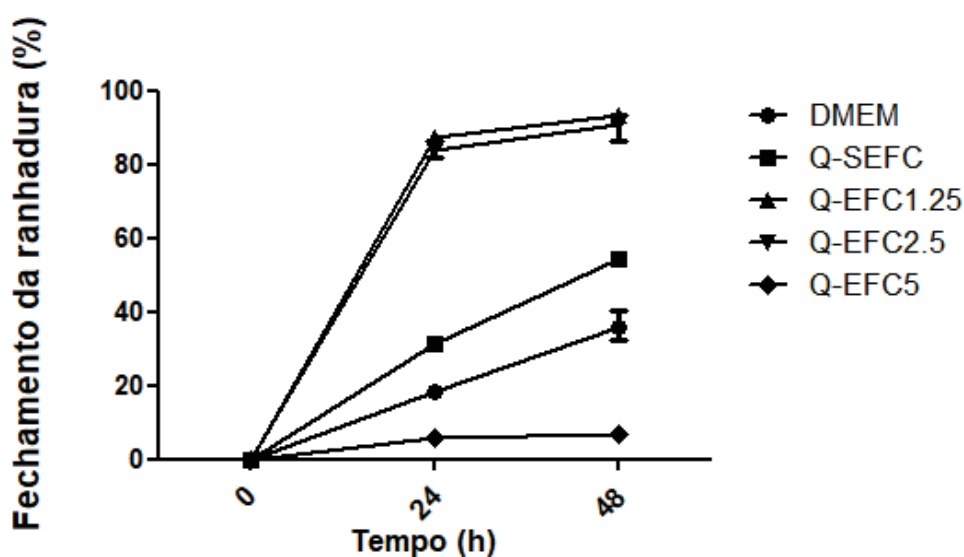


Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com 125 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com 250 mg/cm<sup>3</sup> de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com 500 mg/cm<sup>3</sup> de extrato.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Após exposição às células, os filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3 reduziram a área da ranhura em  $31,6 \pm 1,2\%$ ,  $87,2 \pm 1,2\%$ ,  $83,9 \pm 2,3\%$  e  $5,8 \pm 1,0\%$ , respectivamente, após 24h de tratamento. Para o grupo controle, essa redução foi de  $18,7 \pm 0,8\%$ . Após 48 h de incubação, houve uma redução de  $42,6 \pm 2,7\%$ ,  $54,0 \pm 1,8\%$ ,  $93,3 \pm 1,7\%$ ,  $90,8 \pm 4,0\%$  e  $6,7 \pm 1,1\%$ , para o grupo controle e os filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3, respectivamente (Figura 42).

Figura 42: Porcentagem de fechamento da área da ranhura em linhagem celular L929 após 24 e 48h de exposição aos filmes Q-SEFC, Q-EFC1, Q-EFC2 e Q-EFC3



Q-SEFC: Filmes de quitosana sem a incorporação do extrato; Q-EFC1: Filmes de quitosana com  $125 \text{ mg/cm}^3$  de extrato; Q-EFC2: Filmes de quitosana com  $250 \text{ mg/cm}^3$  de extrato; Q-EFC3: Filmes de quitosana com  $500 \text{ mg/cm}^3$  de extrato.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA (2022).

Como pode ser observado, os filmes de Q-SEFC propiciaram porcentagem de fechamento da área da ranhura significativamente maior que o grupo controle, após 24 e 48h de exposição às células ( $p < 0,05$ ). Nesse sentido, estudos da literatura descreveram resultados semelhantes ao encontrado em nosso estudo (BRÁS et al., 2020). Esse resultado pode ser explicado pela propriedade cicatrizante da quitosana, a qual é capaz de ativar fibroblastos, permitindo a formação de tecido fibroso e a reepitelização (PATRULEA et al., 2015). Além disso, a propriedade de cicatrização da quitosana é comprovada por meio da disponibilidade comercial de curativos contendo esse polímero (ChitoGauze XR pro<sup>®</sup>, ChitoFlex<sup>®</sup> e Axiostat<sup>®</sup>) (HAMED I et al., 2018).

Por sua vez, os resultados encontrados para os filmes Q-EFC1 e Q-EFC2 foram significativamente superiores em comparação à porcentagem de fechamento

da ranhura obtidos para filmes Q-SEFC e o meio DMEM ( $p < 0,05$ ). Esse resultado pode indicar um efeito sinérgico entre a quitosana e os constituintes do extrato de folhas de *C. arabica* L. e representa evidência crucial para que os filmes possam ser utilizados futuramente como curativos bioativos. Nesse caso, é possível que a atividade do extrato seja devido à presença de quantidades significativas de mangiferina e 5-ACQ, os quais, como já descrito, apresentam propriedades cicatrizantes bastante promissoras (BAGDAS et al., 2014; ALLAW et al., 2020; LWIN et al., 2021).

Por fim, constatou-se, de modo surpreendente, que a porcentagem de migração dos fibroblastos a partir da exposição ao filme Q-EFC3 foi significativamente inferior às demais amostras, incluindo o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Esse resultado pode ser explicado com base no postulado na Lei de Arndt-Schulz, que afirma que “uma dose de baixa concentração de um ativo irá estimular a atividade celular, enquanto que altas concentrações podem inibir o crescimento celular” (CHIN et al., 2018). Nesse contexto, resultados de outros trabalhos corroboram nossa observação (CHIN et al., 2018; SOUBHAGYA et al., 2020). Tal comportamento pode ser também atribuído ao maior teor de compostos inorgânicos no filme mais concentrado, o qual pode prejudicar o processo de desenvolvimento celular.

## CONCLUSÃO

O extrato hidroalcolico das folhas de *C. arabica* L. apresentou teores significativos de fenolicos totais, 5-ACQ e mangiferina, ainda exerceu atividade antioxidante por meio dos ensaios do sequestro do radical DPPH●, do poder de reducao do complexo fosfomolibdenio e de co-oxidacao do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Além disso, apresentou atividade antimicrobiana relevante para bactérias Gram-positivas como *S. aureus* e *S. epidermidis* e ausencia de citotoxicidade frente à linhagem celular L929. Dessa forma, apresenta potencial para utilização no tratamento de feridas.

Os filmes elaborados apresentaram boa uniformidade no peso e espessura. Ademais, houve um aumento na coloração, opacidade, umidade, solubilidade e intumescimento de acordo com o aumento da incorporação do extrato de folhas de *C. arabica* L. Eles ainda demonstraram estabilidade térmica acima de 40° C, exibiram baixos padrão de ruptura na análise mecânica e propiciaram o controle na liberação *in vitro* dos compostos 5-ACQ e mangiferina após 24h. No ensaio de espectroscopia na região do infravermelho, foi possível analisar bandas características da quitosana e do extrato de folhas de *C. arabica* L., bem como identificar interações intermoleculares entre ambos os compostos. Além disso, os filmes elaborados não induziram efeitos tóxicos na linhagem celular L929 e apresentaram atividade antimicrobiana frente à bactérias Gram-positivas. Nesse caso, a incorporação do extrato promoveu uma potencialização na inibição da zona de crescimento bacteriano, possivelmente devido à presença da mangiferina. Por fim, os filmes Q-EFC1 e Q-EFC2 propiciaram relevante migração celular no ensaio de cicatrização *in vitro*. Em conjunto, esses resultados indicam que os filmes acrescidos do extrato das folhas de *C. arabica* L. podem ser alternativa promissora para a utilização no tratamento de feridas.

Frisa-se que este é o primeiro relato de caracterização fisico-química e biológica dos filmes desenvolvidos, de forma que mais estudos devem ser realizados com o objetivo de confirmação do potencial terapêutico dos mesmos.

## REFERÊNCIAS

- ABBA, M.; HUSSAIN, T.; ARSHAD, M.; ANSARI, A.R.; IRSHAD, A.; NISAR, J.; et al. Wound healing potential of curcumin cross-linked chitosan/ polyvinyl alcohol. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 140, p. 871–876, 2019.
- ABRAS, S.K.; AZIZI, M., H.; HAMIDY, Z.; BAGHERIPOORFALLAH, N. Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based coatings as a function of the incorporation of gel of *Aloe vera*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2058–2062, 2012.
- ACIDRI, R.; SAWAI, Y.; SUGIMOTO, Y.; HANDA, T.; SASAGAWA, D.; MASUNAGA, T.; et al. Phytochemical profile and antioxidant capacity of coffee plant organs compared to green and roasted coffee beans. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p.1- 17, 2020.
- AKYUZ, L.; KAYA, M.; MUJTABA, M.; ILK, S.; SARGIN, I.; ASIER M.; et al. Supplementing capsaicin with chitosan-based films enhanced the anti-quorum sensing, antimicrobial, antioxidant, transparency, elasticity and hydrophobicity. **Int J Biol Macromol**, v.115, p.438-446, 2018.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKI, E.; MITAKU, S.; CHINOUE, I.B. Composition and antimicrobial activity of de essential oils of two organum species. **J Agr Food Chem**, n.40, p.4168-4170, 2001.
- ALLAW, M.; VILLA, M.P.; MANCA, M.L.; CADDEO, C.; ARUFO, M.; NACHER, A. et al. Innovative strategies to treat skin wounds with 107angiferina: fabrication of transfersomes modified with glycols and mucin. **Nanomedicine**, v.15, n.17, o,2020-2016, 2020.
- ALMEIDA, J.M.D.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Revista Ciência eTecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.446-452, 2006.
- ALMEIDA, R.F.; TREVISAN, M.T.S.; THOMAZIELLO, R.A.; BREUER, A.; KLIKA, K.D.; ULRICH, C.M.; et al. Nutraceutical compounds: Echinoids, flavonoids, xanthones and caffeine identified and quantitated in the leaves of *Coffea arabica* trees from three regions of Brazil. **Food Research International**, v.115, p. 493-503, 2019.
- 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.
- AMMAR, H.O.; SALAMA, H.A.; EL-NAHHAS, S.A.; ELMOTASEM, H. Design and evaluation of chitosan films for transdermal delivery of Glimepiride. **Current Drug Delivery**, v. 5, n.4, p. 290-298, 2008.
- ASHIHARA, H.; LUDWIG, I.A.; KATAHIRA, R.; YOKOTA, T.; FUJIMURA, T.;

CROZIER, A. Trigonelline and related nicotinic acid metabolites: occurrence, biosynthesis, taxonomic considerations, and their roles in planta and in human health. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, p. 765–798, 2015.

AZEVEDO, A.B.A.; KIECKBUSH, T.G.; TASHIMA, A.K.; MOHAMEDA, R.S.; MAZZAFERA, P.; MELO, S.A.B.V. Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, p. 186–192, 2008.

BAGDAS, D.; GUL, N.Y.; TOPAL, A.; TAS, S.; OZYIGIT, M.O.; et al. Pharmacologic overview of systemic chlorogenic acid therapy on experimental wound healing. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v.387, n.11, p.1101–1116, 2014.

BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M.H.; RAHIMI, R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, p. 601–617, 2014.

BAJKO, E.; KALINOWSKA, M.; BOROWSKI, P.; SIERGIEJCZYK, L.; LEWANDOWSKI, W. 5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. **Food Science and Technology**, v.65, p.471-479, 2016.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, p. 27-51, 2005.

BANERJEE, S.; BAGCHI, B.; BHANDARY, S.; KOOL, A.; HOQUE, N.A.; BISWAS, P.; et al. Antimicrobial and biocompatible fluorescent hydroxyapatite-chitosan nanocomposite films for biomedical applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.171, p.300–307, 2018.

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

BARBOSA, L.C.A. **Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2011.

BARNES, H.A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. An Introduction to Rheology, 5th ed. Amsterdam: ELSEVIER Science Publishers B.V., 1998.

BAXTER, R.M.; DAI, T.; KIMBALL, J.; WANG, E.; HAMBLIN, M.R.; WIESMANN, W.P.; et al. Chitosan dressing promotes healing in third degree burns in mice: Gene expression analysis shows biphasic effects for rapid tissue regeneration and decreased fibrotic signaling. **Journal of Biomedical Materials Research** v.101, n.2, p. 340-8, 2013.

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

BRÁS, T.; ROSA, D.; GONÇALVES, A.C.; GOMES, A.C.; ALVES, V.D.; CRESPO, J.G.; 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.

CAMARGO, M.B.P. Impacto da variabilidade e da mudança climática na produção de café arábica no Brasil. **Bragantia**, v.69, n. 1, p. 239-247, 2010.

CAMPA, C.; MONDOLOT, L.; RAKOTONDRAVAO, A.; BIDEL, LP.; GARGADENNEC, A.; COUTURON, E.; et al. A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. **Annals of Botany**, v.110, p.595–613, 2012.

CAMPA, C.; URBAN, L.; MONDOLOT, L.; FABRE, D.; ROQUES, S.; LIZZI, Y.; et al. Juvenile coffee leaves acclimated to low light are unable to cope with a moderate light increase. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1-16, 2017.

CAMPOS, A.C.L.; BRANCO, A.B.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n.1, p. 51-8, 2007.

CARVALHO, F.G.; MAGALHÃES, T.C.; TEIXEIRA, N.M.; GONDIM, B.L.C.; CARLO, H.L.; SANTOS, R.L.; et al. Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation. **Materials Science & Engineering**, v.C 104, 109885, 2019.

CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W.W.; SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffees specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**; v. 40, p. 1155–1163, 2002.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, 1998.

CERQUEIRA, M., A.; SOUZA, B., W.; TEIXEIRA, J, A.; VICENTE, A. A. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films – A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 175-184, 2012.

CHABALA, L.F.G.; CUARTAS, C.E.E.; LÓPEZ, M.E.L. Release behavior and antibacterial activity of chitosan/alginate blends with aloe vera and silver nanoparticles. **Marine Drugs**, v.15, n.10, p.328-341, 2017.

CHARERNSRIWILAIWAT, N.; ROJANARATA, T.; NGAWHIRUNPAT, T.; SUKMA, M.; OPANASOPIT, P. Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with *Garcinia mangostana* extracts. **Int J Pharm**, v.16, n.1-2, p.333-43. 2013.

CHEN, W.P.; WU, L.D. Chlorogenic acid suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced inflammatory mediators in human chondrocytes. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v.7, n.12, p.8797-8801, 2014.

CHEN, X. A review on coffee leaves: Phytochemicals, bioactivities and applications, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.59, n 6, p.1008-1025, 2019.

CHEN, X.M.; MA, Z.; KITTS, D.D. Effects of processing method and age of leaves on phytochemical profiles and bioactivity of coffee leaves. **Food Chemistry**, v.249, p.143–153, 2018.

CHEN, X.; MU, K.; KITTS, D. Characterization of phytochemical mixtures with inflammatory modulation potential from coffee leaves processed by green and black tea processing methods. **Food Chemistry**, v. 271, n. 15, p. 248-58, 2019.

CHEN, Z.; HU, H.; LI, J.; ZHANG, C.; GAO, F; MA, X.; et al. A feasible biocompatible hydrogel film embedding *Periplaneta americana* extract for acute wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. .2019.

CHIN, C.Y.; JALIL, J.; NG, P.Y.; NG, S.F. Development and formulation of Moringa oleifera standardised leaf extract film dressing for wound healing application. **Journal of Ethnopharmacology**, v.212, p.188–199, 2018.

CLINICAL STANDARD LABORATORY INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility** Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24. CLSI, 2014.

COLOBATU, L.; GAVAN, A.; MOCAN, A.; BOGDAN, C.; MIREL, S.; TOMUTA, I. Development of bioactive compounds loaded chitosan films by using a QbD approach– A novel and potential wound dressing matéria. **Reactive and Functional Polymers**, v.138, p.46–54, 2019.

CORDEIRO, P.H.Y.; ZANDONAI, C.H.; GENESI, B.P.; LOPES, P.S.; LOPEZ, E.S.; et al. Development of chitosan/silver sulfadiazine/zeolite composite films for wound dressing. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 535; p.1-22, 2019.

COSTA, N.N.; LOPES, L.F.; FERREIRA, D.F.; PRADO, E.M.L.P.; SEVERI, J.A.; et al. Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/ PAA blends for use as wound dressing: *In vitro* analysis and physicochemical evaluation. **Materials Science & Engineering**, v. 109, 110643, 2020.

COSTA S.; ABRANCHES R.P.; GARCIA, M.T.; PIERRE, M.B. Chitosan-based mucoadhesive films containing 5-aminolevulinic acid for buccal cancer's treatment. **J Photochem Photobiol B**. v.140, p.266-75, 2014.

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.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L.H; FRANCISCO, A.; SANTO, M.L.P.E.; TEIXEIRA, E. Quitosana: Um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.16, n.2, p.195-205, 2005.

DAVIS, A.P.; GOVARTS, R.; BRIDSON, D.M.; STOFELN, P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (*Rubiaceae*). **Botanical Journal of the**



**Linnean Societ**, v.152, p.465–512, 2006.

DAVIS, R.; MARKHAN, A.; BALFOUR, J.A. Ciprofloxacin. An updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. **Drugs**, v.51, n.6, p.1019-74, 1996.

DEBONE, H.S.; LOPES, P.S.; SEVERINO, P.; YOSHIDA, C.R.P.; SOUTO, E.B.; SILVA, C.F. 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.

DHIVYA, S.; PADMA, V.V.; SANTHINI, E. Wound dressings: A review. **Biomedicine**, v.5, n.4, p. 24-28, 2015.

DÍEZ-PASCUAL, A.M.; VICENTE, A.L.D. Wound Healing Bionanocomposites Based on Castor Oil Polymeric Films Reinforced with Chitosan-Modified ZnO Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 16, p.2631–2644, 2015.

DOMINGUES-JÚNIOR, A.P.; SHIMIZU, M.M.; MOURA, J.C.M.S.; CATHARINO, R.R.; RAMOS, R.A.; RIBEIRO, R.V.; et al. Looking for the physiological role of anthocyanins in the leaves of *Coffea arabica*. **Photochemistry and Photobiology**, v.88, p.928–937, 2012.

DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, v.31, n.7, p.1184-1187, 1959.

DU, S.; LIU, H.; LEI, T.; XIE, X.; WANG, H.; HE, X.; et al. Mangiferin: An effective therapeutic agent against several disorders (Review). **Molecular medicine reports**, v.18, p.4775-4786, 2018.

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.

FERNANDES, F.P. Desenvolvimento e caracterização de filmes e comprimidos bucais a base de pectina e goma gelana para liberação tópica de triancinolona. 2017. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

FERRAZ, A. **Cultura do café**: Curso técnico e profissionalizante. Minas Gerais: Instituto Formação, 2013.

FERREIRA-JÚNIOR, L.G.; SILVA, F.M.; FERREIRA, D.D.; SALES, R.S. Recomendação para colheita mecânica do café baseado no comportamento de vibração das hastes derriçadoras. **Ciência Rural**, v.46, n.2, p.273-278, 2016.

FITZMAURICE S.D.; SIVAMANI, R.K.; ISSEROFF R.R. Antioxidant Therapies for Wound Healing: A Clinical Guide to Currently Commercially Available Products. **Skin Pharmacol Physiol**, v.24, p.113–126, 2011.

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

FRESHNEY, R. **Culture of animal's cells**: A manual of basic technique. New York: 1987.

FRIEDMAN, A.J.; PHAN, J.; SCHAIRER, D.; CHAMPER, J.; QIN, M.; PIROUZ, A.; et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan-alginate nanoparticles: a targeted therapy for cutaneous pathogens. **Journal of Investigative Dermatology**, v.133, n.5, p.1231–1239, 2013.

GADKARI, P.V.; BALARAMAN, M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. **Food and bioproducts processing**, v.93, p.122–138, 2015.

GÓMEZ, R.R.; VANHEUVERZWJIN, J.; SOUARD, F.; DELPORTE, C.; STEVIGNY, C.; STOFFELEN, P.; et al. Determination of three main chlorogenic acids in water extracts of coffee leaves by liquid chromatography coupled to an electrochemical detector. **Antioxidants**, v.7, n.10, p.1-14, 2018.

GONZALEZ, A.C.O.; COSTA, T.F.; ANDRADE, Z.A.; MEDRADO, A.R.A.P. Wound healing: A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.91, n.5, p.614-20, 2016.

HAN, H.S.; SONG, K.B. Antioxidant activities of mandarin (*Citrus unshiu*) peel pectin films containing sage (*Salvia officinalis*) leaf extract. **International Journal of Food Science and Technology**, v.55, n.9, p. 1-9, 2020.

HANNAN, A.; ASGHAR, S.; NAEEM, T.; ULLAH, M.I.; AHMED I.; ANEELA, S.; et al. Antibacterial effect of mango (*Mangifera indica* Linn.) leaf extract against antibiotic sensitive and multi-drug resistant *Salmonella typhi*. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v.26, n.4, p.715-719, 2013.

HAILEMESKEL, B.; FULLAS, F. The use of freshly roasted coffee bean powder in the treatment of burn wound: A case report. **The Open Dermatology Journal**, v.1, n.2, p. 42-46, 2016.

HAMED, H.; MORADI, S.; HUDSON, S.M.; TONELLI, A.E. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. **Carbohydr Polym.** v.1, p.199:445-460, 2018.

HATAMI, T.; EMAMI, S.A.; MIRAGHAEI, S.S.; MOJARRA, M. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Different Extracts and Fractions from the Aerial Parts of *Artemisia biennis* Willd. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.13, n.2, p.551-558, 2014.

HECKMAN, M.A.; WELL, J.; MEJLA, E.G. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of Food Science**, v.75, n.3, p.77-87, 2010.

HERNANDEZ, I.; ALEGRE, L.; BREUSEGEM, F.V.; MUNNE-BOSCH, S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? **Trends in Plant Science**, v.14, n.3, p.125- 132, 2009.

HUMARYANTO; AVE, O.R. Exploring the potential of green coffee extract for wound healing treatment. IOP Conf. Series: **Earth and Environmental Science**, v.391, 2019.

ISAAC, C.; LADEIRA, P.R.S.; RÊGO, F.M.P.; ALDUNATE, J.C.B.; FERREIRA, M.C. Processo de cura das feridas: Cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina (São Paulo)**, v.89, n 3/ 4, p.125-31, 2010.

ISO 10993 -5: 2009 - Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Disponível em <https://www.iso.org/standard/36406.html>, acesso em 01 dezembro 2021.

JAISAN, C.; PUNBUSAYAKUL, N. Development of coffee pulp extract-incorporated chitosan film and its antimicrobial and antioxidant activities. **KKU Res. J.**, v.21, n.2, p.140-149, 2016.

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

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; KUMAR, P.T.S.; NAIR, S.V.; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**, v.29, p.322–337, 2011.

JEON, J.S.; KIM, H.T.; JEONG, I.H.; HONG, S.R.; OH, M.S.; YOON, M.H.; et al. Contents of chlorogenic acids and caffeine in various coffee-related products. **Journal of Advanced Research**, v.17, p.85–94, 2019.

JYOTSHNA; KHARE, P.; SHANKER, K. Mangiferin: A review of sources and interventions for biological activities. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.12, n.5, p.504-514, 2016.

KAMINIDEVI, S.; KIM, H.; SARAVANA, P.S.; CHUN, B.; KANG, H.W. Fabrication of multifunctional chitosan-based nanocomposite film with rapid healing and antibacterial effect for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.118, p.1713-1725, 2018.

KANGAL, M.K.O.; REGAN, J.P. Wound healing. [Updated 2020 Apr 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535406/>

KAUSAR, R.; KHAN, A.; JAMIL, B.; SHAHZAD, Y.; HAQ, I. Development and

pharmacological evaluation of vancomycin loaded chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 256, p. 117565, 2021.

KIM C.Y.; AHN, M.J.; KIM, J: Preparative isolation of mangiferin from anemarrhena asphodeloides rhizomes by centrifugal partition chromatography. **J Liq Chromatogr Relat Technol**, v.29, p.869-875, 2006.

KIM, M.Y.; HA, H.K.; AYU, I.L.; HAN, K.S.; LEE, W.J.; LEE, R.M. Manufacture and Physicochemical Properties of Chitos Oligosaccharide/A2  $\beta$ -Casein Nano-Delivery System Entrapped with Resveratrol. **Food Sci Anim Resour**, v.39, n.5, p831-834, 2019

KIM, T.H.; LIM, H.J.; KIM, M.S.; LEE, M.S. Dietary supplements for benign prostatic hyperplasia: An overview of systematic reviews. **Maturitas**, v.73, p.180– 185, 2012.

KHAN, R. A.; KHAN, S.; SALMIERI, C. L.; TIEN, B.; RIEDL, J.; BOUCHARD, G.; et al. Lacroix, mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films, **Carbohydr. Polym.**, v.90, p. 1601-1608, 2012.

KHARAZIAN, N.A.; VASAFI, H.I. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/nanocrystalline cellulose/calcium peroxide films for potential wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 133, p.881–891, 2019.

KLEIN, A.M.; DEWENTER, I.S.; CHARNTKE, T. Bee pollination and fruit set of *Coffea arabica* and *C. canephora* (*Rubiaceae*). **American Journal of Botany**, v.90, n.1, p.153–157, 2003.

KÖLLING-SPEER, I.; KURT, A.; NGUYEN, T.H.U; SPEER, K. Diterpenes in coffee leaves. In: 17th **International Colloquium on the Chemistry of Coffee**: Paris, 1997.

KRAVANJA, G.; PRIMOŽIČ, M.; KNEZ, Z.; LEITGEB, M. Chitosan-based (nano) materials for novel biomedical applications. **Molecules**, v.24, n.10, p.1960, 2019.

KUETE, V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. **Planta Med.**, v.76, n.14, p.1479-91, 2017.

KUMAR, B.; VIJAYAKUMAR, M.; GOVINDARAJAN, R.; PUSHPANGADAN, P. Ethnopharmacological approaches to wound healing exploring medicinal plants of India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p.103-113, 2007.

LANIA, B.G.; MORARI, J.; SOUZA, A.L.D.; SILVA, M.N.; ALMEIDA, A.R.; VEIRA-DAMIANI, G.; et al. Topical use and systemic action of green and roasted coffee oils and ground oils in a cutaneous incision model in rats (*Rattus norvegicus albinus*). **PLoS One**, v.12, n.12, p e0188779, 2017.

LANNA, E.G. **Composições nanoestruturadas de Bryophyllum Pinnatum (Lam.) Oken com  $\beta$ -ciclodextrina**. Dissertação (Mestrado- Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Juiz de Fora; 2015.

LIANG, A.Y.; PARK, J.L. Guan, *In vitro* scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration, **Nat. Protoc.** v.2, n.2, p. 329–333, 2007.

LI, X.; MA, M.; AHN, D.U.; HUANG, X. Preparation and characterization of novel eggshell membrane-chitosan blend films for potential wound-care dressing: From waste to medicinal products. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.123, p.477-484, 2019.

LOADER, T.B.; TAYLOR, C.G.; ZAHRADKA, P.; JONES, P.J. Chlorogenic acid from coffee beans: evaluating the evidence for blood pressure regulation health claim. **Nutrition Reviews**, v. 75, n. 2, p. 114-133, 2017.

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **J Neurosci Methods**, v. 96, n. 2, p. 147-52, 2000.

LUDWIG, I.A.; CLIFFORD, M.N.; LEAN, M.E.J.; ASHIHARAD, H.; CROZIER, A. *Coffee*: Biochemistry and potential impact on health. **Food & Function**, v.5, p.1695–1717, 2014.

LWIN, O.M.; GIRIBABU, N.; KILARI, E.K., SALLEH, N. Topical administration of mangiferina promotes healing of the wound of streptozotocin-nicotinamide-induced type-2 diabetic male rats. **J Dermatolog Treat.**, v.32, n.8, p.1039-1048, 2021.

MA, L.; LIN, X.M. Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health. **Society of Chemical Industry**, v.90, p.2–12, 2010.

MANDELBAUM, S.H.; SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrization: Current concepts and auxiliary resources - Part I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, n.4, p.393-410, 2003.

MALAFRONTA, N.; PESCA, M.S.; BISIO, A.; ESCOBAR, L.M.; DE TOMMASI, N. "New flavonoid glycosides from vernonia ferrugínea." **Natural Product Communications**, v.4, n.12, p.1639–1642, 2009.

MARQUES, P.; MARTO, J.; GONÇALVES, L.M.; PACHECO, R.; FITAS, M.; PINTO, P.; et al. *Cynara scolymus* L.: A promising Mediterranean extract for topical anti-aging prevention. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 699-706, 2017.

MARTINEZ, H.E.P.; CLEMENTE, J.M.; LACERDA, J.S.; NEVES, Y.P.; PEDROSA, A.W. Nutrição mineral do cafeeiro e qualidade da bebida. **Revista Ceres**, v.61, p.838-848, 2014.

MATTA, F.M.; AVILA, R.T.; CARDOSO, A.A.; MARTINS, S.C.V.; RAMALHO, J.G. Physiological and agronomic performance of the coffee crop in the context of climate change and global warming: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.66, p.5264–5274, 2018.

MAVER, T.; MAVER, U.; KLEINSCHEK, K.S.; SMRKE, D.M.; KREFT, S. A review of herbal medicines in wound healing **International Journal of Dermatology**, v.54, n.7, p. 740-51, 2015.

MAZLAN, N.A.; AZMAN, S.; GHAZALI, N.F.; YUSRI, P.Z.S.; IDI, H.M.; ISMAIL, M., et al Synergistic antibacterial activity of mangiferin with antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Drug Invent Today**, v.12, p.14–17, 2019.

MAZZAFERA, P. Mineral nutrition and caffeine content in coffee leaves. **Bragantia**, v.58, n.2, p.387-391, 1999.

MCCOLL, D.; CARTLIDGE 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, G.A.; SHIMIZU, M.M.; MAZZAFERA, P. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. **Phytochemistry**, v.67, p.277–285, 2006.

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.

MENGATTO, L.; HELBLING, M.I.; LUNA, A.J. Recent advances in chitosan films for controlled release of drugs. **Recent patents on drug delivery & formulation.**, v.6, n.2, p.156-170, 2012.

MESS, C.; SOUARD, F.; DELPORTE, C.; DECONINCK, E.; STOFFELEN, P.; STÉVIGNY, C.; et al. Identification of coffee leaves using FT-NIR spectroscopy and SIMCA. **Talanta**, v.177, p.4-11, 2018.

MONENTE, C.; BRAVO, J.; VITAS, A.I.; ARBILLAGA, L.; PEÑA, M.P.; CID, C. Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. **Journal of Functional Foods**, v.12, p.365-374, 2015.

MONJE, A.F.B.; PARRADO, L. X.; GUTIÉRREZ-GUZMÁN, N. ATR-FTIR for discrimination of espresso and americano coffee pods. **Coffee Science**, v.13, n. 4, p. 550-558, 2019.

MONTEIRO, A.; COLOMBAN, S.; AZINHEIRA, H.G.; GUIMARÃES, L.G.; SILVA, M.C.; NAVARINI, L; et al. Dietary antioxidants in coffee leaves: Impact of botanical origin and maturity on chlorogenic acids and xanthones. **Antioxidants (Basel)**, v.9, n.1, p.1- 16, 2020.

MORAIS, DCM., BARROS, P. O., TAMOS, E. F., ZUIM, N. R. B. Ação cicatrizante de substâncias ativas: d-pantenol, óleo de girassol, papaína, própolis e fator de crescimento de fibroblastos. **Rev. Foco**. v. 4, n.4, p. 83-97, 2013.

NASCIMENTO, E.A.; OLIVEIRA, L.E.M.; CASTRO, E.M.; FILHO, N.D.; MESQUITA, A.C.; VIEIRA, C.V. Alterações morfofisiológicas em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) consorciado com seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.852-857, 2006.

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

NGAMSUK, S.; HUANG, T.; HSU, J. Determination of phenolic compounds, procyanidins, and antioxidant activity in processed *Coffea arabica* L. leaves. **Foods**, v.8, n.9, p.389-402, 2019.

NOVAES, F.J.M.; JUNIOR, I.I.; SUTILI, F.K.; MARRIOTT, P.J.; BIZZO, H.R.; AQUINO-NETO, F.R.A.; et al. Lipase-catalysed esters synthesis of Cafestol and Kahweol. **Food Chemistry**, v.259, p.226-233, 2018.

NUHU, A.A. Bioactive micronutrients *in Coffee*: recent analytical approaches for characterization and quantification. **ISRN Nutr.** v.2014, p.1-13, 2014.

OECD. Test Guideline No. 439 - *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, 2010.

OJAGH, S., M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S., H.; HOSSEINI, S., M., H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with affinity toward water. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 161-166, 2010.

OLIVEIRA, A.R.; ABRISHAMKAR, A.; VELOSO, E.M.; OLIVEIRA, F.C.; SILVA, J.G.; PEREIRA, J.R., et al. Effect of composition on rheological behavior of iron oxides produced by hydrothermal method. **Ceramics International**, v.43, p.7436-7442, 2017.

OLIVEIRA, I.V.P.M.; DIA, R.V.C. Cicatrização de feridas: Fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.267-271, 2012.

ORHAN, D.D.; KUPELI, E.; YESILADA, E.; ERGUN, F. Antiinflammatory and antinociceptive activity of flavonoids isolated from viscum album ssp. **Zeitschrift f'ur Naturforschung**, v. 61, n. 1-2, p. 26–30, 2006.

ORSTED, H.L.; KEAST, D.; LALANDE, L.F.; FRANÇOISE, M. Basic principles of wound healing: An understanding of the basic physiology of wound healing provides the clinician with the framework necessary to implement the basic principles of chronic wound care. **Soins des plaies Canada**, v.9, n.2, p. 4- 12, 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v.6, p.153–162, 2000.

PANSARA, C.; MISHRA, R.; MEHTA, T.; PARIKH, A.; GARG, S. 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.

PANUSA, A.; ZUORRO, A.; LAVECCHIA, R.; MARROSU, G.; PETRUCCI, R.

Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.61, p.4162–4168, 2013.

PATEL, S.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, M.R.; SINGH D. Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.107, p.1888-1897, 2018.

PATRULEA, V.; OSTAFE, V.; BORCHARD, G.; JORDAN, O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.7, p.417–426, 2015.

PEREDA, M.; AMICA, G.; MARCOVICH, N. E. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1318-1325, 2012.

PEREIRA, R.F.; BARTOLO, P.J. Traditional therapies for skin wound healing. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v.5, n.5, p.208–229, 2016.

PIPATTANAWAROTHAI, A.; ATHIPORNCHAI, A.; SRIPREECHASAK, P.; TRAKULSUJARITCHOK, T. Development of polymeric hydrogels for potential biomedical applications: sol-gel synthesis and *in vitro* release of mangiferin. **วารสารวิทยาศาสตร์ ุรพา บัีหี**, n.2562, p.885-900, 2019.

PRATEEPCHANACHAI, S.; THAKHIEW, W.; DEVAHASTIN, S.; SOPONRONNARIT S. Mechanical properties improvement of chitosan films via the use of plasticizer, charge modifying agent and film solution homogenization. **Carbohydrate Polymers**, v.174, p.253-261, 2017.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; 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, n.2, p.337-341, 1999.

POMPELLI, M.F.; MARTINS, S.C.V.; ANTUNES, W.C.; CHAVES, A.R.M.; DAMATTA, F.M. Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. **Journal of Plant Physiology**, v.167, p.1052-1060, 2010.

POWERS, J.G.; MORTON, L.M.; PHILLIPS, T.J. Dressings for chronic wounds. **Dermatologic Therapy**, v.26, p.197–206, 2013.

RAMALHO, J.C.; REBELO, M.C.; SANTOS, M.E.; ANTUNES, M.L.; NUNES, M.A. Effects of calcium deficiency on *Coffea arabica*. Nutrient changes and correlation of calcium levels with some photosynthetic parameters. **Plant and Soil**, v.172, p. 87–96, 1995.

RAMBABU, K.; BHARATH, G.; BANAT, F.; SHOW, P.L.; COCOLETZI, H.H. Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 1234-1243, 2019.



- RANJBAR, R.; YOUSEFI, A. Effects of *Aloe Vera* and Chitosan Nanoparticle Thin-Film Membranes on Wound Healing in Full Thickness Infected Wounds with Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*. **Bulletin of Emergency and Trauma**, v.6, n.1, p.8-15, 2018.
- RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v.55, p.207–216, 2007.
- RATANAMARNO, S.; SURBKAR, S. Caffeine and catechins in fresh coffee leaf (*Coffea arabica*) and coffee leaf tea. **International Journal of Science and Technology**, v.11, n.3, p. 211-218, 2017.
- REIDY, B.; HAASE, A.L. A.; DAWSON, K.A.; AND LYNCH, I. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. **Materials**, v.6, n.6, p.2295-2350, 2013.
- REINKE, J.M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v.49, n.1, p.35-43, 2012.
- REN, Y.; WANG, C.; XU, J.; WANG, S. Cafestol and Kahweol: A review on their bioactivities and pharmacological properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, p.1-15, 2019.
- RICHARDS, D.M.C.; MONK, J.P.; PRICE, A.; BENFIELD, P.; TODD, P.A.; WARD, A. Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. **Drugs**, v.35, n.4, p. 373-447, 1988.
- ROOHANI, N.; HURRELL, R.; SCHULIN, R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. **Journal of Research in Medical Sciences**, v.18, n.2, p.144-157, 2013.
- ROSS, I. A. **Medicinal plants of the world**: 3.ed. New Jersey: Human Press, 2005.
- RUDKOWSKA, I.; ABUMWEIS, S.S.; NICOLLE, C.; JONES, P.J. Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols in low-fat yogurt consumed as a snack or with a meal. **Journal of the American College of Nutrition**, v.27, n.5, p.588-95, 2008.
- RUNTI, G.; PACOR, S.; COLOMBAN, S.; GENNARO, R.; NAVARINI, L.; SCOCCHI, M. Arabica coffee extract shows antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* and low toxicity towards a human cell line. **Food Science and Technology**, v.62, p.108-114, 2015.
- SAHARIAH, P.; MÁSSON, M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure-activity relationship. **Biomacromolécules**, v.18, n. 11, p. 3846-3868, 2017.
- SAHA, S.; SADHUKHAN, P.; SIL, P.S. Mangiferin: A xanthonoid with multipotent anti-inflammatory potential. **BioFactors**, v.42, n.5, p. 459-474, 2016.

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, M.D.; ALMEIDA, M.C.; LOPES, N.P.; SOUZA, G.E.P. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n.11, p.2236-2240, 2006.

SEGHEO, L.; SANTOS, B.C.S.; WERNECK, A.F.L.; VILELA, F.M.P.; SOUSA, O.V.; RODARTE, M.P. Antioxidant extracts of coffee leaves and its active ingredient 5-caffeoylquinic acid reduce chemically-induced inflammation in mice. **Industrial Crops & Products**, v.126, p.48–57, 2018.

SHAH, A.; BUABEID, M.A.; ARAFA, E.S.A.; HUSSAIN, I.; LI, L.; MURTAZA, G. 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.

SIMÕES, M.; BENNETT, R.; ROSA, E. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, v. 26, n.6, p. 746–757, 2009.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B.R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v.24, n.8, p 770-775, 2010.

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

SOUBHAGYA, A.S.; MOORTHY, A.; PRABAHARAN, M. Preparation and characterization of chitosan/pectin/ZnO porous films for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.157, p.135–145, 2020.

SOUZA, D.S. A Review of *in vitro* drug release test methods for nano-sized dosage forms. **Advances in Pharmaceutics**, p. 1-12, 2014.

SOUZA, G.A.A.D.; GARCIA, L.M.; ROCHA, S.S.; MACIEL, A.P. Microbiological profile of skin and soft tissue infections in hospitalized patients from a university hospital. **R Epidemiol Control Infec.**, v.6, n.1, p. 33-36, 2016.

SOUZA, V.G.L.; FERNANDO, A.L.; PIRES, J.R.A.; RODRIGUES, P.F.; LOPES, A.A.S.; FERNANDES, F.M.B. Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. **Industrial Crops and Products**, v.107, p.565-572, 2017.

SPADA, J.C.; SILVA, E.M.; TESSARO, I.C Production and characterization of pinhão starch biofilms. **Rev. Bras. Ciênc. Agrár**, v.9, n.3, p.365-369, 2014.

SPENCER, A.L.R., SPENCER, J.F.T. **Public Health Microbiology**: Methods and protocols first ed. Human Press Inc: Nem Jersey, 2004.

STEFANELLO, N.; SPANEVELLO, R.M.; PASSAMONTI, S.; PORCIÚNCULA, L.; BONAN, C.D.; OLABIYI, A.A.; et al. Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. **Food and Chemical Toxicology**, v.123, p.298-313, 2019.

SUÁREZ, L.F.; TULANDE, J.; MINA, J.H.; PEÑARANDA, J. Desarrollo de apósitos de quitosano para su posible aplicación en la regeneración de tejido epitelial, **J. Rev. Colom. Mat.** , v.5, p.56-63, 2014.

SÜNTAR, I.; AKKOL, E.K.; NAHAR, L.; SARKER, S.D. Wound healing and antioxidant properties: do they coexist in plants? **Free Radicals and Antioxidants**, v..2, n. 2, p. 1-7, 2012

TAJIK, N.; TAJIK, M.; MACK, I.; ENCK, P. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: A comprehensive review of the literature. **European Journal of Nutrition**, v.56, p.2215–2244, 2017.

THANGAPAZHAM, R.L.; SHARAD, S.; MAHESHWARI, R.K. Phytochemicals in wound healing. **Wound Healing Society**, v.5, n.5, p.230-241, 2016.

THEIN-HAN, W.W.; STEVENS, W.F. Transdermal delivery controlled by a chitosan membrane. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.30, n.4, p.397–404, 2004.

TOMAC, I.; SERUGA, M. Electrochemical Behaviour of Some Chlorogenic Acids and Their Characterization in Coffee by Square-Wave Voltammetry. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v.9, p. 6134 – 6154, 2014.

TRACY, L.E.; MINASIAN, R.A.; CATERSON, E.J. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound, **Adv. Wound Care**, v.5, n.3, p.119–136, 2016.

TRECCO, A.; BORGES, F.A.; PIERRI, E.G.; SANTOS, A.G.; CHIN, C.M.; HERCULANO, R.D. Liberação de componentes do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz empregando membranas de látex natural como suporte. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.35, n.1, p.89-95, 2014.

TREVISAN, M.T.S.; ALMEIDA, R.F.; SOTO, G.; FILHO, E.M.V.; ULRICH, C.M.; et al. Quantitation by HPLC-UV of mangiferin and isomangiferin in coffee (*Coffea arabica*) leaves from Brazil and Costa Rica after solvent extraction and infusion. **Food Analytical Methods**, v.9, p.1-7, 2016.

TURBIANI, F.R.B.; KIECKBUSCH, T.G.; GIMENES, M.L. Liberação de benzoato de cálcio de filmes de alginato de sódio reticulados com íons cálcio. **Revista Polímeros**, v. 21, p. 175-81, 2011.

UUSI-RASI, K.; KÄRKKÄINEN, M.U.; LAMBERG-ALLARDT, C.J. Calcium intake in health maintenance a systematic review. **Food & Nutrition Research**, v.57, p.1- 15, 2013.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **Journal of International Medical Research**, v.37, n.5, p.1528-42, 2009.

VYAS, A.; SYEDA, K.; AHMAD, A.; PADHYE, S.; SARKAR, F.H. Perspectives on medicinal properties of mangiferin. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.12, p.412-425, 2012.

XIAO, W.; HAN, L.; SHI, B. Microwave-assisted extraction of flavonoids from Radix astragali. **Sep Purif Technol**, v 62, p.614–8, 2008.

WALLACE, H.A.; BASEHORE, B.M.; ZITO, P.M. Wound healing phases. [Acesso em 22 de jun 2021. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. Acesso em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/>.

WAUTHOZ, N.; BALDE, A.; BALDE, E.S.; VANDAMME, M.; DUEZ, P. Ethnopharmacology of *Mangifera indica* L. bark and pharmacological studies of its main C-glucosylxanthone, mangiferin. **Int J Biomed Pharmaceutic Sci**. v.1, n.2, p.112–9, 2007.

WINTGENS, J.N. Coffee; Growing, processing, sustainable production, a guidebook for growers, processors, traders, and researchers, 2. ed. **Reference and Research Book News**, v. 28, n. 5, 2013.

YUE, P.Y.K.; LEUNG, E.P.Y.; MAK, NK.; WONG, R.N.S. A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates, **J Biomol Screen**, v.15, n.4, p. 427-433, 2010.

ZHANG, G.F.; LIU, X.; ZHANG, S.; PAN, B.; LIU, M.L. Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. **Eur J Med Chem**. v. 25, p.146:599-612, 2018.

ZHAO, Y.; WANG, Z.; ZHANG, Q.; CHEN, F.; YUE, Z.; ZHANG, T.; et al. Accelerated skin wound healing by soy protein isolate–modified hydroxypropyl chitosan composite films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.118, n. Pt A, p.1293-1302, 2018.

ZOCOLER, A.M.D.; SANCHES, A.C.C.; ALBRECHT, I.; MELLO, J. C. P. Antioxidant capacity of extracts and isolated compounds from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45 n. 3, p. 551-562, 2009.

ZOU, Q.; CAI, B.; LI, J.; LI, Y. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the chitosan/Tur composite film for wound healing applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v.28, n.7, p.601-615, 2017.

ZOU, T.; WU, H.; LI, H.; JIA, Q.; SONG, G. Comparison of microwave-assisted and conventional extraction of mangiferin from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. **Journal of Separation Science**, v.36, n.20, p.3457-3462, 2014.