

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Davi Glanzmann

**AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO DE FILME NANOCOMPÓSITO A BASE DE
SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS DE LARANJA EM CÉLULAS CHO**

JUIZ DE FORA
2025

Davi Glanzmann

**AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO DE FILME NANOCOMPÓSITO A
BASE DE SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS DE LARANJA EM CÉLULAS CHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Juiz de Fora como
requisito à obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr.^a Michele Munk
Coorientador: Dr. Humberto de Mello Brandão

JUIZ DE FORA
2025

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

Glanzmann, Davi.

AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO DE FILME NANOCOMPÓSITO A
BASE DE SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS DE LARANJA EM CÉLULAS CHO / Davi
Glanzmann. -- 2025. 28 p.

Orientadora: Michele Munk

Coorientador: Humberto Brandão

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora,
Instituto de Ciências Biológicas, 2025.

1. Citotoxicidade. 2. Filme nanocompósito. 3. Nanotoxicidade. 4. Resíduos industriais
da laranja. 5. Absorção do Vermelho Neutro. I. Munk, Michele, orient. II. Brandão,
Humberto, coorient. III. Título

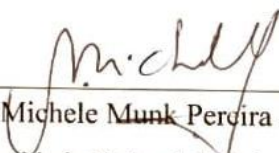
Davi Glanzmann

**AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO DE FILME NANOCOMPÓSITO A BASE DE
SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS DE LARANJA EM CÉLULAS CHO**

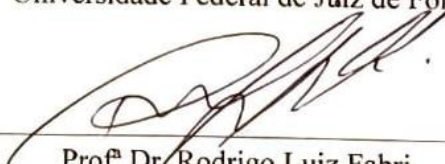
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Juiz de Fora como
requisito à obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Aprovada em 31 de julho de 2025

BANCA EXAMINADORA



Profª Dra. Michele Munk Pereira - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profª Dr. Rodrigo Luiz Fabri
Universidade Federal de Juiz de Fora

•


Profª Dra. Eduarda Rocha de Oliveira
Secretaria de Educação do Estado de Minas Gerais

Dedico este trabalho à minha família e à minha namorada, que me deram todo o apoio e o incentivo necessários durante o processo de graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pois sem uma força superior, a vida faria menos sentido.

Agradeço também aos meus pais, José e Silmar, por me incentivarem a dar o meu melhor e possibilitarem chegar onde cheguei. Obrigado pelo amor, pelo carinho, pelo apoio e pela dedicação. Agradeço também ao meu irmão, Nicolas, pelas orientações acadêmicas, pelas tardes de jogos que me ajudaram a distrair a cabeça e por todo apoio de sempre. Agradeço à minha avó, Maria Léa, que desde o ensino médio se mostrou interessada em meus estudos e minhas explicações, obrigado pelas tardes que passou me escutando falar de ciência. E agradeço ao meu primo, Allan, por ter sido um irmão mais novo para mim e também meu melhor amigo ao longo da vida.

Um agradecimento especial à minha namorada, Vittoria, que desde a graduação foi um porto seguro para mim, fazendo o possível e o impossível para tornar minha caminhada mais leve.

Agradeço aos meus companheiros de graduação, ao Laboratório de Nanobiotecnologia e Nanotoxicologia da UFJF, à Embrapa – Gado de Leite e, em especial, aos meus colegas do Laboratório de Inovação em Nanobiotecnologia e Materiais Avançados para Pecuária, especialmente à minha supervisora, Letícia, por ter me ensinado praticamente tudo o que eu sei sobre cultivo de células animais. Agradeço também aos meus amigos (aqui incluo meus professores) dos ensinamentos fundamental e médio, que sempre me motivaram e me apoiaram na carreira acadêmica.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Humberto Brandão, que acreditou e confiou em mim, me acolhendo e me orientando sem pestanejar.

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Michele Munk, por ter aberto a primeira porta desse caminho, obrigado por ter apostado suas fichas em mim.

E, por fim, agradeço aos meus demais familiares e amigos, que sempre acreditaram no meu potencial, oraram por mim e me apoiaram nessa jornada.

“Às vezes a vida é como este túnel escuro, nem sempre se vê a luz no fim do túnel, mas se você continuar em frente, você chegará a um lugar melhor” – Iroh, Avatar: A Lenda de Aang

RESUMO

Este artigo aborda a caracterização e a avaliação citotóxica de um filme nanocompósito produzido a partir de resíduos industriais de laranja e nanocristais de celulose, investigando seu potencial como material alternativo para embalagens alimentares ativas, inteligentes, biodegradáveis e possivelmente comestíveis. Realiza um estudo experimental de caráter investigativo para determinar o comportamento físico do material em meio aquoso, sua fração solúvel e insolúvel, além de avaliar sua segurança citotóxica em modelo *in vitro*. O trabalho objetiva analisar a estabilidade estrutural do filme e identificar eventuais efeitos tóxicos em células CHO-K1. Emprega testes de imersão em água, secagem em estufa e liofilização para medir a solubilidade e aplica ensaios de absorção de Vermelho Neutro e exclusão por Azul de Tripán para avaliação da viabilidade celular. Os resultados indicam que o filme apresenta aproximadamente 71% de fração solúvel e 28% de fração insolúvel, mantendo-se estável em água por até 24 horas. O ensaio de Azul de Tripán não apontou citotoxicidade significativa ($p > 0,05$), enquanto o Vermelho Neutro revela perda de viabilidade celular em concentrações iguais ou superiores a 3,125 mg/mL ($p < 0,03978$), com 12,5 mg/mL próximo ao ponto de inibição letal de 50% (IL 50). Conclui-se, que o material é promissor para uso em embalagens, mas requer aprimoramentos para garantir estabilidade e segurança adequadas.

Palavras-chave: filme biodegradável; resíduos industriais de laranja; nanotoxicidade

ABSTRACT

This article addresses the characterization and cytotoxic evaluation of a nanocomposite film produced from industrial orange residues and cellulose nanocrystals, investigating its potential as an alternative material for active, intelligent, biodegradable, and possibly edible food packaging. It presents an experimental investigative study to determine the physical behavior of the material in aqueous media, its soluble and insoluble fractions, and to assess its cytotoxic safety in an *in vitro* cell model. The study aims to analyze the structural stability of the film and identify possible toxic effects on CHO-K1 cells. Immersion tests in water, drying in an oven, and lyophilization were used to measure solubility, while Neutral Red absorption and Trypan Blue exclusion assays assessed cell viability. Results indicate that the film contains approximately 71% soluble fraction and 28% insoluble fraction, maintaining stability in water for up to 24 hours if undisturbed. The Trypan Blue assay showed no significant cytotoxicity ($p > 0,05$), whereas the Neutral Red assay revealed reduced cell viability at concentrations equal to or greater than 3.125 mg/mL ($p < 0,03978$), with 12.5 mg/mL approaching the 50% lethal inhibition point (LF 50). Therefore, the material is promising for packaging applications but requires further refinement to ensure adequate stability and safety.

Keywords: biodegradable film; orange industrial waste; nanotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Avaliação macroscópica do comportamento da fração insolúvel do filme nanocompósito imerso em água nos intervalos de 0 h (A), 1 h (B), 3 h (C), 5 h (D), 10 h (E) e 12 h (F).....18

Figura 2 – Comparação dos valores de peso e percentual de frações do filme nanocompósito, obtidos pelos métodos de secagem em estufa (E), liofilização (L) e média geral (M). A - Comparação entre pesos iniciais e pesos finais das amostras (em gramas). B – Percentual das frações solúvel e insolúvel em cada método.....19

Figura 3 – Viabilidade celular (%) obtida no ensaio de absorção do vermelho neutro após exposição ao filme nanocompósito em diferentes concentrações por 24 h, com leituras em diferentes comprimentos de onda: 490 (verde), 540 (vermelho) e 630 (azul) nm. (A) Gráfico em linhas representando a média dos grupos controle e tratados, dispostos em ordem crescente de concentração, nas diferentes leituras. (B) Gráfico em barras, comparando as médias dos valores de viabilidade para os mesmos grupos. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e o controle (*) a partir da concentração de 3,125 mg/mL ($p < 0,05$; ANOVA one-way; teste de Tukey).....20

Figura 4 – Viabilidade celular (%) obtida no ensaio de exclusão por Azul de Tripán após exposição ao filme nanocompósito em diferentes concentrações por 24 h. (A) Gráfico de barras representando a média e o desvio padrão dos grupos controle e tratados, dispostos em ordem crescente de concentração. (B) Boxplot mostrando a distribuição dos valores individuais de viabilidade para os mesmos grupos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,6576$; ANOVA one-way; teste de Tukey).....21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem das frações solúvel e insolúvel do filme nanocompósito obtidas por dois métodos distintos de secagem, em estufa e por liofilização.....	19
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SFB	Soro Fetal Bovino
NEAA	Solução de Aminoácidos Não-Essenciais
CHO-K1	Linhagem de Células Epiteliais de Ovário de Hamster Chinês

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	DESENVOLVIMENTO.....	14
2.1	Materiais.....	14
2.2	Caracterização do Filme.....	14
2.2.1	Avaliação do comportamento da fração insolúvel sob imersão em meio aquoso...	15
2.2.2	Avaliação da solubilidade do material em meio aquoso.....	15
2.3	Cultivo Celular.....	15
2.4	Ensaio de Citotoxicidade.....	16
2.4.1	Preparação do material para os ensaios.....	16
2.4.2	Ensaio de absorção de vermelho neutro.....	16
2.4.3	Ensaio de exclusão por azul de tripan.....	17
2.5	Análise Estatística.....	17
3	RESULTADOS.....	17
3.1	Caracterização do Filme.....	17
3.1.1	Comportamento da fração insolúvel sob imersão em meio aquoso.....	17
3.1.2	Solubilidade do material em meio aquoso.....	18
3.2	Ensaio de Citotoxicidade.....	19
3.2.1	Ensaio de absorção de vermelho neutro.....	19
3.2.2	Ensaio de exclusão por azul de tripan.....	20
4	DISCUSSÃO.....	21
5	CONCLUSÃO.....	23
	REFERÊNCIAS.....	23
	APÊNDICES.....	26
	APÊNDICE A.....	26
	APÊNDICE B.....	27
	APÊNDICE C.....	28

AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE FILME NANOCOMPÓSITO À BASE DE SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS DE LARANJA EM CÉLULAS CHO

IN VITRO EVALUATION OF A NANOCOMPOSITE FILME DERIVED FROM INDUSTRIAL ORANGE BY-PRODUCTS IN CHO CELLS

Davi Glanzmann^{1*}
Michele Munk^{2**}
Humberto Brandão^{3***}

1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação global com os impactos ambientais associados ao uso de polímeros sintéticos, especialmente plásticos de uso único, tem impulsionado o desenvolvimento de materiais alternativos, renováveis, biodegradáveis e com menor pegada ambiental (Geyer; Jambeck; Law, 2017; Nilsen-Nygaard *et al.*, 2021; Shah *et al.*, 2008). Estima-se que apenas cerca de 9% dos plásticos produzidos mundialmente são reciclados, com o restante acumulando-se em aterros sanitários ou dispersando-se no meio ambiente, contribuindo para problemas de poluição em escala planetária (Jambeck, 2015; Singh; Walker, 2024).

Nesse contexto, os filmes poliméricos biodegradáveis surgem como uma estratégia promissora para a substituição parcial ou total dos plásticos convencionais em embalagens, especialmente quando associados a propriedades funcionais adicionais, como atividade antimicrobiana ou indicadores de qualidade — características que definem as embalagens ativas e inteligentes (Emamifar *et al.*, 2011; Han, 2013; Melo *et al.*, 2019). A utilização de resíduos agroindustriais como matéria-prima para esses biopolímeros reforça o conceito de economia circular, agregando valor a subprodutos que, de outra forma, teriam descarte de baixo valor agregado ou oneroso (Bayer *et al.*, 2014; Perotto *et al.*, 2018).

Dentre os resíduos agroindustriais de maior relevância, destaca-se a casca de laranja, abundante na indústria cítrica e rica em compostos bioativos, como pectina, flavonoides e óleos essenciais, que conferem potencialidade tanto para formação de filmes quanto para propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Cheng *et al.*, 2024; Figueira; Pereira; Castilho, 2023; Guerrero *et al.*, 2020). Nanocompósitos são materiais híbridos formados pela incorporação de nanopartículas em uma matriz polimérica, promovendo a interação entre os componentes em escala nanométrica. Essa combinação resulta em sinergias que possibilitam a superação de limitações típicas dos filmes biodegradáveis, como baixa resistência mecânica e

¹ Aluno de Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail: davi.glanz@gmail.com

² * Orientadora. Professora Adjunto do Departamento de Biologia, orientadora e vice-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Imunologia, DIP/Genética e Biotecnologia) da Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail: michele.munk@ufjf.br

³ *** Co-Orientador. Pesquisador e coordenador do Laboratório de Inovação em Nanobiotecnologia e Materiais Avançados para Pecuária da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, unidade Gado de Leite. E-mail: humberto.brandao@embrapa.br

elevada permeabilidade a gases e à umidade, ampliando, assim, seu desempenho funcional em aplicações de interesse, especialmente no setor de embalagens sustentáveis (Oliveira *et al.*, 2018; Genet *et al.*, 2025). Além disso, a incorporação de nanocristais de celulose tem sido explorada como estratégia para reforço mecânico e melhoria das barreiras físico-químicas dos filmes biodegradáveis, devido à sua elevada relação de aspecto, alta cristalinidade e propriedades renováveis (Xu *et al.*, 2024; Genet *et al.*, 2025).

Apesar das vantagens técnico-ambientais, a avaliação da citotoxicidade desses nanocompósitos é essencial para validar sua segurança em aplicações que envolvem contato direto com alimentos e, em alguns casos, consumo humano direto, como no caso de filmes comestíveis (Bouwmeester *et al.*, 2009; Cockburn *et al.*, 2012). Ensaio de citotoxicidade *in vitro* fornecem informações preliminares sobre a compatibilidade biológica dos materiais, sendo parte crucial na etapa de desenvolvimento e regulamentação de novos materiais para embalagens alimentícias (Amenta *et al.*, 2015; ISO 10993-5:2009).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade *in vitro* de um filme nanocompósito desenvolvido a partir de resíduos industriais de laranja e nanocristais de celulose, visando sua aplicação como embalagem ativa, inteligente, biodegradável e potencialmente comestível. Espera-se, com isso, contribuir para a expansão de alternativas sustentáveis ao plástico convencional, alinhadas às demandas ambientais e de segurança alimentar da sociedade contemporânea.

2 DESENVOLVIMENTO

Foram realizadas análises experimentais para a caracterização do material e para a determinação do seu potencial citotóxico na linhagem celular escolhida. O termo *filme nanocompósito* será, doravante, designado apenas como *filme*, visando a simplificação textual.

2.1 Materiais

O filme utilizado neste estudo foi obtido por meio de um projeto em parceria com o Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária e o Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite.

A linhagem celular CHO-K1 (células epiteliais de ovário de hamster chinês) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, código 0069) e cedida pelo Laboratório de Nanobiotecnologia e Nanotoxicologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

O meio de cultura utilizado foi DMEM-F12 (Nova Biotecnologia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil), 1% de solução de aminoácidos não essenciais (NEAA) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e 1% de antibióticos, contendo penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco, Estados Unidos).

Para os ensaios de citotoxicidade, foram utilizados o corante vermelho neutro (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e o corante azul de tripan (Nuclear, Brasil). A solução de descoloração do vermelho neutro foi preparada com álcool etílico 99,8° (ACS Científica, Brasil), ácido acético glacial (Dinâmica – Química Contemporânea Ltda., Brasil) e água ultrapura obtida em deionizador Milli-Q (Millipore – Merck, Alemanha).

Os principais equipamentos empregados no desenvolvimento dos experimentos foram: microscópio óptico invertido Primo Vert (ZEISS, Alemanha), incubadora úmida de CO₂ (SANYO – North America Corporation, Estados Unidos), centrífuga Heraeus Megafuge 8R (Thermo Scientific, Alemanha), mesa agitadora pendular (Tecnal, Brasil), balança analítica AUY220 (Shimadzu, Japão), espectrofotômetro BioTek Eon (Agilent Technologies, Winooski, Estados Unidos), estufa de secagem modelo 002 CB (FANEM, São Paulo, Brasil) e liofilizador JJ-02 (JJ Científica – Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda., Brasil).

2.2 Caracterização do Filme

Para definir quais ensaios de citotoxicidade seriam realizados e como conduzi-los, foi necessário avaliar a capacidade de solubilidade do filme. A proposta inicial era a realização de um ensaio de entumescimento, com avaliações de peso em diferentes intervalos de tempo. Todavia, após certo tempo de imersão, o material se desfez ao ser manipulado. Dessa forma, outros ensaios foram realizados para caracterizar o filme.

2.2.1 Avaliação do comportamento da fração insolúvel sob imersão em meio aquoso

O primeiro teste realizado com o filme foi a sua imersão em água, para observação do comportamento da porção insolúvel no líquido ao longo do tempo. Para isso, 3 pedaços do filme foram cortados em dimensões de, aproximadamente, 2,5 cm X 2,5 cm e posicionados no centro de placas de petri de polipropileno (100 mm) contendo 6 mL de água MilliQ, suficiente para que as amostras ficassem completamente submersas. Os filmes foram gentilmente guiados para encostarem no fundo da placa e suas posições foram demarcadas externamente com uma caneta permanente.

As placas foram fechadas e colocadas numa região de pouco uso da bancada, onde ficaram protegidas da luz solar e de interação com o meio externo, enquanto possibilitavam fácil acesso para visualização.

Os filmes foram observados ao longo de 48 h, nos intervalos de 1, 3, 5, 10 e 24 h, para averiguar a solubilização e a estabilidade da porção insolúvel. Registros de imagem foram realizados ao longo das etapas.

2.2.2 Avaliação da solubilidade do material em meio aquoso

Para definir a solubilidade do filme, foi elaborado um protocolo baseado no protocolo descrito por Gontard *et al.* (2007). Brevemente, 4 amostras foram recortadas em tamanhos de aproximadamente 2,5 cm X 2,5 cm e colocadas em dessecadora com sílica à vácuo *overnight*. Após secas, as amostras foram pesadas isoladamente e depositadas em tubos tipo Falcon de 15 mL, pesados previamente. Após a adição de 5 mL de água MilliQ, os tubos foram colocados sob agitação moderada (50 rpm) por 24 h, para favorecer a solubilização. Os filmes foram, então, centrifugados a 4500 rpm, por 25 min e a 4°C para separação das fases. Os sobrenadantes foram coletados com o auxílio de uma micropipeta de 1mL, e separados em novos tubos Falcon, também pesados previamente. Todo este procedimento, até então, foi realizado em duas vezes independentes. A partir deste momento, foram feitas duas continuações distintas para concluir o experimento. Na primeira, tanto as frações solúveis quanto insolúveis foram submetidas à liofilização para secagem das amostras, que foram pesadas uma última vez, possibilitando a inferência do percentual de solubilização a partir da comparação do peso inicial com o peso final. Na segunda, as frações solúveis foram submetidas à liofilização enquanto as frações insolúveis foram secas em estufa a 50°C, ambas pesadas novamente, para a inferência do percentual de solubilização por comparação.

2.3 Cultivo Celular

Para a avaliação da citotoxicidade do filme nanocompósito, foi utilizada a linhagem celular CHO-K1 (células epiteliais aderentes de ovário de hamster chinês, código BCRJ 0069), cedida pelo Laboratório de Nanobiotecnologia e Nanotoxicologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. O descongelamento, a expansão e o armazenamento das células foram realizados

no Laboratório de Inovação em Nanobiotecnologia e Materiais Avançados para Pecuária (LINMAP), pertencente à unidade Gado de Leite da EMBRAPA.

As células foram mantidas em meio de manutenção composto por DMEM-F12, suplementado com 10% de SFB, 1% de NEAA e 1% de antibióticos, em incubadora de CO₂. Antes de cada ensaio, as células foram descongeladas por no mínimo duas passagens para garantir estabilidade e viabilidade celular. Posteriormente, foram tripsinizadas, avaliadas quanto a viabilidade celular por exclusão com o corante Azul de Tripán e plaqueadas de acordo com a placa e a densidade exigidas para cada ensaio. Após plaqueamento, as células permaneceram em incubação por 24 h para adesão e recuperação antes da aplicação dos tratamentos. Os mapas de distribuição dos grupos experimentais nas placas de 24, 48 e 96 poços estão apresentados no Apêndice A, e medidas preventivas foram adotadas para minimizar o efeito de borda, preenchendo os poços externos das placas de 48 e 96 poços com PBS, conforme recomendações de Mansoury *et al.* (2021).

2.4 Ensaios de Citotoxicidade

Os testes escolhidos para avaliação do potencial citotóxico do material foram o ensaio de Absorção do Corante Vermelho Neutro e o ensaio de Exclusão por Azul de Tripán, e seguiram o delineamento recomendado pelo Guia 129 da OECD (OECD, 2010), incluindo ensaios preliminares para definição de faixa de dosagem e ensaios principais para determinação da resposta celular à fração solúvel do filme.

Nos testes preliminares foram utilizadas concentrações crescentes de 0,0001 a 1000 µg/mL. A partir dos resultados obtidos nos testes preliminares, foram definidas as concentrações dos ensaios principais: 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25 e 50 mg/mL.

2.4.1 Preparação do material para os ensaios

A preparação da solução estoque seguiu as diretrizes de solubilização e diluição do Guia 129 da OECD (OECD, 2010). Considerando que os filmes apresentaram aproximadamente 71% de fração solúvel em água, o material foi pesado de forma a garantir que a fração solúvel resultasse em uma concentração final de 100 mg/mL. Para isso, o material foi disperso em meio DMEM-F12 e submetido a agitação moderada (50 rpm) em mesa agitadora pendular por 12 h. Em seguida, sob condições assépticas em cabine de fluxo laminar, a solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm para esterilização, seguida de diluição e ajustes para as concentrações requeridas nos ensaios. Para manter a proporção de 1:1 entre o tratamento e o meio de manutenção já presente nos poços, as soluções foram preparadas com o dobro das concentrações alvo de exposição.

2.4.2 Ensaio de absorção de Vermelho Neutro

O ensaio de absorção de Vermelho Neutro foi conduzido de acordo com o Guia 129 da OECD (OECD, 2010) e o protocolo de Repetto *et al.* (2008). Para o preparo, o corante foi diluído inicialmente a 400 µg/mL em meio DMEM-F12 e, posteriormente, ajustado para 40 µg/mL no momento do uso. A solução de descoloração foi preparada com 50% etanol 96°, 49% de água ultrapura (MilliQ) e 1% de ácido acético glacial.

No teste preliminar, as células foram plaqueadas em placa de 96 poços ($\approx 1 \times 10^4$ células viáveis/poço), incubadas por 24 h para adesão e expostas às concentrações definidas, mantendo-se a proporção de 1:1 entre o meio e o tratamento (100 µL de cada). Após 24 h de exposição, o meio foi removido e 100 µL de corante (40 µg/mL) foram adicionados, com posterior incubação por 2 h em incubadora de CO₂. Em seguida, o corante foi removido, os poços lavados duas

vezes com PBS e adicionados 150 μL da solução de descoloração. A placa foi mantida sob agitação orbital por 15 min e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

No ensaio principal, o procedimento foi idêntico, ajustando-se as concentrações (1,56 a 50 mg/mL) e realizando as leituras nos comprimentos de onda de 490, 540 e 630 nm. A escolha dos diferentes comprimentos de onda utilizados nas leituras visou gerar informações técnicas internas ao laboratório, considerando as limitações de filtros ópticos dos distintos equipamentos disponíveis.

2.4.3 Ensaio de exclusão por Azul de Tripán

Para validar os resultados do Vermelho Neutro, foi aplicado o ensaio de exclusão por Azul de Tripán, seguindo o protocolo de Crowley *et al.* (2016).

No teste preliminar, as células foram plaqueadas em placa de 24 poços ($\approx 5 \times 10^4$ células viáveis/poço), incubadas por 24 h e expostas aos tratamentos (0,0001 a 1000 $\mu\text{g/mL}$) na proporção 1:1 (500 μL de meio de manutenção e 500 μL de tratamento). Após 24 h, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, e o pellet celular ressuspensionado em meio DMEM-F12. Foram misturados 10 μL da suspensão celular com 10 μL do corante azul de tripan, incubados por 2 min e quantificados em câmara de Neubauer, utilizando os quatro quadrantes dos cantos. O percentual de viabilidade foi calculado pela média dos quadrantes multiplicada por 2×10^4 (fator de diluição x fator de correção da câmara).

Para o ensaio principal, o procedimento foi repetido utilizando placas de 48 poços ($\approx 3 \times 10^4$ células viáveis/poço) e concentrações de 1,56 a 50 mg/mL, adequando-se os volumes para 200 μL de meio de manutenção e 200 μL de tratamento.

2.5 Análise Estatística

Os dados experimentais foram organizados em planilhas eletrônicas e analisados com o software PAST (Hammer *et al.*, 2001). Foram realizados testes de normalidade (Shapiro-Wilk), análises de variância One-way ANOVA e testes post hoc de Tukey para comparação entre grupos, considerando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização do Filme

Durante a manipulação do material e os testes de interação com a água, observou-se que apenas uma fração do mesmo foi completamente solubilizada, enquanto outra parte permaneceu como sólido visível em suspensão no meio.

Visto que o filme apresentava porções com diferentes graus de afinidade pela água, tornou-se necessário determinar qual porção do peso do material correspondia às frações solúvel e insolúvel. Essa etapa foi fundamental para definir os protocolos de avaliação de avaliação de citotoxicidade, considerando que essas frações poderiam apresentar diferentes efeitos e potenciais citotóxicos.

3.1.1 Comportamento da fração insolúvel sob imersão em meio aquoso

Durante o período de observação, constatou-se que, na ausência de qualquer forma de agitação, a fração insolúvel do material apresentou apenas um leve entumescimento, mantendo, no entanto, sua forma estrutural original de maneira estável (Figura 1). Não foram observados

sinais de desintegração completa, delaminação significativa ou dispersão de partículas sólidas no meio líquido, apenas perda de coloração do material e uma sutil turbidez no líquido.

Esses resultados preliminares indicam que a matriz insolúvel do filme possui resistência à solubilização em condições de imersão estática, característica desejável para aplicações em embalagens que demandem resistência parcial à umidade. Todavia, o material se desfez facilmente ao ser manipulado após imersão por mais de 3h, o que sugere um comprometimento de sua integridade mecânica durante o uso.

As imagens obtidas em cada intervalo de tempo ilustram o aspecto macroscópico do material, reforçando a estabilidade da fração não solúvel mesmo após 24 h de contato contínuo com a água (Figura 1).

Figura 1

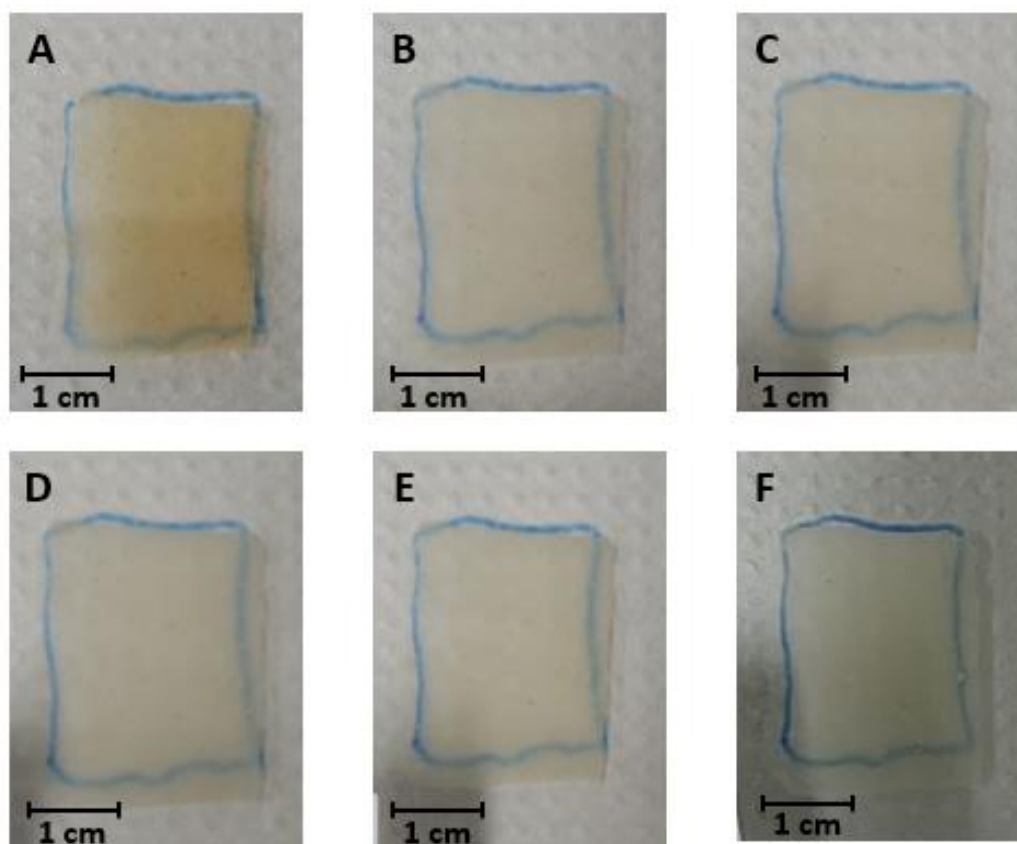


Fig. 1 | Avaliação macroscópica do comportamento da fração insolúvel do filme nanocompósito imerso em água nos intervalos de 0 h (A), 1 h (B), 3 h (C), 5 h (D), 10 h (E) e 12 h (F).

3.1.2 Solubilidade do material em meio aquoso

A solubilidade do filme nanocompósito em meio aquoso foi determinada por meio de dois ensaios independentes, utilizando-se métodos distintos de secagem da fração insolúvel: um em estufa de secagem comum e ou em liofilizador. Em ambos os procedimentos, amostras do material foram imersas em água ultrapura, mantidas sob as mesmas condições experimentais descritas na seção 2.2.2, e posteriormente submetidas à secagem até peso constante.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 2. Observa-se que os valores obtidos por ambos os métodos apresentam variações pouco significativas, indicando boa reprodutibilidade do experimento. A média geral revelou que aproximadamente 28,2% do

peso do material corresponde à fração insolúvel, enquanto a fração solúvel representa cerca de 71,8% do peso total.

Esse comportamento sugere que o filme apresenta uma porção majoritariamente solúvel em água, o que reforça seu potencial como matriz biodegradável e/ou comestível, sem comprometer a função de barreira parcial da fração insolúvel, quando requerido para aplicações em embalagens ativas.

Tabela 1

Método de Secagem	Amostra	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	% Fração Insolúvel	% Fração Solúvel
Estufa de Secagem (E)	E1	0,02944	0,00905	30,74	69,26
	E2	0,03145	0,00975	31,00	69,00
	E3	0,03139	0,00934	29,75	70,25
	Médias (E)	0,03076	0,00938	30,49	69,51
	Desvio Padrão	0,00066	0,000203		
Liofilizador (L)	L1	0,03432	0,00945	27,53	72,47
	L2	0,02719	0,00778	28,61	71,39
	L3	0,02228	0,00581	26,07	73,93
	L4	0,03233	0,00932	28,82	70,18
	Médias (L)	0,02903	0,00809	27,76	72,24
	Desvio Padrão	0,002705	0,000849		
Médias Gerais		0,02977	0,00851	28,93	70,92

Tabela 1 | Porcentagem das frações solúvel e insolúvel do filme nanocompósito obtidas por dois métodos distintos de secagem, em estufa e por liofilização.

Figura 2

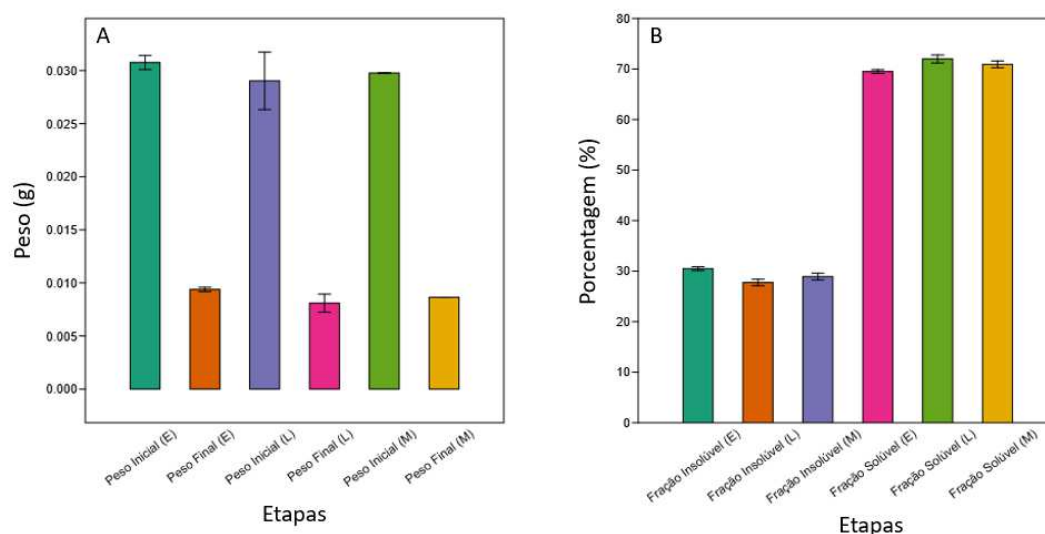


Fig. 2 | Comparação dos valores de peso e percentual de frações do filme nanocompósito, obtidos pelos métodos de secagem em estufa (E), liofilização (L) e média geral (M). **A** - Comparação entre pesos iniciais e pesos finais das amostras (em gramas). **B** - Percentual das frações solúvel e insolúvel em cada método.

3.2 Ensaios de Citotoxicidade

3.2.1 Ensaio de absorção de Vermelho Neutro

Nos testes preliminares de absorção de Vermelho Neutro, realizados com concentrações crescentes de 0,0001 até 1000 $\mu\text{g/mL}$, não foi observado efeito citotóxico significativo em comparação ao grupo controle ($p > 0,05$). Diante desse resultado, constatou-se a necessidade de ampliar as concentrações testadas, motivando a realização de um ensaio principal com doses mais elevadas, variando de 1,56 mg/mL a 50 mg/mL.

O ensaio principal de absorção de Vermelho Neutro demonstrou que o filme nanocompósito apresentou efeito citotóxico dependente da concentração. As células do grupo controle (0 mg/mL) mantiveram boa viabilidade celular, servindo como referência para os grupos tratados, sendo considerada como 100% para efeitos comparativos.

Na concentração de 1,56 mg/mL, não foi observada diferença estatística significativa em relação ao controle ($p > 0,05$). Entretanto, a partir da concentração de 3,125 mg/mL, todas as doses resultaram em redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,05$; ANOVA one-way; teste de Tukey). Destaca-se que na concentração de 12,5 mg/mL, a viabilidade foi reduzida para 50,22%, valor que se aproxima de uma concentração inibitória letal de 50% (IL_{50}) para o período de exposição de 24 horas.

A análise comparativa entre os três comprimentos de onda avaliados demonstra coerência no padrão de resposta apenas nos comprimentos de 490 nm e 540 nm, sendo o pico de absorção em 540 nm o parâmetro principal para discussão dos resultados. A leitura em 630 nm se mostrou incompatível com o corante utilizado. Gráficos em linha e de barras (Figura 3) ilustram o comportamento da viabilidade celular corrigida em função das leituras nos três comprimentos de onda. Os outputs completos das análises estatísticas encontram-se reunidos no Apêndice B.

Esses resultados reforçam que o filme apresenta citotoxicidade funcional significativa em doses iguais ou superiores a 3,125 mg/mL, indicando potencial limiar de segurança para aplicações que exijam contato direto com células vivas.

Figura 3

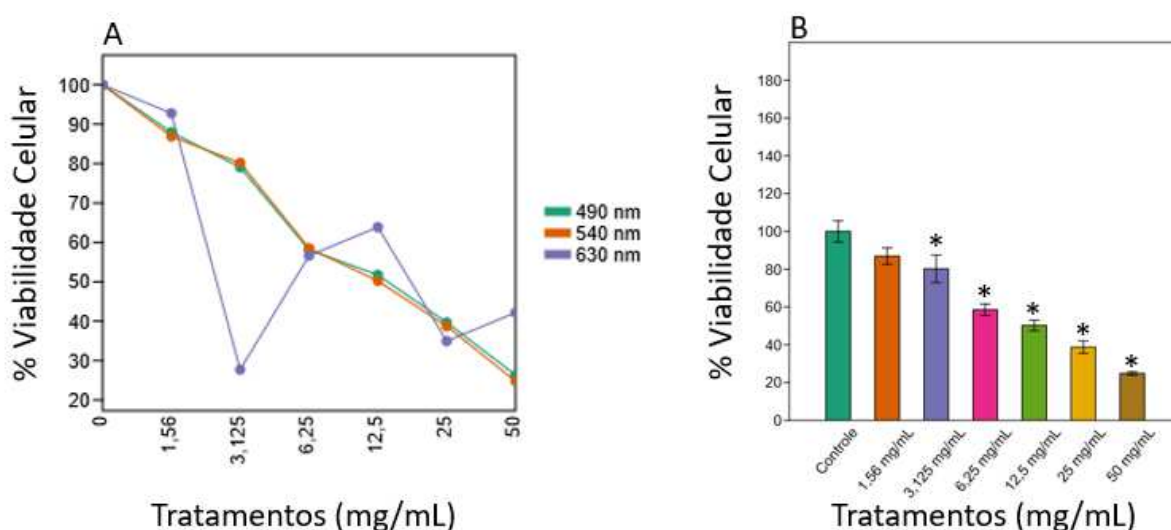


Fig. 3 | Viabilidade celular (%) obtida no ensaio de absorção do vermelho neutro após exposição ao filme nanocompósito em diferentes concentrações por 24 h, com leituras em diferentes comprimentos de onda: 490 (verde), 540 (vermelho) e 630 (azul) nm. (A) Gráfico em linhas representando a média dos grupos controle e tratados, dispostos em ordem crescente de concentração, nas diferentes leituras. (B) Gráfico em barras, com média e desvio padrão, comparando os valores de viabilidade para os mesmos grupos. Foram observadas diferenças

estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos e o controle (*) a partir da concentração de 3,125 mg/mL; (ANOVA one-way; teste de Tukey).

3.2.2 Ensaio de exclusão por Azul de Tripán

Assim como observado no teste preliminar de absorção de vermelho neutro (Item 3.2.1), os resultados preliminares do ensaio de exclusão por Azul de Tripán também não indicaram diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular em comparação ao grupo controle. Dessa forma, foram definidas concentrações mais elevadas para o ensaio principal, visando uma melhor identificação de potenciais efeitos citotóxicos.

Os resultados obtidos para as doses testadas demonstraram que os dados atenderam ao pressuposto de normalidade (teste de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA one-way, $p = 0,6576$). De acordo com a Figura 4, observa-se que a viabilidade celular permaneceu estável mesmo nas concentrações mais altas avaliadas, indicando ausência de efeito citotóxico relevante nas condições testadas.

As análises estatísticas detalhadas encontram-se no Apêndice C, incluindo os outputs completos gerados no software PAST.

Figura 4

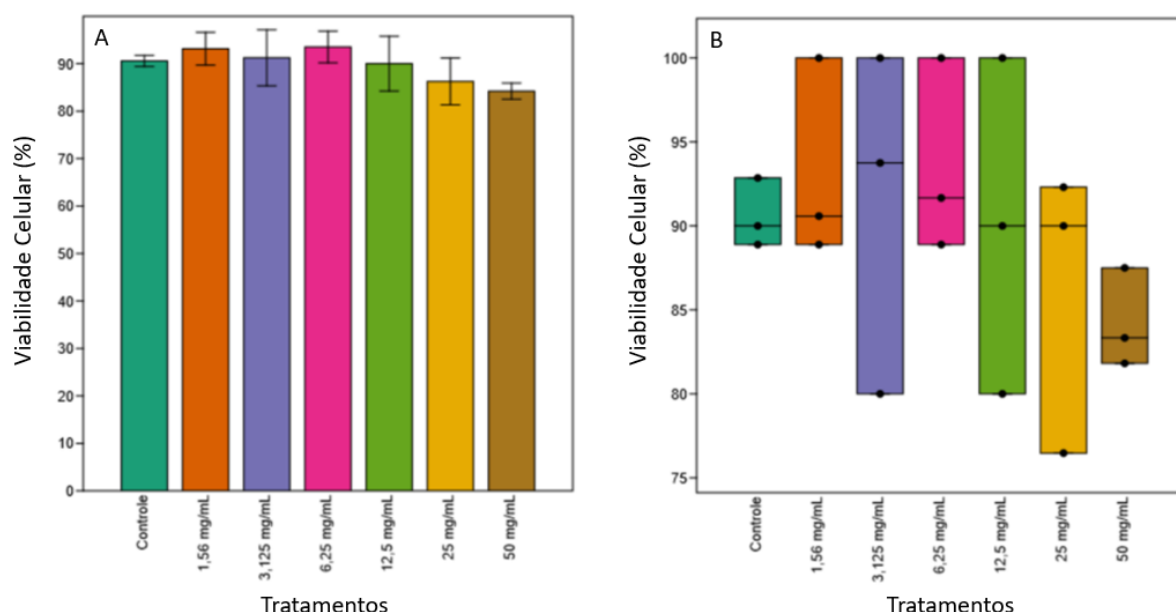


Fig. 4 | Viabilidade celular (%) obtida no ensaio de exclusão por Azul de Tripán após exposição ao filme nanocompósito em diferentes concentrações por 24 h. (A) Gráfico de barras representando a média e o desvio padrão dos grupos controle e tratados, dispostos em ordem crescente de concentração. (B) Boxplot mostrando a distribuição dos valores individuais de viabilidade para os mesmos grupos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,6576$; ANOVA one-way; teste de Tukey).

4 DISCUSSÃO

O estudo avaliou a fração solúvel e insolúvel de um filme nanocompósito à base de resíduos de laranja e nanocristais de celulose, visando seu uso como embalagem ativa e biodegradável. Verificou-se que o material mantém cerca de 29% de fração insolúvel, estável em água por até 24 h sem agitação. Nos testes de citotoxicidade, não houve comprometimento imediato da membrana celular pelo Azul de Tripán, mas o Vermelho Neutro indicou redução funcional da viabilidade a partir de 3,125 mg/mL ($p < 0,03978$), com 12,5 mg/mL próximo ao IL_{50} (50,22%).

Um aspecto relevante a ser considerado é o comportamento físico da fração insolúvel do filme nanocompósito em meio aquoso. Durante o ensaio de imersão em água, observou-se que, na ausência de perturbação mecânica, a fração insolúvel manteve sua forma estrutural geral e apresentou apenas leve entumescimento ao longo de 24 h. No entanto, quando submetida a manipulação ou movimentação após imersão superior a 1 h, a estrutura insolúvel se desagregou, indicando limites de estabilidade mecânica do material em ambientes úmidos. Esse comportamento é consistente com o resultado da análise de solubilidade, que mostrou que cerca de 72% do peso total do filme corresponde à fração solúvel, restando aproximadamente 28% como fração insolúvel residual. Na literatura, observam-se filmes com solubilidade variando de cerca de 17% a 41% (Colussi *et al.*, 2017), de 39% a mais de 60% (De Lima Barizão *et al.*, 2020) e até formulações com apenas 0,13% de solubilidade (Xu *et al.*, 2021), indicando que o material desenvolvido neste estudo apresenta maior proporção de fração solúvel em comparação com vários filmes biodegradáveis já relatados. No contexto de aplicação como embalagem alimentar ativa, inteligente ou biodegradável, tal característica pode ser favorável para produtos que demandem biodegradação controlada ou potencial comestibilidade, mas ao mesmo tempo destaca a importância de considerar as condições de uso, como umidade, contato direto com alimentos úmidos ou líquidos e manuseio durante o armazenamento e transporte. Assim, futuras formulações podem buscar otimizar a resistência mecânica da fase insolúvel sem comprometer a solubilidade desejada para garantir segurança e funcionalidade adequadas.

A análise das diferentes leituras espectrofotométricas do ensaio de absorção de Vermelho Neutro revelou coerência entre os comprimentos de onda de 490 nm e 540 nm, os quais apresentaram curvas de viabilidade celular com inclinações semelhantes ao longo das concentrações testadas. Esse comportamento indica que ambas as faixas espectrais refletem de forma consistente a retenção do corante pelas células viáveis, corroborando a confiabilidade dos resultados principais discutidos em 540 nm. Em contrapartida, a leitura em 630 nm apresentou um comportamento mais disperso, com angulação distinta e padrão de resposta menos definido. Esse resultado reforça a escolha da leitura em 540 nm como referência principal para interpretação da viabilidade celular, uma vez que esse comprimento de onda está consolidado na literatura como ideal para quantificação do Vermelho Neutro (Repetto *et al.*, 2008).

Outro ponto de destaque foi a identificação de uma concentração de 12,5 mg/mL como ponto de inibição letal de 50% (IL₅₀) no ensaio de Vermelho Neutro, uma vez que a viabilidade celular nesse grupo caiu para aproximadamente 50,22% em relação ao controle. Este valor indica um limite crítico de concentração a partir do qual o filme nanocompósito exerce um efeito citotóxico funcional relevante.

Quando comparados os resultados obtidos pelos dois ensaios de citotoxicidade observa-se uma divergência importante, que é coerente com as características de cada método. O ensaio de absorção de Vermelho Neutro avalia a capacidade funcional das células vivas de captar e reter o corante em seus lisossomos, o que depende da atividade metabólica intacta e da estabilidade das organelas celulares (Gonçalves; Sobral, 2020). Assim, este teste é sensível a alterações subletais precoces, como estresse oxidativo, alteração do pH lisossomal ou disfunção de membrana interna, sendo capaz de identificar efeitos citotóxicos iniciais antes que ocorra morte celular irreversível (R. Ian Freshney *et al.*, 2016). Já o ensaio de exclusão por Azul de Tripán baseia-se em um mecanismo distinto: o corante só é absorvido por células que perderam a integridade da membrana plasmática, característica de necrose avançada ou morte irreversível (Gonçalves; Sobral, 2020). Por isso, o Azul de Tripán não detecta alterações metabólicas sutis ou disfunções de organelas que não resultem imediatamente em lise celular (R. Ian Freshney *et al.*, 2016). Além disso, como a quantificação foi feita por contagem manual em câmara de Neubauer, sem leitura espectrofotométrica, o ensaio pode apresentar maior variabilidade nos resultados. Essa diferença explica por que, no presente estudo, mesmo as concentrações do

filme que reduziram significativamente a viabilidade funcional no Vermelho Neutro ($\geq 3,125$ mg/mL) não apresentaram variação estatística no Azul de Tripán. O resultado sugere que o material provoca citotoxicidade funcional subletal, mas não necessariamente induz necrose imediata no período de 24 h testado.

Portanto, a combinação dos dois ensaios amplia a compreensão do comportamento biológico do filme nanocompósito, demonstrando a importância de associar abordagens complementares na avaliação de segurança de novos materiais para embalagens ativas e biodegradáveis.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o filme nanocompósito à base de resíduos industriais de laranja e nanocristais de celulose apresenta uma fração solúvel predominante (71,2%), mantendo cerca de 28,2% de material insolúvel, o qual permanece estruturalmente intacto em meio aquoso por até 24 h, desde que não haja perturbação mecânica.

Os ensaios de citotoxicidade indicaram ausência de morte celular significativa pelo método de exclusão por Azul de Tripán, sugerindo que o material não compromete imediatamente a integridade da membrana plasmática. Por outro lado, o ensaio de absorção de Vermelho Neutro revelou redução funcional da viabilidade celular em concentrações iguais ou superiores a 3,125 mg/mL ($p < 0,03978$), destacando 12,5 mg/mL como valor próximo do IL_{50} para o período de exposição testado.

Em conjunto, esses resultados indicam que o filme possui potencial para uso como material de embalagem alimentar ativa ou biodegradável, mas que ajustes na formulação e testes complementares são recomendados para garantir estabilidade mecânica prolongada e níveis de segurança adequados para contato com alimentos ou aplicações comestíveis.

REFERÊNCIAS

AVATAR: A LENDA DE AANG. [Avatar: The Last Airbender]. Direção: Michael Dante DiMartino; Bryan Konietzko. Produção: Nickelodeon Animation Studio. Estados Unidos: Nickelodeon, 2005–2008. Série de animação.

BAYER, I. S. et al. Direct Transformation of Edible Vegetable Waste into Bioplastics. **Macromolecules**, v. 47, n. 15, p. 5135–5143, 15 jul. 2014.

BOUWMEESTER, H. et al. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 52–62, fev. 2009.

CHENG, J. et al. Applications of biodegradable materials in food packaging: A review. **Alexandria Engineering Journal**, v. 91, p. 70–83, 1 mar. 2024.

COCKBURN, A. et al. Approaches to the safety assessment of engineered nanomaterials (ENM) in food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 2224–2242, 1 jun. 2012.

COLUSSI, R. et al. Acetylated rice starches films with different levels of amylose: Mechanical, water vapor barrier, thermal, and biodegradability properties. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1614–1620, abr. 2017.

CROWLEY, L. C. et al. Measuring Cell Death by Trypan Blue Uptake and Light Microscopy. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2016, n. 7, p. 10.1101/pdb.prot087155, 2016.

DE LIMA BARIZÃO, C. et al. Biodegradable films based on commercial κ -carrageenan and cassava starch to achieve low production costs. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, n. Pt A, p. 582–590, 15 dez. 2020.

EMAMIFAR, A. et al. Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice. **Food Control**, v. 22, n. 3-4, p. 408–413, mar. 2011.

FIGUEIRA, O.; PEREIRA, V.; CASTILHO, P. C. A Two-Step Approach to Orange Peel Waste Valorization: Consecutive Extraction of Pectin and Hesperidin. **Foods**, v. 12, n. 20, p. 3834–3834, 19 out. 2023.

R IAN FRESHNEY et al. **Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications**. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, 2016.

GENET, M. B. et al. Cellulose nanocrystal-based synthetic biodegradable biopolymeric composites: A comprehensive review on recent progress. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 299, p. 140098, 21 jan. 2025.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, 19 jul. 2017.

GUERRERO, P. et al. Effect of Fructose and Ascorbic Acid on the Performance of Cross-Linked Fish Gelatin Films. **Polymers**, v. 12, n. 3, p. 570, 4 mar. 2020.

Guidance Document on using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. [s.l.] **OECD**, 2010.

HAMMER, Ø.; DAVID; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistical Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, v. 4, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2001.

HAN, J. H. Innovations in food packaging. **Amsterdam: Academic Press**, 2013.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5:2009 — Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: ISO, 2009.

JAMBECK, J. R. Plastic Waste Inputs from Land into the Ocean. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 768–771, 13 fev. 2015.

GONÇALVES, Juan Carlos Ramos; SOBRAL, Marianna Vieira (Org.). Cultivo de células: da teoria à bancada. João Pessoa: Editora UFPB, 2020.

GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 29, n. 1, p. 39–50, 13 jul. 2007.

MANSOURY, M. et al. The edge effect: A global problem. The trouble with culturing cells in 96-well plates. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 26, p. 100987, 2021.

MELO, P. E. F. et al. Antioxidant films from mango kernel components. **Food Hydrocolloids**, v. 95, p. 487–495, 1 out. 2019.

NILSEN-NYGAARD, J. et al. Current status of biobased and biodegradable food packaging materials: Impact on food quality and effect of innovative processing technologies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 1333–1380, 6 fev. 2021.

OLIVEIRA, A. V. et al. Nanocomposite Films from Mango Kernel or Corn Starch with Starch Nanocrystals. **Starch - Stärke**, v. 70, n. 11-12, 9 maio 2018.

PEROTTO, G. et al. Bioplastics from vegetable waste via an eco-friendly water-based process. **Green Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 894–902, 2018.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 12 2008.

SHAH, A. A. et al. Biological Degradation of plastics: a Comprehensive Review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 246–265, maio 2008.

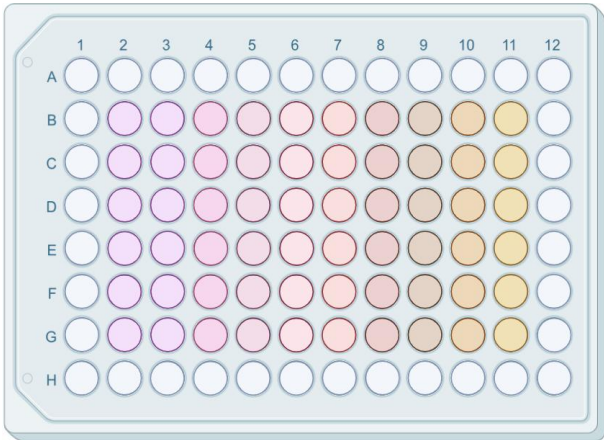
SINGH, N.; WALKER, T. R. Plastic recycling: A panacea or environmental pollution problem. npj **Materials Sustainability**, v. 2, n. 1, 1 ago. 2024.

XU, Y. et al. Development and properties of bacterial cellulose, curcumin, and chitosan composite biodegradable films for active packaging materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 260, p. 117778, maio 2021.

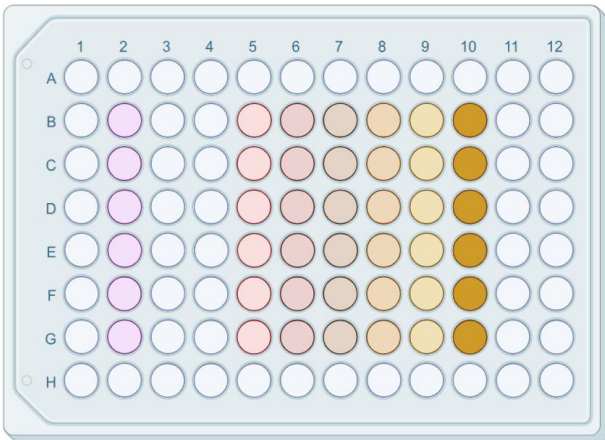
XU, Y. et al. Nanocellulose Composite Films in Food Packaging Materials: A Review. **Polymers**, v. 16, n. 3, p. 423, 1 jan. 2024.

APÊNDICES

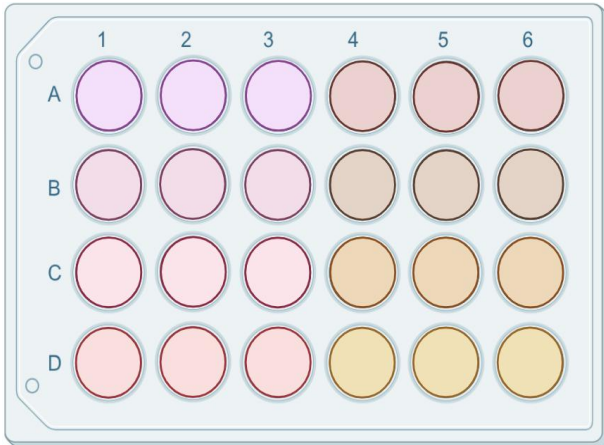
APÊNDICE A – MAPAS DE PLACA



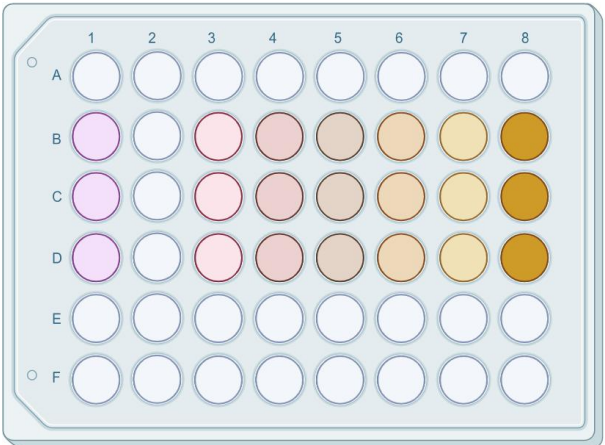
Apêndice A Fig. 1 | Mapa de placa de 96 poços utilizado no ensaio preliminar de absorção do vermelho neutro. Poços brancos (preenchidos com PBS): linhas A e E e colunas 1 e 12; Controle: colunas 2 e 3; Tratamentos: colunas 4 (0,0001 µg/mL), 5 (0,001 µg/mL), 6 (0,01 µg/mL), 7 (0,1 µg/mL), 8 (1 µg/mL), 9 (10 µg/mL), 10 (100 µg/mL) e 11 (1000 µg/mL).



Apêndice A Fig. 2 | Mapa de placa de 96 poços utilizado no ensaio principal de absorção do vermelho neutro. Poços brancos (preenchidos com PBS): linhas A e E e colunas 1, 3, 4, 11 e 12; Controle: coluna 2; Tratamentos: colunas 5 (1,56 mg/mL), 6 (3,125 mg/mL), 7 (6,25 mg/mL), 8 (12,5 mg/mL), 9 (25 mg/mL) e 10 (50 mg/mL).



Apêndice A Fig. 3 | Mapa de placa de 24 poços utilizado no ensaio preliminar de exclusão por azul de tripan. Controle: A1-3; Tratamentos: B1-3 (0,001 µg/mL), C1-3 (0,01 µg/mL), D1-3 (0,1 µg/mL), A4-6 (1 µg/mL), B4-6 (10 µg/mL), C4-6 (100 µg/mL), D4-6 (1000 µg/mL).



Apêndice A Fig. 4 | Mapa de placa de 48 poços utilizado no ensaio principal de exclusão por azul de tripan. Poços brancos (preenchidos com PBS): Linhas A, E e F e coluna 2; Controle: coluna 1; Tratamentos: colunas 3 (1,56 mg/mL), 4 (3,25 mg/mL), 5 (6,25 mg/mL), 6 (12,5 mg/mL), 7 (25 mg/mL) e 8 (50 mg/mL).

APÊNDICE B – OUTPUTS ESTATÍSTICOS DO ENSAIO DE VERMELHO NEUTRO

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
Test for equal means						
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)	Critical F(p=0.05)
Between groups:	0,0103958	6	0,00173263	39,41	3,751E-14	2,372
Within groups:	0,00153867	35	4,39619E-05		Permutation p (n=99999)	
Total:	0,0119345	41			1E-05	
Components of variance (only for random effects):						
Var(group):	0,000281446	Var(error):	4,39619E-05	ICC:	0,864902	
omega²:	0,8459					
Levene's test for homogeneity of variance, from means				p (same):	0,1639	
Levene's test, from medians				p (same):	0,2791	
Welch Ftest in the case of unequal variances: F=69,79, df=14,47, p=7,48E-10						
Bayes factor: 2,576E11 (decisive evidence for unequal means)						

Apêndice B Fig. 1 | Output do teste de análise de variância (ANOVA one-way) realizado no software PAST, referente ao ensaio de absorção do Vermelho Neutro. A análise mostra diferença estatística significativa entre os grupos tratados e o controle ($p < 0,0001$).

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc	
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal. Significant comparisons are pink.							Copenhaver-Holland 1988
	Controle	1,56 mg/mL	3,125 mg/mL	6,25 mg/mL	12,5 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL
Controle		0,3565	0,03978	1,61E-06	3,149E-08	1,881E-10	5,628E-13
1,56 mg/mL	3,017		0,9274	0,0009231	1,675E-05	6,651E-08	1,338E-10
3,125 mg/mL	4,556	1,539		0,01861	0,0004304	1,61E-06	2,447E-09
6,25 mg/mL	9,544	6,527	4,987		0,8237	0,03978	7,04E-05
12,5 mg/mL	11,45	8,435	6,896	1,909		0,5112	0,003614
25 mg/mL	14,1	11,08	9,544	4,556	2,648		0,2895
50 mg/mL	17,3	14,28	12,75	7,758	5,849	3,202	

Apêndice B Fig. 2 | Output do teste post hoc de Tukey, realizado no software PAST, referente ao ensaio de absorção do Vermelho Neutro. O teste evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos grupos tratados e do controle, a partir da concentração de 3,125 mg/mL ($p < 0,05$).

APÊNDICE C – OUTPUTS ESTATÍSTICOS DO ENSAIO DE AZUL DE TRIPAN

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
Test for equal means						
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)	Critical F(p=0.05)
Between groups:	214,6	6	35,7666	0,6955	0,6576	2,848
Within groups:	720,011	14	51,4294		Permutation p (n=99999)	
Total:	934,611	20			0,6559	
Components of variance (only for random effects):						
Var(group):	-5,22092	Var(error):	51,4294	ICC:	-0,112986	
omega²:	0					
Levene's test for homogeneity of variance, from means				p (same):	0,2576	
Levene's test, from medians				p (same):	0,7805	
Welch Ftest in the case of unequal variances: F=1,438, df=5,965, p=0,3358						
Bayes factor: 0,1128 (substantial evidence for equal means)						

Apêndice C Fig. 1 | Output do teste de análise de variância (ANOVA one-way) realizado no software PAST, referente ao ensaio de exclusão por Azul de Tripán. A análise mostra ausência de diferença estatística significativa entre os grupos tratados e o controle ($p = 0,6576$).

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc	
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal. Significant comparisons are pink.							
Copenhaver-Holland 1988							
	Controle	1,56 mg/mL	3,125 mg/mL	6,25 mg/mL	12,5 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL
Controle		0,9992	1	0,9984	1	0,9874	0,922
1,56 mg/mL	0,6219		0,9999	1	0,9976	0,8913	0,726
3,125 mg/mL	0,1613	0,4606		0,9996	1	0,9742	0,8826
6,25 mg/mL	0,7092	0,08732	0,5479		0,9957	0,8672	0,6913
12,5 mg/mL	0,1406	0,7625	0,3019	0,8498		0,9941	0,9487
25 mg/mL	1,044	1,666	1,205	1,753	0,9034		0,9998
50 mg/mL	1,537	2,159	1,699	2,246	1,397	0,4932	

Apêndice C Fig. 2 | Output do teste post hoc de Tukey, realizado no software PAST, referente ao ensaio de exclusão por Azul de Tripán. O teste evidenciou ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos grupos tratados e do controle ($p > 0,05$).