

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

Júlia Bertolini Fajardo

**Biocurativos inovadores para o tratamento de feridas contendo Jambu
(*Acmella oleracea*): caracterização físico-química e avaliação de propriedades
multifuncionais.**

Juiz de Fora

2023

Júlia Bertolini Fajardo

**Biocurativos inovadores para o tratamento de feridas contendo Jambu
(*Acmella oleracea*): caracterização físico-química e avaliação de propriedades
multifuncionais.**

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Thaís Nogueira Barradas

Juiz de Fora

2023

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

Bertolini Fajardo, Júlia.

Biocurativos inovadores para o tratamento de feridas contendo Jambu (*Acmella oleracea*): caracterização físico-química e avaliação de propriedades multifuncionais. / Júlia Bertolini Fajardo. -- 2023.

150 f. : il.

Orientador: Rodrigo Luiz Fabri

Coorientadores: Guilherme Diniz Tavares, Thaís Nogueira Barradas

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica.

Programa de

Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. Produtos naturais. 2. Asteraceae. 3. Curativo. 4. Polímero. I. Luiz Fabri, Rodrigo, orient. II. Diniz Tavares, Guilherme, coorient. III. Nogueira Barradas, Thaís, coorient. IV. Título.

Júlia Bertolini Fajardo

**Biocurativos inovadores para o tratamento de feridas contendo Jambu
(*Acmella oleracea*): caracterização físico-química e avaliação de propriedades
multifuncionais.**

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

Aprovada em 30 de novembro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rodrigo Luiz Fabri – Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

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

Dra. Thaís Nogueira Barradas - Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Juliana Perdiz Senna

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Michele Munk Pereira

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 07 / 11 / 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Luiz Fabri, Professor(a)**, em 30/11/2023, às 14:32, 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 01/12/2023, às 09:44, 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 **Michele Munk Pereira, Professor(a)**, em 01/12/2023, às 14:02, 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 **Juliana Perdiz Senna, Usuário Externo**, em 04/12/2023, às 18:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thais Nogueira Barradas, Professor(a)**, em 05/12/2023, às 00:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1564202** e o código CRC **07434758**.

AGRADECIMENTOS

Como dizia Aristóteles “O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”. A decisão pela defesa e realização da ciência nunca foi fácil, em especial nos tempos de obscurantismo e negacionismo em que vivemos. Portanto, é preciso coragem, determinação, força e paciência para vencer o retrocesso e fortalecer a disseminação do conhecimento. Porém, nada disso é possível sem o empenho coletivo e o apoio de pessoas que acreditam em nossas escolhas e lutas.

Agradeço imensamente aos meus pais, Eliane e Cláudio, por todo apoio, incentivo e ensinamento durante a minha caminhada. Ao meu irmão, Henrique, às minhas avós e tias por todo amor e carinho de sempre. Ao meu parceiro, amigo e amor, Felipe, que esteve comigo durante estes anos, sempre me motivando, acreditando e acalmando.

Agradeço também aos meus amigos queridos Thalita, Mariane e Victor por sempre estarem ao meu lado desde que nos encontramos pela primeira vez em 2014. Aos meus queridos colegas do LPNB, obrigada por todo ensinamento, acolhimento, auxílio, apoio e momentos felizes.

Por fim, e não menos importante, agradeço imensamente ao meu orientador, Rodrigo, por ter me acolhido no início da pós-graduação em um momento decisivo de minha trajetória acadêmica. Obrigada por contribuir para o meu aprendizado e acreditar no meu potencial. Agradeço também aos meus coorientadores Thaís e Guilherme por todo apoio.

*“Nada a temer, senão o correr da luta.
Nada a fazer, senão esquecer o medo.”*

(Milton Nascimento)

RESUMO

O envelhecimento e doenças crônicas estão relacionados ao aumento dos casos de feridas de difícil cicatrização. Em 2021, o gasto global com o tratamento de feridas alcançou 3,5 bilhões de dólares. Biocurativos poliméricos possibilitam uma nova abordagem para o reparo de lesões cutâneas. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo desenvolver biocurativos de quitosana incorporados com o extrato metanólico das folhas de *Acmella oleracea*, bem como realizar a caracterização físico-química e biológica da formulação, visando o tratamento de feridas. As folhas de *A. oleracea* foram trituradas e submetidas a maceração com metanol 99,8%, obtendo o extrato metanólico (AOM). Por meio da técnica de *UFLC-QTOF-MS*, foi verificada a presença de compostos fenólicos e das alquilamidas, como o espilantol, principal composto bioativo da planta. O extrato não induziu efeitos tóxicos em fibroblastos L929 e macrófagos murinos. AOM foi capaz de reduzir a produção celular de mediadores inflamatórios IL-6, TNF- α , NO e CLs, em macrófagos, em 100%, 96,66%, 46,06%, 97,72%, respectivamente, na maior concentração testada (300,00 $\mu\text{g/mL}$). Efeitos antioxidantes também foram observados para AOM com valores de CI_{50} de $44,50 \pm 4,46$ e $127,6 \pm 14,42$ $\mu\text{g/mL}$, nos ensaio de inibição dos radicais DPPH• e NO, respectivamente, AAR% de $63,56 \pm 13,01$ a quercetina e AAR% de $104,01 \pm 21,29$ a rutina, no ensaio de poder de redução do fosfomolibdênio, e porcentagem de inibição da peroxidação lipídica de 63,69%, no ensaio de inibição da formação de MDA. Além disso, em macrófagos intraperitoneais, observou-se uma redução de 61,38% da produção celular de espécies reativas de oxigênio. AOM apresentou atividade antimicrobiana de moderada a alta, com $\text{CIM} \leq 1000$ $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *C. albicans*. Os filmes poliméricos foram preparados pelo método de evaporação do solvente com quitosana a 2% (p/v), na ausência (Q-BR) e na presença de diferentes concentrações de AOM (Q-AOM5%, Q-AOM2,5% e Q-AOM1%). Os filmes exibiram peso e espessura uniformes e boa capacidade de intumescimento. Imagens de MEV mostraram superfície com partículas de formato irregulares, proporcionais a concentração de extrato. Ademais, a avaliação do perfil de liberação evidenciou que estes foram capazes de liberar, satisfatoriamente e de forma gradual, fitoconstituintes de AOM ao fim de 8h (Q-AOM5%: $67,15 \pm 2,16$; Q-AOM2,5%: $66,78 \pm 2,47$; Q-AOM1%: $39,38 \pm 0,11$). Os filmes

também se apresentaram termicamente estáveis até 40°C e exibiram resistência a ruptura nas análises reológicas. Além disso, no ensaio de FTIR, foi possível identificar o estabelecimento de interações intermoleculares entre o polímero e os fitoconstituintes de AOM. Assim como AOM, os filmes não exibiram efeito citotóxico. Os biocurativos reduziram a produção celular de mediadores inflamatórios, IL-6, IL-12 e NO, em macrófagos, em 95,41, 100% e 66,87%, respectivamente, na maior concentração de AOM (Q-AOM5%). Efeitos antioxidantes também foram observados, com valores máximos de inibição de 90,41% no ensaio de inibição dos radicais DPPH e AAR% de $28,29 \pm 3,41$ a quercetina e AAR% de $46,29 \pm 5,58$ a rutina, no ensaio de poder de redução do fosfomolibdênio. Os biocurativos também exerceram atividade antimicrobiana pela inibição do crescimento e adesão de biofilme frente aos microrganismos citados anteriormente. Conclui-se que os biocurativos de quitosana e AOM apresentam-se como uma formulação inédita para o tratamento de feridas, com características físico-químicas promissoras e amplo potencial bioativo. Sugere-se a realização de estudos adicionais para confirmação da atividade da formulação por meio de modelos *in vivo* e de ensaios de cicatrização, além de ensaios de permeação cutânea e de estabilidade físico-química.

Palavras-chave: Produtos naturais. Asteraceae. Curativo. Polímero.

ABSTRACT

Aging and chronic diseases are associated with an increase in difficult-to-heal wounds. The global wound care costs was estimated at USD \$3.5 billion in 2021. Polymeric wound dressings offer a new approach to repairing skin injuries. Therefore, the aim of the present work is to develop chitosan based wound dressings composed of the methanolic extract of *Acmella oleracea* leaves. The polymeric films were characterised in terms of their physico-chemical and biological properties. The leaves were crushed and subjected to maceration in metanol 99,8% (v/v). Phenolic compounds and alkamides, such as spilanthol, were identified in the methanolic extract (AOM) by UFLC-QTOF-MS. The extract did not induced cytotoxicity on L929 fibroblasts and murine macrophages. AOM reduced celular production of the inflammatory mediators IL-6, TNF- α , NO and lipid bodies in macrophages by 100%, 96.66%, 46.06% and 97.72%, respectively, at the highest concentration tested (300.00 $\mu\text{g/ml}$). Antioxidant effects were also observed for AOM. The extract obtained an IC50 of 44.50 ± 4.46 and 127.6 ± 14.42 $\mu\text{g/mL}$ in the DPPH and NO radical scavenging assays, respectively. The reducing power of phosphomolybdenum was $63,56 \pm 13,01$ of AAR% for quercetin and 104.01 ± 21.29 of AAR% for rutin, and the percentage of lipid peroxidation inhibition was 63.69%. Furthermore, it was observed a reduction of 61,38% in celular production of reactive oxygen species by murine macrophages. The extract showed moderate to high antimicrobial activity against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *E. coli* and *C. albicans* strains (MIC values ≤ 1000 $\mu\text{g/mL}$). The films were prepared by the solvent casting method, with 2% (w/v) of chitosan, in the absence (Q-BR) and the presence of diferente concentrations of AOM (Q-AOM5%, Q-AOM2,5% and Q-AOM1%). The films showed uniformity concerning weight and thickness, and good swelling capacity. SEM photomicrographs showed particles of irregular size, most likely the result of crescent extract concentration. Furthermore, the release profile showed that the films were able to release the AOM phytoconstituents in a satisfactory and gradual manner after 8 h of experiment (Q-AOM5%: 67.15 ± 2.16 ; Q-AOM2.5%: 66.78 ± 2.47 ; Q-AOM1%: 39.38 ± 0.11). In addition, the films showed a good thermal resistance above the body temperature and a good mechanical resistance. FTIR analysis revealed the formation of intermolecular interactions between the polymer and the AOM phytoconstituents. As with AOM, the films did not show any cytotoxic effects.

The films reduced cellular production of the inflammatory mediators IL-6, IL-12 and NO in macrophages by 95,41, 100 and 66,87%, respectively, at the highest concentration of AOM (Q-AOM5%). Antioxidant effects were also observed in the films. The reducing power of phosphomolybdenum was 28.29 ± 3.41 AAR% for quercetin and 46.29 ± 5.58 AAR% for rutin and the percentage of maximum DPPH radical scavenging was 90.41%. The biocuratives also exhibited antimicrobial activity by inhibiting microbial growth and biofilm adhesion of the aforementioned microorganisms. The current work demonstrated that chitosan and AOM biodressings represent an unprecedented formulation for wound care with promising physicochemical properties and bioactive potential. In vivo skin wound models, scratch assay, skin permeation tests and physicochemical stability tests can be performed as an extension of the reported work.

Keywords: Natural products. Asteraceae. Wound dressing. Polymer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Fases do processo de cura de lesões cutâneas.	26
Figura 2:	Resposta imune em feridas agudas e crônicas.	29
Figura 3:	Tipos de curativos de base polimérica.	33
Figura 4:	Processo de desacetilação da quitina e obtenção da quitosana.	34
Figura 5:	Representação dos mecanismos de ação antibacteriano e antifúngico da quitosana.	36
Figura 6:	Medicamentos oriundos de produtos naturais descobertos no último século.	37
Figura 7:	Espécie vegetal <i>Acemella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen.	39
Figura 8:	Estrutura molecular básica das alquilamidas.	41
Figura 9:	Estrutura química do espilantol (C ₁₄ H ₂₃ NO).	42
Figura 10:	Desenho experimental do trabalho.	46
Figura 11:	Esquema de elaboração dos filmes de quitosana com diferentes concentrações de AOM.	58
Figura 12:	Esquema de liberação de fitoconstituintes a partir dos filmes.	60
Figura 13:	Viabilidade celular de fibroblastos L929 e macrófagos peritoneais murinos após tratamento com diferentes concentrações de AOM.	74
Figura 14:	Avaliação dos níveis intracelulares de EROS por espectrofluorimetria em macrófagos tratados com diferentes concentrações de AOM.	76
Figura 15:	Porcentagem de inibição da produção de íons nitrito por AOM.	77
Figura 16:	Atividade sequestrante de radicais DPPH do AOM em comparação aos controles positivos rutina e quercetina, nas concentrações de 7,812 a 250 µg/mL.	79
Figura 17:	Produção de malondialdeído na presença de AOM e BHT nas concentrações 7,5, 15 e 30 µg/mL.	81
Figura 18:	Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneiais após tratamento com AOM.	84

Figura 19: Avaliação do acúmulo de corpúsculos lipídicos (CLs) em macrófagos peritoneais murinos após tratamento com AOM.	85
Figura 20: Dosagem de IL-6 e TNF- α em macrófagos tratados com diferentes concentrações de AOM e estimulados com LPS e IFN- γ .	86
Figura 21: Filmes poliméricos de quitosana e diferentes concentrações de AOM.	91
Figura 22: Valores de condutividade elétrica e potencial zeta das soluções precursoras dos filmes poliméricos.	93
Figura 23: Curvas de fluxo e viscosidade das soluções precursoras dos filmes em função da taxa de cisalhamento.	95
Figura 24: Curva de viscosidade versus temperatura das soluções precursoras dos filmes, de 10 a 50 °C.	96
Figura 25: Curvas referentes aos módulos G' e G'' das soluções precursoras em função da tensão de cisalhamento.	98
Figura 26: Espectrofotometria de varredura de AOM no intervalo de 200-400 nm e seus picos de absorbância.	100
Figura 27: Curva padrão de AOM.	100
Figura 28: Porcentagem de liberação de fitoconstituintes a partir dos filmes poliméricos entre os tempos 0 e 480 min.	102
Figura 29: Espectrofotometria de varredura de espilantol e ácido vanílico.	103
Figura 30: Perfil de liberação dos filmes nos comprimentos de onda característicos do espilantol e do ácido vanílico entre os tempos 0 e 480 min.	104
Figura 31: Teor de fenóis totais liberados a partir dos filmes poliméricos versus tempo no ensaio do perfil de liberação.	105
Figura 32: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes poliméricos.	107
Figura 33: Gráfico de dispersão do grau de intumescimento dos filmes poliméricos imersos em fluido de ferida simulado em um intervalo de tempo de 0 a 8h.	110

Figura 34:	Curvas de TGA e DTG dos filmes, da quitosana e do extrato puro.	112
Figura 35:	Espectros de infravermelho de AOM e dos filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR.	114
Figura 36:	Espectros de infravermelho sobrepostos de AOM e dos filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR.	116
Figura 37:	Análise reológica de ruptura axial e rotacional dos filmes poliméricos.	118
Figura 38:	Viabilidade celular de fibroblastos L929 e macrófagos peritoneais murinos após tratamento com os filmes poliméricos de quitosana e AOM.	119
Figura 39:	Atividade sequestrante de radicais DPPH dos filmes poliméricos com diferentes concentrações de AOM pelo método de liberação forçada e liberação estática por 24h.	121
Figura 40:	Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais murinos após o tratamento com os filmes poliméricos.	124
Figura 41:	Dosagem de IL-6 e IL-12 em macrófagos peritoneais murinos tratados com os filmes poliméricos.	125
Figura 42:	Halos de inibição para as linhagens de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i> .	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Composição dos biocurativos (filmes poliméricos) de quitosana e AOM.	57
Tabela 2:	Identificação dos compostos do extrato metanólico das folhas de <i>Acmella oleracea</i> (AOM) por UFLC-QTOF-MS. TR - Tempo de retenção por minuto; [M+H] ⁺ - massa/carga (m/z) em modo positivo; MS ² - massas dos fragmentos do íon molecular; identificação experimental dos compostos detectados, estrutura molecular e referências.	71
Tabela 3:	Avaliação da capacidade antioxidante de AOM por meio dos ensaios de sequestro dos radicais livres DPPH e de redução do complexo fosfomolibdênio.	78
Tabela 4:	Produção de MDA e porcentagem de inibição da produção de MDA em relação ao controle negativo (CN) diante de diferentes concentrações de AOM e BHT.	81
Tabela 5:	Concentração inibitória mínima (CIM) de AOM e dos controle positivos, efeito no valor da CIM, e concentração bactericida mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM) de AOM frente a microrganismos de interesse.	88
Tabela 6:	Valores de $\tan \delta$ das soluções precursoras em função da tensão de cisalhamento.	98
Tabela 7:	Porcentagem de liberação de fitoconstituintes do extrato a partir dos filmes poliméricos entre os tempos 0 e 480 min.	102
Tabela 8:	Valores de peso médio, espessura e umidade dos filmes poliméricos.	109
Tabela 9:	Intervalos de temperatura com maior degradação térmica (Td) e perda de massa (Δm) dos filmes poliméricos, de AOM e da quitosana	112
Tabela 10:	Dimensões dos filmes poliméricos utilizados nos ensaios antioxidantes e correspondentes concentrações de extrato.	119

Tabela 11:	Avaliação da capacidade antioxidante dos filmes poliméricos por meio do ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio submetidos a liberação forçada e de 24h.	122
Tabela 12:	Dimensões dos filmes poliméricos utilizados nos ensaios antimicrobianos e correspondentes concentrações de extrato.	126
Tabela 13:	Efeito dos filmes poliméricos no crescimento de bactérias e fungos causadores de infecções cutâneas.	127
Tabela 14:	Valores de halo de inibição dos filmes poliméricos para as linhagens de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i> .	129
Tabela 15:	Porcentagem média de inibição \pm DP da formação de biofilme pelos filmes poliméricos frente a <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> .	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AAR%	Atividade Antioxidante Relativa
ABS	Absorbância
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOM	Extrato metanólico das folhas de <i>Acmella oleracea</i>
AOM	Extrato metanólico das folhas de <i>Acmella oleracea</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CL	Corpúsculo lipídico
CN	Controle negativo
COX-2	Ciclooxigenase-2
CP	Controle positivo
CV	Coeficiente de variação
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
Dh	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão

DTG	Termogravimetria derivada
EAT	Equivalentes de ácido tânico
EC	Etrato córneo
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ESP	Espessura
FTIR	Espectroscopia eletrônica vibracional na região do Infravermelho
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MH	Mueller-Hinton
MMP	Metaloproteinases
NK	Células <i>natural killers</i>
NO	Óxido nítrico
NPS	nitroprussiato de sódio
PDGFS	Fatores de crescimento derivados de plaquetas
PLA2	Fosfolipase A2
PM	Peso médio
PZ	Potencial Zeta
Q-AOM1%	Filme polimérico de quitosana e AOM à 1%
Q-AOM2,5%	Filme polimérico de quitosana e AOM à 2,5%
Q-AOM5%	Filme polimérico de quitosana e AOM à 5%

Q-BR	Filme polimérico de quitosana
SB	Sabouraud
SUS	Sistema Único de Saúde
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TGA	Termogravimetria
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFLC- QTOF-MS	Cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a espectrometria de massas com analisador quadrupolo tempo de voo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	ASPECTOS GERAIS DO REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS	25
2.2	IMPACTOS ECONÔMICOS E TENDÊNCIAS DO MERCADO	29
2.3	TRATAMENTO E MANEJO DE LESÕES CUTÂNEAS	30
2.3.1	Medicamentos utilizados na prática clínica	31
2.3.2	Curativos	32
2.4	QUITOSANA	34
2.5	ESPÉCIES VEGETAIS NO TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS	37
2.6	<i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K Jansen: USO TRADICIONAL, FITOQUÍMICA, ATIVIDADE BIOLÓGICA E APLICAÇÕES DA ESPÉCIE	39
2.6.1	Alquilamidas	42
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVO GERAL	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	MATERIAL VEGETAL	46
4.2	PREPARO DO EXTRATO	47
4.3	TEORES DE FENÓIS TOTAIS	47
4.4	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DO EXTRATO POR UFLC-QTOF-MS	48
4.5	LINHAGENS CELULARES E CULTURA	48
4.6	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO	49
4.6.1	Análise da citotoxicidade de AOM em fibroblastos L929 e macrófagos peritoneais	49
4.6.2	Avaliação da atividade antioxidante	50
4.6.2.1	<i>Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS)</i>	<i>50</i>
4.6.2.2	<i>Sequestro de radicais livres (DPPH•)</i>	<i>50</i>
4.6.2.3	<i>Poder de redução do complexo fosfomolibdênio</i>	<i>51</i>
4.6.2.4	<i>Inibição da formação de malondialdeído</i>	<i>52</i>
4.6.2.5	<i>Inibição de radicais de óxido nítrico (NO) pelo método de Griess</i>	<i>53</i>

4.6.3	Avaliação da atividade anti-inflamatória	53
4.6.3.1	<i>Redução dos níveis de óxido nítrico (NO)</i>	53
4.6.3.2	<i>Acúmulo de corpúsculos lipídicos (CLs) em macrófagos estimulados com LPS e IFN-γ</i>	54
4.6.3.3	<i>Dosagem de citocinas pró-inflamatórias.....</i>	55
4.6.4	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	55
4.6.4.1	<i>Linhagens microbianas.....</i>	55
4.6.4.2	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....</i>	55
4.6.4.3	<i>Determinação da Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM e CFM)</i>	56
4.7	DESENVOLVIMENTO DOS FILMES DE QUITOSANA	57
4.8	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SOLUÇÕES PRECURSORAS DOS BIOCURATIVOS (FILMES POLIMÉRICOS).....	58
4.8.1	Determinação da Condutividade elétrica e Potencial Zeta (PZ)	58
4.8.2	Determinação dos parâmetros reológicos das soluções precursoras	59
4.9	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS BIOCURATIVOS (FILMES POLIMÉRICOS)	59
4.9.1	Perfil de liberação.....	59
4.9.2	Teores de fenóis totais liberados no ensaio de perfil de liberação	60
4.9.3	Avaliação dos filmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	61
4.9.4	Determinação de peso médio e espessura.	61
4.9.5	Teor de umidade.....	61
4.9.6	Grau de intumescimento.....	62
4.9.7	Análise termogravimétrica (TGA).....	62
4.9.8	Espectroscopia eletrônica vibracional na região do Infravermelho (FTIR).....	63
4.9.9	Caracterizações por Análise Dinâmico Mecânica nos modos axial e rotacional	63
4.10	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FILMES	64
4.10.1	Análise da citotoxicidade em fibroblastos L929 e macrófagos peritoneais	64
4.10.2	Avaliação da atividade antioxidante	64
4.10.2.1	<i>Sequestro de radicais livres (DPPH•)</i>	64
4.10.2.2	<i>Poder de redução do complexo fosfomolibdênio.....</i>	65

4.10.3	Avaliação da atividade anti-inflamatória	65
4.10.3.1	<i>Redução dos níveis de óxido nítrico (NO)</i>	65
4.10.3.2	<i>Dosagem de citocinas pró-inflamatórias</i>	66
4.10.4	Avaliação da atividade antimicrobiana	66
4.10.4.1	<i>Disco-difusão em ágar</i>	66
4.10.4.2	<i>Inibição do crescimento microbiano</i>	66
4.10.4.3	<i>Interferência na fase de adesão do biofilme</i>	67
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1	TEORES DE FENÓIS TOTAIS.....	69
5.2	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DO EXTRATO POR UFLC-QTOF-MS.....	70
5.3	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO	73
5.3.1	Análise da citotoxicidade	73
5.3.2	Avaliação da atividade antioxidante	74
5.3.3	Avaliação da atividade anti-inflamatória	82
5.3.4	Avaliação da atividade antimicrobiana	87
5.4	DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	90
5.4.1	Caracterização físico-química das soluções precursoras dos filmes .	91
5.4.1.1	<i>Determinação da Condutividade elétrica e Potencial Zeta (PZ)</i>	92
5.4.1.2	<i>Determinação dos parâmetros reológicos das soluções precursoras</i>	94
5.4.2	Caracterização físico-química dos filmes	98
5.4.2.1	<i>Perfil de liberação</i>	99
5.4.2.2	<i>Teores de fenóis totais liberados no ensaio de perfil de liberação</i>	104
5.4.2.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	105
5.4.2.4	<i>Peso médio, espessura e teor de umidade</i>	108
5.4.2.5	<i>Grau de intumescimento</i>	109
5.4.2.6	<i>Análise termogravimétrica</i>	110
5.4.2.7	<i>Espectroscopia eletrônica vibracional na região do infravermelho (FTIR)</i>	113
5.4.2.8	<i>Análise dinâmico mecânica nos modos axial e rotacional</i>	116
5.5	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FILMES	118
5.5.1	Análise da citotoxicidade	118
5.5.2	Avaliação da atividade antioxidante	119

5.5.3	Avaliação da atividade anti-inflamatória	123
5.5.4	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	125
6	CONCLUSÃO	133
	REFERÊNCIAS.....	135

1 INTRODUÇÃO

Lesões cutâneas podem ser definidas como danos na função e estrutura da pele saudável, podendo ser resultado de trauma mecânico, doenças crônicas, queimaduras, cirurgias e condições genéticas (Cañedo-Dorantes; Cañedo-Ayala, 2019). São classificadas em feridas agudas, quando a cicatrização total dura até 12 semanas, e feridas crônicas, quando o processo de cura leva longos períodos (Nosar *et al.*, 2018).

O envelhecimento populacional e a alta prevalência de doenças crônicas estão diretamente relacionados ao aumento dos casos de feridas de difícil cicatrização (Al-gharibi *et al.*, 2018). O gasto global com o tratamento de feridas foi estimado em 3,5 bilhões em 2021, com tendência de crescimento (Sen, 2019). Estes fatores ajudaram a alavancar o mercado mundial de tratamento de feridas, o qual foi avaliado em 10,65 bilhões de dólares em 2022, de acordo com o *Globe News Wire* e o *Precedence Research*, com expectativa de crescimento para 34,45 bilhões até 2030 (Globe News Wire, 2022).

Feridas de difícil cicatrização não apenas elevam os gastos com saúde e reduzem a produtividade do indivíduo, mas também afetam sua autoestima, saúde, independência e convívio social (Maver *et al.*, 2015). Os tratamentos tradicionalmente utilizados, como curativos e medicamentos de uso tópico, além de serem mais onerosos para os serviços de saúde, resultam em tempo longo até total cicatrização, reações adversas, impasses frente ao seu uso prolongado e aparecimento de recidivas (Al-gharibi *et al.*, 2018; Shukla *et al.*, 2019; Cortez *et al.*, 2019; Gushiken *et al.*, 2021).

No passado, os curativos eram vistos como produtos passivos com papel reduzido no processo de cura de feridas. Contudo, o desenvolvimento de curativos ativos e funcionais tem atraído cada vez mais atenção de pesquisadores e do mercado (Liu *et al.*, 2018). Curativos modernos incluem espumas, filmes, hidrocoloides e hidrogéis, os quais podem ser formulados a partir de materiais altamente biocompatíveis (Mirhaj *et al.*, 2022).

Filmes curativos são membranas poliméricas de espessura e tamanho variáveis que se aderem a lesões de diversos tamanhos e se adaptam a diferentes partes do corpo (Raju *et al.*, 2022). Além de apresentarem boa flexibilidade, fácil remoção, permitem a troca gasosa e serem impermeáveis a líquidos e bactérias,

podem ser utilizados para incorporação de biomoléculas, funcionando assim como um sistema de liberação de medicamentos diretamente no sítio da lesão (Savencu *et al.*, 2021).

Estas formulações podem ser desenvolvidas utilizando a quitosana como matéria-prima, um polissacarídeo catiônico natural, biocompatível e biodegradável, formado pela desacetilação parcial ou total da quitina (Savencu *et al.*, 2021). Além de funcionar como polímero base para desenvolvimento de curativos, a quitosana pode desempenhar atividades biológicas importantes em diversos estágios da cicatrização de feridas, acelerando o reparo tecidual e evitando infecções (Bano *et al.*, 2017). Outra função importante atribuída à quitosana é sua capacidade de funcionar como material para controle e liberação de drogas, atuando também como um indutor de permeação cutânea (Liu *et al.*, 2018).

Como o reparo de lesões cutâneas envolve mecanismos complexos, o grande desafio para o seu manejo está no desenvolvimento de tratamentos capazes de atuar em diversas vias do processo de resolução da ferida. Sabendo do grande potencial terapêutico das espécies vegetais, a utilização de produtos naturais para o desenvolvimento de novas formulações pode representar uma fonte de compostos bioativos em lesões cutâneas e uma oportunidade de valorização da biodiversidade brasileira e dos povos tradicionais (Maver *et al.*, 2015; Moeini *et al.*, 2020).

Acmella oleracea (L.) R.K Jansen, também conhecida como jambu, agrião do Pará e agrião bravo, é uma espécie vegetal nativa da Amazônia, cujo uso é amplamente difundido na cadeia produtiva alimentar do Norte do Brasil (Uthpala; Navaratne, 2021). Atualmente, o jambu tem atraído grande interesse no campo da medicina de produtos naturais e como um nutracêutico, com aplicação cosmética, farmacêutica e em alimentos (Silva, 2023).

Além do seu uso alimentício, o jambu tem sua aplicação vasta e bem documentada na medicina tradicional no tratamento de lesões de pele e mucosas, sendo também utilizado em casos de gripe, tosse, tuberculose, dor de dente, malária, infecções bacterianas e fúngicas (Lalthanpuii *et al.*, 2018; Araújo *et al.*, 2021; Bellumori *et al.*, 2022). As folhas do jambu contêm diversos compostos das classes dos taninos, flavonoides, carotenóides, fitosteróis e terpenos. São especialmente ricas em alquilamidas, em particular o espilantol, ao qual é atribuída grande parte das

atividades biológicas da espécie (Lalthanpuii *et al.*, 2018; Uthpala; Navaratne, 2020; Savic *et al.*, 2021).

Apesar de apresentarem variadas atividades biológicas e aplicações para a indústria farmacêutica, existem poucos produtos comerciais à base de jambu e de espilantol disponíveis no mercado (Silveira *et al.*, 2018). Ademais, ainda que hajam estudos acerca do potencial bioativo do jambu, a aplicação desta espécie especificamente para o tratamento de lesões cutâneas ainda é pouco investigada.

Diante disso, sabendo da complexidade do processo de cura de lesões cutâneas e do potencial farmacológico da planta, a hipótese do presente trabalho é de que filmes poliméricos (biocurativos) de quitosana incorporados com o extrato metanólico das folhas de *A. oleracea* podem ser utilizados no tratamento de feridas devido à sua multifuncionalidade, tanto do extrato, quanto dos filmes de quitosana, para as atividades citotóxica, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

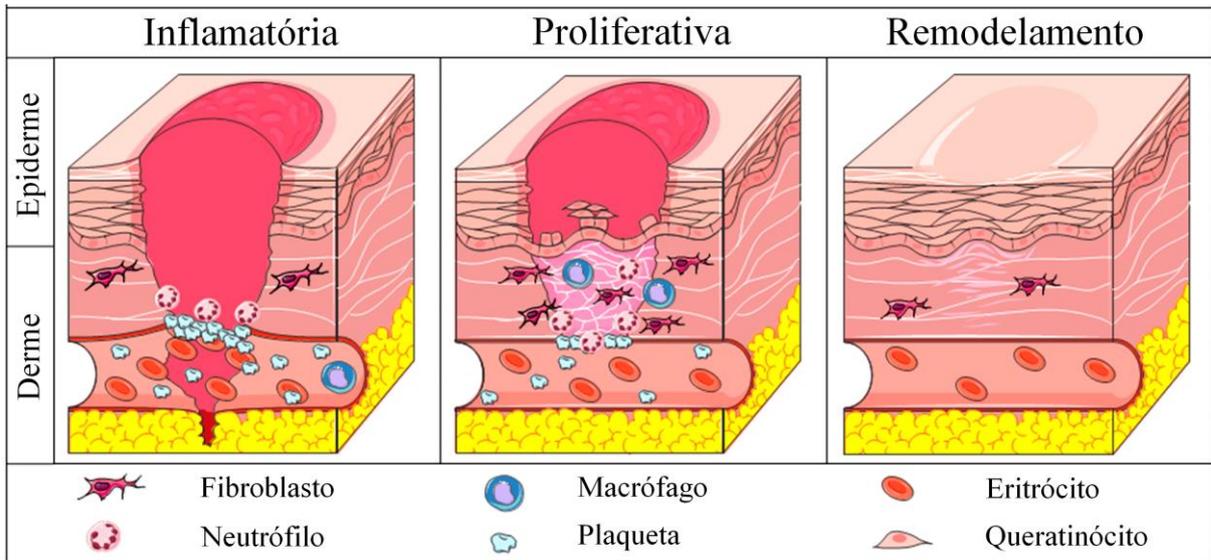
2.1 ASPECTOS GERAIS DO REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS

A pele é o órgão com maior área de superfície do corpo humano, representando uma grande interface entre o corpo e o ambiente. Sua principal função é formar uma complexa barreira física protetora contra agentes externos como microrganismos e danos causados pela radiação ultravioleta, além de evitar a perda de água, promover a termorregulação e síntese de vitamina D (Dehdashtian *et al.*, 2018).

Por estar em contato direto com o ambiente externo, este órgão se torna vulnerável a diferentes tipos de injúrias (Raju *et al.*, 2022). As lesões cutâneas são definidas como algum dano na função e estrutura da pele saudável, podendo ser resultado de trauma mecânico, doenças crônicas, queimaduras, cirurgias e condições genéticas (Cañedo-dorantes; Cañedo-ayala, 2019). Ainda podem ser classificadas em feridas agudas, quando a cicatrização total dura até 12 semanas, e feridas crônicas, quando o processo de cura leva longos períodos, podendo haver recidivas. As últimas se caracterizam por processo inflamatório prolongado, com altos níveis de enzimas citotóxicas, radicais livres, mediadores inflamatórios e liberação de metaloproteases (Nosar *et al.*, 2018).

Após uma lesão cutânea, a integridade da pele deve ser prontamente restabelecida (Visha; Karunagaran, 2019). Células mononucleares do sangue periférico, células residentes da pele, matriz extracelular (MEC), citocinas, fatores de crescimento e moléculas regulatórias participam deste processo, o qual é dividido em 3 fases: inflamatória, proliferativa e de remodelamento (Figura 1) (Cañedo-dorantes; Cañedo-ayala, 2019; Petkovic *et al.*, 2021).

Figura 1: Fases do processo de cura de lesões cutâneas.



Fonte: Adaptado de Gushiken *et al.*, (2021).

A fase inflamatória se inicia nos primeiros segundos após a lesão com a ativação de plaquetas, as quais sintetizam componentes responsáveis pela formação de um tampão plaquetário que restaura a hemostase e age como uma matriz celular provisória. Concomitantemente, plaquetas e células lesionadas iniciam a liberação de citocinas como o fator de transformação de crescimento alfa (TGF- α), a interleucina IL-1 β e fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFS), responsáveis pela ativação de fibroblastos, recrutamento e ativação de macrófagos e neutrófilos (Gushiken *et al.*, 2021). Tais células trabalham em conjunto na iniciação, evolução e resolução da fase inflamatória, contribuindo para a remoção de bactérias, células mortas e outros materiais estranhos (Larouche *et al.*, 2018).

Os neutrófilos desempenham papel central por meio da liberação de várias moléculas antimicrobianas como espécies reativas de oxigênio (EROS), peptídeos e proteases (Larouche *et al.*, 2018). Estes também secretam diversas citocinas e fatores de crescimento, os quais agem como quimiocinas para células inflamatórias, promovem a proliferação de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais (Gushiken *et al.*, 2021).

Além da resposta ao dano tecidual desempenhada por células do sistema imune inato, há grande colaboração de células do sistema imune adaptativo como linfócitos T, B e *natural killers* (NK), os quais oferecem memória específica e duradoura

contra patógenos intracelulares e extracelulares (Larouche *et al.*, 2018). As células NK, por exemplo, promovem a liberação de interferon gama (INF- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) nas fases iniciais da cicatrização, estimulando macrófagos e fibroblastos, aumentando a deposição de colágeno e a angiogênese (Cañedo-dorantes; Cañedo-ayala, 2019).

A fase proliferativa é caracterizada por intensa migração e proliferação celular, além da síntese de um tecido de granulação composto por uma matriz celular provisória, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos (Gushiken *et al.*, 2021). Esta fase é responsável por reparar os danos causados pela ferida por meio de 4 mecanismos: fibroplasia, incluindo a proliferação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, deposição da matriz extracelular e contração da ferida; reepitelização e interação epitélio-mesenquimal entre queratinócitos e fibroblastos; angiogênese, incluindo proliferação do endotélio celular e formação de novos vasos; reparação da inervação periférica (Cañedo-dorantes; Cañedo-ayala, 2019).

Por fim, se inicia a fase de remodelamento, podendo se estender por meses. Nesta fase, todos os processos ativados previamente são silenciados e células como macrófagos, miofibroblastos e células epiteliais isoladas entram em apoptose ou deixam a ferida. A epiderme, vasos da derme, nervos e fibras do músculo esquelético são remodelados e formam um tecido funcional (Gushiken *et al.*, 2021). Além disso, metaloproteinases (MMP) liberadas pelos fibroblastos e macrófagos degradam colágeno tipo III e o substituem por colágeno tipo I, formando um tecido de maior resistência e flexibilidade (Petkovic *et al.*, 2021).

Múltiplos fatores podem impedir a resolução de feridas, tais como componentes locais, que impactam especificamente características da própria ferida, e componentes sistêmicos que afetam a capacidade de reparo do organismo (Visha; Karunagaran, 2019). A Figura 2 resume as principais diferenças entre os processos inflamatórios envolvidos em feridas agudas e crônicas.

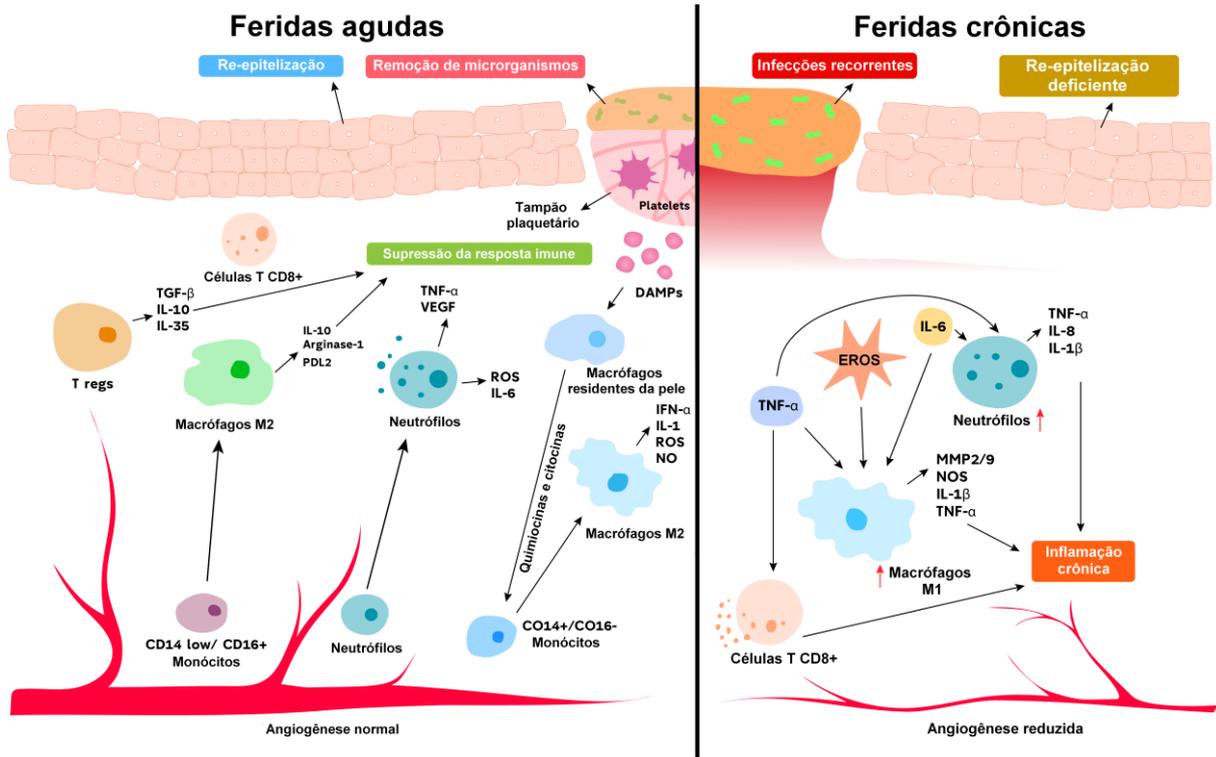
Feridas sem o manejo adequado e com altos níveis de exudato oferecem um ambiente rico em umidade e nutrientes para o crescimento de microrganismos. O desenvolvimento de infecções em feridas atrasa o processo de cicatrização, visto que a liberação de endotoxinas microbianas aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias e MMPs (Simões *et al.*, 2018; Abbas *et al.*, 2019). Bactérias como

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* são comumente isoladas em lesões infectadas (Savencu *et al.*, 2021). Entre estes exemplos, *P. aeruginosa* e *S. aureus* são as mais prevalentes (Chin *et al.*, 2019). Além disso, fungos como *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Malassezia restricta* e *Curvularia luneta* também podem ser causadores de infecções em feridas crônicas (Yazarlu *et al.*, 2021).

Como descrito anteriormente, citocinas como IL-1 β e TNF- α são essenciais nas fases iniciais do processo de cura de feridas. Porém, o estado inflamatório prolongado provocado pela superprodução das mesmas, resulta em destruição tecidual devido a hiperativação de células imunes como neutrófilos e macrófagos. Ademais, a IL-12, citocina capaz de promover a diferenciação de linfócitos T naive em linfócitos efetores, estimula a produção de IFN- γ , citocina responsável por polarizar macrófagos M1 (pró-inflamatórios) (Larouche *et al.*, 2018). Esta inflamação exacerbada contribui para problemas de re-epitelização através da produção aumentada de MMPs, fibrose e baixa vascularização (Razieyva *et al.*, 2021). Análises feitas em lesões crônicas encontraram níveis significativamente elevados de IL-1, IL-6 e TNF- α , e níveis reduzidos em feridas em cicatrização (Chin *et al.*, 2019; Gushiken *et al.*, 2021).

Ainda cabe ressaltar a importância do estresse oxidativo aumentado na manutenção de feridas de difícil cicatrização. Apesar de serem essenciais para o processo de cura de lesões cutâneas e combate a infecções, o excesso de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem causar danos severos às células, pois provocam aumento da liberação de citocinas, indução de MMPs e degradação de proteínas da MEC (Chin *et al.*, 2019).

Figura 2: Resposta imune em feridas agudas e crônicas.



Fonte: Adaptado de Raziyyeva *et al.*, (2021).

2.2 IMPACTOS ECONÔMICOS E TENDÊNCIAS DO MERCADO

O envelhecimento populacional e a alta prevalência de doenças crônicas estão diretamente relacionados ao aumento dos casos de feridas crônicas e de difícil cicatrização. Além disso, o aumento dos casos de resistência microbiana frente aos antibióticos e comorbidades como obesidade, diabetes e hipertensão, aumentam os custos associados ao tratamento (Al-gharibi *et al.*, 2018). O gasto global com o tratamento de feridas foi de 2,8 bilhões de dólares em 2014, com estimativa de crescimento para 3,5 bilhões em 2021 (Sen, 2019). Estes fatores ajudaram a alavancar o mercado mundial de tratamento de feridas, o qual foi avaliado em 10,65 bilhões de dólares em 2022 de acordo com o *Globe News Wire*, com tendência de crescimento para 34,45 bilhões até 2030. Ademais, há uma tendência de mercado para o desenvolvimento de curativos tecnológicos almejando, em especial, o tratamento de lesões crônicas, de difícil cicatrização. Em 2022, curativos tecnológicos dominaram o setor de tratamento de feridas, alavancado por seus diversos benefícios

em comparação com os curativos tradicionais, discutidos adiante (Fortune Business Insights, 2023).

Na atenção primária à saúde brasileira, lesões cutâneas são, geralmente, de longa evolução. Estas requerem realização frequente de curativos, o que interfere na qualidade de vida do paciente e em sua produtividade, resultando em gastos elevados para o sistema de saúde. De acordo com o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), em 2023 foram aprovados cerca de 11 milhões de procedimentos para a realização de curativos na rede ambulatorial do SUS. Tais procedimentos geraram investimento público de 175 milhões de reais apenas neste ano.

Visto que os recursos públicos são limitados, é necessário um manejo mais eficiente para o tratamento de feridas através, por exemplo, da introdução de novas tecnologias para prevenção e cura mais adequados. Portanto, produtos que ofereçam troca menos frequente do curativo, reduzam a dor e diminuam o risco de infecções serviriam como grandes aliados no manejo de feridas (Al-gharibi *et al.*, 2018; Cortez *et al.*, 2019).

Um estudo de Cortez *et al.*, (2019) buscou avaliar os custos do tratamento de lesões cutâneas de difícil cicatrização quando tratadas com curativos convencionais e curativos modernos como hidrogéis e filmes. O tratamento tradicional levou cerca de 620 dias, enquanto o mais moderno, 151 dias, com número reduzido de trocas, menor frequência de visitas do paciente ao serviço e menor tempo gasto pelo profissional de saúde. Os autores também estimaram que, para um município brasileiro com 200 pessoas em tratamento de lesões cutâneas, o custo do tratamento com curativos modernos seria 85% inferior ao tradicional (R\$1.350.000,00 *versus* R\$208.000,00).

2.3 TRATAMENTO E MANEJO DE LESÕES CUTÂNEAS

Apesar da pele ser capaz de regenerar por si só após uma lesão, essa capacidade pode estar comprometida em condições especiais, como em feridas de grande extensão, queimaduras profundas, feridas crônicas, úlceras e doenças crônicas (Pereira; Bártolo, 2013). Os principais objetivos do tratamento de feridas são

reduzir o tempo necessário para cura e minimizar consequências indesejadas, como aparecimento de cicatrizes e infecções (Maver *et al.*, 2015). Tradicionalmente, o manejo de feridas inclui a limpeza e desbridamento do local, proteção por meio de curativos e tratamentos farmacológicos como drogas antimicrobianas e anti-inflamatórias de aplicação tópica (Zeng *et al.*, 2018).

2.3.1 Medicamentos utilizados na prática clínica

Aliados aos curativos, medicamentos de uso tópico são os mais utilizados no tratamento farmacológico de feridas, pois apresentam vantagens se comparados com a administração sistêmica como desvio do metabolismo de primeira passagem e de efeitos adversos sistêmicos, além de fácil aplicação. Porém, estes também podem causar irritação, desconforto e reações alérgicas (Gushiken *et al.*, 2021).

A aplicação tópica de antibióticos, quando necessária, é de suma importância para melhor recuperação do tecido, já que a infecção provoca extenso dano tecidual. Apesar de tais benefícios, seu uso não deve ser prolongado devido a possibilidade de resistência microbiana, reações de hipersensibilidade e dermatite de contato (Gushiken *et al.*, 2021). Antibióticos como os das classes dos aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, glicopeptídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina são geralmente associados a curativos para o controle do processo infeccioso (Simões *et al.*, 2018; Moeini *et al.*, 2020).

Fármacos da classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) também podem ser utilizados no controle do processo inflamatório exacerbado em feridas. Estas agem através da inibição da cicloxigenase, enzima chave que cataliza a biossíntese de prostaglandinas. Seu efeito também resulta na diminuição da produção de EROS e da migração de neutrófilos para o sítio da inflamação. Porém, o uso destas drogas deve ser de curta duração, visto que seu uso prolongado atrapalha o processo de cicatrização devido a diminuição da queratinização, epitelização e angiogênese (Shukla *et al.*, 2019).

Diante dos efeitos adversos causados por estes medicamentos, da limitação de seu uso por longos períodos e do crescente desenvolvimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis comercialmente, faz-se necessário o

estudo e desenvolvimento de novos tratamentos capazes de superar tais desafios. Neste sentido, espécies de origem vegetal podem representar uma importante fonte de novos compostos bioativos para o tratamento de lesões cutâneas, considerando seu extenso uso popular e estudos corroborando seu potencial biológico.

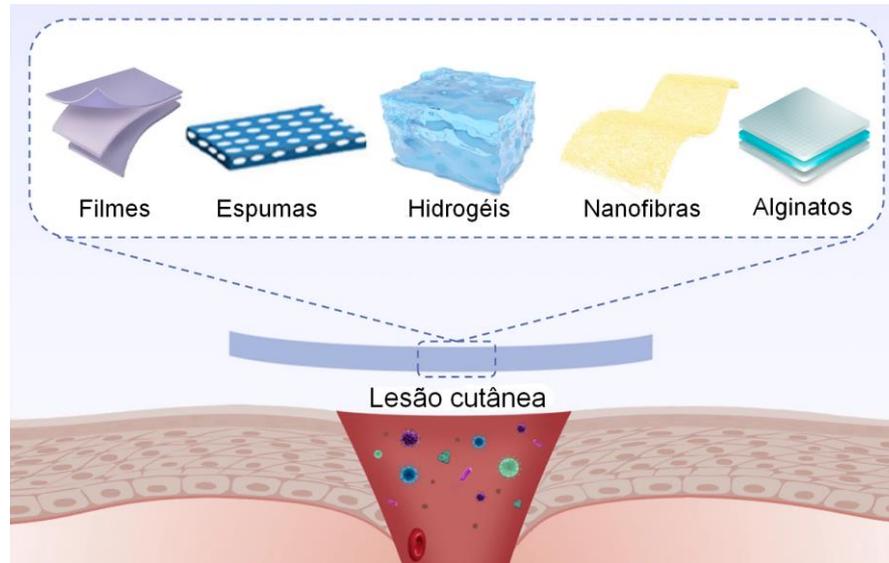
2.3.2 Curativos

A aplicação de curativos é o método mais comum para o tratamento de feridas, já que oferecem uma barreira física entre a pele lesionada e o ambiente externo. Um curativo ideal seria aquele capaz, não só de proteger a ferida do ambiente, mas também de remover excesso de exsudato, manter a hidratação, permitir a troca gasosa, ser de fácil remoção, não causar reações alérgicas e ser biocompatível (Zeng *et al.*, 2018; Gushiken *et al.*, 2021). A presença de microrganismos na ferida gera atraso no processo de cura, por isso, também se espera que um curativo ideal apresente propriedades antimicrobianas para evitar infecções e formação de biofilme (Mirhaj *et al.*, 2022).

Antes de 1960, curativos eram considerados produtos passivos com pequeno papel no processo de cura da ferida (Liu *et al.*, 2018). Porém, atualmente, cada vez mais esforços estão sendo aplicados no desenvolvimento de curativos ativos e funcionais. Os curativos tradicionalmente utilizados como gazes, algodão e bandagem apresentam baixo custo e fácil fabricação, porém, apenas recobrem a ferida e absorvem o exsudato, causando dor no momento da remoção e necessidade de trocas constantes (Mirhaj *et al.*, 2022).

Para superar tais desvantagens, curativos mais modernos como filmes, espumas, hidrocolóides, hidrofibras, alginatos e hidrogéis estão sendo desenvolvidos a partir de polímeros naturais ou sintéticos (Figura 3). Os biopolímeros apresentam vantagem por serem biocompatíveis e biodegradáveis, além de apresentarem boas propriedades físico-químicas e maior semelhança com a MEC, diminuindo o aparecimento de reações alérgicas (Raju *et al.*, 2022).

Figura 3: Tipos de curativos de base polimérica.



Fonte: Adaptado de Shi *et al.*, (2023).

Filmes curativos são membranas poliméricas de espessura e tamanho variáveis que se aderem a lesões de diversos tamanhos e se adaptam a diferentes partes do corpo (Raju *et al.*, 2022). Possuem boa flexibilidade e resistência, absorvem o excesso de exsudato, são de fácil remoção e apresentam menor necessidade de trocas frequentes, permitem a troca gasosa e são uma boa barreira contra contaminação externa (Savencu *et al.*, 2021). Além disso, possibilitam a incorporação de princípios ativos, funcionando assim como um sistema de liberação direta de drogas no sítio da ferida, acelerando o processo de cura (Raju *et al.*, 2022).

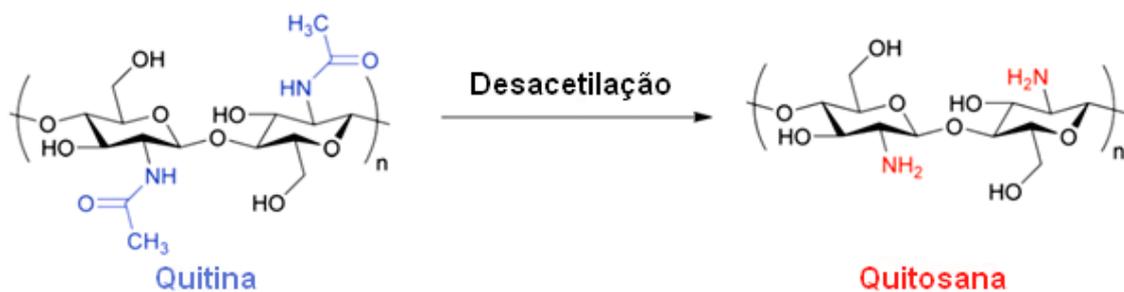
Al-Gharibi *et al.*, (2018) reforçam estas informações. Os autores fizeram uma revisão sistemática onde verificaram a presença de diversos estudos que relacionam o uso de curativos tecnológicos e a cura mais rápida de feridas. Além de aumentarem a taxa de cura, curativos modernos são mais custo-efetivos, visto que diminuem a necessidade de troca do curativo e o tempo necessário para aplicação.

Sendo assim, é possível dizer que os curativos modernos oferecem maior conforto e qualidade de vida ao paciente, maior eficiência e menor custo aos serviços de saúde. Tais fatores associados a tendência de crescimento do mercado, fazem dos curativos tecnológicos um ramo promissor para o desenvolvimento de novas formulações.

2.4 QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo catiônico natural composto de unidades N-acetil-D-glucosamina e β (1 \rightarrow 4)-D-glucosamina oriundas da desacetilação parcial ou total da quitina (Figura 4) (Savencu *et al.*, 2021). A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, podendo ser obtido a baixos custos a partir de crustáceos, fungos, parede celular de algas, exoesqueletos de insetos e moluscos (Matica *et al.*, 2019).

Figura 4: Processo de desacetilação da quitina e obtenção da quitosana.



Fonte: JIN *et al.*, (2021).

Além da sua vasta aplicação na indústria de medicamentos, insumos médicos, engenharia de tecidos, alimentos, cosméticos e na agricultura, a quitosana também apresenta potencial como matéria prima para o desenvolvimento de curativos tecnológicos para o tratamento de feridas (Matica *et al.*, 2019). Isso se dá pelas vantagens de ser um polímero atóxico, biocompatível e biodegradável, por apresentar a habilidade de formar filmes mucoadesivos, além de desempenhar importantes atividades biológicas que aceleram o processo de cura da ferida (Savencu *et al.*, 2021).

Ademais, a quitosana é um eficiente material para o controle de liberação de fármacos, atuando também como um indutor de permeação de substâncias pela pele. Tal efeito se deve à interação da quitosana com as células epiteliais, o que resulta na abertura das junções oclusivas e aumento da permeação paracelular pelo epitélio (Liu *et al.*, 2018).

As propriedades físico-químicas da quitosana são importantes para compreender sua funcionalidade. Uma das principais características deste polímero é a sua natureza policatiônica em meio ácido, resultado da ionização de seus grupamentos amino distribuídos pela cadeia polimérica. A proporção de grupamentos amino é diretamente relacionada ao grau de desacetilação da quitosana, fator que influencia suas propriedades físico-químicas, biodegradabilidade e atividades biológicas. A massa molar também é variável e afeta tanto sua bioatividade, quanto sua viscosidade, elasticidade e resistência (Matica *et al.*, 2019; Moeini *et al.*, 2020).

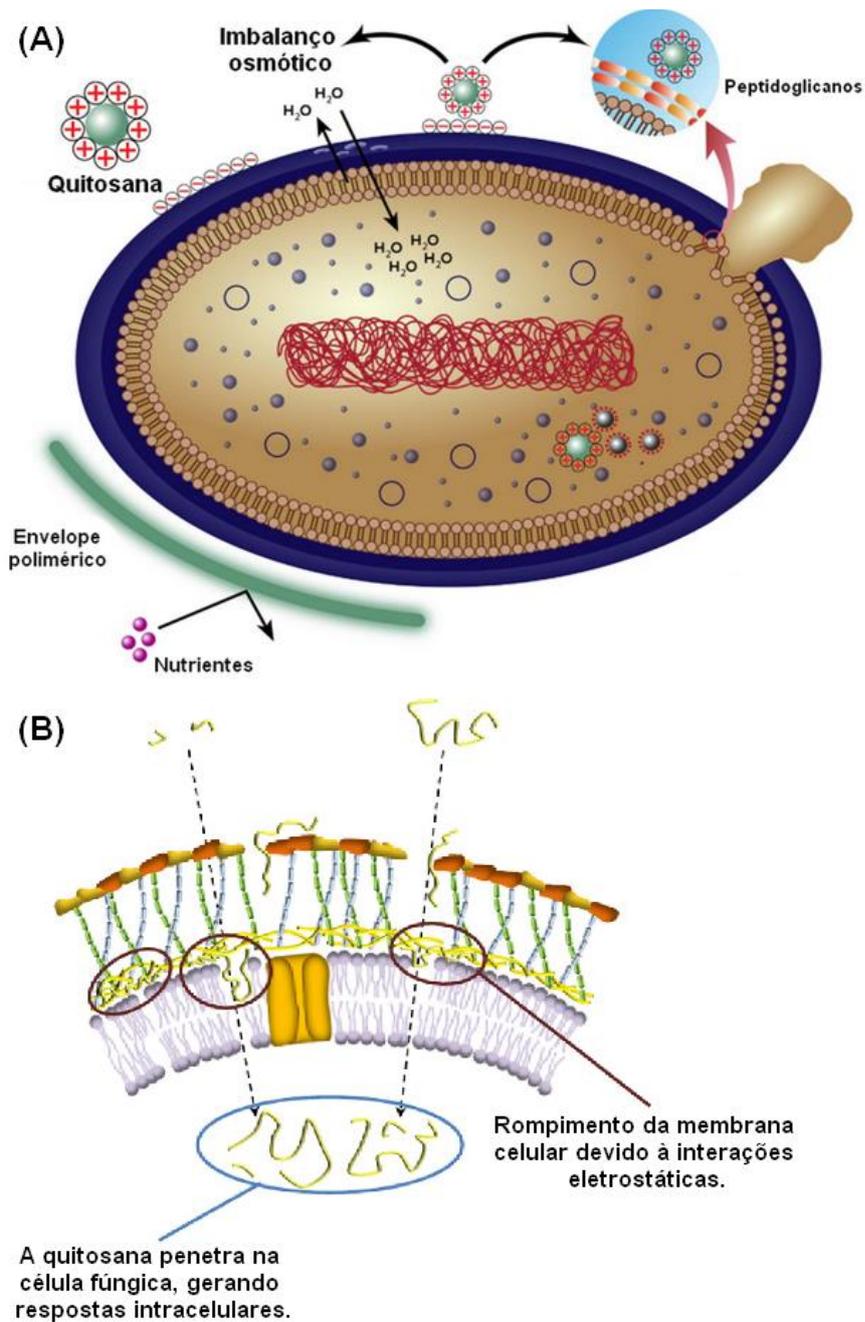
A bioatividade da quitosana tem papel importante em vários estágios da cicatrização de feridas. A coagulação e hemostase se iniciam imediatamente após a lesão e, nesse momento, a quitosana age acelerando tais processos, pois é capaz de favorecer a ativação de plaquetas e bloquear terminações nervosas, reduzindo também a dor (Bano *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018). Na fase inflamatória, estudos indicam que curativos de quitosana aceleram o reparo tecidual, melhoram a função de células inflamatórias e regulam a liberação de mediadores inflamatórios como IL-8, prostaglandina E, IL-1 β entre outros, favorecendo uma resposta mais adequada (Liu *et al.*, 2018).

Nas fases de proliferação e remodelamento, a quitosana pode servir como uma matriz não-proteica para a regeneração da pele, estimular a proliferação de fibroblastos, a angiogênese, regular a deposição de colágeno e aumentar a síntese de ácido hialurônico, acelerando a cura e prevenindo o aparecimento de cicatrizes (Liu *et al.*, 2018). A prevenção de cicatrizes é atribuída em especial à N-acetil-glicosamina presente na quitosana, essencial para o reparo tecidual e componente principal do tecido dérmico (Bano *et al.*, 2017).

Formulações elaboradas a partir deste biopolímero também são úteis para a prevenção de infecções por conta da sua atividade antimicrobiana intrínseca. Os possíveis mecanismos envolvidos se devem à interação dos grupos aniônicos presentes na superfície da parede celular bacteriana com os grupos catiônicos $-NH_3^+$ da cadeia polimérica da quitosana. Esta interação forma uma camada impermeável na superfície da célula bacteriana e inibe o transporte de solutos essenciais para sua sobrevivência (Figura 5) (Bano *et al.*, 2017). Outra possibilidade é atribuída à invasão da quitosana no núcleo celular, a qual inibe a síntese de RNA mensageiro e,

consequentemente, de proteínas (Moeini *et al.*, 2020). O mesmo ocorre em células fúngicas, onde o rompimento da membrana celular atribuído a interações eletrostáticas entre a quitosana e fosfolípidos de membrana resultam na invasão do polímero e na inibição da síntese de proteínas (Verlee *et al.*, 2017).

Figura 5: Representação dos mecanismos de ação antibacteriano (A) e antifúngico (B) da quitosana.



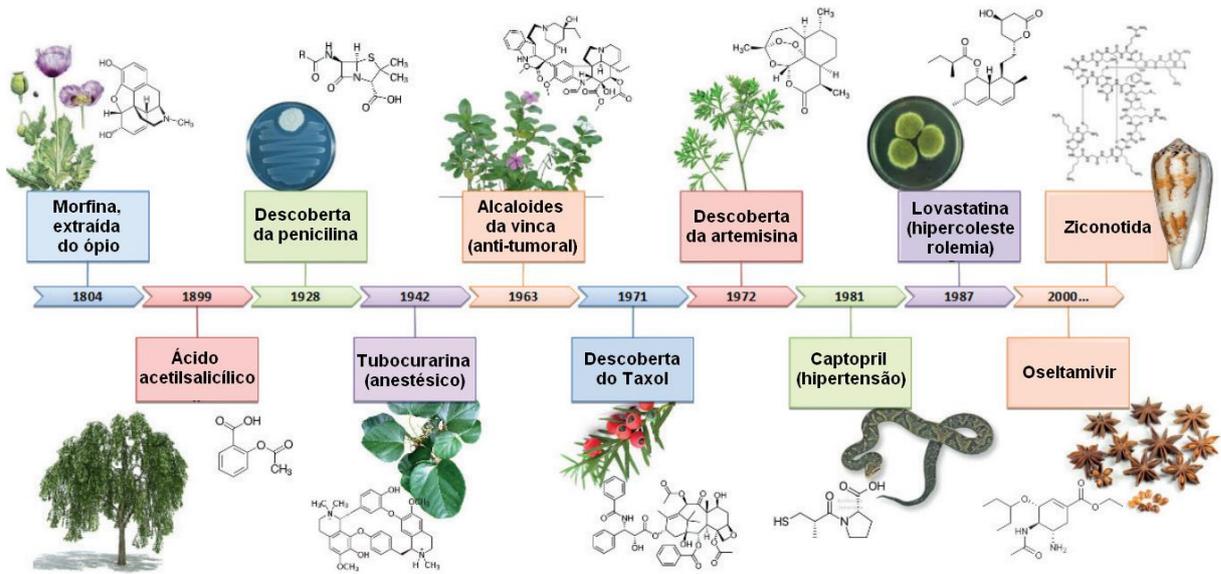
Fonte: Adaptado de Simões *et al.*, (2018) e Verlee *et al.* (2017).

Alguns curativos compostos de quitosana já estão disponíveis no mercado, sendo que a maioria deles atua como hemostático, como por exemplo o Celox™ (MedTrade) e o ExcelArrest® XT (Hemostasis). O Chitoderm® (Trusetal) também é comercializado como curativo, mas, diferente dos dois primeiros, é indicado para o tratamento de infecções cutâneas (Matica *et al.*, 2019). Curativos a base de quitosana podem ser fabricados tanto sozinhos, quanto incorporados com antibióticos, partículas metálicas, compostos naturais e extratos com potencial na cicatrização de feridas (Kravanja *et al.*, 2019). Brás *et al.*, (2020) desenvolveram filmes de quitosana incorporados com o extrato das folhas de *Cynara Cardunculus* L. para o tratamento de feridas crônicas. Os resultados exibiram promissora capacidade anti-inflamatória e cicatrizante aliadas à baixa citotoxicidade. Ademais, Abbas *et al.*, (2022) buscaram avaliar as atividades biológicas de um filme de quitosana e do extrato das raízes de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton. Foi observada importante atividade antimicrobiana e antioxidante, indicando que o curativo poderia ser usado no tratamento de feridas e doenças infecciosas.

2.5 ESPÉCIES VEGETAIS NO TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS

O uso de plantas medicinais pela população como tratamento para doenças diversas é uma prática comum a milhares de anos. Porém, somente a partir do século IX, se iniciaram as investigações e as primeiras descobertas de fitocompostos com atividades farmacológicas como a digoxina (*Digitalis lanata*) isolada por Claude-Adolphe Nativelle, atropina (*Atropa belladonna*) isolada por Mein, salicilina (casca do salgueiro, *Salix alba*) isolada por Rafeale Piria, entre outros (Dutra *et al.*, 2016). A Figura 6 exemplifica alguns dos principais medicamentos desenvolvidos a partir de produtos naturais até os anos 2000.

Figura 6: Medicamentos oriundos de produtos naturais descobertos no último século



Fonte: Adaptado de Valli e Bolzani (2019).

Desde então, o interesse pela fitomedicina vem se expandindo pelo mundo. Estima-se que o mercado global de produtos naturais de origem vegetal tenha alcançado 165 bilhões de dólares em 2022 de acordo com o *Fortune Business Insights*. Além disso, cerca de 50% dos novos medicamentos desenvolvidos entre 1981 e 2014 são derivados de produtos naturais (Sorokina; Steinbeck, 2020).

O Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta, abrigando cerca de 20% do total de espécies de fauna e flora (BRASIL, 2023). Tal fator, associado ao uso extenso de plantas pela medicina tradicional brasileira, colocam o país em grande vantagem na pesquisa e desenvolvimento de produtos naturais (Valli; Bolzani, 2019).

Diversas espécies vegetais e seus respectivos extratos são tradicionalmente utilizados para o tratamento de feridas, já que são capazes de induzir a cura e a regeneração tecidual. Além de oferecerem uma fonte acessível de compostos bioativos, na maioria das vezes, provocam efeitos adversos mínimos (Yazarlu *et al.*, 2021).

Visto que o reparo de lesões cutâneas envolve mecanismos complexos, o grande desafio para o manejo de feridas está no desenvolvimento de tratamentos considerados multifuncionais, ou seja, capazes de desempenhar uma combinação de atividades biológicas como anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e analgésica (Serra *et al.*, 2017). Estudos *in vivo* e *in vitro* tem demonstrado a capacidade de

metabólitos secundários de exercerem tais efeitos no processo de cura de feridas, modulando a produção de citocinas e fatores de crescimento, promovendo a regeneração celular e a deposição tecidual (Moeini *et al.*, 2020).

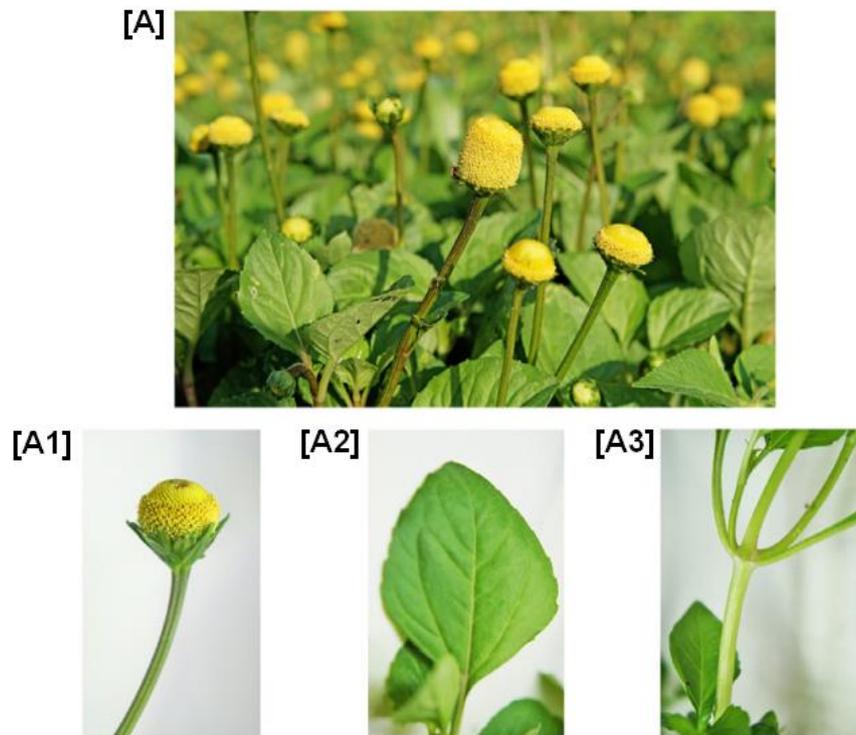
No Brasil diversas plantas com potencial farmacológico para o tratamento de feridas já são aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e podem ser prescritas no Sistema Único de Saúde (SUS). Entre estas destaca-se aquelas nativas do Brasil como *Ananas comosus* L. Merrill (abacaxi); *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt. (crajiuru); *Caesalpinia leiostachya* (Benth.) Ducke. (pau-ferro); *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba); *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. (canela de cunhã); *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta); *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira); *Stryphnodendron adstringens* Mart. (barbatimão); *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb. (ipê rosa) (Marmitt *et al.*, 2018).

Diante do exposto, fatores como a tendência de crescimento mundial do mercado de plantas medicinais, a exuberante biodiversidade brasileira e o grande potencial farmacológico das espécies vegetais, abrem caminhos para a pesquisa e desenvolvimento de novas formulações visando o tratamento de lesões cutâneas.

2.6 *Acmella oleracea* (L.) R.K Jansen: USO TRADICIONAL, FITOQUÍMICA, ATIVIDADE BIOLÓGICA E APLICAÇÕES DA ESPÉCIE

Acmella oleracea (L.) R.K Jansen, popularmente conhecida como jambu, agrião do pará e agrião bravo, é uma espécie vegetal nativa da Amazônia presente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Gilbert; Favoreto, 2010; Lalthanpuii *et al.*, 2018). É uma planta herbácea anual e perene da família Asteraceae, medindo até 90 cm de altura (Figura 7). Essa espécie está presente na cadeia produtiva alimentar do Norte do Brasil e suas folhas e flores são usadas em pratos típicos, como tacacá e pato no tucupi, devido ao sabor acre e pungente (Uthpala; Navaratne, 2021).

Figura 7: Espécie vegetal *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen.



Acmella oleracea (L.) R. K. Jansen. A: Planta inteira. A1: flor amarela e arredondada. A2: folha ovalada e irregular. A3: haste.

Fonte: Adaptado de PERETTI et al., (2021).

Além do seu uso alimentício, o jambu tem sua aplicação vasta e bem documentada na medicina tradicional. A decocção de suas flores e folhas é utilizada no tratamento de lesões de pele e mucosas, assim como em casos de gripe, tosse, tuberculose, dor de dente, malária, infecções bacterianas e fúngicas (Lalthanpuii *et al.*, 2018; Araújo *et al.*, 2021; Bellumori *et al.*, 2022). A espécie é conhecida popularmente como planta da dor de dente, devido ao efeito anestésico do seu composto majoritário, o espilantol (Uthpala; Navaratne, 2021).

O cultivo do jambu é feito principalmente por pequenos agricultores em hortas domésticas, com finalidade comercial, cujas técnicas de cultivo utilizadas são as tradicionais advindas dos povos nativos da Região Amazônica. Por este motivo, é considerada uma espécie de grande importância para a economia familiar no Norte do Brasil. *A. oleracea* apresenta fácil cultivo e germinação rápida em clima quente e úmido, com ciclo de vida de 40 a 75 dias (Silva, 2023).

Atualmente, o jambu tem atraído grande interesse no campo da medicina de produtos naturais e como um nutracêutico, com aplicação cosmética, farmacêutica e em alimentos (Silva, 2023). Porém, sua produção ainda é majoritariamente familiar, o que limita o seu cultivo em escala (Homma *et al.*, 2011).

As folhas de jambu podem conter diversos compostos fenólicos (ácido vanílico, ácido clorogênico, escopoletina e ácido *trans*-ferúlico), flavonoides (quercetina) e taninos. Tais compostos se concentram especialmente nas folhas da planta, e estão relacionados a sua forte capacidade antioxidante e anti-inflamatória, por meio da inibição de mediadores como a cicloxigenase e a lipoxigenase (Abdul-Rahim *et al.*, 2021).

Fitosteróis como o β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, α -amirina e β -amirina também são encontradas em *A. oleracea* e apresentam valor nutricional significativo no combate a doenças cardiovasculares. Ademais, terpenos como o β -cariofileno, β -pineno, α e β -bisabolol, mirceno e limoneno são alguns exemplos desta classe de compostos isolados nas partes aéreas de *A. oleracea*. Os terpenos, em especial o β -cariofileno, são responsáveis por importantes atividades anti-inflamatória, antiedema, antitumoral e bactericida (Lalthanpuii *et al.*, 2018; Savic *et al.*, 2021; Murthy; Kee-Yoeup, 2021).

As partes aéreas do jambu também são especialmente ricas em alquilamidas, sendo que a maioria de suas atividades biológicas é atribuída a presença do espilantol, responsável também pelas características sensoriais de formigamento e anestesia (Lalthanpuii *et al.*, 2018; Savic *et al.*, 2021).

Baseados em sua vasta aplicação no tratamento de doenças pelos povos tradicionais, as atividades biológicas do jambu e seus fitoconstituintes vem sendo investigadas. O extrato metanólico de jambu demonstrou ser eficaz na redução de hiperpigmentação da pele e melhora da cicatrização, aspectos importantes para o tratamento de feridas. Ademais, o extrato metanólico de jambu também demonstrou ser eficaz na redução de hiperpigmentação da pele e melhora da cicatrização (Uthpala; Navaratne, 2021).

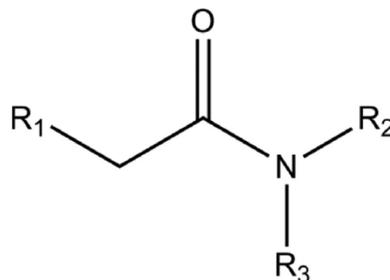
Além disso, ajudando a corroborar o uso popular do jambu no tratamento de doenças infecciosas, alguns estudos têm demonstrado o efeito antimicrobiano de extratos da planta. De acordo com um estudo de Uthpala *et al.*, (2021), o extrato

aquoso das flores de *A. oleracea* exibiu valores de concentração inibitória mínima inferiores a 1000 µg/mL para *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Peretti *et al.*, (2021) também verificaram que o extrato hidroalcoólico de folhas e raízes de *A. oleracea* foi capaz de inibir o crescimento de *Streptococcus mutans*, bactéria causadora da cárie dental.

2.6.1 Alquilamidas

As alquilamidas são um grupo de metabólitos secundários relacionado a variados efeitos farmacológicos (Elufioye *et al.*, 2020). São produzidas como resultado da ligação entre ácidos graxos, insaturados em sua maioria, e um grupamento amina proveniente de um aminoácido descarboxilado podendo ser alifático, cíclico ou aromático (Figura 8). Esta ligação amida se assemelha às ligações peptídicas encontradas nas proteínas (Sharma; Arumugam, 2021).

Figura 8: Estrutura molecular básica das alquilamidas.



R₁: cadeia de ácido graxo; R₂: aminoácido descarboxilado ou seus derivados; R₃: H /CH₃/OCH₃ /OH.

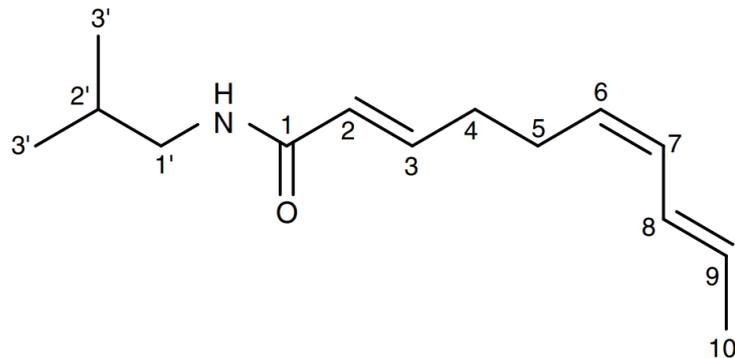
Fonte: Sharma; Arumugam, (2021).

O espilantol é uma alquilamida alifática formada a partir do aminoácido valina, precursor da porção isobutilamina da molécula, e do ácido α-linolênico (Figura 9) (Silveira, 2017). Apresenta uma porção amida relativamente polar e uma porção graxa mais apolar, o que confere uma característica anfifílica e possibilita sua extração por meio de solventes de diferentes polaridades (Uthpala; Navaratne, 2021).

O espilantol é amplamente distribuído em espécies das famílias Asteraceae e Piperaceae. Na família Asteraceae está presente não só na espécie *A. oleracea*, mas também em outras plantas do gênero *Acmella* como *A. ciliate*, *A. oppositifolia*, *A.*

radicans, *A. brachyglossa*, *A. paniculata* e *A. uliginosa*, além de *Welelia parviceps* e *Heliopsis longipes* (Barbosa *et al.*, 2016). Apesar de ser encontrado em todas as partes de *A. oleracea*, o espilantol é extraído em maior concentração nas flores (Alcantara *et al.*, 2015).

Figura 9: Estrutura química do espilantol (C₁₄H₂₃NO).



Fonte: Barbosa *et al.*, (2016).

Apesar dos mecanismos anti-inflamatórios do espilantol não serem totalmente elucidados, um estudo *in vitro* de Bakondi *et al.*, (2019) sugere que esta alquilamida é capaz de inibir a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Tais efeitos podem ser parcialmente atribuídos à inativação do NF-κB. Ademais, outros estudos indicaram que compostos bioativos encontrados na planta como terpenos, ácido vanílico, flavonoides, escopoletina e ácido *trans*-ferúlico podem atuar sinergicamente ao espilantol por meio desta via.

De acordo com um trabalho de Fabri *et al.*, (2021), realizado por nosso grupo de pesquisa, o espilantol foi capaz de exercer atividade antifúngica sobre uma cepa multirresistente de *Candida albicans*. Tal composto interferiu na integridade da célula fúngica, causando o rompimento da membrana celular. De acordo com os autores, um dos possíveis mecanismos de ação do espilantol se dá por sua ligação ao ergosterol, fundamental para a integridade e manutenção das características físicas da membrana celular fúngica (Fabri *et al.*, 2021).

Em um estudo em modelo de dermatite atópica, o espilantol reduziu o espessamento da epiderme e modulou a deposição de colágeno, além de regular a infiltração de células inflamatórias na lesão (Abdul-Rahim *et al.*, 2021). Spiegeleer *et al.*, (2013) também indicaram que alquilamidas como o espilantol, além de penetrarem

de forma significativa pela pele, são capazes de aumentar a capacidade de permeação de outros compostos, podendo potencializar o efeito farmacológico local. Tais fatos ajudam a justificar a aplicação tópica de preparações contendo alquilamidas para redução da dor e doenças de pele como eczema e em cosméticos para a suavização de rugas.

Apesar de apresentarem diversas atividades biológicas e aplicações para a indústria farmacêutica, existem poucos produtos comerciais à base de jambu e de espilantol disponíveis no mercado. A atividade analgésica do espilantol já foi estabelecida e é explorada em produtos como formulações de géis bucais de espilantol com ação analgésica como o Buccaldol® (Alphamega, França) e o Indolphar® (ID Phar, Bélgica), além de tinturas de uso tópico contendo extrato de *A. oleracea* para tratamento de infecções fúngicas produzidas pela empresa belga A. Vogel (Silveira *et al.*, 2018).

O extrato de jambu, assim como espilantol, é capaz de relaxar a musculatura lisa facial e, por isso, ganha destaque na formulação de cosméticos antirrugas e antienvhecimento. Como exemplo temos o Spilol®, ativo patenteado pela Natura Cosméticos, o Gatuline® Expression AF e o Gatuline® In-tense da farmacêutica Gattefossé SAS (Silveira *et al.*, 2018).

Apesar da existência de estudos acerca do potencial bioativo do Jambu, a aplicação desta espécie especificamente para o tratamento de lesões cutâneas ainda é pouco investigada. Diante disso, sabendo da complexidade do processo de cura de lesões cutâneas e do potencial farmacológico da planta, objetiva-se com este trabalho, o desenvolvimento de um filme polimérico de quitosana e extrato metanólico das folhas de *A. oleracea* de forma a contribuir, não só para a melhoria da qualidade de vida da população através do tratamento de desordens cutâneas, mas também para o desenvolvimento de produtos que forneçam destaque à biodiversidade brasileira através da valorização da comunidade e economia locais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Aprofundar o conhecimento acerca do potencial biológico do extrato metanólico das folhas de *Acmella oleracea* (AOM) e desenvolver um biocurativo (filmes poliméricos) de quitosana contendo AOM, visando a aplicação tópica em feridas.

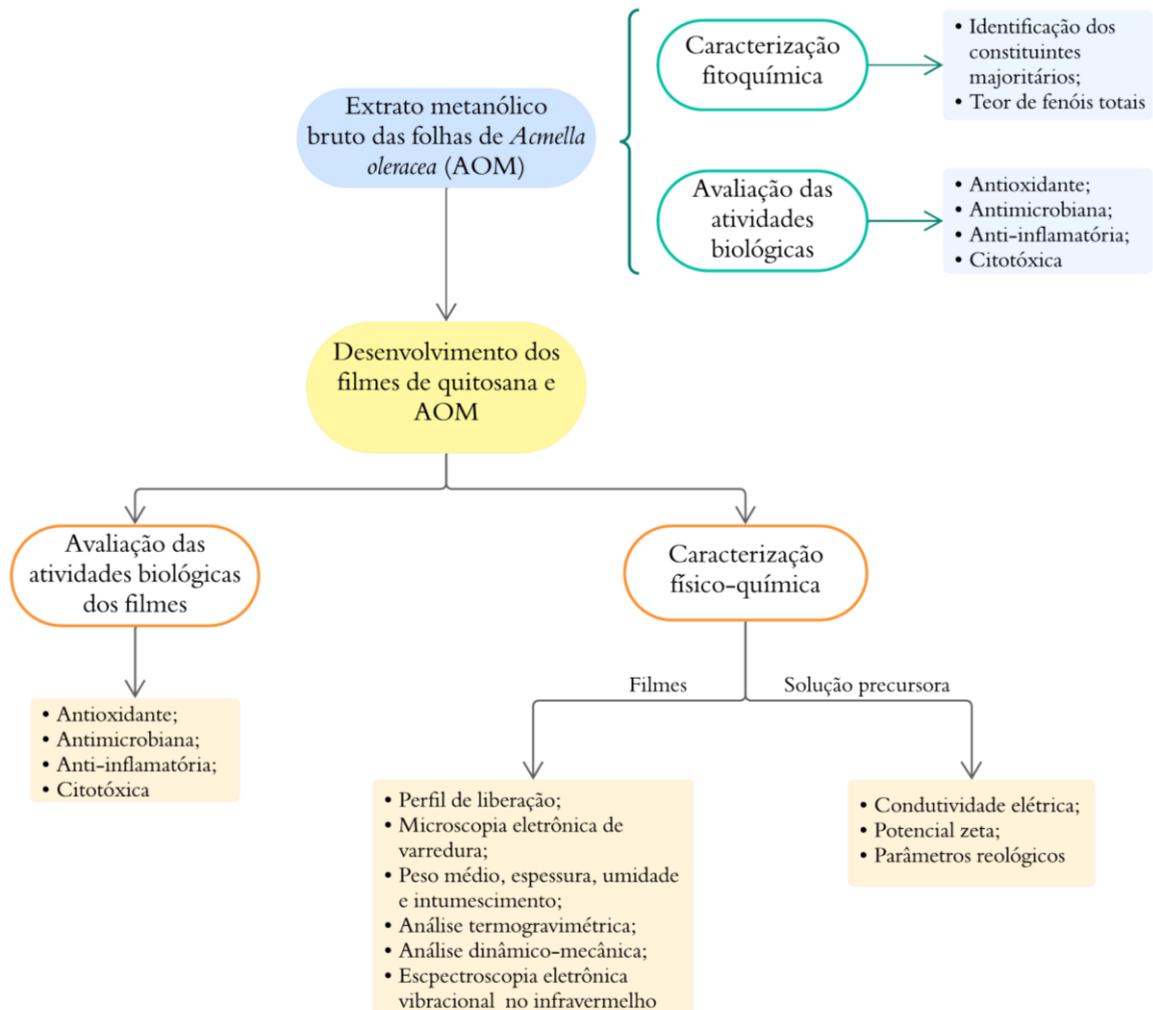
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a identificação dos constituintes de AOM por cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a espectrometria de massas com analisador quadrupolo tempo de voo (*UFLC-QTOF-MS*);
- Avaliar a citotoxicidade de AOM em cultura celular;
- Avaliar a atividade antioxidante de AOM *in vitro*;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória de AOM em cultura celular;
- Avaliar a atividade antimicrobiana de AOM frente aos principais microrganismos causadores de infecções cutâneas;
- Desenvolver os biocurativos de quitosana com diferentes concentrações de AOM;
- Realizar a caracterização físico-química das soluções precursoras dos biocurativos e dos biocurativos contendo AOM;
- Avaliar o perfil de liberação de fitoconstituintes presentes nos biocurativos;
- Avaliar a citotoxicidade dos biocurativos em cultura celular;
- Avaliar a atividade antioxidante dos biocurativos *in vitro*.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória dos biocurativos em cultura celular;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos biocurativos frente aos principais microrganismos causadores de infecções cutâneas;

4 MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma disposto na Figura 10 apresenta um resumo dos ensaios realizados no presente estudo.

Figura 10: Desenho experimental do trabalho.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

4.1 MATERIAL VEGETAL

O extrato metanólico das folhas de *Acmella oleracea* (AOM) foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Alan Franco Barbosa, professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso - Campus Sorriso (IFMT - Campus

Sorriso). O material vegetal (folhas) das amostras de Jambu foi coletado na Fazenda Experimental do IFMT na cidade de Sorriso em maio de 2019. A fazenda experimental está localizada na região centro-norte do estado do Mato Grosso, Brasil, nas coordenadas: 12°41'39,98" S e 55°48'22,04" O. A planta foi identificada como *Acmella oleracea* L. e incorporada ao herbário da IFMT Campus Sinop (DRG786). A espécie vegetal e a atividade a ser desenvolvida foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (número de cadastro: A114768).

4.2 PREPARO DO EXTRATO

As folhas coletadas foram lavadas com água para remover resíduos do solo e higienizadas por meio de imersão em solução contendo 200 ppm (mg/L) de cloro residual livre a partir de hipoclorito de sódio com 10% de pureza durante 10 min. Em seguida, uma última lavagem com solução contendo 5 ppm (mg/L) de cloro residual livre foi realizada durante 10 min, com subsequente drenagem da água. O processo de desidratação foi realizado em desidratador (Tecnal, TE-394/3 MP, Brasil) com circulação forçada de ar a 50 °C. O material vegetal desidratado (898,61 g) foi então triturado e submetido à maceração com metanol 99,8% em temperatura ambiente. O solvente foi removido em evaporador rotativo a 40°C. A extração foi efetuada durante cerca de 40 dias, até a exaustão. O extrato obtido (AOM) foi armazenado sob refrigeração a 4°C.

4.3 TEORES DE FENÓIS TOTAIS

A determinação do teor de fenóis totais em AOM foi realizada de acordo com o método adaptado de Folin–Ciocalteu (Folin, 1927). Para isso, foi preparada uma curva de calibração utilizando-se ácido tânico como padrão, em concentrações de 7,5 à 350 µg/mL, a partir de uma solução metanólica à 500 µg/mL. Para o doseamento da amostra, foi preparada uma solução estoque de AOM à 1 mg/mL. Em microplaca de 96 poços foram adicionados 120 µL do reagente Folin-Ciocalteu à 20 %, 30 µL da amostra e 100 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) à 4 %. Para o branco da amostra,

a solução reagente foi substituída por metanol. Decorridos 30 min de incubação ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-Vis a 770 nm. O conteúdo total de fenóis foi expresso em mg/g de extrato vegetal, em equivalentes de ácido tânico (EAT). O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para a concentração testada.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DO EXTRATO POR UFLC-QTOF-MS.

A análise dos fitoconstituintes presentes em AOM foi feita por meio da cromatografia líquida ultrarrápida acoplada à espectrometria de massa no modo de íons positivos usando um Shi-madzu UFLC (modelo Nexera) e um espectrômetro de massa Bruker (modelo QTOF Compact) com fonte de ionização por *electrospray*. Como fase móvel, foi utilizada água acidificada com ácido fórmico, pH = 3 (fase A) e metanol (fase B), com vazão de injeção de 0,4 mL/min e tempo de corrida de 12 min. A coluna utilizada foi do tipo Kinetex 2,6 µm, C18-100A, com dimensões de 100 mm x 3,0 mm.

A corrida cromatográfica começou com 40% da fase B, aumentando para 70% aos 12,20 min e 95% aos 15,70 min. Posteriormente, a fase móvel foi devolvida a 40% B aos 17,20 min para reequilibrar a coluna, seguindo até 18,50 min, com término em 20 min. As condições de ionização foram definidas da seguinte forma: voltagem de *electrospray* da fonte de íons de 40 V, voltagem capilar de 4500 V e temperatura capilar de 220 °C. A aquisição de massa de varredura completa foi realizada por varredura de 100 a 1000 m/z.

A comparação do perfil de fragmentação dos constituintes presentes no extrato foi feita por meio do banco de dados Wiley e dados da literatura. A análise foi realizada em colaboração com a Fiocruz através da Plataforma de Métodos Analíticos de Farmanguinhos/Fiocruz.

4.5 LINHAGENS CELULARES E CULTURA

Fibroblastos L929 (ATCC®CCL-1 NCTC) foram cultivados em meio *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino e 1%

da solução dos antibióticos [Penicilina (100 µg/mL) e Estreptomicina (100 µg/mL)]. Macrófagos da cavidade peritoneal obtidos a partir de camundongos BALB/c foram cultivados em meio RPMI-1640 suplementado com 2Mm de L-glutamina, 5% de SFB e solução de antibióticos [Penicilina (100 µg/mL) e Estreptomicina (100 µg/mL)]. O protocolo para utilização de linhagens de macrófagos peritoneais foi aprovado pelo Comitê de Ética para a Investigação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (n° 007/2018-CEUA). Tanto os fibroblastos L929 quanto macrófagos peritoneais foram mantidos em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ até o dia do experimento.

4.6 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO

4.6.1 Análise da citotoxicidade de AOM em fibroblastos L929 e macrófagos peritoneais

A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2Htetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983). Os fibroblastos L929 cultivados foram transferidos para microplacas de 96 poços (5x10³ células/poço), assim como os macrófagos peritoneais murinos (2x10⁵ células/poço). Ambos foram tratados com AOM em concentrações que variaram de 18,75 a 300,00 µg/mL. Para o controle, foram utilizadas células tratadas apenas com dimetilsulfóxido (DMSO). As células foram incubadas por 48 h em 5% CO₂ a 37 °C. Após esse período, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 90 µL de meio suplementado acrescido de 10 µL de solução de MTT à 5 mg/mL, para que então as placas fossem incubadas por 2:30 h à 37 °C com 5% de CO₂. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para as concentrações testadas. A absorvância (Abs) foi lida a 570 nm em espectrofotômetro e a viabilidade celular (%) obtida pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{Abs (amostra)}}{\text{Abs (controle negativo)}} \times 100$$

Onde,

- Abs (amostra): absorvância medida após tratamento das células com a amostra;

- Abs (controle): absorvância medida após tratamento das células com DMSO (veículo).

4.6.2 Avaliação da atividade antioxidante

4.6.2.1 Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS)

Os níveis intracelulares de EROS em macrófagos peritoneais estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) e IFN- γ foram avaliados usando 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) (Stroppa *et al.*, 2017). As células foram incubadas por 48h na presença de diferentes concentrações de AOM (18,75 a 300,00 μ g/mL) e estimuladas com LPS a 1 μ g/mL e IFN- γ a 1 ng/mL. Macrófagos estimulados, que não receberam tratamento, foram utilizados como controle. Após este período, os macrófagos foram lavados com PBS e incubados com H₂DCFDA (1 mM) por 30 min ao abrigo de luz a 37°C e CO₂ 5%. Os níveis de EROS foram avaliados por espectrofluorímetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a 485/528 nm de excitação e emissão, respectivamente. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para as concentrações testadas.

4.6.2.2 Sequestro de radicais livres (DPPH•)

A atividade sequestrante de radicais DPPH• foi determinada pelo método descrito por Brand-Williams *et al.*, (1995). O extrato e os controles positivos (rutina e quercetina) foram solubilizados em metanol (MeOH) obtendo-se uma solução à 1 mg/mL. 100 μ L das soluções do extrato e controles positivos foram transferidos para microplaca de 96 poços e foram realizadas diluições sucessivas com 50 μ L de MeOH. Em seguida, 150 μ L da solução reagente de DPPH 20 μ g/mL em MeOH foram adicionados aos poços, resultando em concentrações de 250,00 a 0,49 μ g/mL. O branco da amostra foi preparado pela substituição do reagente DPPH pelo MeOH. Já o controle negativo foi preparado apenas com DPPH sem as amostras. A placa foi incubada por 30 min ao abrigo de luz para que então fosse medida a absorvância em

espectrofotômetro UV-Vis (ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2) à 517 nm em temperatura ambiente. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para as concentrações testadas. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da concentração inibitória de 50% (IC₅₀) em $\mu\text{g/mL}$, que indica a quantidade necessária de amostra para inibir em 50% a ação oxidante do radical DPPH• e como porcentagem de inibição do radical DPPH, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Abs DPPH} - \text{Abs Amostra}}{\text{ABS DPPH}} \times 100$$

Onde,

- Abs DPPH: absorvância mensurada para o radical DPPH•
- Abs amostra: absorvância mensurada para as amostras.

4.6.2.3 Poder de redução do complexo fosfomolibdênio.

O ensaio foi baseado no método descrito por Prieto *et. al.*, (1999). O extrato e os controles positivos (quercetina, rutina) foram solubilizados em solução hidroalcolica (MeOH:H₂O) na proporção 1:1, resultando em soluções de 0,5 mg/mL para a amostra e controles positivos. 300 μL das amostras e 2 mL da solução reagente (1,12 mL da solução de fosfato, 0,48 mL de molibdato, 0,4 mL de H₂SO₄) foram adicionados em tubos de ensaio. O branco da amostra foi preparado substituindo-se a solução reagente por MeOH e o branco do experimento foi preparado substituindo-se a amostra pela solução hidroalcolica. Em seguida, os tubos foram fechados e aquecidos em banho-maria à 95°C por 90 min. Após este período, os tubos de ensaio foram resfriados em banho de gelo e 200 μL das soluções foram transferidas para microplaca de 96 poços para que então fosse realizada a leitura em espectrofotômetro UV-Vis (ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2) à 695 nm. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para as concentrações testadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de Atividade Antioxidante

Relativa (AAR%) a quercetina e rutina (Negri *et al.*, 2009; Zocoler *et al.*, 2009), conforme a equação abaixo:

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

Onde,

- Abs (controle positivo): absorvância dos controles positivos, quercetina e rutina;
- Abs (amostra): absorvância das amostras;
- Abs (branco amostra): absorvância do branco das amostras; e
- Abs (branco controle positivo): absorvância do branco dos controles positivos.

4.6.2.4 Inibição da formação de malondialdeído

A determinação da peroxidação lipídica pela quantificação de malondialdeído (MDA) foi realizada de acordo com o método descrito por Osawa *et al.*, (2005) com algumas modificações. Para AOM e o BHT (controle positivo) foram utilizadas as concentrações de 7,5; 15 e 30 mg em 200 µL de metanol. O preparo do homogenato de cada amostra se deu pela adição, em cada béquer, de 25 g de carne moída, 17 mL de água destilada e as amostras previamente solubilizadas. Os homogenatos foram então aquecidos em chapa aquecedora até o aparecimento da coloração “amarronzada” (carne cozida). Em seguida, o volume de cada bequer foi completado para 100 mL de água destilada e procedeu-se a homogeneização da mistura. Como controle negativo (100% de oxidação), foi utilizado um homogenato apenas com adição de metanol (sem adição de amostra). Os homogenatos foram então transferidos para frascos âmbar vedados e armazenados sob refrigeração durante 7 dias. Para a quantificação de MDA, foram realizadas leituras das absorvâncias dos dias 0, 1, 3, 5 e 7. Em cada tubo de ensaio foi adicionado 0,5 g de homogenato, 50 µL de BHT, 2,5 mL de ácido fosfórico à 1 % e 1,25 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) à 1%. As soluções foram aquecidas por 15 min em banho-maria à 100 °C e em seguida resfriadas em banho de gelo por 10 min. Após o resfriamento, adicionou-se 3 mL de butanol em cada tubo para que então fossem centrifugados à 4000 rpm por 5 min. Logo após, alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram adicionadas à microplaca de

96 poços e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro UV-Vis (ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2) à 535 nm. O MDA formado após tratamento com as amostras foi determinado a partir de uma curva padrão de MDA. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para as concentrações testadas.

4.6.2.5 Inibição de radicais de óxido nítrico (NO) pelo método de Griess

A determinação da capacidade de inibição de radicais de óxido nítrico pelo AOM foi realizada de acordo com a metodologia adaptada Rocha *et al.*, (2014) com algumas modificações. Foram preparadas soluções estoques de 1 mg/mL de AOM e do controle positivo ácido gálico, solubilizados em tampão fosfato a 10% de DMSO. As amostras e o controle foram avaliados nas concentrações seriadas de 7,81 a 250 µg/mL. Em microplaca de 96 poços foram adicionados 62,5 µL de amostra e 62,5 µL de nitroprussiato de sódio NPS (10mM em tampão fosfato). O branco da amostra foi preparado pela substituição do NPS por tampão fosfato. Já no controle negativo as amostras foram substituídas por tampão fosfato a 10% de DMSO. A placa foi então incubada por uma hora na presença de luz e em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 125 µL do reagente de Griess (Sulfanilamida 1% e N-naftiletilenodiamina (NED) 0,1% 1:1 em H₃PO₄ 2,5%). Após 10 min de incubação ao abrigo de luz, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para as concentrações testadas. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão da porcentagem de inibição do radical óxido nítrico e da concentração inibitória de 50% (IC₅₀) em µg/mL, que indica a quantidade necessária de amostra para inibir em 50% o óxido nítrico.

4.6.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.6.3.1 Redução dos níveis de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada de forma indireta por meio da quantificação de nitritos (NO₂⁻) por meio do método de Griess descrito por Sun *et al.*, (2003). Os macrófagos peritoneais foram tratados com AOM em concentrações variando de

18,75 a 300,00 µg/mL e estimulados com LPS a 1 µg/mL e IFN-γ a 1 ng/mL. Após, essas células foram incubadas por 48 h em estufa à 37°C com atmosfera de CO₂ 5%. Como controles foram utilizadas células não tratadas e estimuladas com LPS e IFN-γ (controle-estímulo) e células sem tratamento e sem estímulo (controle-basal). Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços onde foi realizada a dosagem indireta de NO. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro à 540 nm. A quantidade em µM de NO₂⁻ nas amostras foi obtida por meio de curva padrão de diluição seriada (18,75 a 300,00 µg/mL) de uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂) (Guevara *et al.*, 1998). O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para as concentrações testadas.

4.6.3.2 *Acúmulo de corpúsculos lipídicos (CLs) em macrófagos estimulados com LPS e IFN-γ*

A determinação do acúmulo de CLs foi realizada em macrófagos peritoneais na presença de AOM nas concentrações de 150,00 e 300,00 µg/mL e estimulados com LPS e IFN-γ. Para verificação dos resultados foi utilizado o marcador Nile Red (9-dietilamino-5H-benzo(α)fenoxazina-5-ona) de acordo com Basselin *et al.*, (1997) com algumas modificações. Os macrófagos foram plaqueados nas concentrações de 2 x 10⁵ células por poço, incubados com AOM e estimulados por 48 h a 37 °C e 5% CO₂. Como controles foram utilizadas células não tratadas e estimuladas com LPS e IFN-γ (controle-estímulo) e células sem tratamento e sem estímulo (controle-basal). Em seguida, as células foram lavadas com PBS e coradas com 200 µL de Nile Red (10 µg/mL) em PBS por 20 min a 25 °C. A leitura foi realizada em espectrofluorímetro (FLx800) nos comprimentos de onda de 485 e 528 nm de excitação e emissão, respectivamente. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para as concentrações testadas e os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência.

4.6.3.3 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias

Foram realizadas as dosagens das citocinas TNF- α e IL-6 para avaliar a atividade anti-inflamatória de AOM frente a macrófagos peritoneais. As células foram tratadas com AOM nas concentrações de 150,00 e 300,00 $\mu\text{g/mL}$, incubadas por 6 h e, em seguida, estimuladas com LPS e IFN- γ por 24 h em 5% de CO_2 a 37 °C. Como controles foram utilizadas células não tratadas e estimuladas com LPS (controle-estímulo) e células sem tratamento e sem estímulo (controle-basal). Nos sobrenadantes coletados, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 foram quantificadas pelo método imunoenzimático (do inglês, *enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA) do tipo sanduíche, utilizando kit comercial BD OptEIA™ (BD Biosciences) conforme protocolo do fabricante. As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 450 nm e as concentrações das citocinas (pg/mL) calculadas em comparação à curva padrão. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para as concentrações testadas.

4.6.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.6.4.1 Linhagens microbianas

Para verificar o potencial antibacteriano de AOM, as seguintes linhagens de bactérias foram utilizadas: *Escherichia coli* (ATCC® 10536™), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 0016™), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 33591™), *Pseudomonas aeruginosa* (INCAS 2742). Já o potencial antifúngico foi investigado para as seguintes linhagens: *Candida albicans* sensível aos antifúngicos convencionais (ATCC® 24433™), e *Candida albicans* resistente aos antifúngicos convencionais (ATCC® 10231™).

4.6.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O experimento foi realizado de acordo com o protocolo descrito pela CLSI para determinação do CIM (CLSI, 2017; CLSI, 2018). As linhagens bacterianas foram

previamente cultivadas em ágar Mueller-Hinton (MH), e as linhagens fúngicas em ágar Sabouraud (SB). As bactérias foram incubadas a 37°C por 24 h, enquanto os fungos foram incubados a 35°C pelo mesmo período. O experimento foi realizado através do método de microdiluição em caldo para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras frente a espécies mencionadas no 4.6.4.1. Os testes foram realizados usando caldo MH para as bactérias e caldo RPMI para os fungos. Os inóculos foram elaborados utilizando os microrganismos cultivados em ágar diluídos em salina, para bactérias, e diluído em água destilada, para fungos.

A amostra AOM foi solubilizada em DMSO 20%, obtendo-se uma solução à 2,5 mg/mL. Foram transferidos 160 µL desta solução para placa de 96 poços contendo meio de cultura para que então fossem realizadas diluições seriadas, as quais resultaram em concentrações de 1000 a 7,8 µg/mL. Em seguida, foram adicionados 20 µL de inóculo contendo 3×10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colônias/mL) para as bactérias e 3×10^4 UFC/mL para os fungos de acordo com a escala turbidimétrica padrão de 0,5 e 1 McFarland, respectivamente. Tais análises foram realizadas simultaneamente com o controle de crescimento (caldo + microrganismo), o branco do experimento (caldo + extrato) e o controle do meio (caldo). As placas contendo bactérias foram então incubadas a 37°C por 24 h, enquanto as placas com fungos foram incubadas a 35°C pelo mesmo período. Os resultados de CIM foram definidos de acordo com o poço de menor concentração de AOM onde não foi observado crescimento microbiano. Ciprofloxacino e nistatina foram utilizados como controle positivo para bactérias e fungos, respectivamente. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para as concentrações testadas.

4.6.4.3 *Determinação da Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM e CFM)*

As concentrações bactericidas (CBM) e fungicidas mínimas (CFM) foram feitas de acordo com o método de Spencer e Spencer (2004), com modificações. Após a realização do CIM, 10 µL de cada poço onde não se observou crescimento microbiano foram retirados e transferidos para placas com ágar MH (bactérias) e ágar SB (fungos). As placas foram então incubadas a 37°C por 24 h para bactérias e 35°C por

24 h para os fungos. Se após o período de incubação o microrganismo não retomou o seu crescimento, considera-se a concentração de AOM como bactericida/fungicida.

4.7 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES DE QUITOSANA

Os filmes de quitosana foram elaborados de acordo com a técnica de evaporação de solvente segundo metodologia adaptada de Escárcega *et al.*, (2018). Os filmes são aqui denominados como Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR, os quais correspondem, respectivamente, aos filmes de quitosana e AOM a 5%, 2,5% e 1% de extrato (p/v) e ao filme de quitosana sem extrato (filme branco). Foi utilizada a quitosana da marca Sigma-Aldrich (nº 448869) de baixo peso molecular e grau de desacetilação $\geq 75\%$.

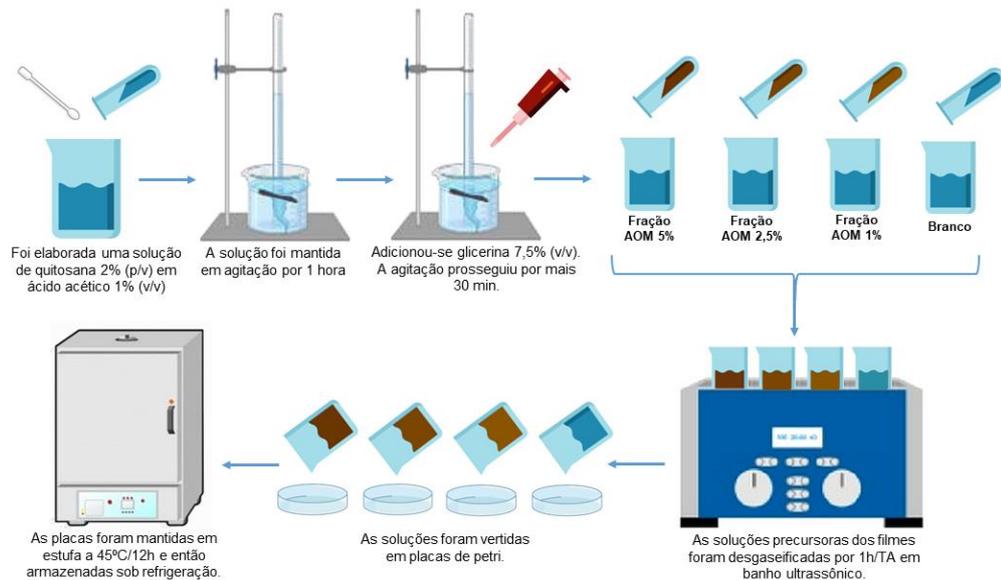
Para o desenvolvimento da solução precursora dos filmes, uma solução de quitosana 2% (p/v) em ácido acético 1% (v/v) foi mantida em agitação por 1 hora em agitador mecânico Fisatom® em aproximadamente 1100 rotações por minuto para completa dissolução do polímero. Em seguida, foi adicionado o plastificante (glicerina 7,5% v/v) e a agitação prosseguiu por mais 30 min. A solução precursora obtida foi dividida em 4 frações de 12 mL cada, para que então diferentes concentrações de AOM, previamente solubilizados em 1,5 mL de metanol, fossem incorporadas em sua respectiva fração. Ao filme branco adicionou-se apenas 1,5 mL do solvente metanol. As 4 frações resultantes foram desgaseificadas e completamente solubilizadas em banho ultrassônico por 1h em temperatura ambiente. Após este período, cada fração foi vertida em sua respectiva placa de petri (diâmetro de 9 cm) e secas em estufa à 45°C por 18h. Os filmes prontos foram mantidos sob refrigeração entre 4 e 5°C. O processo de obtenção dos filmes e suas composições estão descritas na Figura 11 e na Tabela 1.

Tabela 1: Composição dos biocurativos (filmes poliméricos) de quitosana e AOM.

Biocurativo	Quitosana (p/v)	Glicerina (v/v)	Extrato (p/v)	Extrato (mg/cm³)
Q-AOM5%	2%	7,5%	5%	471,81
Q-AOM2,5%	2%	7,5%	2,5%	337,01

Q-AOM1%	2%	7,5%	1%	125,82
Q-BR	2%	7,5%	-	-

Figura 11: Esquema de elaboração dos filmes de quitosana com diferentes concentrações de AOM.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

4.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SOLUÇÕES PRECURSORAS DOS BIOCURATIVOS (FILMES POLIMÉRICOS)

4.8.1 Determinação da Condutividade elétrica e Potencial Zeta (PZ)

O potencial Zeta (PZ) e a condutividade das soluções precursoras dos filmes foram determinados no Zetasizer Nano ZS90 da Malvern através da técnica de microeletroforese Doppler, com ângulo de espalhamento de luz a 173° e DDP alternada 10 V, a partir dos valores de mobilidade eletroforética, calculado pelo modelo de Smoluchowski (Lanna *et al.*, 2016). As soluções precursoras foram inseridas em célula capilar de polietileno DPS1070. O valor final de PZ e condutividade foram calculados como a média de 5 medidas independentes com 5 contagens cada. Os dados foram então exportados e tratados no GraphPad Prism 8.0.1.

4.8.2 Determinação dos parâmetros reológicos das soluções precursoras

O comportamento reológico das soluções precursoras foi investigado por reologia estacionária e oscilatória em um reômetro automatizado DHR1 da T.A. Instruments. A elaboração das curvas de fluxo e de viscosidade foi feita através de varredura da taxa de cisalhamento, isotermicamente. Também foi feita a medida da viscosidade em função da temperatura, isorrotacionalmente. Já a reologia oscilatória foi utilizada para determinação das características viscoelásticas das soluções através da elaboração de uma curva de varredura de amplitude (módulo de perda G'' e módulo de armazenamento G' versus tensão de cisalhamento). Os experimentos foram realizados utilizando geometria placa-placa, gap de 1000 μm , taxa de cisalhamento variando de 0 até 1000 s^{-1} , a 25 °C (controlado via placa peltier). Os experimentos em função da temperatura foram realizados varrendo-se ciclicamente a temperatura de 10 °C a 50 °C, numa taxa de cisalhamento constante de 5 s^{-1} .

4.9 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS BIOCURATIVOS (FILMES POLIMÉRICOS)

4.9.1 Perfil de liberação

O perfil de liberação de fitoconstituintes de AOM, a partir dos filmes, foi realizado objetivando mimetizar a liberação dos compostos após aplicação na superfície da pele. Os filmes de Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR foram cortados e fixados na abertura de tubos falcon de 1,6 cm de diâmetro. Os tubos foram então posicionados em béqueres contendo fluido de ferida simulado, constituído por 0,68 g de NaCl, 0,22 g de KCl, 2,5 g de NaHCO_3 e 0,35 g de NaH_2PO_4 em 100 mL de água destilada a pH 7,4 (Pansara *et al.*, 2020), de forma que a superfície dos filmes ficasse em contato direto com o fluido (Figura 12). O volume de fluido para as diferentes concentrações de AOM foi previamente calculado para que o teste de liberação fosse conduzido sob condição sink, ou seja, no mínimo 3 vezes o volume de meio necessário para se obter solução saturada de ativo (BRASIL, 2021). Os

béqueres permaneceram sob agitação constante e temperatura à 34 °C durante todo o experimento. Foram retiradas alíquotas de 500 µL com reposição de volume equivalente a cada 20 min durante a primeira hora; a cada 30 min na segunda hora; e a cada 1 h nas coletas subsequentes, totalizando 8 h de experimento. Com as alíquotas coletadas foi realizada varredura por espectrofotometria de ultravioleta (ThermoScientific Skanlt® Multiskan GO, software 3,2) entre os comprimentos de onda de 200 e 400 nm. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para as concentrações testadas. Uma curva padrão de AOM foi elaborada com objetivo de estimar a porcentagem de liberação do extrato a partir dos filmes *versus* tempo.

Figura 12: Esquema de liberação de fitoconstituintes a partir dos filmes.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

4.9.2 Teores de fenóis totais liberados no ensaio de perfil de liberação

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada nas alíquotas coletadas nos intervalos de tempo pré-determinados durante o ensaio de perfil de liberação. O procedimento seguiu o método adaptado de Folin–Ciocalteu (Folin, 1927) de acordo com o descrito no item 4.3. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas, e a média \pm desvio padrão foi utilizada para o cálculo do teor de fenóis. O conteúdo total de fenóis foi expresso em mg/g de extrato, em equivalentes de ácido tânico (EAT).

4.9.3 Avaliação dos filmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização morfológica da microestrutura dos filmes poliméricos Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR foi conduzida utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM-6390LV, Tóquio, Japão) para captura de imagens em 3 diferentes pontos da superfície dos filmes em aumentos de 1500x e 3500x e da secção transversal.

4.9.4 Determinação de peso médio e espessura.

A determinação de peso médio e espessura dos filmes seguiram metodologia proposta por Shah *et al.*, (2019). A avaliação do peso médio dos filmes poliméricos foi realizada em balança analítica (Shimadzu AY220) por meio da pesagem de dez frações individuais de 1,5x1,5 cm retiradas de pontos distintos para cada amostra de filme (Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR). Já a espessura dos filmes foi medida por meio de um micrômetro digital portátil (Insize, modelo 3109-25) com 0,001 mm de precisão na faixa de 0–25 mm nas mesmas 10 amostras utilizadas na determinação do peso médio. Os resultados das análises foram expressos como média \pm desvio padrão e coeficiente de correlação.

4.9.5 Teor de umidade

O teor de umidade dos filmes foi determinado pelo método gravimétrico de acordo com Shah *et al.*, (2019). Resumidamente, 3 unidades de cada filme Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR medindo 1,5x1,5cm foram pesados em balança analítica (Shimadzu AY220), obtendo-se o peso inicial (P_i). Então, os filmes foram acondicionados por 24 h em estufa (Quimis, modelo Q316M2) à 60°C, com circulação forçada de ar. Após este período, os filmes foram novamente pesados para que fosse identificada sua massa final (P_f). A porcentagem de umidade foi determinada pela equação abaixo:

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

Onde,

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

4.9.6 Grau de intumescimento

O grau de intumescimento dos filmes foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Pansara *et al.*, (2020) e Tamahkar *et al.*, (2020). 3 unidades de cada filme nas dimensões de 1,5x1,5 cm foram previamente pesados (P_0) em balança analítica (Shimadzu AY220) e então imersos em líquido de feridas simulado a 34 °C. Nos intervalos de 1h, 2h, 4h, 6h e 8h os filmes foram retirados do fluido com o auxílio de uma pinça e depositados sob papel filtro para remoção do excesso de líquido, para que então fossem novamente pesados. A capacidade de intumescimento foi determinada por meio da equação:

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

Onde,

- P_0 : Peso do filme seco
- P_i : Peso do filme molhado

4.9.7 Análise termogravimétrica (TGA)

Para avaliação do perfil térmico dos filmes em comparação com os precursores (pó de quitosana e AOM), foram obtidas curvas de análise termogravimétrica (TGA) e de termogravimetria derivada (DTG) das amostras. A TGA foi realizada em atmosfera oxidante (ar) à 300 mL/min e a uma taxa de aquecimento de 30°C/min. Durante os experimentos, foram utilizados cadinhos de platina e até 2 mg de cada amostra (Denadai *et al.*, 2006b; Lanna *et al.*, 2016). Os experimentos foram realizados em módulo termogravimétrico em equipamento TGA/DTA STA-7800 da HITACHI. Para a aquisição dos dados foi utilizado o programa TA7000 Measurement STA7200RV. Estes foram então exportados e tratados no OriginPro 9.0®.

4.9.8 Espectroscopia eletrônica vibracional na região do Infravermelho (FTIR)

Para identificar possíveis interações intermoleculares entre os componentes de AOM com a quitosana foi realizado o ensaio de espectroscopia vibracional na região do infravermelho em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier. O espectro das amostras (filmes e AOM) foram obtidos em acessório de refletância total atenuada (ATR) da marca PIKE acoplado ao espectrômetro. Após a aplicação direta de cada amostra sobre a superfície de diamante do módulo de ATR, os espectros foram obtidos como a média de 64 varreduras consecutivas, com resolução de 4 cm^{-1} e adquiridos em um intervalo de número de onda 4500 a 400 cm^{-1} . Para a aquisição dos espectros foi utilizado o programa Perkin Elmer Spectrum Two, da OXFORD Instruments. Os dados foram então exportados e tratados no OriginPro 9.0®.

4.9.9 Caracterizações por Análise Dinâmico Mecânica nos modos axial e rotacional

O comportamento mecânico dos filmes foi avaliado por meio de Análises Dinâmico Mecânicas, utilizando-se o reômetro automatizado DHR1 (T.A. Instruments) acoplado ao acessório de DMA de fixação linear, à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Durante os ensaios de tração (axial), os filmes de $3 \times 0,4\text{ cm}$ foram fixados no acessório e submetidos a uma tração com velocidade constante de $1000\text{ }\mu\text{m/s}$, até a ruptura. Para os experimentos no modo tangencial (rotacional), os filmes foram fixados no acessório com um gap de 3 cm e submetidos à rotação a uma velocidade angular de 2 rad/s . Os experimentos foram realizados em quintuplicata e os resultados foram expressos em força axial (para o modo axial) e em força tangencial (para o modo rotacional) do ponto de ruptura para cada filme na presença e na ausência de extrato (Altiok *et al.*, 2010). Para a aquisição dos dados foi utilizado o programa TRIOS v4.5.0.42498. Estes foram então exportados e tratados no GraphPad Prism 8.0.1.

4.10 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FILMES

4.10.1 Análise da citotoxicidade em fibroblastos L929 e macrófagos peritoneais

A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2Htetrazólio (MTT) (Mosmann, 1983). Os fibroblastos L929 cultivados foram transferidos para placas de 24 poços (5×10^3 células/poço), assim como os macrófagos peritoneais (2×10^5 células/poço). Em seguida, os filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR foram cortados nas dimensões de 2x2 mm e adicionados aos poços, para que então as placas fossem incubadas novamente por 48 h. Para o controle negativo, foram utilizadas células tratadas apenas com DMSO. Após este período, a citotoxicidade foi avaliada conforme metodologia descrita no item 4.6.1. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para cada filme.

4.10.2 Avaliação da atividade antioxidante

4.10.2.1 Sequestro de radicais livres (DPPH•)

A atividade sequestrante de radicais DPPH• foi determinada pelo método descrito por Brand-Williams *et al.*, (1995). O preparo das amostras foi realizado por meio de liberação forçada em centrífuga e liberação estática em 24h. Na liberação forçada, os filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR medindo 4x4 mm foram imersos em 1,5 mL de metanol e centrifugados a 2300 rpm por 10 min (Chu *et al.*, 2019). Na liberação estática, os filmes nas mesmas dimensões citadas anteriormente foram imersos em 1,5 mL de metanol e incubados em estufa a 34 °C por 24 h. Os sobrenadantes foram utilizados para o ensaio, o qual foi conduzido de acordo com o 4.6.2.2. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para cada filme. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH•, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Abs DPPH} - \text{Abs Amostra}}{\text{ABS DPPH}} \times 100$$

Onde,

- Abs DPPH: absorvância mensurada para o radical DPPH•
- Abs amostra: absorvância mensurada para as amostras.

4.10.2.2 Poder de redução do complexo fosfomolibdênio.

O ensaio foi baseado no método descrito por Prieto *et al.*, (1999). O preparo das amostras foi realizado por meio de liberação forçada em centrífuga e liberação estática em 24 h. Na liberação forçada, os filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR medindo 4x4 mm foram imersos em 1,5 mL de solução H₂O:MeOH na proporção de 1:1 e centrifugados a 2300 rpm por 10 min (Chu *et al.*, 2019). Na liberação estática, os filmes nas mesmas dimensões citadas anteriormente foram imersos em 1,5 mL de solução H₂O:MeOH na proporção de 1:1 e incubados em estufa a 34°C por 24h. Os controles positivos e demais procedimentos foram realizados de acordo com o 4.6.2.3. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para cada filme. Os resultados foram expressos em porcentagem de Atividade Antioxidante Relativa (AAR%) a quercetina e rutina (Negri *et al.*, 2009; Zocoler *et al.*, 2009).

4.10.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.10.3.1 Redução dos níveis de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada de forma indireta por meio da quantificação de nitritos (NO₂⁻) pelo método de Griess descrito por Sun *et al.*, (2003). Filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR foram cortados em quadrados medindo 2x2 mm. Macrófagos peritoneais foram então tratados com os filmes e estimulados com LPS a 1 µg/mL e IFN-γ a 1 ng/mL. O ensaio foi conduzido de acordo com o descrito no item 4.6.3.1 O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para cada filme.

4.10.3.2 *Dosagem de citocinas pró-inflamatórias*

Foram realizadas as dosagens das citocinas L-6 e IL-12 para avaliar a atividade anti-inflamatória dos filmes frente a macrófagos peritoneais. As células foram tratadas com os filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR medindo 2x2 mm, incubados por 6 h e, em seguida, estimulados com LPS e IFN- γ por 24 h em 5% de CO₂ e a 37 °C. Como controles foram utilizadas células não tratadas e estimuladas (controle-estímulo) e células sem tratamento e sem estímulo (controle-basal). O ensaio foi conduzido de acordo com o item 4.6.3.3. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para cada filme.

4.10.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.10.4.1 *Disco-difusão em ágar*

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes pelo método de disco-difusão em ágar foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Altiok *et al.*, (2010). Para o experimento, foram utilizados os mesmos microrganismos e condições de cultivo descritos nos itens 4.6.4.1 e 4.6.4.2. Foram preparados inóculos das bactérias e dos fungos de interesse de acordo com a escala turbidimétrica padrão de 0,5 e 1 McFarland, respectivamente. Com o auxílio de swab, os microrganismos foram inoculados uniformemente sobre a superfície de uma placa Petri contendo meio de cultura MH, para bactérias, e SB, para fungos. Então, discos dos filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR de 5 mm de diâmetro foram posicionados nas placas inoculadas. Discos padronizados de ciprofloxacino (5 μ g) e nistatina (100 UI/ 20 μ g), no mesmo diâmetro, foram utilizados como controle positivo para bactérias e fungos, respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C, para bactérias, e a 35°C para fungos, por 24h. O experimento foi realizado em duplicata. Após o tempo de incubação, foi determinada a zona de inibição medindo-se o halo formado com o auxílio de um paquímetro.

4.10.4.2 *Inibição do crescimento microbiano*

As linhagens bacterianas e fúngicas foram cultivadas e os inóculos para o experimento igualmente elaborados de acordo com o descrito nos itens 4.6.4.1. e 4.6.4.2. Discos de 5 mm de diâmetro dos filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR foram transferidos à placa de 96 poços contendo meio de cultura. Em seguida, foram adicionados 20 µL de inóculo contendo 3×10^4 UFC/mL (unidades formadoras de colônias/mL) para os fungos e 3×10^6 UFC/mL para as bactérias de acordo com a escala turbidimétrica padrão de 1 e 0,5 McFarland, respectivamente. Tais análises foram realizadas simultaneamente com o controle de crescimento (caldo + microrganismo), o branco do experimento (caldo + filme) e o controle do meio (caldo). Discos de ciprofloxacino, para bactérias (5 µg), e de nistatina (100 UI/ 20 µg), para fungos, foram utilizados como controles positivos. As placas contendo bactérias foram então incubadas a 37°C por 24 h, enquanto as placas com fungos foram incubadas a 35°C pelo mesmo período. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para cada filme. A determinação do efeito bactericida/fungicida e bacteriostático/fungistático foi avaliada de acordo com o descrito anteriormente no item 4.6.4.3.

4.10.4.3 *Interferência na fase de adesão do biofilme*

A investigação da influência dos filmes poliméricos na fase de adesão dos biofilmes foi conduzida de acordo com Plyuta *et al.*, (2013) com pequenas modificações. Inicialmente foram adicionados 100 µL das suspensões celulares de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (2×10^8 UFC/mL) em microplacas de 96 poços, seguida de adição dos discos de filmes poliméricos de 5 mm de diâmetro Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR e incubadas por 24 h a 37°C. Discos de ciprofloxacino (5 µg) foram utilizados como controle positivo. Decorrido o período de incubação, seguiu-se com a remoção das suspensões líquidas e os poços foram lavados com 200 µL de salina tamponada estéril (PBS) 10 mM (pH 7,4), para remoção de bactérias livres e flutuantes (não aderentes). Os biofilmes formados por células aderentes foram corados com 200 µL de cristal violeta (0,1%) e incubados a temperatura ambiente por 30 min. O excesso de cristal violeta contido foi lavado com PBS e as placas foram

fixadas com 200 μ L de etanol (96%) e seguido de incubação por 15 min. A quantificação da biomassa dos biofilmes foi realizada por medida da densidade óptica à 570 nm. O experimento foi realizado em duplicata e em três réplicas para cada filme. A redução da adesão do biofilme foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: % de redução = (Abs. controle de crescimento - Abs tratamento) \times 100 / Abs. controle de crescimento.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) seguidas de testes de Bonferroni com grau de significância $p < 0,05$ (95% intervalo de confiança) por meio do software GraphPad Prism 8.0.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TEORES DE FENOIS TOTAIS

O doseamento de fenóis totais foi realizado para AOM devido a relação direta destes compostos, presentes em extratos vegetais, com as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Esta classe de fitoconstituintes é capaz de agir eliminando radicais livres oriundos do estresse oxidativo, diminuindo, portanto, o dano celular e, conseqüentemente, contribuindo para o processo de cicatrização (Abdul rahim *et al.*, 2021). Além disso, compostos fenólicos podem atuar no combate a infecções, visto que são capazes de interagir com o envelope celular bacteriano e alterar a permeabilidade de membrana, afetando o transporte de íons, a adesão microbiana, a atividade enzimática e a produção de enterotoxinas (Suriyaprom *et al.*, 2022).

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram teor de fenóis totais de $172,88 \pm 15,45$ µg/mg de extrato em equivalentes a ácido tânico (EAT) o que corresponde a aproximadamente 17% da composição total de AOM. De acordo com estudos anteriores, compostos fenólicos como o ácido vanílico, ácido *trans*-ferúlico e ácido *trans*-isoferúlico podem estar presentes em extratos de jambu (Abdul rahim *et al.*, 2021; Uthpala; Navaratne, 2021; Prachayasittikul *et al.*, 2019).

Segundo Abeysiri *et al.*, (2013) o teor de fenóis totais no extrato metanólico de *A. oleracea* é significativamente maior nas folhas em comparação com as flores e raízes. Os autores encontraram teores em EAT de 7,59 mg/g, 2,65 mg/g e 5,34 mg/g, para folhas, raízes e flores, respectivamente. Nabi e Shrivastava (2016) também investigaram os teores de compostos fenólicos no extrato etanólico das folhas de jambu, onde encontraram teores em EAT de 84,52 mg/g. Em um outro estudo, Abeysinghe *et al.*, (2014) buscaram avaliar a diferença do teor de fenóis em plantas submetidas a diferentes técnicas de cultivo, onde verificaram diferenças entre o cultivo hidropônico (11,45 mg/g), tradicional (10,99 mg/g) e *in vitro* (9,91 mg/g).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DO EXTRATO POR UFLC-QTOF-MS.

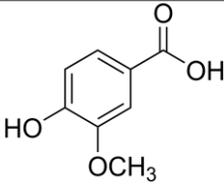
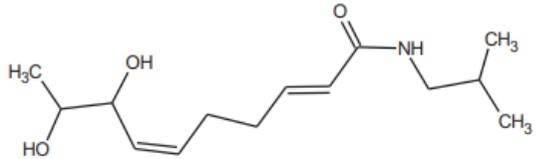
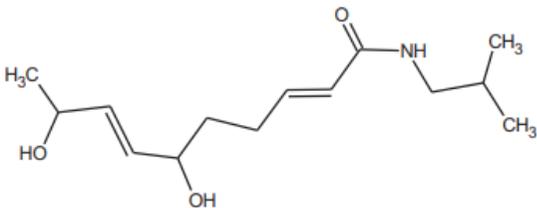
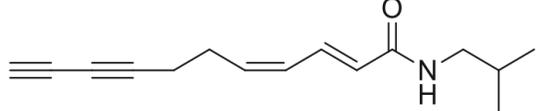
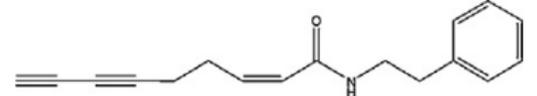
A caracterização fitoquímica feita por *UFLC-QTOF-MS* identificou 8 compostos presentes em AOM (Tabela 2). Entre os compostos identificados, quase sua totalidade são da classe das alquilamidas. Estes dados estão de acordo com a literatura, visto que as folhas de *Acmella oleracea* são ricas nesta classe de fitoconstituintes (Lalthanpuii *et al.*, 2018; Uthpala; Navaratne, 2020; Savic *et al.*, 2021).

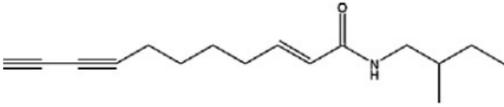
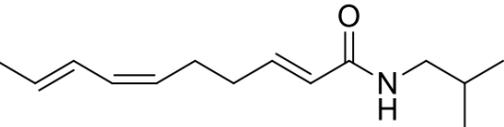
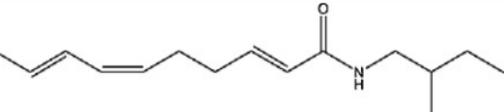
Dentre as alquilamidas, foi possível identificar a presença do espilantol (N-isobutil-2,6,8-decatrienamida), ao qual é atribuído grande potencial terapêutico, e seus produtos de oxidação, ácido 8,9-di-hidroxi-deca-2,6-dienóico isobutilamida e ácido 6,9-di-hidroxi-deca-2,7-dienóico isobutilamida. Também foram identificadas outras quatro alquilamidas, a isobutilamida N-isobutil-2,4-undecadieno-8,10-diinamida, a feniletilamida N-feniletil-6,8-nonadiinamida e as metilbutilamidas N-(2-metilbutil)-2-undecano-8,10-diinamida e N-(2-metilbutil)- 2,6,8-decatrienamida.

As alquilamidas são um grupo de metabólitos secundários produzidos como resultado da ligação entre ácidos graxos, insaturados em sua maioria, e um grupamento amina proveniente de um aminoácido descarboxilado. Compostos desta classe estão associados a diversas atividades biológicas, como anti-nociceptiva, anestésica, anti-inflamatória e antimicrobiana (Sharma; Arumugam, 2021).

Além das alquilamidas, o ácido vanílico também foi identificado em AOM, um composto fenólico com promissora atividade antioxidante e potencial para o tratamento de feridas (Prachayasittikul *et al.*, 2009). Contudo, estudos complementares devem ser realizados para avaliar a existência de compostos fenólicos adicionais, visto que, de acordo com a literatura, extratos de jambu podem ser ricos em ácido *trans*-ferúlico, quercetina e escopoletina (Lalthanpuii *et al.*, 2018; Uthpala; Navaratne, 2020). Também cabe considerar o teor significativo de compostos fenólicos em AOM, descrito anteriormente, o qual sugere a presença de outros fitoconstituintes da classe.

Tabela 2: Identificação dos compostos do extrato metanólico das folhas de *Acmella oleracea* (AOM) por UFLC-QTOF-MS. T_R - Tempo de retenção por minuto; [M+H]⁺ - massa/carga (m/z) em modo positivo; MS² - massas dos fragmentos do íon molecular; identificação experimental dos compostos detectados, estrutura molecular e referências.

Nº	T _R (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS ² (m/z)	Identificação experimental	Estrutura molecular	Referências
1	1,4	169,0695	353.0879 (2M +NH ₃); 191.0514 (M+Na)	Ácido vanílico		RAHIM et al., 2021
2	2,7	278,1708	278,1708 (M+H)	Ácido 8,9-di-hidroxi-deca-2,6-dienóico isobutilamida		SAVIC et al., 2020
3	2,9	278,1706	278,1706 (M+H)	Ácido 6,9-di-hidroxi-deca-2,7-dienóico		SAVIC et al., 2020
4	6,5	230,1516	481,2798 (2M+Na); 252,1335 (M+Na)	(2E,4Z)-N-isobutil-2,4-undecadieno-8,10-diinamida		SAVIC et al., 2020
5	6,7	252,1358	525, 2486 (2M+Na); 274,1177 (M+Na)	(2Z)-N-feniletil-6,8-nonadiinamida		SAVIC et al., 2020

6	7,6	247,4689	762,3728 (3M+Na); 509,3110 (2M+NH ₃)	(2E)-N-(2-metilbutil)-2-undecano-8,10-diinamida		SAVIC et al., 2020
7	7,9	222,1839	465,3424 (2M+Na); 222,1839 (M+H)	(2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida (Espilantol)		SAVIC et al., 2020
8	9,0	235,1915	493,3729 (2M+Na); 236,1993 (M+H)	(2E,6Z,8E)-N-(2-metilbutil)-2,6,8-decatrienamida		SAVIC et al., 2020

5.3 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO

5.3.1 Análise da citotoxicidade

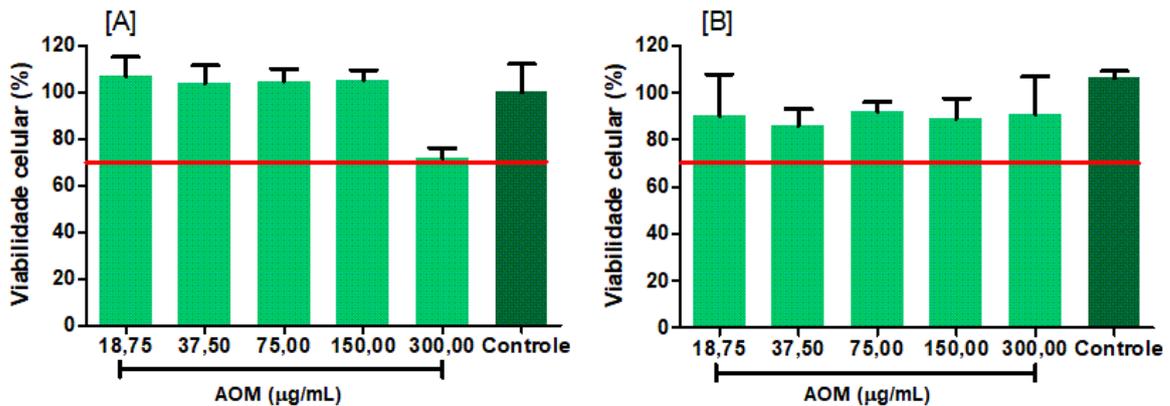
Fibroblastos L929 e macrófagos peritoneais murinos foram cultivados e tratados com AOM nas concentrações de 18,75 a 300,00 µg/mL, a fim de avaliar a viabilidade celular dessas linhagens diante do extrato pelo teste de redução do MTT a formazan, de cor púrpura. A quantidade de formazan gerada é diretamente proporcional ao número de células viáveis, visto que o MTT é clivado apenas por células vivas, metabolicamente ativas (Mosmann, 1983).

Ambos os tipos celulares foram escolhidos em vista de sua presença no sítio da ferida e importância diante do processo de cura. Macrófagos e fibroblastos estão presentes em todas as fases de cicatrização de uma lesão cutânea, desde a liberação de mediadores inflamatórios, até a deposição de colágeno e formação do novo tecido (Cañedo-dorantes; Cañedo-ayala, 2019). Portanto, o efeito do extrato sobre estas células é de extrema importância para a continuidade dos experimentos e desenvolvimento de uma formulação de aplicação tópica.

De acordo com a norma técnica NBR ISO 10993-5 de 2009, ao se avaliar a citotoxicidade *in vitro* de uma substância, a porcentagem de viabilidade celular resultante não pode ser inferior a 70%. Diante disso, foi possível observar que a viabilidade celular tanto de fibroblastos, quanto de macrófagos, foi satisfatória para todas as concentrações testadas de AOM, já que mantiveram ao mínimo 70% da viabilidade celular quando comparados ao controle negativo (DMSO) ($p < 0,05$).

Apesar disso, observou-se redução mais pronunciada da viabilidade celular dos fibroblastos L929 quando em contato com a maior concentração de AOM (300 µg/mL). Tal efeito pode estar relacionado à maior sensibilidade desta linhagem ao ser exposta a um fator estressor, possibilitando uma avaliação mais precisa acerca da citotoxicidade do extrato. Os resultados para ambas as linhagens foram expressos em porcentagem de viabilidade celular (Figura 13).

Figura 13: Viabilidade celular de fibroblastos L929 e macrófagos peritoneais murinos após tratamento com diferentes concentrações de AOM.



Cultura de fibroblastos L929 [A] e cultura de macrófagos peritoneais [B] tratadas com diferentes concentrações de AOM (18,75 a 300,00 µg/mL) e incubadas por 48h para análise de viabilidade celular pelo teste de redução do MTT. AOM: extrato metanólico das folhas de *Acmella oleracea*. Controle: Células tratadas com DMSO (veículo). As letras indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (a). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

5.3.2 Avaliação da atividade antioxidante

Um composto antioxidante é aquele capaz de atrasar ou prevenir a oxidação de um substrato, podendo atuar de diversas maneiras: pela habilidade de doar um átomo de hidrogênio, transferir um elétron e pela habilidade de quelar metais de transição (Santos-sánchez *et al.*, 2019).

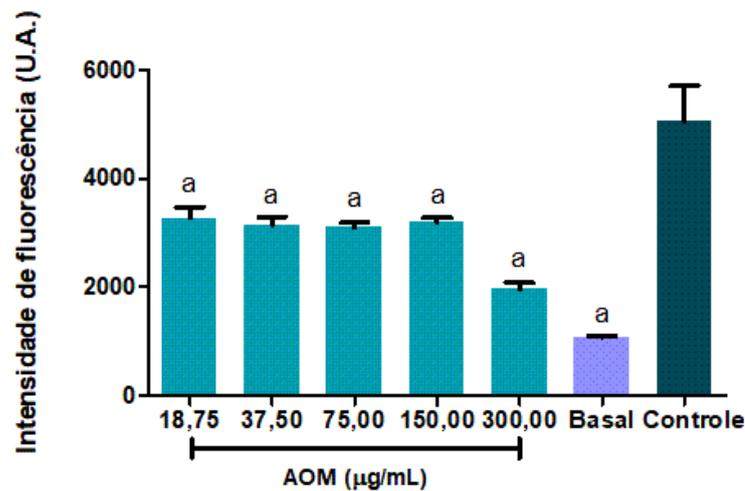
A atividade antioxidante de AOM foi avaliada por meio da determinação da produção de EROS *in vitro* em macrófagos peritoneais e dos testes do sequestro de radicais DPPH, do poder de redução do complexo fosfomolibdênio, da inibição da formação de malondialdeído e da inibição da formação de radicais de óxido nítrico, também *in vitro*. O uso de diferentes metodologias é importante para avaliar amostras complexas, visto que os compostos presentes no extrato podem exercer efeito antioxidante por meio de diferentes mecanismos. Portanto, o poder antioxidante de uma amostra não pode ser definido por apenas um ensaio isolado (Shahidi; zhong, 2015).

Durante o metabolismo celular ocorre a formação de intermediários parcialmente oxidados com alta reatividade denominadas espécies reativas de oxigênio. Tais moléculas são radicais livres ou precursores, os quais apresentam elétrons desemparelhados em um orbital e, por conta disso, tendem a reagir com outras moléculas biológicas para compensar esta deficiência (Santos-sánchez *et al.*, 2019).

Apesar de atuarem de forma positiva no processo de cura da ferida, a produção excessiva e prolongada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pode causar dano celular severo, resultando em feridas de difícil cicatrização. Além de mediar a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α e induzir MMPs, o excesso de EROS pode direta e indiretamente modificar e/ou degradar proteínas da MEC e causar danos na função de fibroblastos e queratinócitos. Ademais, o estresse oxidativo ativa proteínas pró-apoptóticas que induzem a morte celular. Portanto, compostos capazes de modular a produção excessiva de EROS podem desempenhar papel importante no processo de cicatrização de feridas (Dunnill *et al.*, 2017; Chin *et al.*, 2019; Larouche *et al.*, 2022).

Diante do exposto, a influência do tratamento com AOM sobre os níveis intracelulares de EROS em macrófagos foi verificada por meio de espectrofluorimetria e os resultados foram dados em intensidade de fluorescência (A.U). A Figura 14 evidencia redução de 61,38% da produção de EROS nas células tratadas com a maior concentração de AOM (300,00 $\mu\text{g/mL}$) em comparação ao controle ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística de intensidade de fluorescência entre as concentrações de 18,75 a 150,00 $\mu\text{g/mL}$ de AOM, sendo que estas também reduziram de forma significativa os níveis de EROS ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os níveis basais de EROS e os níveis produzidos pelas células tratadas com a maior concentração de extrato (300 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 14: Avaliação dos níveis intracelulares de EROS por espectrofluorimetria em macrófagos tratados com diferentes concentrações de AOM.



Macrófagos peritoneais tratados com AOM nas concentrações de 18,75 a 300,00 µg/mL por 48h e estimulados com LPS e IFN- γ . AOM: extrato metanólico das folhas de *Acmella oleracea*. Basal: células sem estímulo tratadas com DMSO (veículo). Controle: células estimuladas e tratadas com DMSO (veículo). As letras indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (a). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O óxido nítrico (NO) é um mediador químico com variadas funções biológicas, porém, sua contribuição ao dano oxidativo também é relevante. Isso se dá pois o NO pode reagir com o ânion superóxido (O_2^-) e dar origem ao peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente agente oxidante causador de dano tecidual (PATEL RAJESH e NATVAR, 2011).

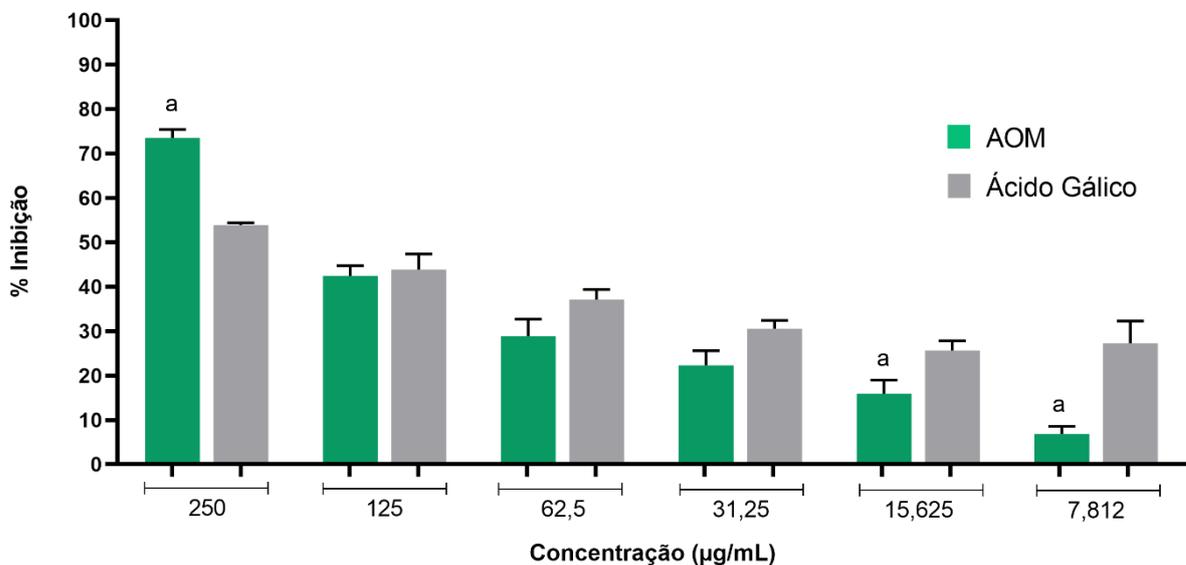
Diante disso, o ensaio de inibição da formação de radicais de óxido nítrico foi realizado para avaliar a capacidade de AOM de evitar a formação de íons nitrito *in vitro* por meio de seu poder antioxidante. O ensaio se baseia no princípio de que o NPS em solução aquosa e pH fisiológico gera NO de forma espontânea, o qual interage com oxigênio para produzir íons nitrito. Porém, compostos antioxidantes competem pelo oxigênio, o que reduz a produção destes íons. Os íons gerados podem então ser estimados utilizando o reagente de Griess (PATEL RAJESH e NATVAR, 2011).

A porcentagem de inibição da produção de íons nitrito por AOM se mostrou dose-dependente, sendo diretamente proporcional ao aumento da concentração de

extrato. Os resultados exibidos na Figura 15 indicam inibição média de 72% na maior concentração de AOM (250 µg/mL), resultado estatisticamente superior ($p < 0,05$) ao ácido gálico, utilizado como controle positivo. O valor de CI_{50} calculado foi de $127,6 \pm 14,42$ µg/mL, estatisticamente inferior ($p < 0,05$) ao valor observado para o controle positivo (CP) ($227,95 \pm 3,46$). Ademais, com exceção da concentração mais baixa, todas as outras concentrações de AOM exibiram inibição de íons nitrito semelhantes ou superiores ao CP.

Tais resultados se devem a presença de compostos antioxidantes no extrato, como o ácido vanílico, os quais competem com o oxigênio disponível para reagir com o óxido nítrico, inibindo assim a formação de nitrito. Um estudo de Lalthanpui *et al.*, (2017) investigou o potencial antioxidante do extrato aquoso das partes aéreas de *A. oleracea* por meio da avaliação de seu poder redutor e da inibição da produção de íons nitrito. Os autores encontraram um poder antioxidante dose-dependente, ao qual atribuíram principalmente a presença de compostos fenólicos no extrato.

Figura 15: Porcentagem de inibição da produção de íons nitrito por AOM.



Resultados de inibição (%) da produção de íons nitrito *in vitro* em diferentes concentrações do extrato metanólico das folhas de *A. oleracea* em comparação com o controle positivo (ácido gálico). a – diferença estatística em relação ao controle positivo ($p < 0,05$). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O ensaio de sequestro de radicais livres DPPH foi realizado a fim de avaliar a capacidade de compostos presentes no extrato de sequestrar radicais livres por meio da doação de átomos de hidrogênio. Quando a solução de DPPH está em contato com uma substância antioxidante, ocorre a redução do radical DPPH a difenil-picril-hidrazina (DPPH-H) com a consequente perda da coloração violeta, resultando em redução da absorvância. Quanto maior a redução do radical livre DPPH pelo extrato, maior é sua capacidade antioxidante e menor a quantidade necessária do extrato para inibir metade da ação oxidante do DPPH (CI₅₀) (Santos-sánchez *et al.*, 2019).

De acordo com os resultados da Tabela 3 o CI₅₀ de AOM foi de 44,50 ± 4,46, valor significativamente superior aos flavonoides rutina (0,44 ± 0,22 µg/mL) e quercetina (0,37 ± 0,02 µg/mL), utilizados como controle positivo ($p < 0,05$). Em termos de atividade sequestrante dos radicais DPPH (%), os resultados se mostraram dose-dependentes, ou seja, as maiores concentrações de extrato exibiram melhores atividades sequestrantes de radicais DPPH (250 µg/mL: 81,02% ± 7,81; 125 µg /mL: 88,89% ± 4,48) e as menores exibiram atividade reduzida (7,8 µg /mL: 12,04% ± 2,73; 15,6 µg /mL: 19,32% ± 2,93) (Figura 16). Em comparação, os compostos rutina e quercetina, utilizados como controles positivos, mantiveram elevada atividade sequestrante em todas as concentrações ($p < 0,05$).

Tabela 3: Avaliação da capacidade antioxidante de AOM por meio dos ensaios de sequestro dos radicais livres DPPH e de redução do complexo fosfomolibdênio.

Amostra	DPPH• – CI ₅₀	Redução do complexo fosfomolibdênio	
	(µg/mL)	AAR% Rutina	AAR% Quercetina
AOM	44,50 ± 4,46 ^{a,b}	104,01 ± 21,29	63,56 ± 13,01
Rutina	0,44 ± 0,22	---	---
Quercetina	0,37 ± 0,02	---	---

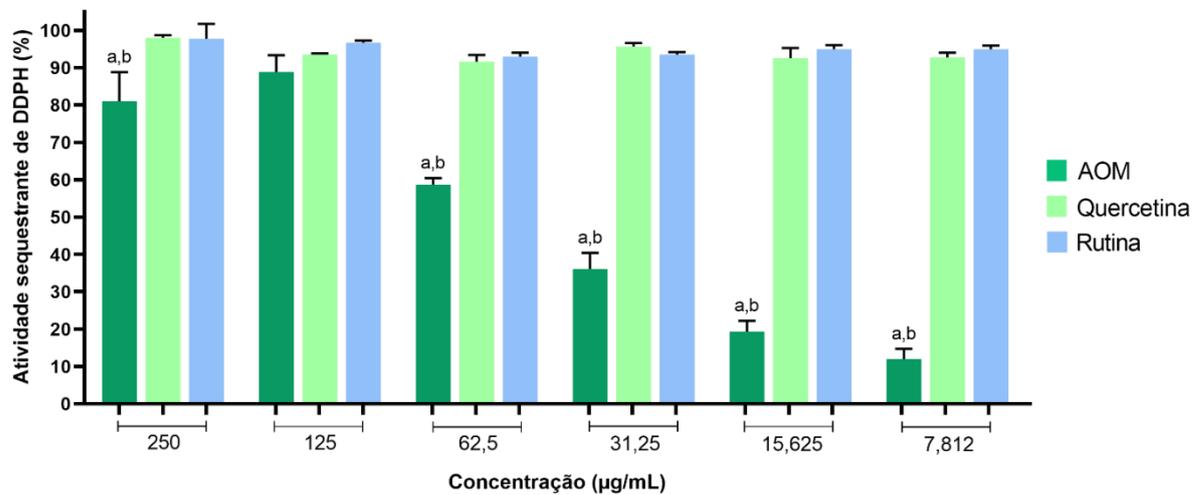
AOM: extrato metanólico das folhas de *Acmella oleracea*. a – Diferença estatística em relação ao controle positivo rutina ($p < 0,05$). b – Diferença estatística em relação ao controle positivo quercetina ($p < 0,05$). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Um estudo de Thakur *et al.*, (2019) investigou a atividade antioxidante de diferentes extratos de Jambu por meio do ensaio de sequestro de radicais DPPH. Os

extratos metanólicos de todas as partes da planta (raízes, folhas e flores) exibiram as maiores capacidades antioxidantes, sendo que os valores de CI_{50} foram de 67,34 a 127,19 $\mu\text{g/mL}$. Importante mencionar que diversos fatores podem influenciar na atividade antioxidante exibida por um extrato, como o tipo de solvente utilizado, época da coleta, parte da planta utilizada, local e condições de cultivo (Thakur *et al.*, 2019).

Figura 16: Atividade sequestrante de radicais DPPH do AOM em comparação aos controles positivos rutina e quercetina, nas concentrações de 7,812 a 250 $\mu\text{g/mL}$.



Resultados de atividade sequestrante de DPPH (%) em diferentes concentrações do extrato metanólico das folhas de *A. oleracea* em comparação com os controles positivos rutina e quercetina. a – Diferença estatística em relação a rutina. b – Diferença estatística em relação a quercetina. (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

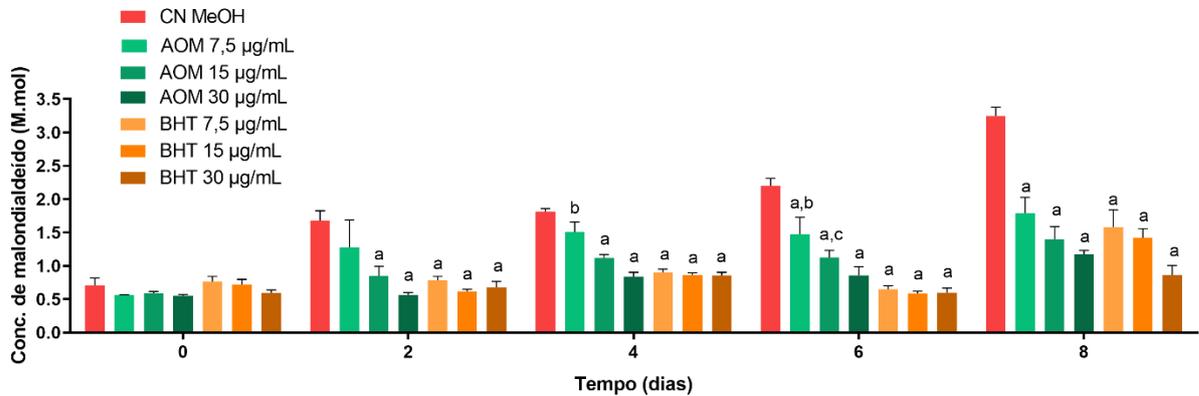
Em adição aos ensaios anteriores, a capacidade antioxidante total de AOM foi avaliada pelo ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio, útil para verificar a capacidade antioxidante de componentes hidrofílicos e lipofílicos. Tal método avalia a propriedade dos compostos tanto de doar elétrons quanto átomos de hidrogênio, causando a redução do molibdênio VI a molibdênio V, o qual resulta em um complexo azulado (Sadeer *et al.*, 2020; Prieto *et al.*, 1999). Os resultados são expressos em porcentagem relativa (AAR%) à capacidade antioxidante de rutina e quercetina. Quanto mais próximo de 100%, mais promissor o potencial antioxidante da amostra, visto que indica semelhança com o poder antioxidante dos compostos utilizados como controles positivos.

Foi possível verificar que o AOM apresentou capacidade antioxidante semelhante a rutina ($104,01 \pm 21,29$), porém inferior a quercetina ($63,56 \pm 13,01$) (Tabela 3). Tais resultados sugerem que os compostos antioxidantes, ainda não totalmente identificados, presentes no extrato podem apresentar maior similaridade com a rutina, além de reforçarem o potencial antioxidante de AOM exibido nos ensaios descritos anteriormente.

O processo de peroxidação lipídica se inicia pela ação de EROS, os quais, na presença de oxigênio molecular, resultam na formação de radicais lipídicos. Esses radicais adquirem um átomo de hidrogênio e dão origem aos peróxidos, cujos produtos de decomposição são extremamente danosos para as membranas celulares (Yadav; Ramana, 2013). O malondialdeído (MDA) é um dos produtos de degradação gerados a partir da peroxidação lipídica, ou seja, da degradação oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana celular. Por conta disso, o MDA tem sido amplamente utilizado como um marcador da peroxidação lipídica e de estresse oxidativo (Elbadrawy; Sello, 2016).

A fim de avaliar a capacidade de AOM de impedir a peroxidação lipídica, foi realizado o teste de doseamento do MDA por meio da complexação deste com o ácido tiobarbitúrico (TBA), resultando em coloração avermelhada. Uma amostra com capacidade antioxidante significativa, deve ser capaz de inibir a produção de MDA gerado no processo de peroxidação lipídica da carne em comparação ao controle. Diante dos resultados dispostos na Figura 17, foi possível observar inibição da produção de MDA a partir do segundo dia de acompanhamento, visto que no dia zero os resultados de doseamento foram estatisticamente semelhantes ao controle negativo ($p < 0,05$). Ao final dos 8 dias de ensaio, a inibição da formação de MDA em relação ao controle negativo (CN) foi de 63,69% para AOM a 30 $\mu\text{g/mL}$, de 56% para AOM a 15 $\mu\text{g/mL}$ e de 44,92% para AOM a 7,5 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados foram estatisticamente semelhantes aos encontrados para as mesmas concentrações de BHT ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Figura 17: Produção de malondialdeído na presença de AOM e BHT nas concentrações 7,5, 15 e 30 µg/mL.



AOM: extrato metanólico das folhas de *A. oleracea*; Controle positivo (CP): Butilhidroxitolueno (BHT); Controle negativo (CN): metanol. a – diferença estatística em relação ao CN ($p < 0,05$); b - diferença estatística de AOM 7,5 µg/mL em relação a CP 7,5 µg/mL ($p < 0,05$); c - diferença estatística de AOM 15 µg/mL em relação a CP 15 µg/mL ($p < 0,05$). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 4: Produção de MDA e porcentagem de inibição da produção de MDA em relação ao controle negativo (CN) diante de diferentes concentrações de AOM e BHT.

		AOM 30 µg/mL	AOM 15 µg/mL	AOM 7,5 µg/mL	BHT 30 µg/mL	BHT 15 µg/mL	BHT 7,5 µg/mL	CN
Dia 0	Média ±	0,55 ±	0,59 ±	0,56 ±	0,59 ±	0,72 ±	0,77 ±	0,71 ±
	DP	0,03	0,05	0,01	0,10	0,19	0,2	0,27
	Inibição (%)	22,54	16,90	21,13	16,90	0,00	0,00	-
Dia 2	Média ±	0,57 ±	0,85 ±	1,28 ±	0,68 ±	0,62 ±	0,78 ±	1,68 ±
	DP	0,06 ^a	0,32 ^a	0,82	0,22 ^a	0,07 ^a	0,12 ^a	0,37
	Inibição (%)	66,07	49,40	23,81	59,52	63,10	53,57	-
Dia 4	Média ±	0,84 ±	1,12 ±	1,51 ±	0,86 ±	0,86 ±	0,90 ±	1,81 ±
	DP	0,13 ^a	0,12 ^a	0,30 ^b	0,11 ^a	0,08 ^a	0,13 ^a	0,11
	Inibição (%)	53,59	38,12	16,57	52,49	52,49	50,28	-

Dia 6	Média ±	0,86 ±	1,13 ±	1,47 ±	0,60 ±	0,58 ±	0,65 ±	2,20 ±
	DP	0,32 ^a	0,21 ^{a,b}	0,44 ^{a,b}	0,17 ^a	0,09 ^a	0,13 ^a	0,25
	(M.mol)							
	Inibição (%)	60,91	48,64	33,18	71,73	73,64	70,45	-
Dia 8	Média ±	1,18 ±	1,43 ±	1,79 ±	0,86 ±	1,42 ±	1,58 ±	3,25 ±
	DP	0,11 ^a	0,49 ^a	0,58 ^a	0,28 ^a	0,24 ^a	0,63 ^a	0,26
	(M.mol)							
	Inibição (%)	63,69	56,00	44,92	73,54	56,31	51,38	-

a – diferença estatística em relação ao CN ($p < 0,05$). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$). b – diferença estatística em relação a concentração equivalente de BHT.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os resultados descritos anteriormente demonstram que o jambu pode ser uma fonte de compostos antioxidantes importante para o processo de cicatrização de lesões cutâneas. De acordo com a literatura, tal atividade é atribuída a presença de metabólitos secundários como as alquilamidas, compostos fenólicos e flavonoides (Silva *et al.*, 2023). Um estudo de Nascimento *et al.*, (2020) comparou a capacidade antioxidante do extrato etanólico de diferentes partes do jambu. Observou-se maior capacidade antioxidante nas folhas da planta, o que se correlaciona diretamente ao maior conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides. Apesar de provavelmente não serem os principais compostos antioxidantes do extrato, também deve-se considerar o efeito sinérgico das alquilamidas, como o espilantol, no aumento de tal atividade (Nascimento *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2023). Essas observações feitas pelos autores podem explicar os achados desse trabalho, visto que foi identificada a presença de diversos compostos da classe das alquilamidas, além do ácido vanílico, importante antioxidante da classe dos compostos fenólicos.

5.3.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

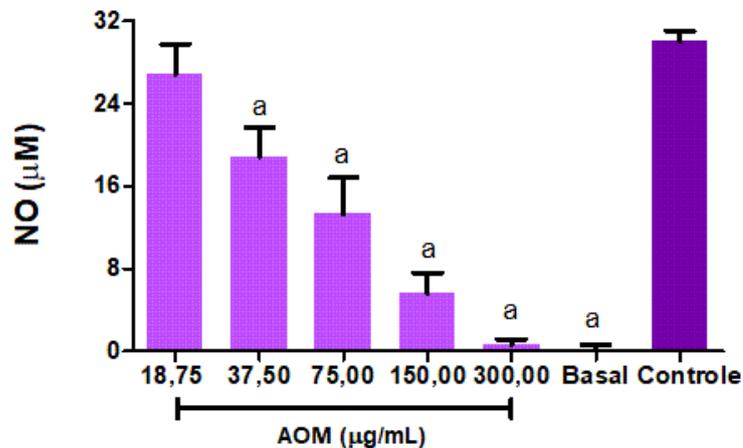
O óxido nítrico é um radical livre considerado como mediador chave para o desenvolvimento de inflamação cutânea, sendo produzido por diversas células envolvidas na cicatrização de feridas como macrófagos, linfócitos, queratinócitos e

fibroblastos. Sua produção implica no aumento da permeabilidade vascular, liberação de citocinas como IL-6 e TNF- α , assim como na migração de células inflamatórias, proliferação e diferenciação de linfócitos T. Estudos indicam que tanto a deficiência, quando o excesso da produção de NO são prejudiciais para a cicatrização, pois, apesar da inflamação ser importante para a proteção do organismo, sua resposta excessiva ou crônica pode gerar dano irreversível ao tecido (Bernatchez *et al.*, 2013; Man *et al.*, 2022).

No presente estudo, a dosagem indireta de NO foi realizada no sobrenadante da cultura de macrófagos murinos estimulados com LPS e INF- γ tratados com concentrações crescentes de AOM (18,75 a 300,00 $\mu\text{g/mL}$), as mesmas utilizadas no ensaio de viabilidade celular. O LPS age se ligando a receptores CD14, TLR-4 e CR3 presentes na superfície dos macrófagos, ativando a transdução de sinais que resultam na ativação do fator de transcrição fator nuclear κB (NF- κB) e expressão de óxido nítrico sintase. Já o INF- γ é uma citocina que atua de maneira sinérgica na ativação de macrófagos e desenvolvimento da resposta inflamatória (Chang *et al.*, 2019).

As células tratadas com todas as concentrações do extrato, exceto a concentração de 18,75 $\mu\text{g/mL}$, tiveram os níveis de NO reduzidos de forma significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle (37,50 $\mu\text{g/mL}$: 37,34%; 75,00 $\mu\text{g/mL}$: 55,80%; 150,00 $\mu\text{g/mL}$: 81,20%; 300 $\mu\text{g/mL}$: 97,72%), o que também corrobora a atividade antioxidante do extrato e a presença de compostos fenólicos confirmadas neste trabalho. Não houve diferença significativa entre a produção de NO nas células tratadas com 300,00 e 150,00 $\mu\text{g/mL}$ de AOM e os níveis basais ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos em micromolar (μM) de acordo com o apresentado na Figura 18.

Figura 18: Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneiais após tratamento com AOM.



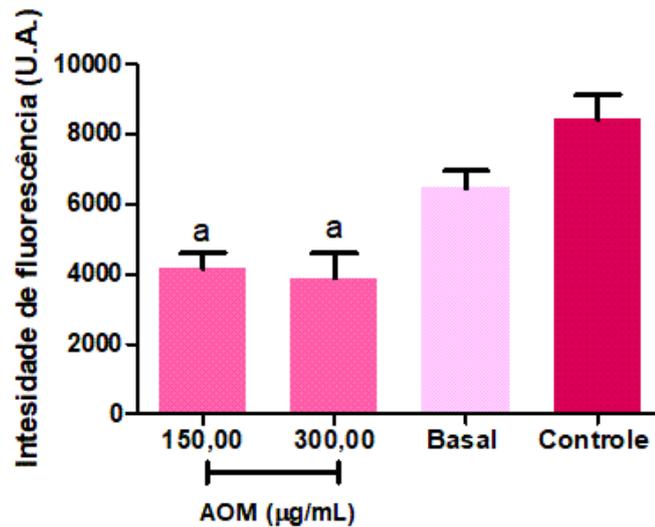
AOM: extrato metanólico das folhas de *Acmella oleracea*. Basal: NO produzido por células tratadas com DMSO (veículo) sem estímulo. Controle: NO produzido por células tratadas com DMSO (veículo) e estimuladas com LPS e IFN- γ . As letras indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (a). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas presentes no citoplasma de diferentes tipos celulares. Enquanto em adipócitos estão mais associadas ao estoque de lipídios e ao metabolismo, em leucócitos os CLs se acumulam em maior quantidade diante de um processo inflamatório. Estas organelas compartimentalizam ácido araquidônico (AA) e toda a maquinaria enzimática para a produção de eicosanoides, como a família de enzimas fosfolipase A2 (PLA2). Portanto, agem como moduladores da resposta imune, participando do metabolismo celular do AA, o que indica que os CLs são capazes de iniciar a cascata de inflamação de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e leucotrienos (Melo; Weller, 2016).

Para avaliar a influência de AOM na produção de CLs, macrófagos peritoneais foram tratados com AOM (150,00 e 300,00 $\mu\text{g/mL}$) e estimulados com LPS e IFN- γ a fim de verificar o acúmulo de CLs no meio intracelular. O acúmulo intracelular de CLs foi significativamente reduzido nas concentrações de 150,00 $\mu\text{g/mL}$ (50,44%) e 300,00 $\mu\text{g/mL}$ (46,06%) em comparação ao controle ($p < 0,05$). Tais resultados foram expressos em intensidade de fluorescência (U.A.) de acordo com o apresentado na Figura 19.

Figura 19: Avaliação do acúmulo de corpúsculos lipídicos (CLs) em macrófagos peritoneais murinos após tratamento com AOM.



AOM: extrato metanólico das folhas de *Acmella oleracea*. Controle: acúmulo de CL por células estimuladas com LPS e IFN- γ tratadas com veículo. Basal: acúmulo de CL por células sem estímulo tratadas com veículo. As letras indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (a). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

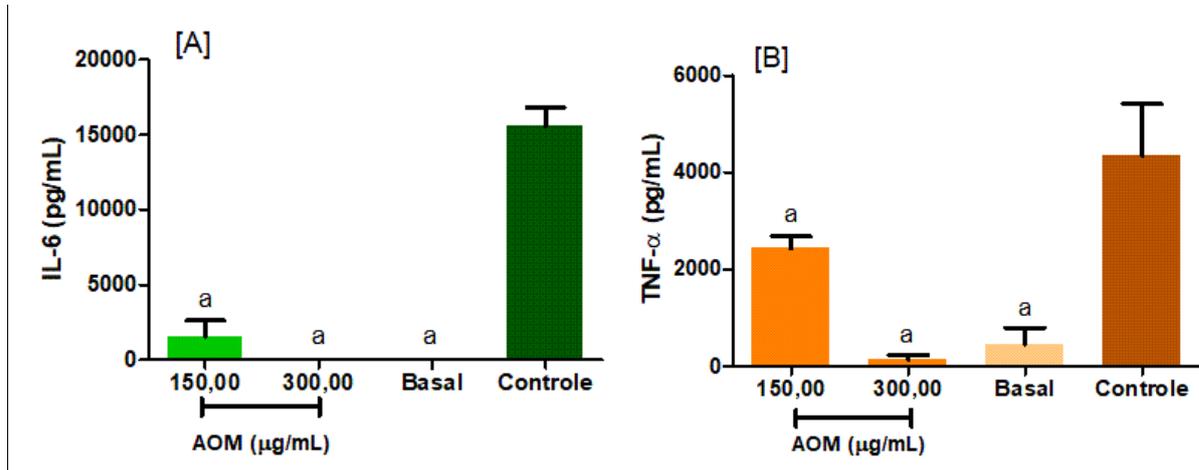
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

TNF- α e IL-6 são interleucinas pró-inflamatórias secretadas por leucócitos como macrófagos e neutrófilos. Ambas estão envolvidas na quimiotaxia de células inflamatórias para o sítio da ferida, enquanto IL-6 ainda se relaciona com o aumento da proliferação de fibroblastos (Gushiken *et al.*, 2021). A produção elevada e prolongada destas citocinas, potencializa a secreção de MMP-1 e MMP-2 e diminui a secreção do inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP)-1, o que favorece a cronificação da lesão por conta do excesso de destruição da MEC (Chin *et al.*, 2019; Larouche *et al.*, 2022).

A influência de AOM na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 foi avaliada por ELISA tipo sanduíche no sobrenadante das culturas de macrófagos tratados com AOM nas concentrações 150,00 e 300,00 $\mu\text{g/mL}$. O tratamento na concentração de 150,00 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de reduzir em 90,12% e 44,03% a produção das citocinas IL-6 e TNF- α , respectivamente, em comparação com o controle sem tratamento ($p < 0,05$). Já a maior concentração de extrato foi capaz de reduzir em 100,00% e em 96,66% a produção de IL-6 e TNF- α , respectivamente, em comparação

ao controle ($p < 0,05$) (Figura 20). Os níveis de citocinas foram expressos em $\times 10^7$ pg/mL.

Figura 20: Dosagem de IL-6 e TNF- α em macrófagos tratados com diferentes concentrações de AOM e estimulados com LPS e IFN- γ .



AOM: extrato metanólico das folhas de *Acmella oleracea*. Basal: células sem estímulo tratadas com veículo. Controle: células estimuladas tratadas com veículo. As letras indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (a). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A ação anti-inflamatória de *A. oleracea* parece estar relacionada com a inibição de mediadores inflamatórios tanto a nível de transcrição genética, quanto de tradução. Um destes possíveis mecanismos foi elucidado por Kim *et al.*, (2018) em cultura de macrófagos RAW 264.7, nos quais o extrato de jambu foi capaz de suprimir a expressão de genes de citocinas dependentes do fator de transcrição NF- κ B. Além disso, de acordo com um estudo de Bakondi *et al.*, (2019), o espilantol foi capaz de reduzir a produção de NO por meio da inibição da expressão da proteína enzima óxido nítrico sintase induzível e pela alteração da transcrição do gene iNOS. Esses trabalhos ajudam a explicar a redução da produção das citocinas IL-6 e TNF- α e do mediador NO descritas anteriormente. Não foram encontrados estudos que abordem a redução do acúmulo de CL intracelular pelo jambu, tornando essa análise inédita para essa espécie, porém, este mecanismo parece estar associado a capacidade de seus

fitoconstituintes de reduzirem a produção de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas (Sharma; Arumugam, 2021).

A maior parte dos efeitos anti-inflamatórios do jambu é atribuída as alquilamidas, em especial ao espilantol, e secundariamente a compostos fenólicos como o ácido vanílico, escopoletina e ácido *trans*-ferulico (Boonen *et al.*, 2012; Bakondi *et al.*, 2019). Apesar de alguns estudos apresentarem evidências acerca do poder anti-inflamatório da espécie, ainda não se sabe os mecanismos de ação exatos responsáveis por este efeito (Uthpala; Navaratne, 2020).

5.3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

O desenvolvimento de processos infecciosos em lesões cutâneas impacta diretamente na eficiência da cicatrização, visto que exacerbam a produção de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios. Existem diversos microrganismos, entre eles fungos e bactérias, que podem ocasionar o aparecimento de infecções em feridas. Nas fases iniciais da formação de uma ferida, bactérias como as gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* são as mais presentes, enquanto as gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são mais prevalentes em feridas crônicas e tendem a invadir camadas mais profundas da pele (Simões *et al.*, 2018). Além disso, alguns fungos, como *Candida albicans*, também podem ser causadores de infecções em feridas crônicas (Yazarlu *et al.*, 2021).

As complicações decorrentes de feridas infeccionadas, como obstrução do processo de cura e aparecimento de infecções sistêmicas, justificam a busca de compostos que atuem impedindo ou combatendo tais microrganismos (Abbas *et al.*, 2019; Visha; Karunagaran, 2019). Ademais, o desenvolvimento cada vez mais frequente de linhagens resistentes aos antimicrobianos tradicionais fazem com que seja necessária a investigação de novas alternativas terapêuticas.

Para este fim, foi realizada a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM), as quais consistem na menor concentração de extrato capaz de inibir o crescimento microbiano após um período de incubação, e das concentrações bactericidas e fungicidas mínimas (CBM/CFM), correspondentes às menores

concentrações de AOM capazes de matar o microrganismo. Os resultados estão exibidos na Tabela 5.

Foi observado um valor de CIM de 1000 µg/mL de AOM para as bactérias *E. coli* (ATCC® 10536™), *S. epidermidis* (ATCC® 0016™) e *S. aureus* (ATCC® 33591™), cujo efeito observado foi bacteriostático. Já para *P. aeruginosa* (INCAS 2742), o valor de CIM foi de 500 µg/mL de extrato, concentração que exerceu atividade bactericida. Valores de CIM de 0,08, 0,63, 0,31 e 0,63 µg/mL de ciprofloxacino (controle positivo) foram encontrados para *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

Tanto para *C. albicans* (ATCC® 24433™), quanto para *C. albicans* (ATCC® 10231™), o valor de CIM foi de 125 µg/mL de extrato, com efeito fungistático. O valor de CIM encontrado para a nistatina, utilizada como controle positivo, foi de 2,5 µg/mL para ambas as linhagens fúngicas avaliadas.

Aligiannis *et al.*, (2001) classificaram os agentes antimicrobianos de acordo com seus valores de CIM em ≤ 500 ug/ml – atividade forte, entre 600 e 1500 - atividade moderada, ≥ 1600 ug/ml - atividade baixa. Diante disso, de acordo com os valores de CIM encontrados, AOM pode ser classificado com atividade antimicrobiana de forte a moderada frente aos microrganismos avaliados.

Quanto a CBM, os valores foram superiores a 1000 µg/mL para *E. coli*, *S. epidermidis* e *S. aureus*, fazendo-se necessária a realização de novos ensaios utilizando maiores concentrações de AOM para determinação exata da CBM. Já para *P. aeruginosa*, a concentração bactericida mínima foi de 500 µg/mL e a CFM para ambos os fungos investigados foi de 500 µg/mL.

Tabela 5: Concentração inibitória mínima (CIM) de AOM e dos controle positivos, efeito no valor da CIM, e concentração bactericida mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM) de AOM frente a microrganismos de interesse.

Microrganismos	CIM de AOM (µg/mL)	Efeito no valor da CIM	CBM/CFM (µg/mL)	CIM CP (bactérias) (µg/mL)	CIM CP (fungos) (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 10536™)	1000	Bacteriostático	>1000	0,08	-

<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC® 0016™)	1000	Bacteriostático	>1000	0,63	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 33591™)	1000	Bacteriostático	>1000	0,31	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (INCAS 2742)	500	Bactericida	500	0,63	-
<i>Candida albicans</i> (ATCC® 24433™)	125	Fungistático	500	-	2,5
<i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231™)	125	Fungistático	500	-	2,5

CP (bactérias): Ciprofloxacino; CP (fungos): Nistatina.

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Diante dos resultados descritos anteriormente, é possível dizer que AOM exerceu atividade inibitória tanto para fungos, quanto para bactérias gram-positivas e gram-negativas. Estes também estão de acordo com alguns relatos da literatura, os quais descrevem o uso tradicional de jambu no tratamento de infecções como feridas, infecções respiratórias, disenteria, entre outras (Elufioye *et al.*, 2020). Um estudo de Uthpala *et al.*, (2021) também investigou o potencial antimicrobiano do extrato aquoso e etanólico das flores e caules de *A. oleracea*. Foram observados valores de CIM de 312,5 a 1250 µg/mL para os microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

Um outro estudo de Peretti *et al.*, (2021) utilizou o extrato hidroalcoólico de folhas e raízes de *A. oleracea* para determinar a CIM sobre *Streptococcus mutans*, bactéria causadora da cárie dental. Os autores encontraram CIM de 125 µg/mL, efeito atribuído em especial a presença de compostos da classe das alquilamidas no extrato, como o espilantol, as quais são capazes de desnaturar a parede celular microbiana, provocando sua ruptura.

Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa também verificou que o espilantol exerceu atividade antifúngica sobre uma cepa multirresistente de *Candida albicans*. Tal composto foi capaz de interferir na integridade da célula fúngica,

causando o rompimento da membrana celular de maneira mais efetiva do que a nistatina, utilizada como droga de referência. De acordo com os autores, um dos possíveis mecanismos de ação do espilantol se dá por meio da sua ligação ao ergosterol, esterol fundamental para a integridade e manutenção das características físicas da membrana celular fúngica (Fabri *et al.*, 2021).

Diante do exposto, a atividade antimicrobiana verificada no presente trabalho também pode ser devida ao efeito sinérgico exercido pelas alquilamidas na composição de AOM, visto que foram identificados 7 compostos da classe, entre eles o espilantol.

5.4 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.

Filmes poliméricos são uma alternativa simples e de baixo custo para aplicação como curativo em feridas. Além disso, podem ser incorporados a moléculas bioativas capazes de atuar em várias etapas do processo de cura por meio de atividades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (Savencu *et al.*, 2021). A metodologia empregada para o desenvolvimento da formulação foi o método de evaporação de solvente, visto que dispensa equipamento específicos e de alto custo, além de ser um método de fácil execução (Escárcega *et al.*, 2018).

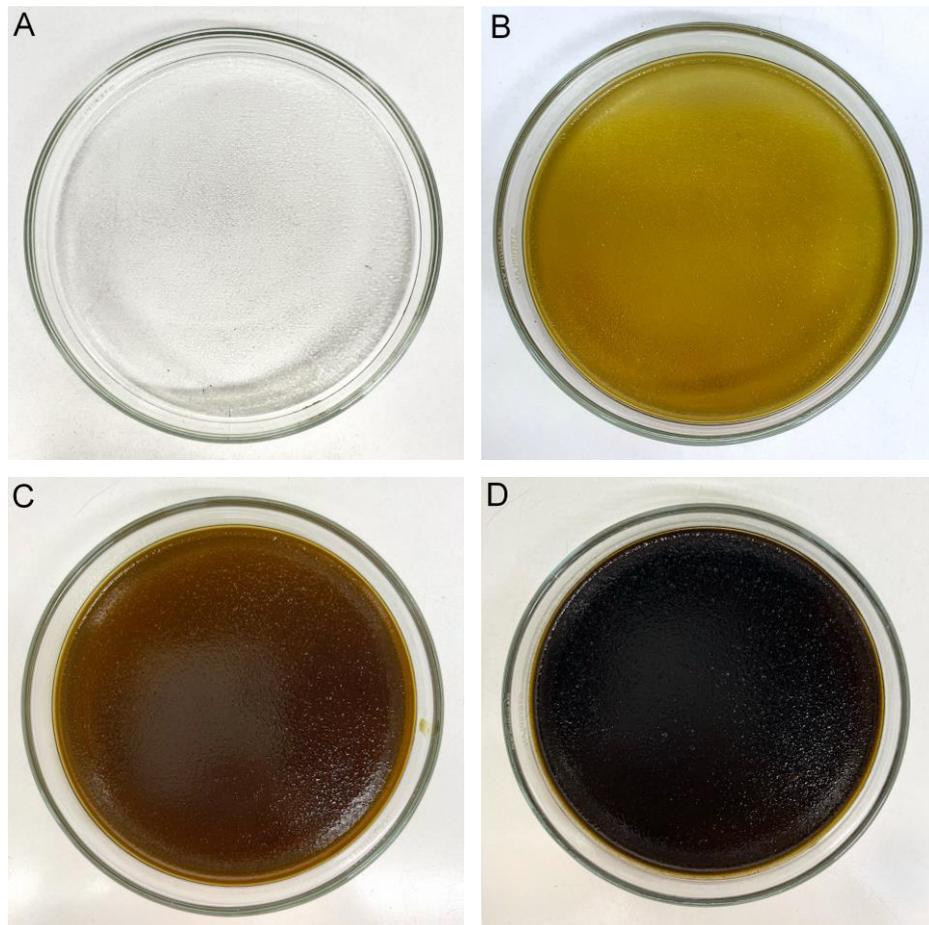
A quitosana foi selecionada como polímero base para o desenvolvimento dos biocurativos em vista da sua ótima capacidade de formar filmes, por ser biocompatível e biodegradável, apresentar atividades biológicas intrínsecas, além de ser uma ótima opção para liberação controlada de compostos bioativos (Liu *et al.*, 2018). Sua concentração ideal para a elaboração de filmes poliméricos e o pH de solubilidade já são definidos em literatura (Escárcega *et al.*, 2018).

Apesar de apresentar capacidade de formar filmes quando em solução ácida, o produto final é frágil e quebradiço, fazendo-se necessária a adição de um plastificante. Quando um plastificante é adicionado, este se intercala entre as cadeias do polímero, as afastando. Este afastamento das cadeias aumenta a flexibilidade e a permeabilidade gasosa do filme formado, aspectos importantes para o seu uso como um biocurativo (Rodríguez-Núñez *et al.*, 2014). Como plastificante utilizou-se a

glicerina, visto que é um plastificante compatível com a quitosana e de baixo custo (Rambabu *et al.*, 2019).

A concentração ideal de glicerina e de AOM na formulação foi alcançada por meio de revisão da literatura, seguida de elaborações de filmes em diferentes concentrações do plastificante e de extrato até a obtenção de biocurativos que aparentassem boa elasticidade, resistência e solubilidade do extrato (Figura 21).

Figura 21: Filmes poliméricos de quitosana e diferentes concentrações de AOM.



A: filme de quitosana sem extrato (branco); B: filme de quitosana contendo AOM a 1% (p/v); C: filme de quitosana contendo AOM a 2,5% (p/v); D: filme de quitosana contendo AOM a 5% (p/v).

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

5.4.1 Caracterização físico-química das soluções precursoras dos filmes

As soluções precursoras dos filmes são compostas pelos componentes dos filmes em solução antes da secagem para obtenção do produto final. Estas foram

avaliadas quanto a suas características coloidais (potencial zeta e condutividade elétrica) e quanto às suas características reológicas.

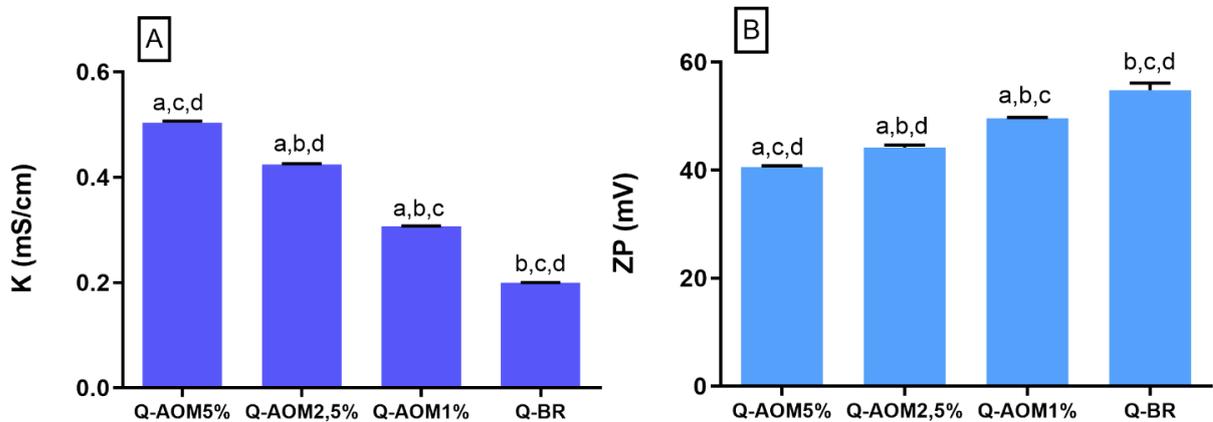
5.4.1.1 *Determinação da Condutividade elétrica e Potencial Zeta (PZ)*

A avaliação da condutividade elétrica da solução precursora dos filmes poliméricos tem como objetivo verificar se este é capaz ou não de conduzir corrente elétrica, propriedade associada a presença de íons livres e sua mobilidade em solução (Ohlweiler, 1981). De acordo com a Figura 22A, a solução precursora de Q-BR, composta por quitosana, ácido acético e glicerina, é uma solução eletrolítica, visto que foi capaz de conduzir corrente elétrica. Isso se deve, possivelmente, à presença dos grupamentos amino da quitosana, os quais são protonados em meio ácido (Matica *et al.*, 2019).

O acréscimo de AOM na solução precursora se mostrou diretamente proporcional ao aumento da condutividade elétrica da solução, como pode ser observado nos valores de condutividade de Q-AOM1%, Q-AOM2,5% e Q-AOM5%, exibidos na Figura 22A. Tal efeito está associado a presença de espécies ionizáveis no extrato das folhas de Jambu, como as alquilamidas.

As alquilamidas apresentam grupamentos funcionais amida em sua estrutura, provenientes de aminoácidos que participam de sua síntese (Sharma; Arumugam, 2021). Portanto, são capazes de receber prótons em meio ácido, adquirindo estrutura positivamente carregada (Deruiter, 2005). Além disso, a condutividade elétrica de uma solução depende não só da presença de espécies iônicas em solução, mas também da mobilidade das mesmas (Ohlweiler, 1981). As alquilamidas são moléculas de baixo peso molecular, o que facilita o percurso e movimentação das cargas elétricas e aumenta sua interface de contato com o meio, favorecendo a condução de eletricidade (Savic *et al.*, 2020).

Figura 22: Valores de condutividade elétrica e potencial zeta das soluções precursoras dos filmes poliméricos.



Condutividade elétrica (A) e potencial zeta (B) de suspensões aquosas obtidas a partir da dispersão de 100 μL da solução precursora dos filmes poliméricos em água milliQ. Experimentos realizados a 25 $^{\circ}\text{C}$ e DDP alternada de 10 mV. a – diferença estatística em relação a Q-BR. b – diferença estatística em relação a Q-AOM5%. c – diferença estatística em relação a Q-AOM2,5%. d – diferença estatística em relação a Q-AOM1% (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O potencial zeta (PZ) se relaciona diretamente com a condutividade elétrica de uma solução, visto que informa sobre a estabilidade de partículas dispersas em um meio contínuo por meio da determinação da magnitude de sua carga superficial (Kim *et al.*, 2019). Portanto, este ensaio é útil para avaliar a influência dos componentes presentes no extrato das folhas de *A. oleracea* e da quitosana sobre a carga superficial das partículas e seu PZ na solução precursora.

De acordo com a Figura 22B, as moléculas de quitosana demonstraram valores positivos de PZ devido à existência de grupamentos amino em sua estrutura, os quais apresentam carga superficial positiva em pH ácido (Escárcega *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2019). Contudo, observou-se que a adição de concentrações crescentes de extrato diminuiu de maneira proporcional os valores de PZ nas soluções precursoras. Estes resultados podem ser explicados pelas características dos grupos funcionais da quitosana e das alquilamidas presentes em AOM.

Os grupamentos amina da quitosana são compostos básicos capazes de aceitar prótons e formar íons positivamente carregados em meio ácido. A constante de ionização, ou constante de basicidade, das aminas tende a ser maior do que das

amidas, o que se traduz na maior capacidade das aminas de ganhar prótons e adquirirem carga superficial positiva. Já os grupamentos amida, presentes nas alquilamidas, apresentam característica neutra, possuindo constante de ionização muito menor em relação às aminas. Sendo assim, por serem menos básicas, as amidas apresentam menor tendência a adquirir prótons e carga superficial em meio ácido (Deruiter, 2005; Zhao *et al.*, 2013). Estas propriedades podem ser observadas nos valores de PZ exibidos na Figura 22B, onde as soluções precursoras com maiores concentrações de extrato, apresentam moléculas com menor carga superficial quando comparadas com o filme Q-BR.

5.4.1.2 Determinação dos parâmetros reológicos das soluções precursoras

A reologia é a ciência que estuda como se dá a deformação e o fluxo de um material quando submetido a uma força de cisalhamento, sendo de grande importância para o desenvolvimento de formulações (Spada *et al.*, 2013). As propriedades reológicas de soluções poliméricas podem afetar sua espalhabilidade, espessura e uniformidade, o que influencia diretamente no resultado final dos filmes poliméricos. Além disso, a viscosidade de uma solução interfere no seu processamento em larga escala, visto que está diretamente relacionada com propriedades de fluxo (Silva-weiss *et al.*, 2013). A avaliação reológica das soluções precursoras foi realizada por meio dos testes estacionários, com aplicação contínua de uma força de cisalhamento, e oscilatórios, onde a aplicação da força se dá de maneira intermitente.

As curvas de fluxo e viscosidade versus a taxa de cisalhamento nos fornecem informações sobre como o material se comporta com a aplicação de uma deformação contínua e crescente (curva ascendente) e após a diminuição e interrupção da aplicação desta força (curva descendente).

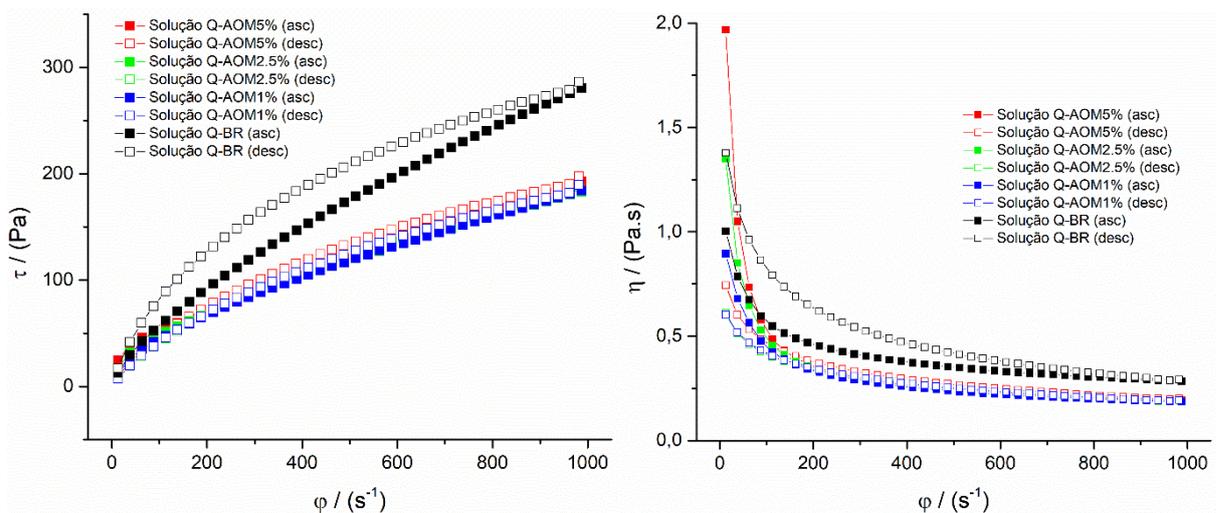
De acordo com a Figura 23, as formulações apresentam comportamento tixotrópico, visto que a aplicação da deformação resulta em um aumento do fluxo e diminuição da viscosidade. Porém, esta alteração é reversível, já que na ausência do cisalhamento, e após determinado tempo, a estrutura se reconstitui e o material volta a apresentar a viscosidade inicial. Quanto maior a área entre a curva ascendente e a

curva descendente, maior o tempo necessário para o retorno ao fluxo e viscosidade iniciais, e, conseqüentemente, mais intenso o comportamento tixotrópico. Portanto, materiais com maior tixotropia apresentam comportamento mais viscoso e menos elástico (Mewis *et al.*, 2009).

Ao comparar as soluções precursoras Q-AOM5%, Q-AOM2,5% e Q-AOM1% com a solução do filme branco Q-BR, foi possível observar que a tixotropia foi atenuada pela adição de AOM. Este comportamento pode ser explicado, visto que o extrato possivelmente interfere na formação dos emaranhados da cadeia polimérica da quitosana, tornando os fluidos menos viscosos, os quais retornam mais rapidamente a sua viscosidade e fluxo iniciais.

Ademais, é possível dizer que todas as formulações apresentam comportamento reológico de materiais não-newtonianos pseudoplásticos, caracterizados pela diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de deformação, típicos de formulações poliméricas (Chhabra, 2010). Estes resultados estão de acordo com um estudo de Bertolo *et al.*, (2020), onde os autores justificam este comportamento pelo fato do aumento da taxa de cisalhamento levar a uma maior ordenação das cadeias poliméricas da quitosana, as quais tendem a se orientar em direção ao estresse aplicado, diminuindo a viscosidade.

Figura 23: Curvas de fluxo e viscosidade das soluções precursoras dos filmes em função da taxa de cisalhamento.

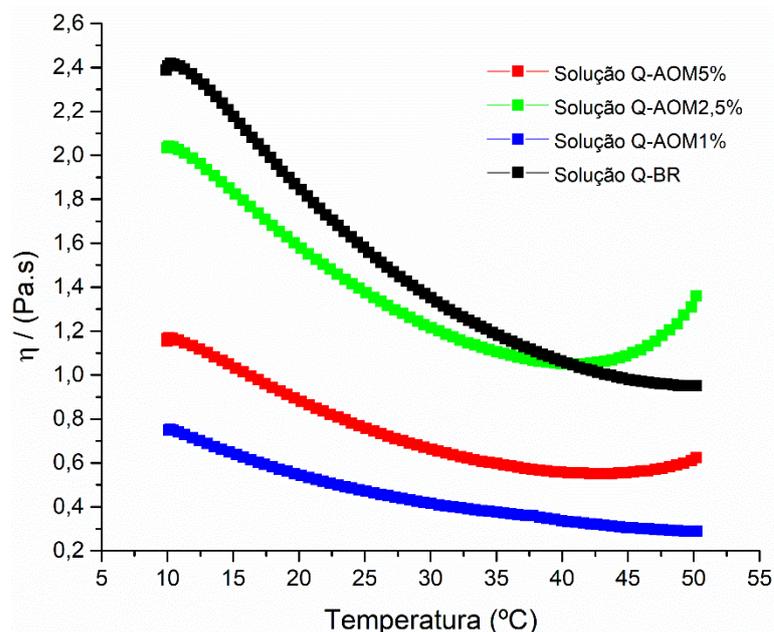


Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Na Figura 24, foi possível avaliar a influência do aumento da temperatura sobre a viscosidade das soluções precursoras. O aumento da temperatura intensifica a difusão das moléculas pelo meio e o rompimento de interações intermoleculares, deixando as amostras mais fluidas e menos viscosas (Canciam, 2010). Como o esperado, este efeito foi observado em todas soluções precursoras, sendo que a solução Q-BR, mais viscosa, sofreu queda ligeiramente maior de viscosidade em função do aumento da temperatura em comparação com as soluções com extrato. Resultado semelhante também foi observado pelos autores Bertolo *et al.*, (2020), onde a adição de extrato da casca de romã a um gel de quitosana diminuiu a sensibilidade da formulação frente a variação de temperatura.

Porém, ao avaliar a perda de viscosidade entre as temperaturas de 20 a 40 °C, faixa de temperatura que abrange o clima brasileiro, não houve alteração brusca no comportamento das formulações, em especial das soluções precursoras dos filmes com AOM (soluções: Q-BR: -0,8 Pa.s; Q-AOM2,5%: -0,5 Pa.s; Q-AOM5%: -0,3 Pa.s; Q-AOM1%: -0,2 Pa.s). Portanto, os resultados sugerem que as formulações não apresentam alterações intensas de viscosidade quando expostas a temperatura ambiente. Tais aspectos devem ser levados em consideração no momento da manipulação das formulações, armazenamento e transporte (Silva-weiss *et al.*, 2013).

Figura 24: Curva de viscosidade *versus* temperatura das soluções precursoras dos filmes, de 10 a 50 °C.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Um material viscoelástico é aquele que apresenta, ao mesmo tempo, propriedades de materiais sólidos e líquidos (Khan *et al.*, 2020). Tal característica é típica de materiais poliméricos e foi avaliada nas soluções precursoras por meio da elaboração de um gráfico de varredura de amplitude oscilatória, exibido na Figura 25.

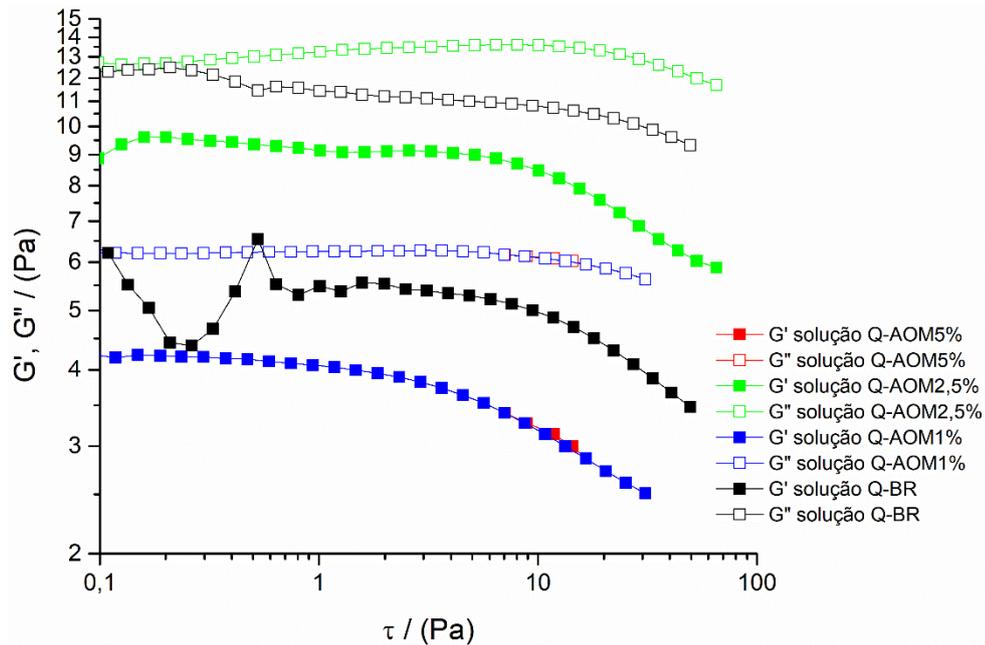
Quando o módulo G'' (módulo viscoso ou módulo de perda) é superior a G' (módulo elástico ou módulo de armazenamento), podemos dizer que o material é mais viscoso do que elástico, apresentando, portanto, perfil mais líquido do que sólido (Khan *et al.*, 2020). Diante disso, todas as soluções precursoras dos filmes apresentam comportamento de líquidos viscoelásticos, visto que o módulo G'' é superior a G' . Nestes casos, existem domínios sólidos livres para se movimentar quando o cisalhamento é aplicado, porém, diferente de amostras mais sólidas, o patamar de ligações intermoleculares é muito mais baixo.

Além disso, não foi observada tendência de interseção entre os dois módulos G' e G'' , ponto de cruzamento que traduz a faixa de tensão onde ocorre a quebra estrutural do material. Isso se justifica pois, em formulações mais líquidas, este ponto de interseção não ocorre devido a baixa estruturação da formulação.

Outro parâmetro que confirma o caráter viscoso e predominantemente líquido das soluções precursoras são os valores de $\tan \delta$ (G''/G'), dispostos na tabela 6. A $\tan \delta$ permite classificar as amostras em viscosas, quando $\tan \delta > 1$, visto que $G'' > G'$, e em elásticas, quando $\tan \delta < 1$, visto que $G'' < G'$. Como o esperado, todas as amostras apresentaram $\tan \delta$ superiores a 1, podendo ser classificadas como soluções mais viscosas, visto que o módulo G'' foi predominante (Bertolo *et al.*, 2020).

Apesar da nítida influência da adição de AOM nos valores dos módulos G'' e G' , não foi possível estabelecer uma relação direta entre a alteração dos módulos viscosos e elásticos, e dos valores de $\tan \delta$ com a adição de concentrações crescentes de AOM na solução precursora.

Figura 25: Curvas referentes aos módulos G' e G'' das soluções precursoras em função da tensão de cisalhamento.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Tabela 6: Valores de $\tan \delta$ das soluções precursoras em função da tensão de cisalhamento.

tan δ das soluções precursoras				
Tensão de cisalhamento	Q-AOM5%	Q-AOM2,5%	Q-AOM1%	Q-BR
0,01	1,42	1,29	1,60	1,83
0,1	1,47	1,42	1,46	1,92
1	1,55	1,45	1,40	2,10
10	1,94	1,62	1,70	2,14

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

5.4.2 Caracterização físico-química dos filmes

As soluções precursoras dos filmes foram adicionadas em placas de petri de 9 cm de diâmetro e secas em estufa, obtendo-se assim os filmes poliméricos. A partir de então, foram realizados ensaios para avaliar suas características físico-químicas como perfil de liberação, microscopia eletrônica de varredura, determinação do peso médio, espessura, umidade e grau de intumescimento, análises térmicas,

espectroscopia eletrônica vibracional na região do infravermelho e caracterização por análise dinâmico mecânica.

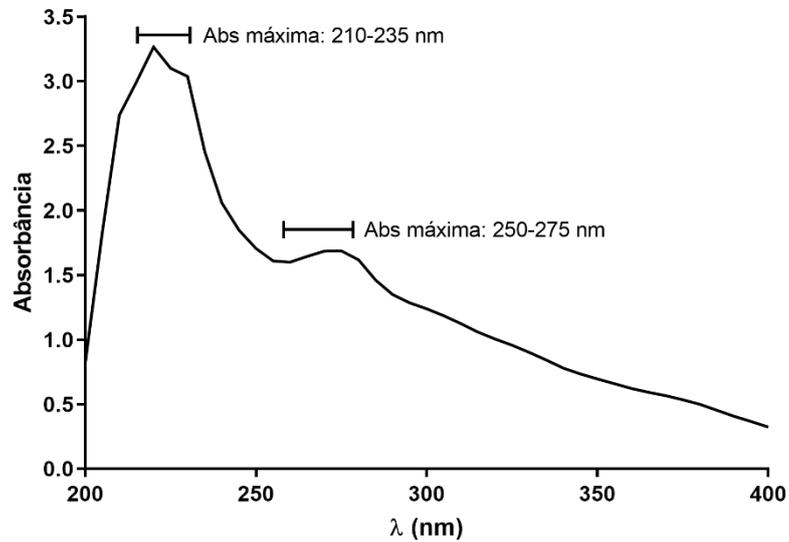
5.4.2.1 Perfil de liberação

O processo de cura de uma ferida é multifatorial e envolve diversas etapas até a total cicatrização. Por isso, espera-se que a formulação ideal seja capaz de liberar compostos bioativos de maneira gradual e controlada para que estes interajam com a pele e exerçam efeito farmacológico (Abbas *et al.*, 2019). Sendo assim, o perfil de liberação de fitoconstituintes de AOM a partir dos filmes foi realizado para simular a liberação a partir de uma face da membrana, mimetizando a liberação unidirecional dos fitoconstituintes na pele.

Para isso, os filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR fixados na abertura de tubos falcon, foram posicionados em contato direto com um fluido de feridas simulado com pH 7,4, objetivando simular as características do exsudato presente em lesões cutâneas. O sistema também foi mantido à 34°C durante as 8 horas de experimento, visto que esta temperatura é compatível com a temperatura média da superfície da pele (Smith *et al.*, 2013). Alíquotas foram coletadas em intervalos determinados e lidas por espectrofotometria de varredura nos comprimentos de onda de 200 a 400 nm. Este intervalo foi escolhido por compreender o espectro de absorbância tanto das alquilamidas como o espilantol, quanto dos compostos fenólicos como o ácido vanílico, classes de fitoconstituintes presentes em AOM (Bae *et al.*, 2010; Mudge *et al.*, 2011; Aleixandre *et al.*, 2017).

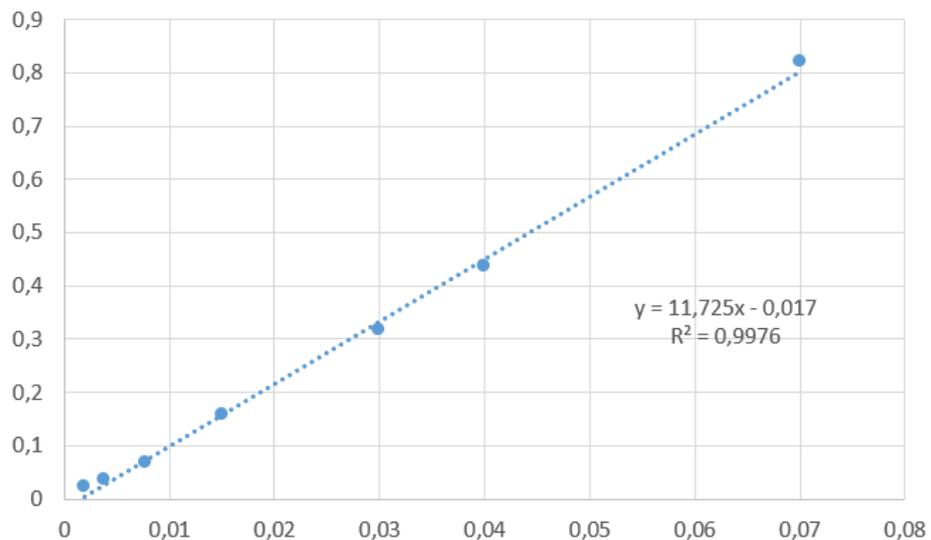
Ademais, a fim de determinar o comprimento de onda de maior absorção do extrato puro, foi realizada a varredura por espectrofotometria de uma solução de AOM no intervalo de 200 a 400 nm (Figura 26). A região de maior absorbância se concentrou entre os comprimentos de onda de 210 a 235 nm, a qual foi escolhida para elaboração de uma curva padrão de AOM (Figura 27).

Figura 26: Espectrofotometria de varredura de AOM no intervalo de 200-400 nm e seus picos de absorbância.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 27: Curva padrão de AOM.



Curva padrão elaborada em concentrações de AOM de 0,0019 a 0,0700 mg/mL *versus* abs. correspondente. As soluções foram lidas em comprimento de onda de 235 nm.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O cálculo da porcentagem de fitoconstituintes liberados a partir dos filmes foi então realizado utilizando-se a curva padrão de AOM conforme descrito nas equações abaixo:

$$\text{Fitoconstituintes liberados (mg)} = \frac{\text{Abs} + 0,017}{11,725} \times Vt$$

$$\text{Liberação (\%)} = \frac{\text{Fitoconstituintes liberados (mg)} \times 100}{Ct}$$

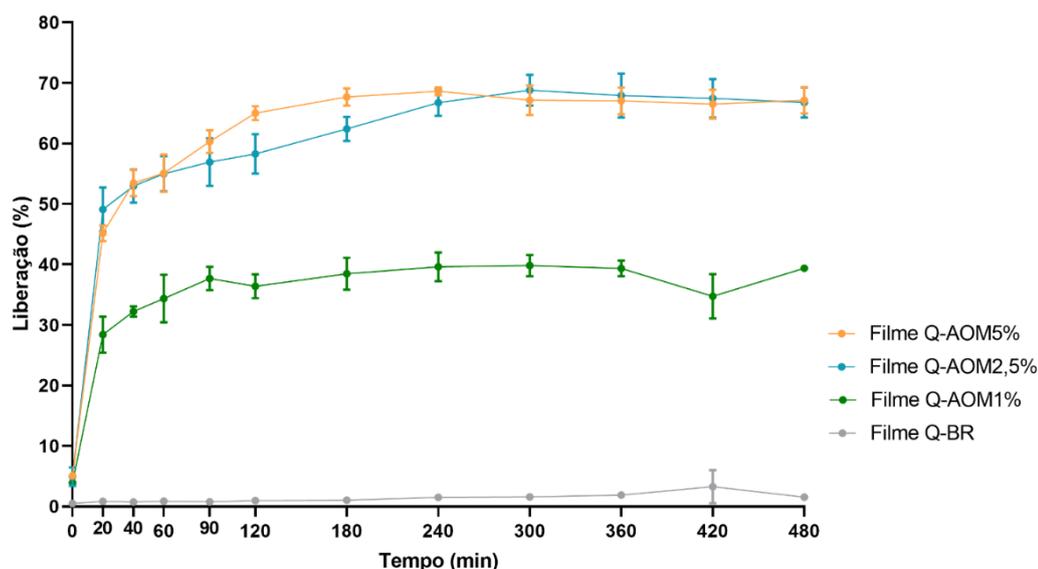
Onde,

- Vt: volume total de fluido de feridas simulado em contato com o filme;
- Abs: Absorbância em 235 nm da alíquota coletada no estudo de liberação em intervalo de tempo determinado;
- Ct: concentração total de AOM presente no filme em contato com o fluido de feridas simulado (mg)

O gráfico de porcentagem de liberação de fitoconstituintes a partir dos filmes *versus* tempo pode ser observado no Figura 28. A partir de 40 min. do início do ensaio, os filmes Q-AOM5% e Q-AOM2,5% apresentaram perfil de liberação constante, visto que não houve diferença estatística entre as coletas subsequentes. O mesmo ocorreu para o filme Q-AOM1% a partir de 20 min. do início da análise. A porcentagem máxima de liberação de fitoconstituintes se deu após 240 min. para o filme Q-AOM5% (68,63% ± 0,64). Já para os filmes Q-AOM2,5% e Q-AOM1%, o pico de liberação se deu após 300 min. do início do teste, com 68,81% ± 2,55 e 39,81% ± 1,77 de liberação, respectivamente (Tabela 7). O filme Q-BR apresentou perfil de liberação próximo a 0%, visto que este não possui extrato em sua composição.

Os perfis de liberação de fitoconstituintes obtidos a partir dos filmes sugerem que, ao serem aplicados topicamente, os filmes poliméricos são capazes de liberar de maneira satisfatória e controlada os ativos presentes na formulação. Tais resultados podem ser justificados pelo fato da quitosana ser um polímero eficiente para o controle de liberação de ativos, proporcionando assim a liberação gradual destes a partir dos filmes poliméricos (Liu *et al.*, 2018).

Figura 28: Porcentagem de liberação de fitoconstituintes a partir dos filmes poliméricos entre os tempos 0 e 480 min.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 7: Porcentagem de liberação de fitoconstituintes do extrato a partir dos filmes poliméricos entre os tempos 0 e 480 min.

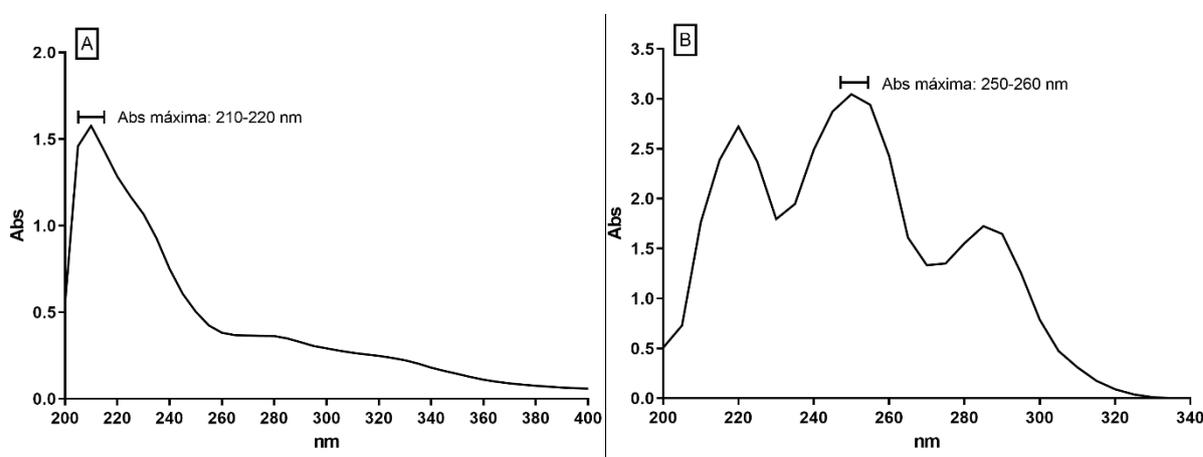
Tempo (min)	% de Liberação (média ± dp)				
	Filme Q-AOM5%	Filme Q-AOM2,5%	Filme Q-AOM1%	Filme Q-BR	
t0	0	5,05 ± 0,48	4,91 ± 1,55	3,91 ± 0,25	0,48 ± 0,20
t1	20	45,16 ^a ± 1,29	50,21 ^a ± 4,34	28,41 ^a ± 4,22	0,81 ± 0,19
t2	40	53,47 ^a ± 2,18	53,47 ^a ± 3,69	32,24 ^a ± 1,23	0,74 ± 0,16
t3	60	55,09 ^{a,b} ± 3,10	56,34 ^a ± 2,50	34,37 ^a ± 5,58	0,85 ± 0,24
t4	90	60,30 ^{a,b} ± 1,88	58,66 ^a ± 3,57	37,67 ^a ± 2,75	0,75 ± 0,26
t5	120	65,00 ^{a,b} ± 1,18	60,04 ^a ± 1,49	36,38 ^a ± 2,77	0,96 ± 0,30
t6	180	67,68 ^{a,b} ± 1,45	62,39 ^a ± 2,01	38,47 ^a ± 3,74	1,02 ± 0,19
t7	240	68,63 ^{a,b} ± 0,64	66,74 ^{a,b} ± 2,18	39,60 ^a ± 3,37	1,51 ± 0,04
t8	300	67,14 ^{a,b} ± 2,43	68,81 ^{a,b} ± 2,55	39,81 ^a ± 2,49	1,59 ± 0,21
t9	360	67,05 ^{a,b} ± 2,22	67,94 ^{a,b} ± 3,65	39,33 ^a ± 1,83	1,88 ± 0,51
t10	420	66,49 ^{a,b} ± 2,38	67,45 ^{a,b} ± 3,19	34,74 ^a ± 5,19	3,28 ± 2,77
t11	480	67,15 ^{a,b} ± 2,16	66,78 ^{a,b} ± 2,47	39,38 ^a ± 0,11	1,55 ± 0,45

a – diferença estatística em relação a t0. b - diferença estatística em relação a t1. (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O espilantol e o ácido vanílico são compostos bioativos importantes presentes em AOM, e, assim, é esperado que estes sejam liberados a partir dos filmes. Com o objetivo de estimar a liberação destes compostos, foram elaborados gráficos de abs. das alíquotas nos comprimentos de onda de 220 nm, para o espilantol, e 255 nm para o ácido vanílico *versus* tempo de liberação, comprimentos de onda selecionados de acordo com os os picos de maior abs. observados no perfil de varredura disposto na Figura 29.

Figura 29: Espectrofotometria de varredura de espilantol e ácido vanílico.



Espectrofotometria de varredura de uma solução de espilantol (A) e ácido vanílico (B) em intervalo de 200-400 nm e seus respectivos picos de absorvância.

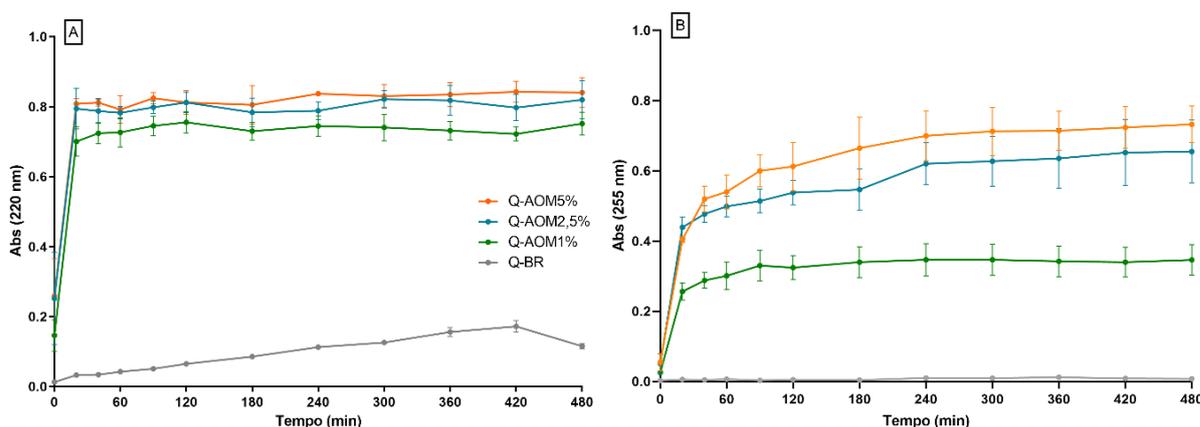
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As absorvâncias das alíquotas nos comprimentos de onda selecionados exibiram perfis semelhantes ao gráfico referente a porcentagem de liberação de constituintes do extrato nos filmes poliméricos. Portanto, nos primeiros 40 min houve um aumento significativo da absorvância com subsequente estabilidade até o término do experimento, tanto para o espilantol, quanto para o ácido vanílico ($p < 0,05$) (Figura 30).

De acordo com a literatura, o espilantol é o composto majoritário presente nos extratos de *Acmella oleracea*, ao qual é atribuída a maioria das atividades biológicas, inclusive suas características sensoriais de formigamento e anestesia (Uthpala; Navaratne, 2020; Savic *et al.*, 2021). Já o ácido vanílico, também identificado em

AOM, apresenta potencial efeito antioxidante e anti-inflamatório (Prachayasittikul *et al.*, 2009). Portanto, a liberação do espilantol e de compostos fenólicos a partir dos filmes de quitosana é de suma importância para a utilização da formulação no tratamento de feridas.

Figura 30: Perfil de liberação dos filmes nos comprimentos de onda característicos do espilantol e do ácido vanílico entre os tempos 0 e 480 min.



Perfil de absorvância das alíquotas coletadas nos comprimentos de onda de 220 nm, referente ao espilantol (A) e 255 nm, referente ao ácido vanílico (B) *versus* tempo de liberação a partir dos filmes poliméricos.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

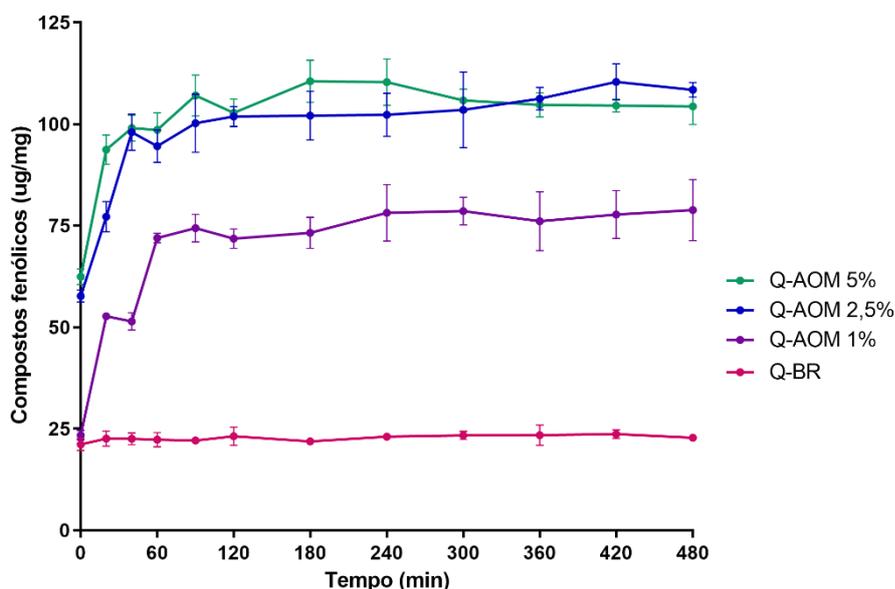
5.4.2.2 Teores de fenóis totais liberados no ensaio de perfil de liberação

As alíquotas obtidas em intervalos de tempos pré-determinados no ensaio de perfil de liberação foram utilizadas para estimar a liberação de compostos fenólicos a partir dos filmes, visto que esses compostos estão presentes em AOM e são importantes para o efeito antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano da formulação. Os resultados de teor de fenóis totais *versus* tempo estão expressos na Figura 31.

Os filmes Q-AOM5% e Q-AOM2,5% liberaram teores de fenóis superiores a Q-AOM1% no decorrer de todo o ensaio. Esse efeito se explica pois, além do filme Q-AOM1% possuir menor concentração de AOM, este apresentou liberação de aproximadamente 40% dos fitoconstituintes do extrato, contra cerca de 68% dos outros dois filmes. Também cabe destacar que houve uma liberação expressiva de

compostos fenólicos a partir dos filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5% e Q-AOM1% apenas na primeira hora de análise. Após este período, o teor de fenóis se manteve constante.

Figura 31: Teor de fenóis totais liberados a partir dos filmes poliméricos *versus* tempo no ensaio do perfil de liberação.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização morfológica da microestrutura dos filmes poliméricos Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR foi realizada com o objetivo de verificar a uniformidade de distribuição de partículas de extrato e quitosana na superfície do filme, assim como possíveis alterações provenientes da interação entre diferentes concentrações de extrato e a quitosana. As análises de varredura para captura de imagens da superfície dos filmes foram realizadas em aumentos de 1500x e 3500x e da secção transversal.

A microestrutura dos filmes poliméricos pode ser observada na Figura 32. O filme de quitosana sem o extrato Q-BR (Figura 32A) possui a superfície e borda lisas e uniformes, sem grumos aparentes. Tais imagens sugerem que a quitosana não se apresenta em sua forma cristalizada, mas sim em natureza amorfa (Yadav *et al.*, 2020). O filme com AOM a 1% (Q-AOM1%) também apresenta superfície uniforme e

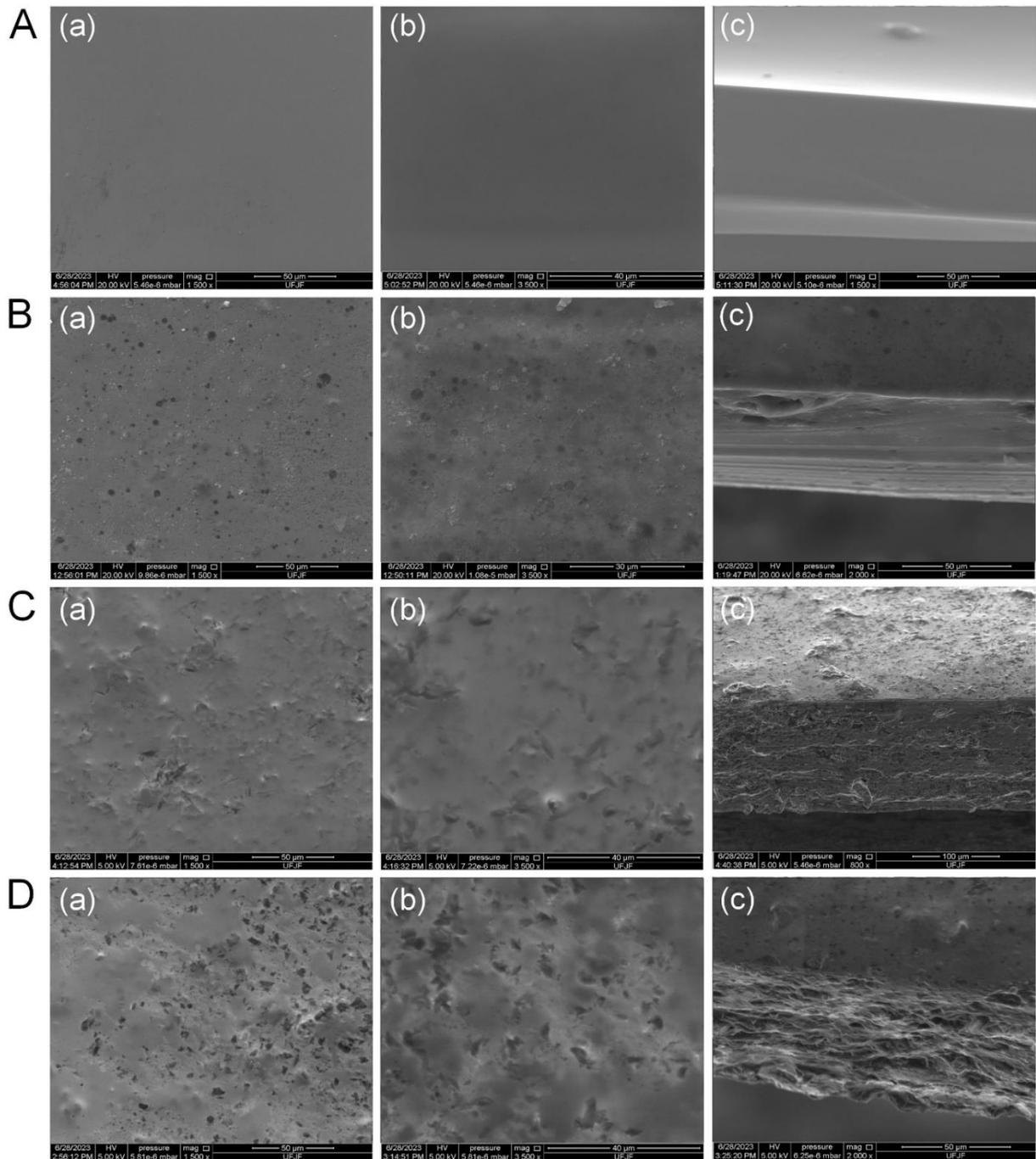
ausência de grupos aparentes, enquanto a imagem de secção transversal sugere uma estrutura bem compactada. Além disso, foi possível observar o aparecimento de manchas escuras circulares bem definidas e espaçadas, atribuídas à formação de microporos. Isso se deve provavelmente à adição do extrato, visto que tais manchas não foram vistas em Q-BR. Imagens similares também foram encontradas em filmes de quitosana e extrato de banana no trabalho de Zhang *et al.*, (2020).

A presença de microporos em filmes curativos é uma vantagem para o tratamento de feridas, visto que tal característica permite a troca gasosa e a passagem de oxigênio. O oxigênio está envolvido em vários processos relacionados à cura da lesão, como no combate a infecções, reepitelização, angiogênese e síntese de colágeno (Soubhagya *et al.*, 2020).

Diferente de Q-BR e Q-AOM1%, a adição de AOM em maiores concentrações (Q-AOM2,5% e Q-AOM5%) se manifesta com o aparecimento de aglomerados de formato irregular, cuja frequência é diretamente proporcional ao aumento da concentração de extrato no filme polimérico, como pode ser observado nas Figuras 32C e 32D. O aparecimento destes aglomerados pode estar relacionado à repulsão eletrostática entre as alquilamidas e a quitosana em solução, visto que ambas estão positivamente carregadas em meio ácido, como discutido anteriormente no item 5.4.1.1. Este efeito altera a aparência da microestrutura dos filmes, os quais ficam menos compactados e mais rugosos. Portanto, a presença de maiores concentrações de AOM em Q-AOM2,5% e Q-AOM5% e a exacerbação da repulsão eletrostática entre os componentes em solução pode estar interferindo no processo de formação da rede polimérica da quitosana. Tal fator ajudaria a explicar a liberação mais acentuada de fitoconstituintes do extrato a partir destes filmes, enquanto que para Q-AOM1%, a liberação se mostrou mais controlada e menos intensa.

Um estudo de Riaz *et al.*, (2020) avaliou a morfologia de filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações do extrato das raízes de *Allium tuberosum*. Os autores também observaram que a adição de concentrações progressivas de extrato à composição dos filmes resulta no aparecimento de agregados irregulares em sua superfície, alterando a estruturação da matriz polimérica.

Figura 32: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes poliméricos.



Imagens de MEV de A) filme Q-BR; B) filme Q-AOM1% C) filme Q-AOM2,5% D) filme Q-AOM5% nos aumentos de 1500x (a), 3500x (b) e seções transversais (c).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.4.2.4 *Peso médio, espessura e teor de umidade*

A medição de parâmetros como peso médio (PM) e espessura (ESP) é de grande relevância para avaliar a uniformidade de conteúdo dos filmes, visto que valores reduzidos de desvio padrão (DP) para peso médio e espessura sugerem distribuição uniforme do extrato na formulação. Neste sentido, os valores de DP podem ser considerados de baixos a médios, já que o coeficiente de variação (CV) de cada análise foi menor do que 20% (Araújo *et al.*, 2014). Tais resultados, em associação com a avaliação do perfil de liberação, sugerem boa uniformidade de conteúdo.

Além disso, os dados descritos na Tabela 8 demonstram diferença significativa entre os pesos médios e as espessuras dos filmes Q-AOM5% (PM: $71,08 \pm 6,81$; ESP: $0,21 \pm 0,02$) em comparação a Q-AOM2,5% (PM: $47,12 \pm 7,47$; ESP: $0,14 \pm 0,02$), Q-AOM1% (PM: $43,45 \pm 8,81$; ESP: $0,15 \pm 0,02$) e Q-BR (PM: $40,18 \pm 6,23$; ESP: $0,15 \pm 0,02$), os quais são estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$). Tais resultados evidenciam que a concentração de extrato nos filmes influencia diretamente nestes parâmetros, visto que o filme com maior concentração de extrato (Q-AOM5%) se apresentou com maior peso médio e espessura.

Ademais, de acordo com Morais *et al.*, (2013), curativos para o tratamento de feridas devem possuir espessura próxima à da epiderme humana (0,05 - 2 mm). Portanto, os filmes poliméricos desenvolvidos se encaixam nestes parâmetros, visto apresentaram valores próximos da espessura da pele.

A determinação da umidade dos filmes também é importante, uma vez que a manutenção de umidade adequada em uma lesão cutânea é essencial para evitar seu ressecamento e favorecer a adesão do filme sobre o local de aplicação (Zeng *et al.*, 2018; Gushiken *et al.*, 2021). De acordo com o exposto na Tabela 8, o teor de umidade dos filmes foi de $14,12 \pm 0,89$ (Q-AOM5%), $17,57 \pm 0,88$ (Q-AOM2,5%), $23,77\% \pm 3,56$ (Q-AOM1%) e $13,03\% \pm 1,99$ (Q-BR). Apenas o filme Q-AOM1% apresentou diferença significativa em relação ao filme Q-BR ($p < 0,05$). Não foi observada relação direta entre a concentração de extrato no filme e o aumento ou diminuição da umidade.

Tabela 8: Valores de peso médio, espessura e umidade dos filmes poliméricos.

	Q-AOM5%		Q-AOM2,5%		Q-AOM1%		Q-BR	
	Média ± DP	CV (%)	Média ± DP	CV (%)	Média ± DP	CV (%)	Média ± DP	CV (%)
Peso (mg)	71,08 ^{a,b,c} ± 6,81	9,58	47,12 ^b ± 7,47	15,85	43,45 ^c ± 8,81	20,28	40,18 ± 6,23	15,51
Espessura (mm)	0,21 ^{a,b,c} ± 0,02	9,52	0,14 ^b ± 0,02	14,29	0,15 ^c ± 0,02	13,33	0,15 ± 0,02	13,33
Umidade (%)	14,12 ^c ± 0,89	6,3	17,57 ^d ± 0,88	5,01	23,77 ^{a,c,d} ± 3,56	14,98	13,03 ± 1,99	15,27

a - diferença estatística em relação ao filme Q-BR. b – diferença estatística entre os filmes Q-AOM5% e Q-AOM2,5%. c – diferença estatística entre os filmes Q-AOM5% e Q-AOM1%. d – diferença estatística entre os filmes Q-AOM2,5% e Q-AOM1%. (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

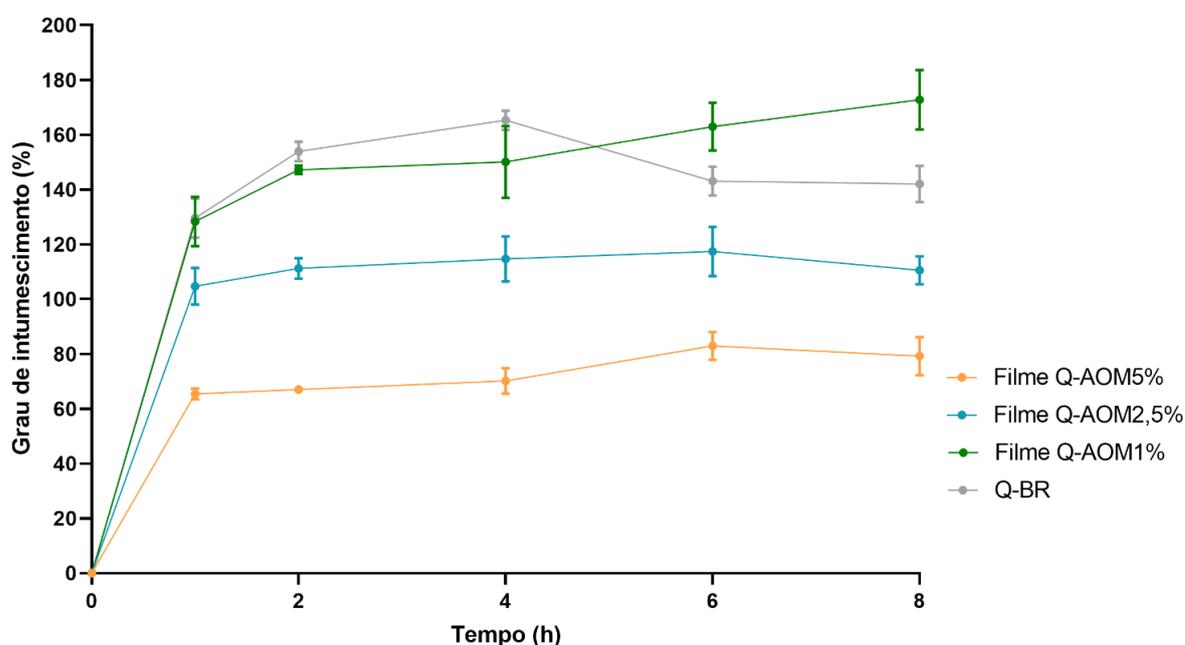
5.4.2.5 Grau de intumescimento

A capacidade de absorver líquidos é de grande importância para o desenvolvimento de filmes curativos, visto que essa propriedade é fundamental para absorção do excesso de exsudatos, diminuindo assim a possibilidade do desenvolvimento de infecções. Além disso, tal funcionalidade é importante para manter o filme aderido ao local de aplicação (Costa *et al.*, 2014). A porcentagem de intumescimento dos filmes está descrita na Figura 33. Ao final das 8h de experimento, observou-se maior absorção de líquidos na primeira hora de análise, seguida de estabilidade. Ao fim do experimento, todos os filmes se mantiveram íntegros, sem sinal de ruptura.

Todos os filmes apresentaram porcentagem de intumescimento significativamente diferentes entre si no final do ensaio, sendo maior para o filme Q-BR (142,02% ± 6,61) e menor para Q-AOM5% (79,2% ± 6,91), ou seja, quanto maior a concentração de extrato no filme, menor sua capacidade de intumescimento. Estes resultados estão de acordo com um trabalho de Wang *et al.*, (2019), onde o grau de intumescimento de filmes de quitosana foi significativamente reduzido após a adição do extrato de *Herba Lophatheri*.

Os resultados aqui discutidos se devem ao fato do grau de intumescimento de filmes compostos de quitosana se relacionar a presença de grupamentos amino na composição do polímero, os quais são capazes de formar ligações de hidrogênio com a água (Shah *et al.*, 2019). Já a redução da capacidade de intumescimento com a adição de extrato pode ser atribuída a possíveis interações químicas estabelecidas entre os fitoconstituintes do extrato e os grupamentos amino da quitosana, limitando a interação do polímero com a água por meio de pontes de hidrogênio (Wang *et al.*, 2019; Brás *et al.*, 2020).

Figura 33: Gráfico de dispersão do grau de intumescimento dos filmes poliméricos imersos em fluido de ferida simulado em um intervalo de tempo de 0 a 8h.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.4.2.6 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) e a termogravimetria derivada (DTG) são técnicas que permitem identificar a estabilidade térmica dos filmes elaborados por meio da observação de transformações resultantes de aquecimento, como desidratação, decomposição, fusão, entre outros. A TGA determina o perfil de perda de massa de um material em função do aumento da temperatura, enquanto a DTG

nada mais é do que a derivada da variação de massa em relação a temperatura, nos quais os degraus são substituídos por picos que delimitam as áreas proporcionais às alterações de massa sofridas (Meisel, 1984; Hădărugă *et al.*, 2019). Os resultados das análises estão expressos na Figura 34 e na Tabela 9.

A curva de DTG da quitosana em pó, evidenciou dois eventos térmicos importantes em aproximadamente 240°C e 450°C, os quais correspondem a decomposição do polímero. Nestas temperaturas ocorre a degradação do anel pirano e ruptura das ligações glicosídicas entre a glucosamina e N-acetilglucosamina (Pereira *et al.*, 2012). Tais resultados estão de acordo com maior perda de massa exibida nos gráficos de TGA entre 170 e 270 (≈ 10%) e entre 410 e 520°C (≈ 36%).

A curva de DTG de AOM apresentou pico inicial em 190 °C, o qual pode estar relacionado a volatilização de compostos aromáticos orgânicos, como o ácido vanílico (Santos *et al.*, 2020). O intervalo de 0 a 190°C correspondeu a pequena perda de massa do extrato (≈ 12%). Outros dois eventos de degradação térmica ocorrem entre 240 e 475°C e em um pico pronunciado em 700°C, compatíveis com maior perda de massa do extrato (240-475°C: ≈ 43%; 670-730°C: ≈ 22%). Não foram encontrados na literatura, trabalhos que correlacionem estes eventos térmicos à degradação de compostos específicos. Porém, dada a composição química de AOM discutida neste trabalho, estes pontos de perda de massa podem estar associados a degradação térmica das alquilamidas.

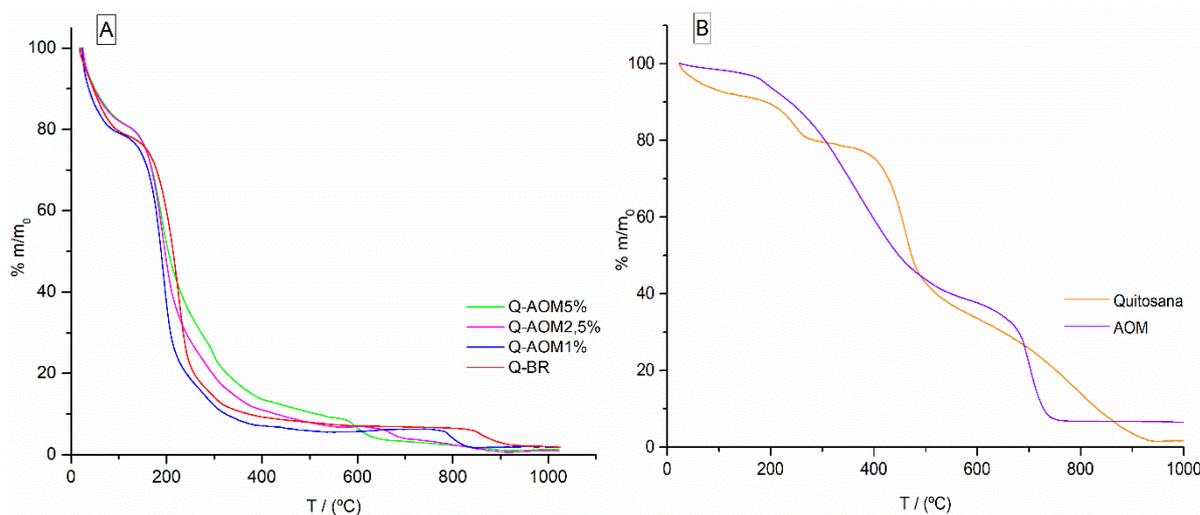
Os filmes poliméricos apresentaram os primeiros indícios de degradação térmica por volta de 50 a 100°C, os quais podem ser atribuídos a evaporação de solventes residuais e compostos voláteis de AOM. Assim como AOM e a quitosana em pó, filmes mantiveram-se estáveis neste intervalo de temperatura, com perda de massa de ≈ 8%.

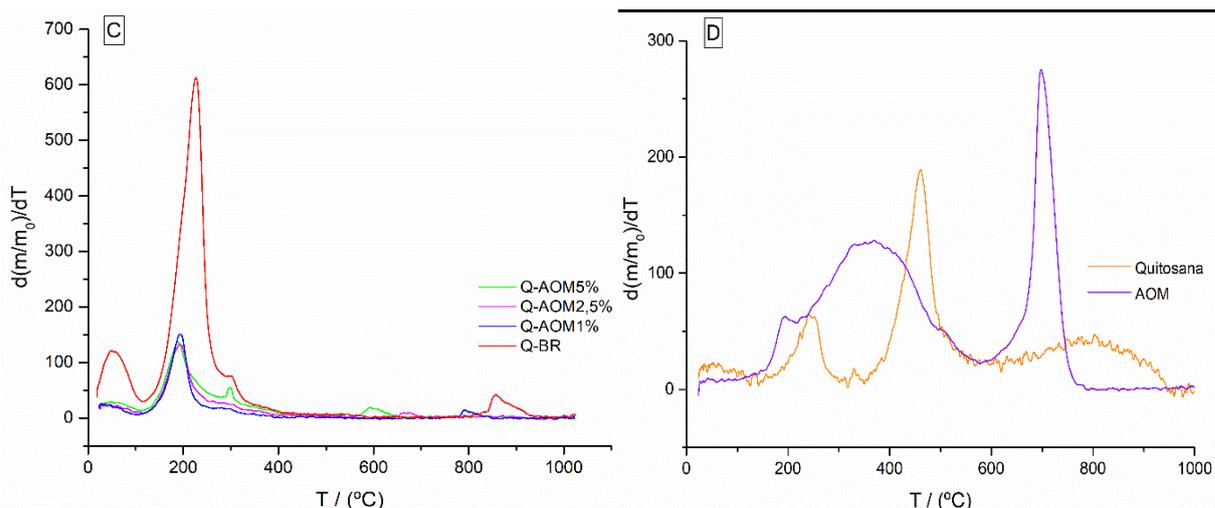
Picos bem pronunciados foram observados entre 190 e 220°C, referentes a degradação da matriz polimérica da quitosana. Estas alterações correspondem a intensa perda de massa exibida nos gráficos de TGA, visto que entre 140 e 280°C todos os filmes perderam em média 57% de sua massa inicial. Perfil de degradação comparável foi observado em um trabalho de Jiang *et al.*, (2021), onde os autores avaliaram a estabilidade térmica de filmes poliméricos de quitosana e glicerina incorporados com o extrato de *Akebia trifoliata*.

A adição de concentrações crescentes de extrato a composição dos filmes poliméricos não sugere alteração significativa das temperaturas de maior perda de massa das formulações em comparação com o filme Q-BR. Contudo, foi possível observar atenuação da intensidade dos picos entre intervalos de 50-100°C e no pico a 190°C. Ademais, observou-se uma redução da estabilidade térmica da formulação em comparação com AOM e a quitosana em pó, possivelmente devido ao estabelecimento de novas interações intermoleculares e aumento da umidade.

A análise térmica de uma formulação é de extrema relevância, pois fornece informações acerca dos pontos de degradação em função da temperatura. Espera-se que produtos comerciais não apresentem degradação térmica até os 40°C, pois isso reduz a necessidade de mantê-los sob refrigeração (Dabiri *et al.*, 2016; Spada *et al.*, 2014). Visto que os filmes elaborados não exibiram perda significativa de massa aos 40°C, supõe-se que estes se mantem estáveis em temperatura ambiente, podendo, portanto, ser utilizados para aplicação tópica.

Figura 34: Curvas de TGA e DTG dos filmes, da quitosana e do extrato puro.





Curvas de TGA (A) e de DTG (C) dos filmes poliméricos Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR. Curvas de TGA (B) e de DTG (D) da quitosana e do extrato puro (AOM).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 9: Intervalos de temperatura com maior degradação térmica (Td) e perda de massa (Δm) dos filmes poliméricos, de AOM e da quitosana.

	$\Delta 1$		$\Delta 2$		$\Delta 3$		Resíduos
	Td ₁ (°C)	Δm_1	Td ₂ (°C)	Δm_2	Td ₃ (°C)	Δm_3	
Qitosana	170 -270	10%	410 - 520	36%	580 - 880	30%	2,5%
AOM	0-190	12%	240-475	43%	670-730	22%	3,4%
Q-AOM5%	50-100	8%	140-280	50%	-	-	1,29%
Q-AOM2,5%	50-100	9%	140-280	56%	-	-	0,94%
Q-AOM1%	50-100	6%	140-280	61%	-	-	1,82%
Q-BR	50-100	10%	140-280	61%	-	-	1,89%

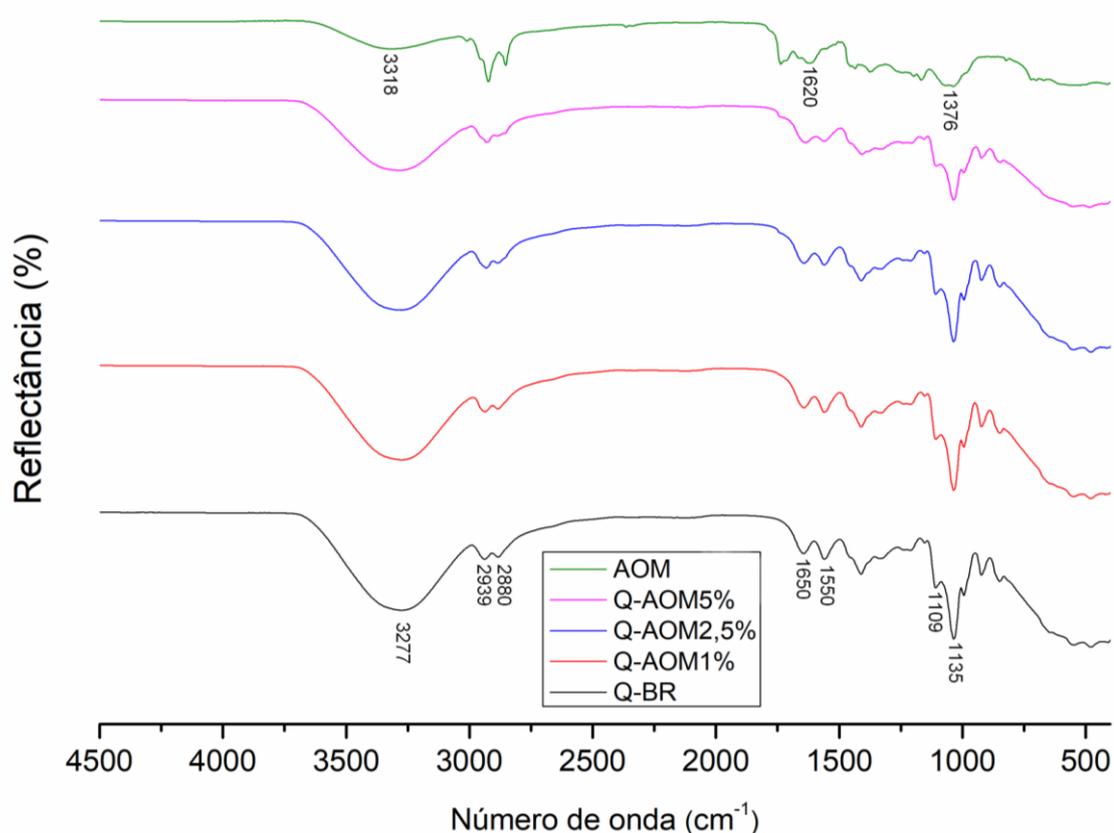
$\Delta 1$, $\Delta 2$ e $\Delta 3$ indicam o primeiro, segundo e terceiro maior estágio de perda de massa dos materiais durante o aquecimento.

5.4.2.7 Espectroscopia eletrônica vibracional na região do infravermelho (FTIR)

A caracterização dos filmes poliméricos por meio da técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) tem como objetivo determinar e identificar grupos funcionais presentes na composição química da formulação, visto que cada grupo absorve energia a uma determinada frequência na região do infravermelho. Além disso, objetiva-se verificar a presença de interações intermoleculares entre os componentes presentes em AOM e a quitosana, uma vez que estas interações se manifestam por deslocamento e/ou intensidade de bandas alteradas.

No filme Q-BR, foi possível identificar as faixas de absorção características da quitosana, incluindo a região entre 3600 e 3000 cm^{-1} , que corresponde às vibrações de grupamentos hidroxila livres sobrepostas por ligações N-H na estrutura principal da quitosana (Figura 35) (Ma *et al.*, 2019). Já os picos em 2939 e 2880 cm^{-1} são característicos de vibrações de estiramento de ligações C-H (Montes-ramírez *et al.*, 2023). Além disso, outras bandas típicas, conforme relatado na literatura, foram detectadas, tais como os picos em 1650 cm^{-1} (amida I, estiramento de C=O), 1550 cm^{-1} (amida II, vibração da ligação N-H), 1109 cm^{-1} (amida III, estiramento de C-N) e 1035 cm^{-1} (estiramento de C-O) (Brás *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2019).

Figura 35: Espectros de infravermelho de AOM e dos filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

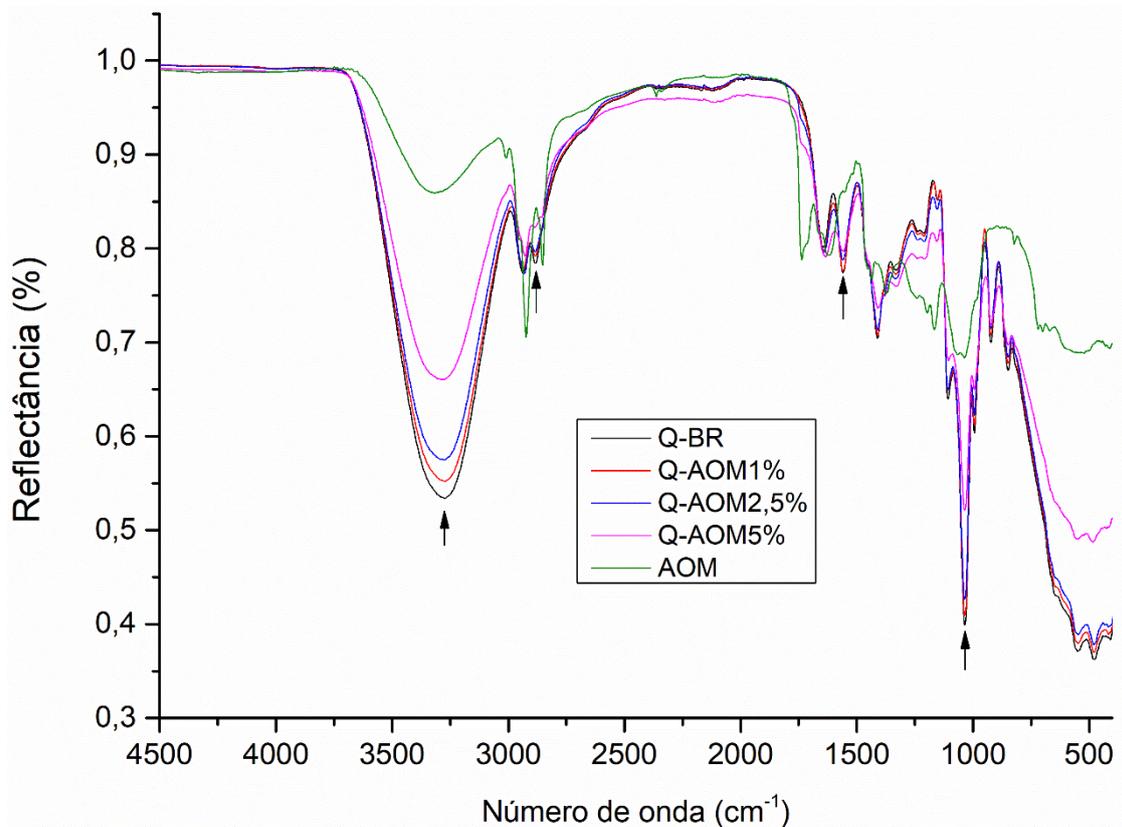
No espectro do extrato das folhas de jambu, são identificadas bandas típicas da presença de compostos nitrogenados, como as alquilamidas. Bandas nas regiões

entre 3500 e 3100 cm^{-1} são características de vibrações de estiramento de grupamentos N-H, as quais neste trabalho, podem estar sobrepostas por vibrações de grupamentos hidroxila livres, dada a presença de compostos fenólicos no extrato. A possibilidade da presença de grupamentos nitrogenados é confirmada pela banda em 1620 cm^{-1} , correspondente a ligações C=O, e pela banda em 1376 cm^{-1} , correspondente a ligações C-N. Ambos estão relacionados a presença de grupamentos amida. Bandas semelhantes foram encontradas em espectros do espilantol e do extrato aquoso de *A. oleracea*, descritos nos trabalhos de Silva *et al.*, (2023) e Begum *et al.*, (2021).

Ao comparar os espectros do filme Q-BR e dos filmes com AOM (Q-AOM5%, Q-AOM2,5% e Q-AOM1), foi possível observar que a vibração de estiramento dos grupamentos hidroxilas livres e das ligações N-H da quitosana são mais intensas no filme Q-BR, quando comparados com os filmes incorporados com extrato (Figura 36). Tais alterações podem ser causadas pela interação entre a matriz da quitosana e compostos presentes no extrato. Este perfil de interação também foi observado em um filme de quitosana e extrato de cúrcuma elaborado por Rachtanapun *et al.*, (2021).

Outras bandas também foram atenuadas com a incorporação de extrato ao filme, como ocorreu na banda em 2880 cm^{-1} , correspondente a vibrações de C-H, em 1550 cm^{-1} , estiramento C-N da amida II, e em 1030, estiramento C-O. Assim como o discutido no parágrafo anterior, mudanças na intensidade de bandas, assim como o deslocamento destas, são manifestações de algum tipo de interação intermolecular entre os grupos funcionais dos fitoconstituintes do Jambu e os grupos funcionais da quitosana.

Figura 36: Espectros de infravermelho sobrepostos de AOM e dos filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5%, Q-AOM1% e Q-BR.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

5.4.2.8 Análise dinâmico mecânica nos modos axial e rotacional

A avaliação da resistência e flexibilidade de materiais de uso tópico é fundamental para determinação de seu desempenho, visto que estes devem ser capazes de suportar cargas mecânicas desde sua fabricação, até seu transporte e manuseio. Além disso, para que um filme polimérico seja utilizado como um curativo, é desejável que este apresente boa deformidade e resistência para se adaptar a diferentes partes do corpo sem que se rompa com facilidade (Santos *et al.*, 2019). A análise dinâmico mecânica também é importante para avaliar a influência dos constituintes da formulação em sua resistência e integridade.

A Figura 37 exibem as propriedades mecânicas dos filmes em termos de sua resistência à ruptura, tanto na direção axial, quanto rotacional em função da força

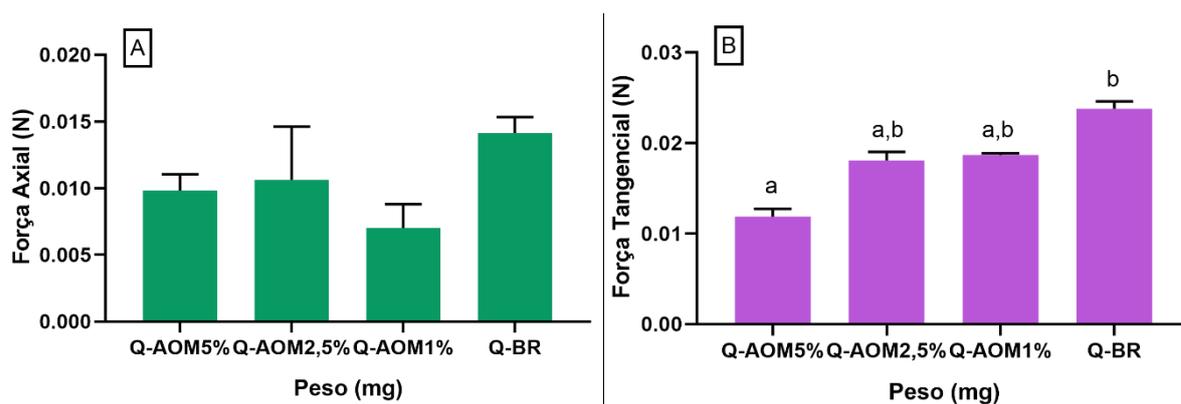
aplicada. Nos ensaios de ruptura axial, os filmes se rompem por estiramento, já nos ensaios rotacionais, esta ruptura se dá por rasgo.

A análise de ruptura axial dos filmes evidencia que a resistência física e elasticidade foi estatisticamente reduzida apenas no filme Q-AOM1%, em relação ao filme branco Q-BR. Esta diminuição da resistência pode ser atribuída ao aparecimento de microporos na superfície dos filmes de Q-AOM1%, observados nas imagens de MEV, facilitando a ruptura. Porém, no ensaio de ruptura rotacional, os filmes se tornaram mais frágeis com a adição de AOM na formulação, visto que Q-AOM5%, Q-AOM2,5% e Q-AOM1% tiveram sua resistência estatisticamente reduzida em relação a Q-BR. Esta maior fragilidade dos filmes a ruptura foi proporcional à concentração do extrato.

Como discutido na análise reológica dos fluidos precursores e nas imagens de MEV, a adição de quantidades crescentes de extrato aos filmes atrapalha a estruturação das cadeias poliméricas da quitosana e resulta na formação de agregados na superfície dos filmes. Esta desorganização acaba proporcionando maior fragilidade dos filmes poliméricos quando expostos à tração.

Os trabalhos de Moradi *et al.*, (2011) e de Altiok *et al.*, (2010) encontraram resultados semelhantes, visto que a incorporação de extrato em filmes de quitosana não apenas alterou as propriedades mecânicas dos filmes, como diminuiu sua resistência. Os autores relacionaram este efeito ao aparecimento de poros nos filmes em decorrência da adição de extrato, o que acaba gerando possíveis pontos de ruptura. Porém, a adição de aditivos além daqueles necessários para a formação da matriz polimérica, também pode acabar reduzindo sua resistência física (Altiok *et al.*, 2010). No caso dos filmes desenvolvidos neste trabalho, a possível repulsão eletrostática estabelecida entre a quitosana e as alquilamidas pode ter contribuído para maior fragilidade do material. Ademais, o aparecimento de poros na superfície dos filmes, como ocorreu em Q-AOM1%, também pode ter contribuído para a diminuição de sua resistência mecânica.

Figura 37: Análise reológica de ruptura axial e rotacional dos filmes poliméricos.



a - diferença estatística em relação a Q-BR. b - diferença estatística em relação a Q-AOM5%. (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

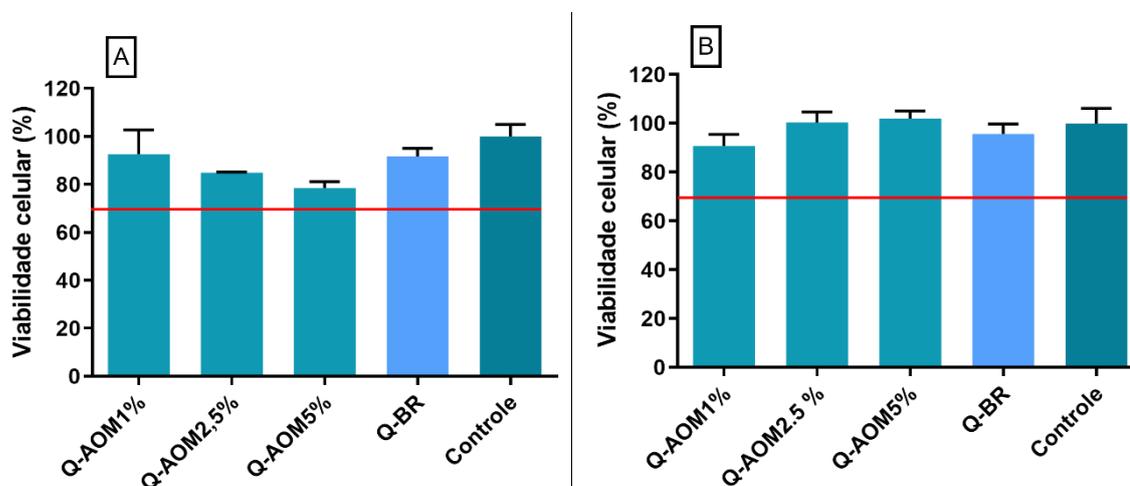
5.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FILMES

5.5.1 Análise da citotoxicidade

A citotoxicidade dos filmes poliméricos foi avaliada em culturas de macrófagos peritoneais murinos e linhagem de fibroblastos L929 por meio do teste de redução do MTT. Para isso, foram utilizados filmes nas dimensões de 2x2 mm, os quais corresponderam a concentrações de AOM próximas às testadas para os extratos puros (Q-AOM5%: 0,396 mg de AOM; Q-AOM2,5%: 0,189 mg de AOM; Q-AOM1%: 0,075 mg de AOM).

A viabilidade celular foi satisfatória para todos os filmes testados, já que mantiveram ao mínimo 70% de células viáveis quando comparados ao controle negativo (DMSO) ($p < 0,05$). Tais resultados estão de acordo com o ensaio de viabilidade celular realizado com AOM, além de demonstrarem a baixa citotoxicidade da quitosana, já descrita em literatura (Bano *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Visha; Karunagaran, 2019). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular (Figura 38).

Figura 38: Viabilidade celular de fibroblastos L929 e macrófagos peritoneais murinos após tratamento com os filmes poliméricos de quitosana e AOM.



Cultura de fibroblastos L929 (A) e cultura de macrófagos peritoneais (B) tratadas com os filmes poliméricos de quitosana. As células foram incubadas por 48h e a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT. AOM: extrato metanólico das folhas de *Acmella oleracea*. Controle: Células tratadas com DMSO (veículo). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.5.2 Avaliação da atividade antioxidante

Para os seguintes ensaios, as dimensões dos filmes foram determinadas para que a solução estoque obtivesse concentração teórica de 1 mg/mL de extrato para Q-AOM5%, 0,5 mg/mL, para Q-AOM2,5% e 0,2 mg/mL, para Q-AOM1% (Tabela 10).

Tabela 10: Dimensões dos filmes poliméricos utilizados nos ensaios antioxidantes e correspondentes concentrações de extrato.

Filme	Dimensão (cm)	Volume (cm ³)	Quantidade de extrato (mg)	Concentração de extrato sol. estoque (mg/mL)
Q-AOM5%	0,4 x 0,4	0,00336	1,58	1,05
Q-AOM2,5%	0,4 x 0,4	0,00224	0,75	0,5
Q-AOM1%	0,4 x 0,4	0,00240	0,30	0,2
Q-BR	0,4 x 0,4	0,00240	-	-

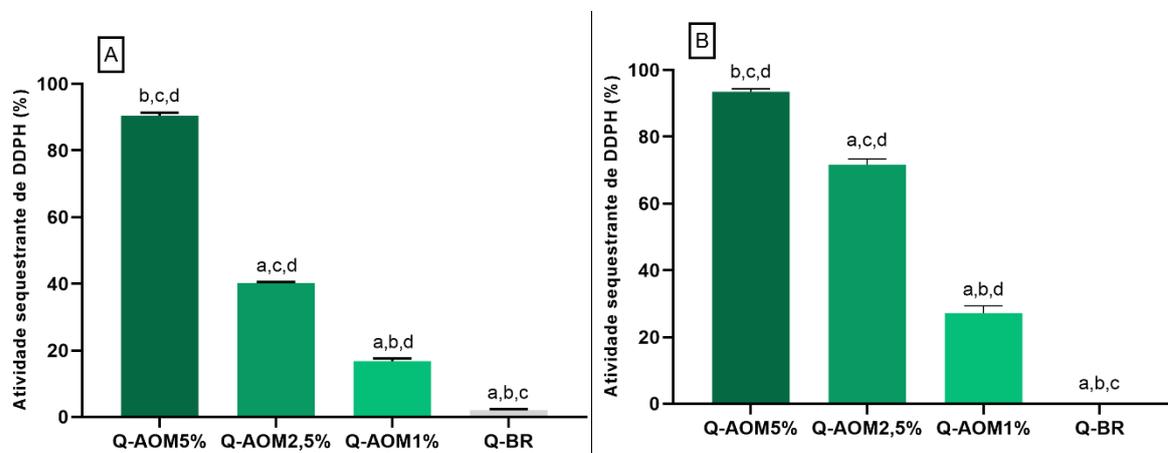
Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Foram realizados dois tipos de preparo das amostras para que os fitoconstituintes fossem liberados a partir da formulação. A liberação forçada por meio de centrifugação por 10 min objetivou acelerar o processo de liberação do extrato em solução, procedimento também realizado em um estudo de Chu *et al.*, (2019). Já a liberação estática de 24h a 34 °C buscou simular uma liberação mais lenta e gradual dos compostos, teoricamente mais semelhante ao que aconteceria com o filme ao ser aplicado na pele. Ambas as formas de preparo foram utilizadas nos ensaios de sequestro de radicais DPPH e de redução do complexo fosfomolibdênio. Os resultados da capacidade de sequestro de radicais DPPH para os filmes poliméricos em diferentes concentrações de extrato e nas duas formas de preparo da amostra estão expostos na Figura 39.

Assim como o extrato puro, os filmes apresentaram resultados dose-dependente, visto que o filme Q-AOM5%, com maior concentração de extrato, apresentou maior capacidade sequestrante (Figura 38A: 90,41%; Figura 39B: 93,51%), enquanto a capacidade sequestrante de Q-AOM2,5% (Figura 39A: 40,18%; Figura 39B: 71,62%) e Q-AOM1% (Figura 39A: 16,71%; Figura 39B: 27,19%) foi proporcionalmente menor. O filme branco sem o extrato não exibiu atividade antioxidante. Tais resultados sugerem que a formulação é capaz de liberar os fitoconstituintes bioativos em solução, o que corrobora o perfil de liberação exibido pelos filmes poliméricos. Conforme discutido anteriormente, as propriedades antioxidantes de AOM podem ser atribuídas a presença de compostos fenólicos, como o ácido vanílico identificado neste trabalho, cumarinas e triterpenoides (Abdul rahim *et al.*, 2021).

Ao comparar os dois métodos utilizados para o preparo da amostra, foi possível observar que a liberação de 24h foi mais eficiente ao promover maior liberação de fitoconstituintes antioxidantes, a partir dos filmes Q-AOM2,5% e Q-AOM1%, possivelmente pelo maior tempo de contato e temperatura controlada. Todavia, a atividade antioxidante de Q-AOM5% foi semelhante para ambos os métodos de preparo. Tal efeito pode estar relacionado a uma maior saturação do meio por conta da maior concentração de extrato ou até mesmo pela liberação máxima possível ter sido alcançada.

Figura 39: Atividade sequestrante de radicais DPPH dos filmes poliméricos com diferentes concentrações de AOM pelo método de liberação forçada e liberação estática por 24h.



Atividade sequestrante de radicais DPPH dos filmes após liberação forçada (A) e após liberação de 24h em estufa à 35°C (B). a – Diferença estatística em relação ao filme Q-AOM5%. b – Diferença estatística em relação ao filme Q-AOM2,5% c – Diferença estatística em relação ao filme Q-AOM1%. d – Diferença estatística em relação ao filme Q-BR. (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio também foi realizado para avaliar a capacidade antioxidante total dos filmes poliméricos. Os resultados estão descritos na tabela 11. A atividade antioxidante relativa dos filmes contendo AOM (AAR%) em relação a rutina e a quercetina foi proporcional a concentração de extrato nas formulações, para ambas as formas de preparo da amostra. Q-AOM5% exibiu melhor AAR% em relação a rutina (Lib. Forçada: AAR% $46,29 \pm 5,58$) e a quercetina (Lib. Forçada: AAR% $28,29 \pm 3,41$), resultados estatisticamente superiores ($p < 0,05$) a AAR% de Q-AOM2,5% (Lib. Forçada AAR% rutina e quercetina: $30,39 \pm 2,51$; e $18,57 \pm 1,54$, respectivamente). Os filmes Q-AOM1% (Lib. Forçada AAR% rutina e quercetina: $14,81 \pm 1,54$; e $9,67 \pm 1,73$, respectivamente) e Q-BR (Lib. Forçada AAR% rutina e quercetina: $11,89 \pm 0,56$; e $7,27 \pm 0,34$) apresentaram capacidade antioxidante estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$). Capacidade antioxidante total proporcional a concentração de AOM na formulação também foi observada nas amostras submetidas a liberação de 24h.

Ademais, como o esperado, a AAR% dos filmes foi mais próxima ao controle positivo rutina, assim como o observado para AOM. Entretanto, os filmes poliméricos

apresentaram AAR% inferiores ao extrato puro. Isso se deve possivelmente a liberação incompleta dos ativos a partir do filme polimérico em solução hidroalcoólica. Os métodos de preparo da amostra exibiram resultados antioxidantes estatisticamente semelhantes para todos os filmes, com exceção de Q-AOM5%, para o qual a liberação de 24h foi menos eficiente ($p < 0,05$).

Tabela 11: Avaliação da capacidade antioxidante dos filmes poliméricos por meio do ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio submetidos a liberação forçada e de 24h.

Filme	Liberação forçada		Liberação 24h	
	AAR% Rutina	AAR% Quercetina	AAR% Rutina	AAR% Quercetina
Q-AOM5%	46,29 ± 5,58 ^{a,b,d}	28,29 ± 3,41 ^{a,b,d}	35,04 ± 4,77 ^{a,b,d}	21,42 ± 2,91 ^{a,b,d}
Q-AOM2,5%	30,39 ± 2,51 ^{a,c,d}	18,57 ± 1,54 ^{a,c,d}	25,51 ± 4,04 ^{a,c,d}	15,59 ± 2,47 ^{a,c,d}
Q-AOM1%	14,81 ± 1,54 ^{b,c}	9,67 ± 1,73 ^{b,c}	13,47 ± 1,82 ^{b,c}	7,92 ± 1,18 ^{b,c}
Q-BR	11,89 ± 0,56	7,27 ± 0,34	9,29 ± 0,39	5,93 ± 0,61

a - diferença estatística entre o filme Q-AOM5% e Q-AOM2,5%. b - diferença estatística entre o filme Q-AOM5% e Q-AOM1%. c - diferença estatística entre o filme Q-AOM2,5% e Q-AOM1%. d - Diferença estatística dos filmes de AOM em relação ao filme Q-BR. (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Um estudo de Wang *et al.*, (2015) avaliou a atividade sequestrante de radicais DPPH de um filme de quitosana incorporado com extrato dos frutos de *Lycium barbarum*. Assim como no presente trabalho, foi observada atividade antioxidante crescente e proporcional a concentração de extrato, o que corrobora os resultados apresentados pelos ensaios antioxidantes, pelo teste de liberação e pelo doseamento de fenóis totais da formulação, os quais indicam que os filmes são capazes de liberar os fitoconstituintes. De maneira semelhante, os autores encontraram baixa atividade antioxidante para os filmes de quitosana sem o extrato. Tais achados, assim como os

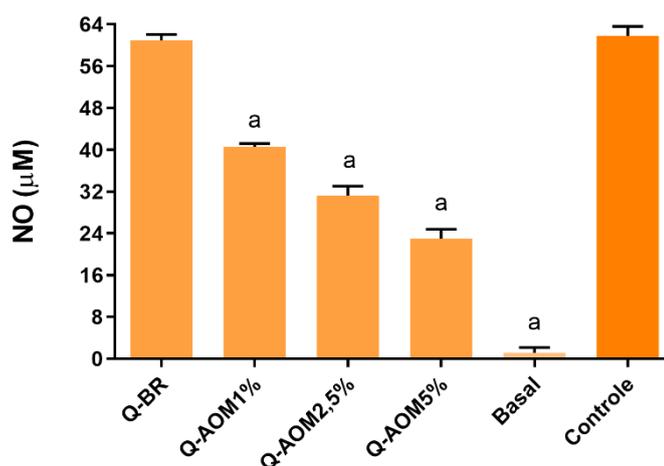
apresentados aqui, confirmam o aumento da capacidade antioxidante dos filmes de quitosana ao serem incorporados com extratos vegetais. Resultados parecidos também foram encontrados em um estudo de Kadam *et al.*, (2021), onde os autores avaliaram a atividade antioxidante de filmes de quitosana incorporados com o extrato hidrometanólico das partes aéreas de *Cedrus deodara*.

5.5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Para realização dos ensaios de avaliação da atividade anti-inflamatória em cultura celular, foram utilizados filmes de 2x2 mm, mesmas dimensões e concentrações empregadas no ensaio de viabilidade celular.

A produção de NO, IL-6 e IL-12 por macrófagos murinos intraperitoneais estimulados com LPS e IFN- γ tratados com os filmes poliméricos está disposta nas Figura 40 e 41. Foi possível observar que os grupos de células tratados com todos os filmes, com exceção de Q-BR, tiveram os níveis de NO reduzidos de forma significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle-estímulo (Q-AOM1%: 34,33%; Q-AOM2,5%: 49,45%; Q-AOM5%: 62,87%). O filme Q-BR sem extrato não produziu atividade anti-inflamatória neste ensaio.

Figura 40: Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais murinos após o tratamento com os filmes poliméricos.



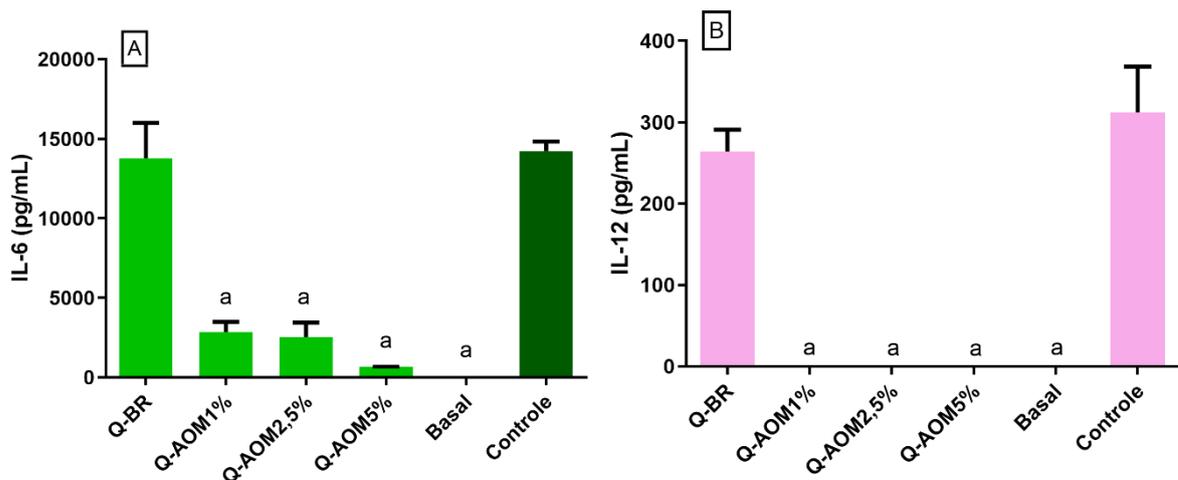
Basal: NO produzido por células que não receberam tratamento e estímulo. Controle: NO produzido por células tratadas com DMSO (veículo) e estimuladas com LPS e IFN- γ . As letras indicam diferença

estatisticamente significativa em relação ao controle (a). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Assim como para o doseamento de NO, o tratamento das células com os filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5% e Q-AOM1% foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a produção das citocinas IL-6 e IL-12 em relação ao controle (Figura 41). Para IL-6, esta redução foi de 79,99%, para Q-AOM1%, 82,28% para Q-AOM2,5% e de 95,41% para Q-AOM5%. Já os níveis de IL-12 produzidos foram indetectáveis nos sobrenadantes das culturas dos macrófagos tratados com os filmes com AOM, não diferindo estatisticamente dos níveis basais ($p < 0,05$). O filme Q-BR não foi capaz de reduzir de maneira significativa a produção das citocinas IL-6 e IL-12.

Figura 41: Dosagem de IL-6 e IL-12 em macrófagos peritoneais murinos tratados com os filmes poliméricos.



Níveis de IL-6 (A) e IL-12 (B) produzidos por macrófagos peritoneais tratados com os filmes. Basal: células sem estímulo e sem tratamento. Controle: células estimuladas com LPS que não receberam tratamento. As letras indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (a). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os resultados aqui exibidos são considerados promissores, visto que demonstram que a liberação de fitoconstituintes a partir dos filmes poliméricos foi suficiente e capaz de exercer o efeito anti-inflamatório *in vitro*, atividade já discutida para AOM.

Quando o fenótipo pró-inflamatório de macrófagos se prolonga no processo de cicatrização, a lesão cutânea pode acabar dando origem a um quadro crônico. Este longo estado pró-inflamatório resulta na produção excessiva de NO e de citocinas como IL-12 e IL-6, prejudicando a resolução da ferida (Ellis *et al.*, 2018). A IL-12 promove a diferenciação de linfócitos T naive em linfócitos efetores, os quais estimulam a produção de IFN- γ e o recrutamento de células pró-inflamatórias para a lesão (Larouche *et al.*, 2018). Portanto, como abordado em tópicos anteriores, a modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias é fundamental para conferir um processo de cicatrização adequado.

Diante disso, Brás *et al.*, (2020) desenvolveram um filme curativo com o extrato etanólico das folhas de *Cynara cardunculos* e buscaram avaliar suas propriedades anti-inflamatórias por meio da dosagem da produção celular de IL-6 *in vitro* após tratamento com a formulação. Assim como no presente trabalho, os autores verificaram um aumento significativo da capacidade anti-inflamatória, pela redução de IL-6, dos filmes de quitosana ao serem incorporados com o extrato. Não foram encontrados trabalhos que abordem a atividade anti-inflamatória de filmes de quitosana e extratos vegetais sobre a redução da produção celular de IL-12.

Apesar de relatado na literatura, não foi observado nos ensaios aqui desenvolvidos, efeito anti-inflamatório do filme de quitosana sem AOM (Q-BR). O efeito anti-inflamatório da quitosana parece estar relacionado ao seu peso molecular. Um estudo de Chang *et al.*, (2016) verificou que variedades de quitosana com mais alto peso molecular (300, 156, 72 kDa) inibem de maneira mais eficaz a produção de NO e TNF- α por macrófagos estimulados com LPS, enquanto aquelas de mais baixo peso molecular (7.1, 3.3 kDa), de maneira oposta, a aumentam. Estes resultados estão de acordo com o encontrado no presente trabalho, visto que a quitosana utilizada para elaboração dos filmes poliméricos é de baixo peso molecular.

5.5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos filmes foi avaliada por meio da exposição direta de microrganismos causadores de infecções cutâneas aos discos dos filmes

poliméricos com 5 mm de diâmetro. Cada disco apresentou a concentração teórica de extrato disposta na Tabela 12.

Tabela 12: Dimensões dos filmes poliméricos utilizados nos ensaios antimicrobianos e correspondentes concentrações de extrato.

Filme	Diâmetro (cm)	Volume (cm ³)	Quantidade de extrato (mg)
Q-AOM5%	0,5	0,0041	1,93
Q-AOM2,5%	0,5	0,0027	0,91
Q-AOM1%	0,5	0,0029	0,37
Q-BR	0,5	0,0029	-

Fonte: Elaborado pela autora (2013).

O efeito dos filmes poliméricos sobre o crescimento microbiano em solução foi avaliado sobre os microrganismos descritos no item 4.6.4.1. Para este fim, os discos foram cortados e adicionados em placas de 96 poços com meio de cultura e inóculo. A presença ou não de atividade inibitória foi verificada após 24h de incubação. Observada a inibição, uma alíquota de cada poço onde não houve crescimento microbiano foi adicionada em uma placa de ágar sólido para avaliação de efeito bactericida/fungicida ou bacteriostático/fungistático. Os resultados estão dispostos na Tabela 13.

Observou-se atividade inibitória bactericida sobre *S. epidermidis* por todos os filmes avaliados, inclusive o filme Q-BR. Mesmo efeito foi visto para *P. aeruginosa*, com exceção do filme Q-BR. Os filmes Q-AOM5% e Q-AOM2,5% também exerceram atividade bacteriostática sobre *S. aureus*. Diferente do extrato puro, os filmes não exibiram atividade inibitória sobre *E. coli*. Com relação a atividade antifúngica, os filmes apresentaram atividade fungicida para ambas as linhagens de *C. albicans* avaliadas, porém, o filme Q-BR não foi eficaz em inibir o crescimento da linhagem resistente aos antifúngicos convencionais.

Os resultados descritos anteriormente corroboram os relatos de atividade antimicrobiana da quitosana pura, visto que o filme Q-BR inibiu o crescimento de *S. epidermidis* e *C. albicans*. Ademais, a incorporação de AOM ao filme foi capaz de

atuar sinergicamente na inibição destes microrganismos, confirmando a atividade antimicrobiana de AOM, já discutida neste trabalho.

A atividade antimicrobiana da quitosana ocorre devido à interação entre grupos aniônicos presentes na superfície da parede celular microbiana e os grupos catiônicos $-NH_3^+$ da cadeia polimérica da quitosana, impedindo o transporte de nutrientes (Bano *et al.*, 2017). Outra possibilidade é que a quitosana invada o núcleo celular, inibindo a síntese de RNA mensageiro e, conseqüentemente, a produção de proteínas (Moeini *et al.*, 2020). O mecanismo de ação exercido é diretamente relacionado ao peso molecular (PM) da quitosana, visto que as de menor PM, como a utilizada neste trabalho, atravessam mais facilmente a membrana celular (Hosseinnejad; Seid, 2016).

A atividade descrita anteriormente também é dependente de outros fatores como pH, grau de desacetilação e microrganismo. Quanto maior a desacetilação, maior a porcentagem de grupamentos amino livres disponíveis para serem protonados em pH ácido $< 6,5$, fatores essenciais para a atividade antimicrobiana da quitosana (El-hack *et al.*, 2020). Apesar de ter exibido atividade antimicrobiana frente a *C. albicans* e *S. epidermidis*, há relatos na literatura de inibição do crescimento de outros microrganismos como *S. aureus* e *E. coli*, não observados neste estudo, o que pode estar relacionado a baixa difusão da quitosana pelo meio (Yuan *et al.*, 2016).

Tabela 13: Efeito dos filmes poliméricos no crescimento de bactérias e fungos causadores de infecções cutâneas.

Microrganismos	Efeito no crescimento microbiano			
	Q-AOM5%	Q-AOM2,5%	Q-AOM1%	Q-BR
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 10536™)	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC® 0016™)	Bactericida	Bactericida	Bactericida	Bactericida
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 33591™)	Bacteriostático	Bacteriostático	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactericida	Bactericida	Bactericida	-

(INCAS 2742)				
<i>Candida albicans</i> (ATCC® 24433™)	Fungicida	Fungicida	Fungicida	Fungicida
<i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231™)	Fungicida	Fungicida	Fungicida	-

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

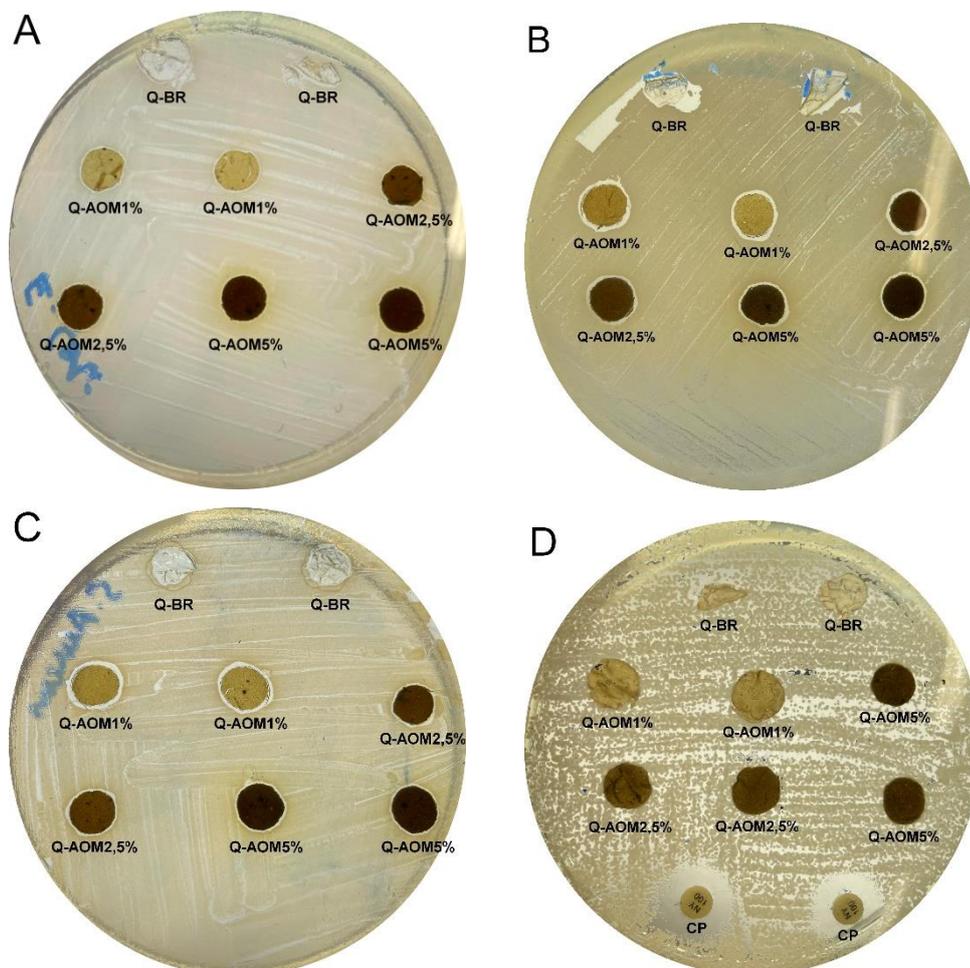
Com o intuito de avaliar a capacidade de difusão dos filmes e de inibir o crescimento microbiano em meio sólido, foi realizado o teste de disco-difusão utilizando-se as bactérias *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus* e a linhagem de *C. albicans* resistente aos antifúngicos convencionais. Como controles positivos, foram utilizados discos de ciprofloxacino, para bactérias, e de nistatina, para fungos. O ciprofloxacino é um antibacteriano de amplo espectro da classe das quinolonas prescrito para o tratamento de infecções cutâneas. Já a nistatina é um antifúngico poliênico cujo mecanismo de ação se dá pela ligação ao ergosterol, esteróide presente na membrana celular de fungos patogênicos como a *Candida* sp (Hauser, 2008).

Foi possível verificar halo de inibição discreto dos filmes Q-AOM5%, Q-AOM2,5% e Q-AOM1% apenas para *S. aureus* e *S. epidermidis* (Figura 42) e (Tabela 14). Os filmes não foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* e *C. albicans*. Ademais, os filmes Q-BR não inibiram o crescimento de nenhum dos microrganismos avaliados neste ensaio. Estes resultados podem estar associados a baixa difusão dos fitoconstituintes a partir do extrato em meio sólido, diferente do que foi observado no teste antimicrobiano em solução, descrito anteriormente. Ambos os antimicrobianos utilizados como controles positivos inibiram satisfatoriamente o crescimento dos microrganismos.

Resultados semelhantes foram observados em um estudo de Zheng *et al.*, (2018), onde os filmes elaborados com óleo essencial de *Litsea cubeba* não exibiram efeito antimicrobiano sobre *S. aureus* e *E. coli*, diferente do óleo puro. Os autores também atribuíram este efeito a baixa difusão dos fitoconstituintes pelo agar. A mesma dificuldade de difusão pelo ágar sólido foi discutida para a quitosana em um trabalho de Ruiz-Navajas *et al.*, (2013). Portanto, a ausência de atividade antibacteriana de Q-BR também pode ser atribuída ao fato da quitosana se difundir muito lentamente pelo

agar, então apenas os microrganismos em contato direto com o filme são inibidos (Yuan *et al.*, 2016).

Figura 42: Halos de inibição para as linhagens de *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.



Halos de inibição dos filmes poliméricos em *Escherichia coli* ATCC® 10536™ (A), *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 0016™ (B), *Staphylococcus aureus* ATCC® 33591™ (C) e *Candida albicans* ATCC® 10231™ (D).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 14: Valores de halo de inibição dos filmes poliméricos para as linhagens de *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

Microrganismos	Halo de inibição (mm)				Ciprofloxacino	Nistatina
	Q-AOM5%	Q-AOM2,5%	Q-AOM1%	Q-BR		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 10536™)	0	0	0	0	20	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC® 0016™)	6	6	6	0	18	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 33591™)	6	6	7	0	8	-
<i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231™)	0	0	0	0	-	12

Os microrganismos desenvolveram a capacidade de se organizar em estados coletivos muito bem-sucedidos, conhecidos como biofilmes. Os biofilmes consistem de uma comunidade bem estruturada envolvida por uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares composta, principalmente, por água e polissacarídeos solúveis, podendo conter também proteínas, fosfolípidios e DNA extracelular.

A formação de biofilmes é uma das maiores causas do desenvolvimento de feridas crônicas. De acordo com Clinton e Carter (2015), menos de 10% das feridas agudas contêm biofilme, enquanto mais de 60% das feridas crônicas, sim. Biofilmes exercem efeito protetor sobre os microrganismos, aumentando sua sobrevivência e diminuindo a efetividade dos antibióticos. Além disso, estes podem ser formados por um conjunto de diferentes espécies de microrganismos, o que potencializa sua virulência (Clinton; Carter, 2015). *P. aeruginosa* e *S. aureus* são duas bactérias comumente isoladas em biofilmes de feridas (Chin *et al.*, 2019), sendo, por isso, escolhidas para o presente ensaio.

A capacidade dos discos de filmes poliméricos em impedir a adesão do biofilme foi avaliada por meio da indução da formação do biofilme simultaneamente ao

tratamento com os biocurativos. A porcentagem de inibição da formação de biofilme de *S. aureus* foi estatisticamente semelhante ao controle positivo (ciprofloxacina) para todos os filmes avaliados (Q-AOM5%: 99,59%; Q-AOM2,5%: 83%; Q-AOM1%: 87,79%; Q-BR: 98%) ($p < 0,05$). De acordo com uma revisão de literatura de Khan *et al.*, (2019), os grupamentos positivamente carregados da quitosana são capazes de reagir eletrostaticamente com componentes do biofilme carregados negativamente como proteínas, DNA e substâncias poliméricas extracelulares, inibindo sua formação.

Já a atividade frente a adesão de biofilmes de *P. aeruginosa* se mostrou dose dependente, visto que o filme com maior concentração de extrato exibiu maior atividade antibiofilme (Q-AOM5%: 67%), enquanto o de menor concentração apresentou atividade reduzida e semelhante a Q-BR (Q-AOM1%: 20,29%; Q-BR: 19,40%) (Tabela 15).

Existem poucos estudos publicados acerca do potencial antibiofilme do Jambu. Um trabalho de Peretti *et al.*, (2021) avaliou a capacidade de um extrato hidroetanólico das folhas de *A. oleracea* de desintegrar biofilmes pré-formados de *S. mutans*. O extrato foi capaz de reduzir em 50% a viabilidade do biofilme, de maneira semelhante ao controle positivo.

A capacidade de evitar a adesão de biofilme na superfície de uma lesão é de extrema importância ao considerarmos que o desenvolvimento do biofilme está intimamente relacionado ao estabelecimento de feridas crônicas, de difícil cicatrização (Clinton; Carter, 2015). Tal fato associado a literatura escassa acerca do potencial antibiofilme do jambu, elicitam o ineditismo dos biocurativos desenvolvidos neste trabalho para o tratamento de lesões cutâneas.

Tabela 15: Porcentagem média de inibição \pm DP da formação de biofilme pelos filmes poliméricos frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

	Q-AOM5%	Q-AOM2,5%	Q-AOM1%	Q-BR	Ciprofloxacina
<i>Staphylococcus</i>					
<i>aureus</i> (ATCC® 33591™)	99,59 \pm 2,72	83,40 \pm 8,87	87,79 \pm 1,91	98,00 \pm 6,73	94,66

<i>Pseudomonas</i>					
<i>aeruginosa</i>	67,41 ±		20,29 ±	19,40 ±	
(INCAS 2742)	1,35 ^a	50,11 ± 8,90 ^a	2,21 ^a	1,73 ^a	91,81

a - diferença estatisticamente significativa em relação a Ciprofloxacina (CP). (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

6 CONCLUSÃO

Foram identificados 8 compostos no AOM, sendo 7 da classe das alquilamidas, entre elas o espilantol, e 1 composto fenólico, o ácido vanílico. O extrato não induziu efeitos tóxicos em fibroblastos L929 e macrófagos murinos. Ademais, AOM exerceu potencial anti-inflamatório, por meio da redução dos níveis de NO, citocinas pró-inflamatórias e CLs nos ensaios *in vitro*. AOM também apresentou atividade antioxidante promissora, visto que foi capaz de exibir atividade sequestrante de radicais livres *in vitro*, de diminuir a peroxidação lipídica e a produção intracelular de EROS em cultura. Ademais, observou-se atividade antimicrobiana relevante frente aos principais microrganismos isolados em lesões cutâneas infeccionadas, como *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Os filmes exibiram peso, espessura e superfície uniformes e boa capacidade de intumescimento, característica importante para a absorção de exsudatos. Ademais, a avaliação do perfil de liberação evidenciou que estes foram capazes de liberar fitoconstituintes de AOM de maneira satisfatória e controlada. Os filmes se apresentaram termicamente estáveis até 40°C e exibiram resistência a ruptura nas análises reológicas, favorecendo seu armazenamento e aplicação tópica. Além disso, no ensaio de FTIR, foi possível identificar o estabelecimento de interações intermoleculares entre o polímero e os fitoconstituintes de AOM.

Assim como o extrato, os filmes não induziram efeitos citotóxicos e exibiram atividade sequestrante de radicais livres *in vitro*, atividade anti-inflamatória por meio da redução da produção celular de NO, IL-6 e IL-12 em cultura e atividade antimicrobiana por meio da inibição do crescimento e adesão de biofilme das bactérias de interesse. Tais resultados podem estar relacionados ao efeito sinérgico da quitosana e de compostos bioativos presentes em AOM.

Logo, pode-se dizer que os biocurativos de quitosana e AOM apresentam-se como uma formulação inédita para o tratamento de feridas, com características físico-químicas promissoras e amplo potencial bioativo. Oferece, ainda, uma alternativa terapêutica biodegradável aos tratamentos convencionais. Contudo, sugere-se a realização de estudos adicionais para confirmação da atividade da formulação no

tratamento de feridas por meio de modelos *in vivo* e de ensaios de cicatrização, além de ensaios de permeação cutânea e de estabilidade físico-química.

Cabe ressaltar a importância deste trabalho para a valorização da biodiversidade brasileira pela possibilidade de exploração sustentável de insumos amazônicos, impactando positivamente o ambiente e a comunidade.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M.; ARSHAD, M.; RAFIQUE, M.K.; ALTALHI, A.A.; SALEH, D.I.; AYUB, M.A.; SHARIF, S.; RIAZ, M.; ALSHAWWA, S.Z.; MASOOD, N.; NAZIR, A. Chitosan-polyvinyl alcohol membranes with improved antibacterial properties contained Calotropis procera extract as a robust wound healing agent. **Arab J Chem**, v. 15, n. 5, p. 103766, 2022.
- ABBAS, M.; HUSSAIN, T.; ARSHAD, M.; ANSARI, A.R.; IRSHAD, A.; NISAR, J.; HUSSAIN, F.; MASOOD, N.; NAZIR, A.; IQBAL, M. Wound healing potential of curcumin cross-linked chitosan/polyvinyl alcohol. **Int J Biol Macromol**, v. 140, p. 871-876, 2019.
- ABDUL RAHIM, R.; JAYUSMAN, P.A.; MUHAMMAD, N.; MOHAMED, N.; LIM, V.; AHMAD, N.H.; MOHAMAD, S.; ABDUL HAMID, Z.A.; AHMAD, F.; MOKHTAR, N.; SHUID, A.N. Potential Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Spilanthes acmella and Its Health Beneficial Effects: A Review. **Int J Environ Res Public Health**, v. 18, n. 7, p. 3532, 2021.
- ABEYSINGHE, D. C.; WIJERATHNE, S. M. N. K.; DHARMADASA, R. M. Secondary metabolites contents and antioxidant capacities of Acmella oleraceae grown under different growing systems. **World J Agric Sci**, v. 2, n. 4, p. 163-167, 2014.
- ABEYSIRI, G. R. P. I.; DHARMADASA, R. M.; ABEYSINGHE, D. C.; SAMARASINGHE, K. Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of Acmella oleraceae Murr.(Asteraceae), a natural remedy for toothache. **Ind Crops Prod**, v. 50, p. 852-856, 2013.
- AFZAL, A.; SHAH, N.H.; HUSSAIN, I.; MUNAWAR, S.H.; MUMTAZ, A.; QURESHI, N. Preparation of Spilanthes acmella based emulgel: Antimicrobial study and evaluation. **Pak J Pharm Sci**, v. 35, 2022.
- ALCANTARA, B.N.; KOBAYASHI, Y.T.; BARROSO, K.F.; DA SILVA, I.D.R.; DE ALMEIDA, M.B.; BARBOSA, W.L.R. Pharmacognostic analyses and evaluation of the in vitro antimicrobial activity of Acmella oleracea (L.) RK Jansen (Jambu) floral extract and fractions. **J Med Plant Res**, v. 9, n. 4, p. 91-96, 2015.
- ALEIXANDRE, J.L.; BUICA, A.; NIEUWOUDT, H.; ALEIXANDRE, J.L.; DU TOIT, W. Spectrophotometric analysis of phenolic compounds in grapes and wines. **J Agric Food Chem**, v.65, n.20, pp.4009-4026, 2017.
- AL-GHARIBI, K. A.; SAJANA, S.; MARIA A. A. Cost-effectiveness of wound care: a concept analysis. **Sultan Qaboos Univ Med J**, v. 18, n. 4, 2018.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two origanum species. **J Agric FoodChem**, v. 49, p. 4168–4170, 2001.

ALTIOK, D.; ALTIOK, E.; TIHMINLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **J Mater Sci Mater Med**, v. 21, p. 2227- 2236, 2010.

ARAÚJO, C.A.; MORGADO, C.S.; GOMES, A.K.C.; GOMES, A.C.C.; SIMAS, N.K. Asteraceae family: A review of its allelopathic potential and the case of *Acmella oleracea* and *Sphagnetocola trilobata*. **Rodriguésia**, v. 72, 2021.

ARAÚJO, D.; SEBBENN, A.M.; ZANATTO, A.C.S.; ZANATA, M.; MORAIS, E.; MORAES, M.L.T.D.; FREITAS, M.L.M. Variação genética para caracteres silviculturais em progênies de polinização aberta de *Astronium graveolens* Jacq.(Anacardiaceae). **Cerne**, v. 20, p.61-68, 2014

BAE, S.S.; EHRMANN, B.M.; ETTAFAGH, K.A.; CECH, N.B., 2010. A validated liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. **Phytochem Anal**, v. 21, n. 5, p.438-443, 2010.

BAKONDI, E.; SINGH, S.B.; HAJNÁDY, Z.; NAGY-PÉNZES, M.; REGDON, Z.; KOVÁCS, K.; HEGEDŰS, C.; MADÁCSY, T.; MALÉTH, J.; HEGYI, P.; DEMÉNY, M.Á. Spilanthol inhibits inflammatory transcription factors and iNOS expression in macrophages and exerts anti-inflammatory effects in dermatitis and pancreatitis. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 17, p. 4308, 2019.

BANO, I.; ARSHAD, M.; YASIN, T.; GHOURI, M.A.; YOUNUS, M. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **Int J Biol Macromol**, v. 102, p. 380-383, 2017.

BARBOSA, A.F.; CARVALHO, M.G.D.; SMITH, R.E; SABAA-SRUR, A.U. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Rev Bras Farmacogn**, v. 26, n. 1, p. 128-133, 2016.

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

BEGUM, A. A. S.; VAHITH, R. M. A.; KOTRA, V.; SHAIK, M. R.; ABDELGAWAD, A.; AWWAD, E. M.; KHAN, M. *Spilanthes acmella* leaves extract for corrosion inhibition in acid medium. **Coatings**, v. 11, n. 1, p. 106, 2021.

BELLUMORI, M.; ZONFRILLO, B.; MAGGINI, V.; BOGANI, P.; GALLO, E.; FIRENZUOLI, F.; MULINACCI, N.; INNOCENTI, M. *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen: Alkylamides and phenolic compounds in aerial parts and roots of in vitro seedlings. **J Pharm Biomed Anal**, v. 220, p. 114991, 2022.

BERNATCHEZ, S.F.; MENON, V.; STOFFEL, J.; WALTERS, S.A.H.; LINDROOS, W.E.; CROSSLAND, M.C.; SHAWLER, L.G.; CROSSLAND, S.P.; BOYKIN Jr, J.V.

Nitric oxide levels in wound fluid may reflect the healing trajectory. **Wound Repair Regen**, v. 21, n. 3, p.410-417, 2013.

BERTOLO, M.R.; MARTINS, V.C.; HORN, M.M.; BRENELLI, L.B.; PLEPIS, A.M. 2020. Rheological and antioxidant properties of chitosan/gelatin-based materials functionalized by pomegranate peel extract. **Carbohydr Polym**, 228, p.115386.

BOONEN, J.; BRONSELAER, A.; NIELANDT, J.; VERYSER, L.; DE TRE, G.; SPIEGELEER, B. Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. **J Ethnopharmacol**, v. 142, n. 3, p. 563-590, 2012.

BORATE, P. P.; DISALE, S. D. Studies on antibacterial activity of *Acmella oleracea* (L.) Murr. **Int J Pharma Sci Heal Care**, v. 5, n. 3, p. 36-42, 2013.

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

BRÁS, T.; ROSA, D.; GONÇALVES, A.C.; GOMES, A.C.; ALVES, V.D.; CRESPO, J.G.; DUARTE, M.F.; NEVES, L.A. Development of bioactive films based on chitosan and *Cynara cardunculus* leaves extracts for wound dressings. **Int J Biol Macromol**, v. 163, p. 1707-1718, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares**. 2021, 38 p. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3364628/Guia+14_2018_vers%C3%A3o+2_+de+29+10+21.pdf/9cecbb40-217e-4b6e-bf2c-0237641edacb>. Acesso em 27 out. 2023

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Brasileira**. 2023. Disponível em: <<https://antigo.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira.html>>. Acesso em 31 out. 2023.

BRASIL, Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde - DATASUS. Produção Ambulatorial do SUS. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def/>> [Acessado em 10 nov. 2023].

BYRD, A.L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J.A. The human skin microbiome. **Nat Rev Microbiol**, v. 16, n. 3, p. 143-155, 2018.

CANCIAM, C.A. Efeito da temperatura na viscosidade de óleos vegetais refinados. Publicatio UEPG: **Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 16, n.1, p.7-12, 2010.

CAÑEDO-DORANTES, L.; CAÑEDO-AYALA, M. Skin acute wound healing: a comprehensive review. **Int J Inflamm**, v. 2019, 2019.

- 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. **Mater Sci Eng**, v.C 104, 109885, 2019.
- CHANG, S.H.; YI-YUNG, L.; GUAN-JAMES, W.; CHUNG-HSIUNG, H.; GUO J. T. Effect of chitosan molecular weight on anti-inflammatory activity in the RAW 264.7 macrophage model. **Int J Biol Macromol**, v. 131, p. 167-175, 2019.
- CHHABRA, R. P. Non-Newtonian fluids: an introduction. **Rheology of complex fluids**, p. 3-34, 2010.
- CHIN, J.S.; LEIGH, M.; SING, Y.C.; DAVID L.B. Drug therapies and delivery mechanisms to treat perturbed skin wound healing. **Adv Drug Deliv Rer**, v. 149, p. 2-18, 2019.
- CHU, Y., XU, T., GAO, C., LIU, X., ZHANG, N. I., FENG, X., LIU, X.; SHEN, X.; TANG, X. Evaluations of physicochemical and biological properties of pullulan-based films incorporated with cinnamon essential oil and Tween 80. **Int J Biol Macromol**, v. 122, p. 388-394, 2019.
- CLINTON, A.; CARTER, T. Chronic wound biofilms: pathogenesis and potential therapies. **Laboratory medicine**, v. 46, n. 4, p. 277-284, 2015.
- CORTEZ, D.N.; MORAES, J.T.; FERREIRA, I.R.; SILVA, E.L.; LANZA, F.M. Costs of treating skin lesions in Primary Health Care. **Braz J Enterostomal Ther**, v. 17, e. 2419, 2019.
- 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.
- DEHDASHTIAN, A.; STRINGER, T. P.; WARREN, A. J.; MU, E. W.; AMIRLAK, B.; & SHAHABI, L. Anatomy and Physiology of the Skin. **In Melanoma**, p. 15-26, 2018.
- DENADAI, Â.M.L., SANTORO, M.M.; LOPES, M.M; LOPES, T.P; CHENNA, A.; DE SOUSA, F.B.; GOMES, M.T.R.; GUZMÁN, F.P. A Supramolecular Complex between Proteinases and β -Cyclodextrin that Preserves Enzymatic Activity. **BioDrugs**, v. 20, n. 5, p. 283-291, 2006b.
- DERUITER, J. Amides and related functional groups. **Principles of Drug Action**, v. 1, p. 1-16, 2005.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUNNILL, C.; PATTON, T.; BRENNAN, J.; BARRETT, J.; DRYDEN, M.; COOKE, J.; LEAPER, D.; GEORGOPOULOS, N.T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **Int Wound J**, v. 14, n. 1, p.89-96, 2017.

DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res**, v. 112, p.4-29, 2016.

ELBADRAWY, E.; SELLO, A. Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts. **Arab J Chem**, v. 9, p. S1010-S1018, 2016.

EL-HACK, Q.E.A.; EL-SAADONY, M.T.; SHAFI, M.E.; ZABERMAWI, N.M.; ARIF, M.; BATIHA, G.E.; KHAFAGA, A.F.; EL-HAKIM, Y.M.A.; AL-SAGHEER A.A. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. **Int J Biol Macromol**, v. 164, pp. 2726-2744, 2020.

ELLIS, S.; LIN, E.J.; TARTAR, D. Immunology of wound healing. **Curr Dermatol Rep**, v. 7, p. 350-358, 2018.

ELUFIOYE, T.O.; HABTEMARIAM, S.; ADEJARE, A. Chemistry and pharmacology of alkylamides from natural origin. **Rev Bras Farmacogn**, v. 30, n. 5, pp. 622-640, 2020.

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. **Int J Biol Macromol**, v.16, p.472-481, 2018.

FABRI, R.L.; FREITAS, J.C.; LEMOS, A.S.; CAMPOS, L.M.; DINIZ, I.O.; PINTO, N.C.; SILVA, T.P.; PALAZZI, C.; MARCHESINI, P.; MONTEIRO, C.; BARBOSA, A.F. Spilanthol as a promising antifungal alkylamide for the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 59, n. 12, p. 1210-1224, 2021

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **J Biol Chem**, v. 73, p. 627, 1927.

FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. Herbal Medicine Market Size, Share & COVID-19 Impact Analysis 2022. Disponível em: <<https://www.fortunebusinessinsights.com/herbal-medicine-market-106320>> Acesso em 31 out. 2023

FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. Wound Care Market, 2023. Disponível em: <<https://www.fortunebusinessinsights.com/wound-care-market-103268>>. Acesso em 17 nov. 2023.

GILBERT B.; FAVORETO R. *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen (Asteraceae)–Jambu. **Rev Fitos**, v. 5, n. 1, p. 83-91, 2010.

GLOBE NEWS WIRE. Advanced Wound Care Market Size to Hit USD 34.45 Billion by 2030, 2022. Disponível em: <<https://www.globenewswire.com/en/news-release/2022/07/19/2481699/0/en/Advanced-Wound-Care-Market-Size-to-Hit-USD-34-45-Billion-by-2030.html>>. Acesso em 17 nov. 2023.

GUEVARA, I.; IWANEJKO, J.; DEMBINSKA-KIEC, A.; PANKIEWICZ, J.; WANAT, A.; ANNA, P.; GOL-BEK, I.; BARTU, S.; MALCZEWSKA-MALEC, M.; SZCZUDLIK, A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clin Chim Acta**, v. 274, n. 2, p. 177-188, 1998.

GUSHIKEN, L.F.S.; BESERRA, F.P.; BASTOS, J.K.; JACKSON, C.J.; PELLIZZON, C.H. Cutaneous wound healing: An update from physiopathology to current therapies. **Life**, v. 11, n. 7, p. 665, 2021.

HABTEMARIAM, S.; BELAI, A. Natural therapies of the inflammatory bowel disease: the case of rutin and its aglycone, quercetin. **Mini-Rev Med Chem**, v. 18, n. 3, p. 234-243, 2018.

HĂDĂRUGĂ, N.G.; BANDUR, G.N.; DAVID, I., HĂDĂRUGĂ, D.I. A review on thermal analyses of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Environ Chem Lett**, 2019.

HAUSER, A.R. **Antibióticos na Prática Clínica**. 1 ed.; Porto Alegre; Artmed, 2008, 328 p.

HOMMA, A.K.O.; SANCHES, R.D.S.; MENEZES, A.J.E.A.; GUSMÃO, S.D. Etnocultivo do jambu para abastecimento da cidade de Belém, estado do Pará. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, v. 6, n. 12, p. 125-141, 2011

HOSSEINNEJAD, M.; SEID, M. J. "Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. **Int J Biol Macromol**. v. 85, p. 467-475, 2016.

JIANG, Y.; YIN, H.; ZHOU, X.; WANG, D.; ZHONG, Y.; XIA, Q.; DENG, Y.; ZHAO, Y. Antimicrobial, antioxidant and physical properties of chitosan film containing *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. peel extract/montmorillonite and its application. **Food chem**, v. 361, p. 130111, 2021

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

KADAM, A. A.; SINGH, S.; GAIKWAD, K. K. Chitosan based antioxidant films incorporated with pine needles (*Cedrus deodara*) extract for active food packaging applications. **Food Control**, v. 124, p. 107877, 2021.

KHAN, F.; PHAM, D.T.N.; OLOKETUYI, S.F.; MANIVASAGAN, P.; OH, J.; KIM, Y.M. Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. **Colloids Surf B**, v. 185, p. 110627, 2020

KHAN, W. A.; M. ALI; M. IRFAN; M. KHAN; M. SHAHZAD; F. SULTAN. A rheological analysis of nanofluid subjected to melting heat transport characteristics. **Applied Nanoscience**, v. 10, p. 3161-3170, 2020.

KIM, K.H.; KIM, E.J.; KWUN, M.J.; LEE, J.Y.; BACH, T.T.; EUM, S.M.; JOO, M. Suppression of lung inflammation by the methanol extract of *Spilanthes acmella* Murray is related to differential regulation of NF- κ B and Nrf2. **J Ethnopharmacol**, v. 217, p. 89-97, 2018.

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

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

LALTHANPUII, P.B.; HRUAILUANGI, L.; SAILO NG, L.H.; LALCHHANDAMA, K. Nutritive value and antioxidant activity of *Acmella oleracea* (Asteraceae), a variety grown in Mizoram, India. **Int J Phytopharm**, v. 7, n. 5, p. 42-46, 2017

LALTHANPUII, P.B.; LALAWMPUII, R.; LALREMSANGA, H.T.; LALCHHANDAMA, K. Pharmacognostic study of the medicinal plant *Acmella oleracea*: analysis of its chemical components and properties. **Biol Conserv**, pp. 303–313, 2018.

LANNA, E.G.; BITTENCOURT, V.C.E.; MOREIRA, A.S.; DA SILVA, J.G.; SOUSA, O.V.; DENADAI, A.M.L. Physicochemical characterization and biological activities of the ethanol extract of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken incorporated in β -cyclodextrin. **J Incl Phenom Macrocycl Chem**, v. 85, n. 247, 2016.

LAROUCHE, J.; SHEORAN, S.; MARUYAMA, K.; MARTINO, M.M. Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets. **Adv Wound Care**, v. 7, n. 7, p. 209-231, 2018.

LEMO, C.N.; PEREIRA, F.; DALMOLIN, L.F.; CUBAYACHI, C.; RAMOS, D.N.; LOPEZ, R.F. Nanoparticles influence in skin penetration of drugs: In vitro and in vivo characterization. In: **Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs**, p. 187-248, 2018.

- LIU, H.; WANG, C.; LI, C.; QIN, Y.; WANG, Z.; YANG, F.; LI, Z.; WANG, J. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. **RSC Advances**, v. 8, n. 14, p. 7533-7549, 2018.
- LIU, X.; YOU, L.; TARAFDER, S.; ZOU, L.; FANG, Z.; CHEN, J.; LEE, C.H.; ZHANG, Q. Curcumin-releasing chitosan/aloe membrane for skin regeneration. **J Chem Eng**, v. 359, p.1111-1119, 2019.
- MA, X.; QIAO, C.; WANG, X.; YAO, J.; XU, J. Structural characterization and properties of polyols plasticized chitosan films. **Int J Biol Macromol**, v. 135, p. 240-245, 2019.
- MAN, M.Q.; WAKEFIELD, J.S.; MAURO, T.M.; ELIAS, P.M. Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation. **Inflammation**, p.1-16, 2022.
- MARMITT, D.J.; BITENCOURT, S.; SILVA, A.D.C.E.; REMPEL, C.; GOETTERT, M.I. The healing properties of medicinal plants used in the Brazilian public health system: a systematic review. **J Wound Care**, v. 27, p.S4-S13, 2018.
- MATICA, M.A.; AACHMANN, F.L.; TØNDERVIK, A.; SLETTA, H.; OSTAFE, V. Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 23, p. 5889, 2019.
- MAVER, T.; MAVER, U.; STANA KLEINSCHEK, K.; SMRKE, D.M.; KREFT, S. A review of herbal medicines in wound healing. **Int J Dermatol**, v. 54, n. 7, p. 740-751, 2015.
- MEISEL, T. In what extension thermal analysis is an analytical method. **J Therm Anal**, v. 29, p. 1379-1392, 1984.
- 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.
- MELO, R.C.; WELLER, P.F. Lipid droplets in leukocytes: Organelles linked to inflammatory responses. **Exp Cell Res**, v. 340, n. 2, p.193-197, 2016.
- MEWIS, J.; WAGNER, N.J. THIXOTROPY. **Advances in colloid and interface science**, v. 147, p. 214-227, 2009.
- MIRHAJ, M.; LABBAF, S.; TAVAKOLI, M.; SEIFALIAN, A.M. Emerging treatment strategies in wound care. **Int Wound J**, 2022.
- MOEINI, A.; PEDRAM, P.; MAKVANDI, P.; MALINCONICO, M.; D'AYALA, G.G. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. **Carbohydr Polym**, v. 233, p. 115839, 2020.

MONTES-RAMÍREZ, P.; MONTAÑO-LEYVA, B.; BLANCAS-BENITEZ, F. J.; BAUTISTA-ROSALES, P. U.; RUELAS-HERNÁNDEZ, N. D.; MARTÍNEZ-ROBINSON, K.; GONZÁLEZ-ESTRADA, R. R. Active films and coatings based on commercial chitosan with natural extracts addition from coconut by-products: Physicochemical characterization and antifungal protection on tomato fruits. **Food Control**, v. 155, p. 110077, 2023.

MORADI, M.; TAJIK, H.; ROHANI, S. M. R.; OROMIEHIE, A. R.; MALEKINEJAD, H.; ALIAKBARLU, J.; HADIAN, M. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with Zataria multiflora Boiss essential oil and grape seed extract. **LWT-Food Sci Technol**, v. 46, n. 2, p. 477-484, 2012.

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.

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

MOURÃO, L. R. M. B. **Estudo in vivo da atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira**. Tese de Doutorado (Núcleo de Energia Nuclear na Agricultura e no Meio Ambiente), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MUDGE, E.; LOPES-LUTZ, D.; BROWN, P.; SCHIEBER, A. Analysis of alkylamides in Echinacea plant materials and dietary supplements by ultrafast liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 15, p.8086-8094, 2011.

MURTHY, H.N., KEE-YOEUP, P. **Bioactive compounds in underutilized vegetables and legumes**. Springer, 2021, 87 p.

NABI, N.G.; SHRIVASTAVA, M. Estimation of Total Flavonoids and Antioxidant Activity of Spilanthes acmella Leaves. **Pharm Biosci J**, v. 4, n. 29, 2016.

NASCIMENTO, L.E.S.; ARRIOLA, N.D.A.; DA SILVA, L.A.L.; FAQUETI, L.G.; SANDJO, L.P.; DE ARAÚJO, C.E.S.; BIAVATTI, M.W.; BARCELOS-OLIVEIRA, J.L.; AMBONI, R.D.D.M.C. Phytochemical profile of different anatomical parts of jambu (Acmella oleracea (L.) RK Jansen): a comparison between hydroponic and conventional cultivation using PCA and cluster analysis. **Food Chem**, v. 332, p.127393, 2020.

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

OH, J.; BYRD, A.L.; PARK, M.; KONG, H.H.; SEGRE, J.A. Temporal stability of the human skin microbiome. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 854-866, 2016.

OHLWEILER, O.A. Fundamentos de Análise Instrumental, 1ª ed., Livros Técnicos e Científicos, 1981.

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

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. **J Pharm Sci**, v. 109, n. 7, p. 2196-2205, 2020.

PATEL RAJESH, M.; PATEL NATVAR, J. In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. **J Adv Pharm Educ Res**, v. 1, n. 1, p. 52-68, 2011.

PEREIRA, F.S.; SILVA AGOSTINI, D.L.; JOB, A.E.; GONZÁLEZ, E.R.P. Thermal studies of chitin–chitosan derivatives. **J Therm Anal**, v. 114, p.321-327, 2013.

PEREIRA, R.F.; BARTOLO, P.J. Traditional therapies for skin wound healing. **Adv wound care**, v. 5, n. 5, p. 208-229, 2016.

PERETTI, P.; RODRIGUES, E.T.; DE SOUZA JUNIOR, B.M.; BEZERRA, R.M.; FERNANDEZ, E.G.; DE SOUSA, F.F.O.; PINHEIRO, M.T. Spilanthal content of *Acmella oleracea* subtypes and their bactericide and antibiofilm activities against *Streptococcus mutans*. **S Afr J Bot**, v. 143, p. 17-24, 2021.

PETKOVIC, M.; MOURITZEN, M.V.; MOJSOSKA, B.; JENSSEN, H. Immunomodulatory properties of host defence peptides in skin wound healing. **Biomolecules**, v. 11, n. 7, p. 952, 2021.

PLYUTA, V.; ZAITSEVA, J.; LOBAKOVA, E.; ZAGOSKINA, N.; KUZNETSOV, A.; KHMEL, I. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. v. 121, n. 11, p. 1073-1081, 2013.

PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v. 14, n. 2, p. 850–867, 2019.

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

RACHTANAPUN, P.; KLUNKLIN, W.; JANTRAWUT, P.; JANTANASAKULWONG, K.; PHIMOLSIRIPOL, Y.; SEESURIYACHAN, P.; LEKSAWASDI, N.; CHAIYASO, T.; RUKSIRIWANICH, W.; PHONGTHAI, S.; SOMMANO, S.R.; PUNYODOM, W.;

REUNGSANG, A.; NGO, T. M. P. Characterization of chitosan film incorporated with curcumin extract. **Polymers**, v. 13, n. 6, p. 963, 2021.

RAJU, N.R.; SILINA, E.; STUPIN, V.; MANTUROVA, N.; CHIDAMBARAM, S.B.; ACHAR, R.R. Multifunctional and Smart Wound Dressings—A Review on Recent Research Advancements in Skin Regenerative Medicine. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, p.1574, 2022.

RAMBABU, K.; BHARATH, G.; BANAT, F.; SHOW, P.L.; COCOLETZI, H.H. Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging. **Int J Biol Macromol**, v. 126, p. 1234-1243, 2019

RAZIYEVA, K.; KIM, Y.; ZHARKINBEKOV, Z.; KASSYMBEK, K.; JIMI, S.; SAPAROV, A. Immunology of acute and chronic wound healing. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, p.700, 2021

RIAZ, A.; LAGNIKA, C.; LUO, H.; DAI, Z.; NIE, M.; HASHIM, M.M.; LIU, C.; SONG, J.; LI, D. Chitosan-based biodegradable active food packaging film containing Chinese chive (*Allium tuberosum*) root extract for food application. **Int J Biol Macromol**, v. 150, p. 595-604, 2020.

ROCHA, M. I. Salt marsh plants as source of bioactive compounds. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Algarve, Faro, 2014.

RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, J.R.; MADERA-SANTANA, T.J.; SÁNCHEZ-MACHADO, D.I.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; SOTO VALDEZ, H. Chitosan/hydrophilic plasticizer-based films: preparation, physicochemical and antimicrobial properties. **J Polym Environ**, v. 22, p. 41-51, 2014

RUIZ-NAVAJAS, Y.; VIUDA-MARTOS, M.; SENDRA, E.; PEREZ-ALVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. **Food control**, v. 30, n. 2, p. 386-392, 2013.

SADEER, N.; MONTESANO, D.; ALBRIZIO, S.; ZENGIN, G.; MAHOMOODALLY, M.F. The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 709, 2020.

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, O.V.D.; SOARES, S.D.; VIEIRA, E.L.S.; MARTINS, M.G.; NASCIMENTO, F.D.C.A.D.; TEIXEIRA-COSTA, B.E. Physicochemical properties and bioactive composition of the lyophilized *Acmella oleracea* powder. **J Food Process Preserv**, v. 45, n. 4, p. 15354, 2021.

SANTOS-SÁNCHEZ, N.F.; SALAS-CORONADO, R.; VILLANUEVA-CAÑONGO, C.; HERNÁNDEZ-CARLOS, B. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. **Antioxidants**, v. 10, p.1-29, 2019.

SAVENCU, I.; IURIAN, S.; PORFIRE, A.; BOGDAN, C.; TOMUȚĂ, I. Review of advances in polymeric wound dressing films. **React Funct Polym**, v. 168, p. 105059, 2021.

SAVIC, S.; PETROVIC, S.; SAVIC, S.; CEKIC, N. Identification and photostability of N-alkylamides from *Acmella oleracea* extract. **J Pharm Biomed Anal**, v. 195, 2021.
SEN, C. K. Human wounds and its burden: an updated compendium of estimates. **Adv wound care**, v. 8, n. 2, p. 39-48, 2019.

SERRA, M.B.; BARROSO, W.A.; SILVA, N.N.D.; SILVA, S.D.N.; BORGES, A.C.R.; ABREU, I.C.; BORGES, M.O.D.R. From inflammation to current and alternative therapies involved in wound healing. **Int J Inflam**, 2017.

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. **Int J Pharm**, v. 564, p. 22–38, 2019.

SHARMA, R.; ARUMUGAM, N. N-alkylamides of *Spilanthes* (syn: *Acmella*): Structure, purification, characterization, biological activities and applications—a review. **Future Foods**, v. 3, 2021.

SHI, S.; WANG, L.; SONG, C.; YAO, L.; XIAO, J. Recent progresses of collagen dressings for chronic skin wound healing. **Collagen and Leather**, v. 5, n. 1, p.31, 2023.

SHUKLA, S.K.; SHARMA, A.K.; GUPTA, V.; YASHAVARDDHAN, M.H. Pharmacological control of inflammation in wound healing. **J Tissue Viability**, v. 28, n. 4, p.218-222, 2019.

SILVA, L.A.L.; LOTAS, K.M.; PEREIRA, A.M.; DE SOUZA, L.D.S.S. Potencial da extração de óleo essencial assistida por enzimas a partir do Jambu (*Spilanthes Oleracea* L.). **Braz J Dev**, v. 9, n. 3, p. 11373-11389, 2023

SILVA, S. P.; FERNANDES, J. A. L.; SANTOS, A. S.; FERREIRA, N. R. Jambu Flower Extract (*Acmella oleracea*) Increases the Antioxidant Potential of Beer with a Reduced Alcohol Content. **Plants**, v. 12, n. 8, p. 1581, 2023.

SILVA-WEISS, A.; BIFANI, V.; IHL, M.; SOBRAL, P.J.A.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. **Food hydrocoll**, v. 31, n. 2, p.458-466, 2013.

- SILVEIRA, N. **Investigação fitoquímica e farmacológica das alcanidas de *Acmella ciliata* (H. B. K.) Cassini (Asteraceae)**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
- SILVEIRA, N.; SANDJO, L.P.; BIAVATTI, M.W. Spilanthol-containing products: A patent review (1996–2016). **Trends Food Sci Technol**, v. 74, p. 107-111, 2018.
- SIMÕES, D.; MIGUEL, S.P.; RIBEIRO, M.P.; COUTINHO, P.; MENDONÇA, A.G.; CORREIA, I.J. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 127, p. 130-141, 2018.
- SMITH, C.J.; ALEXANDER, L.M.; KENNEY, W.L. Nonuniform, age-related decrements in regional sweating and skin blood flow. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 305, n.8, pp.R877-R885, 2013.
- SOROKINA, M.; STEINBECK, C. Review on natural products databases: where to find data in 2020. **J cheminformatics**, v. 12, n. 1, p. 20, 2020
- SOUBHAGYA, A. S.; A. MOORTHI; M. PRABAHARAN. Preparation and characterization of chitosan/pectin/ZnO porous films for wound healing. **Int J Biol Macromol**, v. 157, p. 135-145, 2020.
- SPADA, G.; GAVINI, E.; COSSU, M.; RASSU, G.; CARTA, A.; GIUNCHEDI, P. Evolution of the effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on topical administration of milk thistle extract, **Carbohydr Polym**, v. 92, n. 1, p. 40–47, 2013.
- 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.
- SPIEGELEER, B.; BOONEN, J.; MALYSHEVA, S.V.; DI MAVUNGU, J.D.; DE SAEGER, S.; ROCHE, N.; BLONDEEL, P.; TAEVERNIER, L.; VERYSER, L. Skin penetration enhancing properties of the plant N-alkylamide spilanthol. **J Ethnopharmacol**, v. 148, n. 1, p. 117-125, 2013.
- STROPPA, P.H.F.; ANTINARELLI, L.M.R.; CARMO, A.M.L.; GAMEIRO, J.; COIMBA, E.S.; DA SILVA, A.D. Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonenses*. **Bioorg Med Chem**, v. 25, n. 12, p. 3034–3045, 2017.
- 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.
- SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. ‘Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay’. **Sensors**, v. 3, n. 8, p. 276-284, 2003.

SURIYAPROM, S.; MOSONI, P.; LEROY, S.; KAEWKOD, T.; DESVAUX, M.; TRAGOOLPUA, Y. Antioxidants of fruit extracts as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p.602, 2022

TAMAHKAR, E.; ÖZKAHRAMAN, B.; SÜLOĞLU, A. K.; İDİL, N.; PERÇİN, I. A novel multilayer hydrogel wound dressing for antibiotic release. **J Drug Deliv Sci Technol**, v. 58, 2020.

THAKUR, H.A.; BHAMARE, M.R. Phytochemical and antimicrobial activity of *Spilanthes acmella* Linn. **World J Pharm Res**, v. 4, n. 4, p. 723-733, 2015.

THAKUR, S.; SAGAR, A.; PRAKASH, V. Studies on Antibacterial and Antioxidant Activity of Different Extracts of *Spilanthes acmella* L. **Plant Arch**, v. 19, p. 1711–1717, 2019

THU, H. E.; ZULFAKAR, M.H; NG, S.F. Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. **Int J Pharm**, v. 434, n. 1-2, p. 375-383, 2012.

UTHPALA, T.G.G.; NAVARATNE, S.B. *Acmella oleracea* plant; identification, applications and use as an emerging food source–review. **Food Rev Int**, v. 37, n. 4, p. 399-414, 2021.

VALLI, M. AND BOLZANI, V.S. Natural products: perspectives and challenges for use of Brazilian plant species in the bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019

VERLEE, A., MINCKE, S., STEVENS, C.V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydr. Polym**, v. 164, p. 268-283, 2017.

VISHA, M. G.; KARUNAGARAN, M. A review on wound healing. **International Journal of Clinicopathological Correlation**, v. 3, n. 2, p. 50-59, 2019.

WANG, L.; GUO, H.; WANG, J.; JIANG, G.; DU, F.; LIU, X. Effects of *Herba Lophatheri* extract on the physicochemical properties and biological activities of the chitosan film. **Int J Biol Macromol**, v. 133, p. 51-57, 2019.

WANG, Q.; TIAN, F.; FENG, Z.; FAN, X.; PAN, Z.; ZHOU, J. Antioxidant activity and physicochemical properties of chitosan films incorporated with *Lycium barbarum* fruit extract for active food packaging. **Int J Food Sci Technol**, v. 50, n. 2, p. 458-464, 2015.

WANG, X.; YONG, H.; GAO, L.; LI, L.; JIN, M.; LIU, J. Preparation and characterization of antioxidant and pH-sensitive films based on chitosan and black soybean seed coat extract. **Food Hydrocoll**, v. 89, p. 56-66, 2019.

YADAV, S.; MEHROTRA, G.K; BHARTIYA, P.; SINGH, A.; DUTTA, P. Preparation, physicochemical and biological evaluation of quercetin based chitosan-gelatin film for food packaging. **Carbohydr Polym**, v. 227, p. 115348, 2020.

YADAV, U.C.S.; RAMANA, K.V. Regulation of NF- κ B-Induced Inflammatory Signaling by Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes. **Oxid Med Cell Longev**, p. 1-11, 2013.

YAZARLU, O.; IRANSHAHI, M.; KASHANI, H.R.K.; RESHADAT, S.; HABTEMARIAM, S.; IRANSHAHY, M.; HASANPOUR, M. Perspective on the application of medicinal plants and natural products in wound healing: A mechanistic review. **Pharmacol Res**, v. 174, 2021.

YUAN, G.; XIAOE, C.; DUO, L. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. **Food Res Int**, v. 89, p. 117-128, 2016.

ZENG, R.; LIN, C.; LIN, Z.; CHEN, H.; LU, W.; LIN, C.; LI, H. Approaches to cutaneous wound healing: basics and future directions. **Cell Tissue Res**, v. 374, n. 2, p. 217-232, 2018.

ZHANG, W.; LI, X.; JIANG, W. Development of antioxidant chitosan film with banana peels extract and its application as coating in maintaining the storage quality of apple. **Int J Biol Macromol**, v. 154, p. 1205-1214, 2020.

ZHAO, M.; WANG, H.B.; JI, L.N.; MAO, Z.W. Insights into metalloenzyme microenvironments: biomimetic metal complexes with a functional second coordination sphere. **Chem Soc Rev**, v. 42, n. 21, p.8360-8375, 2013.

ZHENG, K.; LI, W.; FU, B.; FU, M.; REN, Q.; YANG, F.; QIN, C. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films containing hardleaf oatchestnut starch and Litsea cubeba oil. **Int J Biol Macromol**, v. 118, p. 707-715, 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. **Braz J Pharm Sci**, v. 45 n. 3, p. 551-562, 2009.