

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PEDRO HENRIQUE SOUSA LOPES

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS QUE INCORPORAM O
ÓLEO ESSENCIAL DE *Lithraea brasiliensis* Marchand: AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ATIVIDADE LEISHMANICIDA E
CITOTOXICIDADE**

SÃO LUÍS
2023

PEDRO HENRIQUE SOUSA LOPES

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS QUE INCORPORAM O
ÓLEO ESSENCIAL DE *Lithraea brasiliensis* Marchand: AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ATIVIDADE LEISHMANICIDA E
CITOTOXICIDADE**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em Química pelo
Programa de Pós-graduação em Química da
Universidade Federal do Maranhão

Orientadora: Prof.^a. Dra. Ana Clécia Santos de
Alcântara

Coorientadora: Prof.^a. Dra. Mayara Cristina
Pinto da Silva

SÃO LUÍS
2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Lopes, Pedro Henrique Sousa.

DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS QUE INCORPORAM
O ÓLEO ESSENCIAL DE *Lithraea brasiliensis* Marchand:
AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ATIVIDADE
LEISHMANICIDA E CITOTOXICIDADE / Pedro Henrique Sousa
Lopes. - 2023.

58 f.

Coorientador(a): Mayara Cristina Pinto da Silva.

Orientador(a): Ana Clécia Santos de Alcântara.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luis,
2023.

1. Anti-Leishmania. 2. Biofilmes. 3. Biopolímeros.
4. Óleo essencial. I. Alcântara, Ana Clécia Santos de.
II. Silva, Mayara Cristina Pinto da. III. Título.

PEDRO HENRIQUE SOUSA LOPES

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS QUE INCORPORAM O
ÓLEO ESSENCIAL DE *Lithraea brasiliensis* Marchand: AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ATIVIDADE LEISHMANICIDA E
CITOTOXICIDADE**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em Química pelo
Programa de Pós-graduação em Química da
Universidade Federal do Maranhão

São Luís, 24 de março de 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Ana Clécia Santos de Alcântara (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão – Departamento de Química

Prof.Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra
Universidade Federal do Maranhão – Departamento de Química

Prof.^a Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho
Universidade Federal do Piauí – Departamento de Química

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Ana Alcântara por toda confiança e orientação para a realização deste trabalho. Muita gratidão por ter me apoiado, acreditado no meu potencial e contribuído para minha formação como professor, pesquisador e pessoa ao longo desse tempo.

À Prof.^a Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva pelo apoio para a realização deste trabalho e por sempre manter as portas do seu laboratório abertas. Obrigada pela confiança.

Ao Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia (LPI) pela realização dos ensaios biológicos. Em especial, agradeço a Aline Santana pelo auxílio e paciência nessa nova área de estudo.

Ao Centro de Ciência Exatas e Tecnologia – UFMA pela infraestrutura oferecida que proporcionou o desenvolvimento desta pesquisa. Em especial, a Central Analítica.

Ao Programa de Pós-graduação em Química da UFMA.

À FAPEMA pela bolsa concedida.

Aos meus pais, por terem acreditado em mim, confiando que daria certo, mesmo nos momentos difíceis. Por essas razões vocês merecem tanto quanto eu ver mais esse sonho realizado.

Aos amigos que fiz no Bionanos durante todos esses anos, meu muito obrigado por todo apoio na realização desse trabalho.

À Universidade Federal do Maranhão pela minha formação me proporcionando mais uma oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

RESUMO

Os biopolímeros são compostos químicos produzidos por seres vivos ou matérias primas de fontes renováveis de energia, que têm a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso. Devido as suas propriedades físico-químicas, bem como caráter biocompatível e biodegradável, estes tipos de materiais são amplamente utilizados na indústria farmacêutica. Este trabalho teve como objetivo preparar filmes autossustentados de carboximetilcelulose combinados com o polissacarídeo alginato de sódio ou a proteína zeína, os quais foram utilizados como matrizes biopoliméricas para o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*. Os filmes preparados foram caracterizados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), por análises térmicas TG/DTG e DSC, bem como as taxas de transmissão de vapores de água também foram investigados. Após a caracterização química, foram realizados os testes de citotoxicidade *in vitro* utilizando eritrócitos de carneiro e células de linhagem RAW. Quanto a atividade leishmanicida em promastigota de *Leishmania amazonensis*, o ensaio foi através do método de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) - 2,5-difenil-2H-tetrazólio). Os biofilmes sintetizados indicaram uma melhor estabilidade térmica e química do óleo essencial uma vez encapsulado na matriz biopolimérica comparada ao óleo puro, garantindo uma boa retenção dos constituintes do óleo essencial, sendo altamente promissor para aplicação farmacológica, enquanto o ensaio citotóxico em eritrócitos de ovelhas e em células RAW, expressou correlação de resultados, em que o tratamento com os filmes sintetizados não apresentou toxicidade relevante, sendo caracterizado o sistema como dose dependente para células RAW. Ao analisar os filmes sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, foi concluído que houve toxicidade em todas as amostras testadas. Sendo assim, os biofilmes despertam interesse, uma vez que são capazes de inibir e interferir no curso das leishmanioses. Esses resultados nos direcionam para futuras investigações, uma vez que existem poucos estudos relacionados a essa tecnologia do material e das características do óleo essencial.

Palavras-chaves: biopolímeros, óleo essencial, anti-Leishmania, biofilmes.

ABSTRACT

Biopolymers are chemical compounds produced by living beings or raw materials from renewable energy sources, which have the ability to form gels and viscous solutions in an aqueous medium. Due to their physicochemical properties, as well as their biocompatible and biodegradable character, these types of materials are widely used in the pharmaceutical industry. The objective of this work was to prepare self-supporting carboxymethylcellulose films combined with the polysaccharide sodium alginate or the zein protein, which were used as biopolymeric matrices for the essential oil of *Lithraea brasiliensis*. The prepared films were characterized by vibrational spectroscopy in the infrared region (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), TG/DTG and DSC thermal analysis, as well as the transmission rates of water vapors were also investigated. After chemical characterization, in vitro cytotoxicity tests were performed using sheep erythrocytes and RAW cells. As for the leishmanicidal activity in promastigotes of *Leishmania amazonensis*, the test was performed using the MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). The synthesized biofilms indicated a better thermal and chemical stability of the essential oil once encapsulated in the biopolymeric matrix compared to the pure oil, ensuring good retention of the essential oil constituents, being highly promising for pharmacological application, while the cytotoxic assay in erythrocytes from sheep and in RAW cells, expressed correlation of results, in which the treatment with the synthesized films did not present relevant toxicity, being characterized the system as dose dependent for RAW cells. When analyzing the films on the promastigotes forms of *Leishmania amazonensis*, it was concluded that there was toxicity in all tested samples. Therefore, biofilms arouse interest, since they are capable of inhibiting and interfering with the course of leishmaniasis. These results direct us to future investigations, since there are few studies related to this technology of the material and the characteristics of the essential oil.

Keywords: biopolymers, essential oil, anti-*Leishmania*, biofilms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organograma da classificação dos polímeros.....	15
Figura 2: Estrutura molecular do composto carboximetilcelulose.....	17
Figura 3: Representação da estrutura dos meros e do polímero natural alginato.....	18
Figura 4: Modelo caixa de ovos para o alginato.....	19
Figura 5: Estrutura da unidade monomérica de zeína e estrutura computacional da zeína.....	20
Figura 6: Frutos de <i>Lithraea brasiliensis</i>	21
Figura 7: Ilustração do protozoário <i>Leishmania</i> (a), Lesão cutânea de leishmaniose...23	
Figura 8: Sistema de hidrodestilação.....	25
Figura 9: Células de permeabilidade.....	27
Figura 10: Cromatograma do óleo essencial de <i>Lithraea brasiliensis</i>	32
Figura 11: (A) CMC – ZN 0,25%, (B) CMC – ZN 0,5% (C) CMC – AS 0,25%, (D) CMC – AS 0,5%.....	34
Figura 12: Espectro FTIR do OR <i>Lithraea brasiliensis</i> e dos filmes.....	36
Figura 13: Curva DSC do Óleo de <i>Lithraeae brasiliensis</i> e dos filmes de alginato.....	37
Figura 14: Curva TGA obtidas para os filmes, sob atmosfera de N ₂	39
Figura 15: Micrografias das superfícies (direita) e seção transversal (direita) dos sintetizados.....	42
Figura 16: Taxa de transmissão de vapor de água dos filmes.....	42
Figura 17: Percentual de hemólise dos biofilmes em eritrócitos de carneiro. Os resultados correspondem a (médias \pm SD) de amostras individuais testadas em triplicata.....	44
Figura 18: Percentual de citotoxicidade dos biofilmes (a) e do óleo essencial de <i>L.B</i> (b) em células RAW.....	45
Figura 19: Citotoxicidade dos biofilmes de Alginato e Zeína em promastigotas <i>L. amazonensis</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração (m/m) dos componentes do filme.....	26
Tabela 2. Concentração (m/m%) dos componentes do óleo.....	33
Tabela 3. Percentual de solubilidade dos filmes.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AS	Alginato de sódio
CMC	Carboximetilcelulose
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformata em Fourier
HATR	Acessório Horizontal de Reflectância Total Atenuada
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) - 2,5-difenil-2H-tetrazólio
<i>L. brasiliensis</i>	<i>Lithraea brasiliensis</i>
OE LB	Óleo essencial de <i>Lithraea brasiliensis</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
TVA	Taxa de transmissão de vapor de água
WHO	World Organization Health
ZN	Zeína

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Polímeros	15
2.2 Carboximetilcelulose	17
2.3 Alginato.....	18
2.4 Zeína.....	20
2.5 <i>Lithraea brasiliensis Marchand</i>	21
2.6 Leishmaniose.....	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 METODOLOGIA	25
4.1 Materiais e reagentes	25
4.2 Extração do óleo essencial de <i>Lithraea brasiliensis</i>	25
4.3 Produção de filmes.....	26
4.4 Caracterização dos materiais	27
4.4.1 Taxa de transmissão de vapor de água	27
4.4.2 Teste de solubilidade.....	27
4.4.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.....	28
4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	28
4.4.5 Análises térmicas	28
4.4.5.1 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	28
4.4.5.2 Análise termogravimétrica (TGA) e termogravimetria derivada.....	28
4.4.6 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)....	28
4.5 Ensaios biológicos	29
4.5.1 Teste de hemólise com eritrócitos de carneiro.....	29

4.5.2 Ensaio de citotoxicidade celular in vitro.....	30
4.5.3 Citotoxicidade promastigotas (<i>Leishmania amazonensis</i>).....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Caracterização do óleo essencial de <i>Lithraea brasiliensis</i>	32
5.1.1 Caracterização físico-química dos biofilmes que incorporam o óleo essencial de <i>Lithraea brasiliensis</i>	34
5.2 Teste de hemólise com eritrócitos de carneiro.....	43
5.3 Ensaio de citotoxicidade em células RAW-264.7.....	45
5.4 Avaliação da atividade em promastigota de <i>Lithraea amazonenses</i>	45
6 CONCLUSÃO.....	47
7 REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

Avanços tecnológicos trouxeram inovadores métodos de distribuição fisiológica de medicamentos. Diferentes sistemas carreadores têm sido extensivamente estudados com o objetivo de controlar a liberação de substâncias ativas e melhorar a eficácia e a seletividade das formulações (FLORES et al., 2011). Sistemas de administração convencionais, como spray, injeção e pílulas, apresentam um aumento na concentração do fármaco, logo após a administração dele, atingem um pico máximo de dosagem no sangue e depois declinam, conforme o tempo de ação do medicamento. Com a liberação controlada tem-se uma constância na liberação durante a maior faixa de tempo (LYRA, 2007).

Materiais desenvolvidos neste campo devem apresentar características tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e propriedades físico-químicas e biológicas conhecidas (CHEN et al., 2016; MOLINA et al., 2015). Por meio de matrizes poliméricas, a liberação de ativos tem sido comprovada como uma interação complexa entre intumescimento, difusão, erosão e relaxação (BAZZO et al., 2008). Essa técnica tem como principais vantagens a liberação à uma vazão mássica controlada durante períodos prolongados, a perda de material pode ser evitada ou reduzida durante o processo e armazenamento (POTHAKAMURY; BARBOSA-CANOVÁS, 1995).

Existem dois tipos de abordagens que podem ser usadas para a liberação de fármacos, a liberação controlada ou a liberação específica, sendo a liberação controlada um tipo de formulação concebida de forma a prolongar a dissolução do fármaco e a sua absorção, até que o mesmo chegue ao local desejado (FREIRE et al, 2006). Em vista disso, a liberação de fármacos de forma sistemática é parte significativa da investigação farmacêutica, além de que a maioria dos sistemas de liberação de fármacos ter como base as matrizes poliméricas.

Os polímeros naturais têm sido usados como alternativas para a geração de biomateriais utilizados em aplicações biomédicas. A maior vantagem destes materiais é sua elevada disponibilidade da matéria prima além de serem biodegradáveis (MITSUKA, 2007). Por outro lado, o interesse das indústrias de produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, pelo uso de extratos bioativos e de substâncias bioativas procedentes de plantas, é crescente, com vistas, principalmente, ao desenvolvimento de produtos funcionais (CYBORAN et al., 2014). A utilização dos compostos bioativos, como os fenólicos, óleos essenciais, alcalóides, carotenóides e terpenóides na produção de cosméticos e fármacos tem sido limitada, principalmente, por serem pouco solúveis em

água e apresentarem baixa absorção e, também, por não serem capazes de atravessar as membranas lipídicas das células ou por terem tamanho molecular excessivamente alto, o que pode levar à perda de biodisponibilidade e de eficácia (BONIFÁCIO et al., 2014). A instabilidade química durante a estocagem (temperatura, presença de oxigênio, luz etc.) é outro fator que pode limitar o desenvolvimento de tais produtos (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). Uma das formas possíveis de se reduzir os inconvenientes acima referidos, seria a utilização da encapsulação de tais compostos ativos em materiais poliméricos que além de atuarem como carreadores, podem facilitar e aumentar o controle da estabilidade, melhorar a solubilidade, a biodisponibilidade e controlar a liberação de compostos bioativos (ABBAS et al., 2015; NEVES et al., 2015).

O gênero *Lithraea* pertence à família Anacardiaceae e compreende três espécies de plantas que são comuns em partes da América do Sul: *Lithraea caustica*, presente na Argentina e Chile, e *Lithraea mielloide* e *Lithraea brasiliensis*, presente no Brasil, Uruguai e Argentina. As plantas pertencentes ao gênero *Lithraea* são descritas apresentando atividades antimicrobianas, antivirais e citotóxicas (RUFFA et al., 2002), e a *Lithraea brasiliensis*, conhecida como “aroeira”, “aroeira-braba” ou “aroeira preta” também mostrou atividade promissora contra microrganismos (SHIMIZU et al., 2006), apesar de ser reportado propriedades irritantes (ALÉ et al., 1997; PIENNAR; TEICHMAN, 1998).

A técnica de encapsulação é um procedimento que vem sendo empregado com a finalidade de reduzir e/ou prevenir os processos de degradação até que os compostos cheguem aos sítios onde sua absorção é desejada (DE VOS et al., 2010). Trata-se de uma tecnologia onde o composto bioativo é envolto por uma barreira física. Além disso, essa técnica possibilita o empacotamento de sólidos, líquidos ou gás em pequenas cápsulas que liberam o seu conteúdo por períodos prolongados em condições específicas, aumentando a biodisponibilidade do composto encapsulado (NEDOVIC et al., 2011).

Mediante o exposto, o presente trabalho visa a utilização de filmes biopoliméricos na encapsulação de princípios ativos naturais, contemplando suas caracterizações utilizando diversas técnicas físico-químicas, até sua aplicação em sistemas *in vitro* com a avaliação da toxicidade frente células saudáveis, bem como a atividade leishmanicida dos biofilmes.

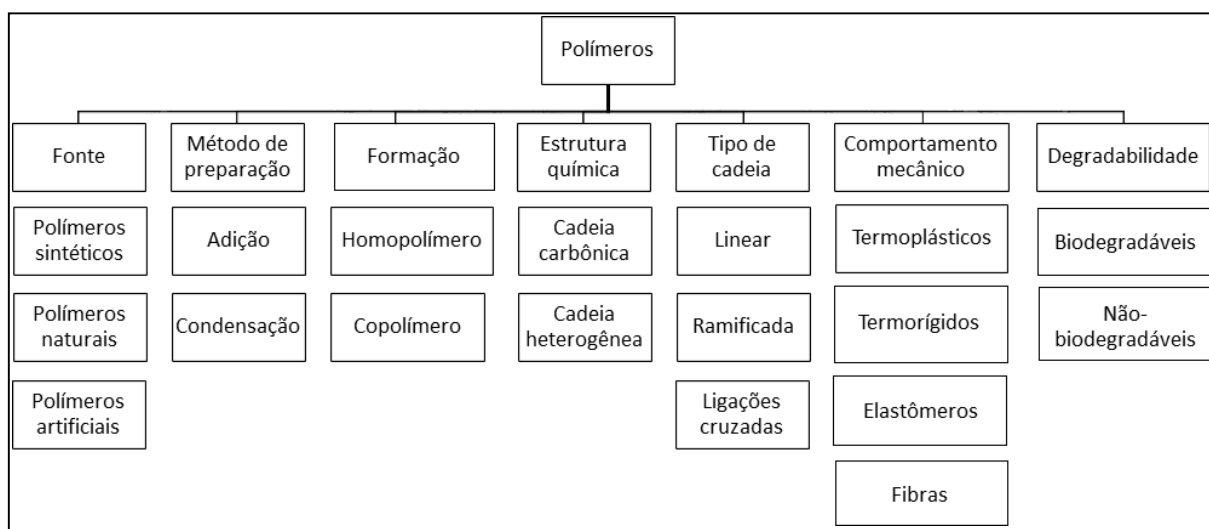
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Polímeros

Os polímeros são macromoléculas que se caracterizam através de suas interações intra e intermoleculares, pela sua estrutura química e por seu tamanho. Essas macromoléculas possuem elevadas massas moleculares, podendo ter unidades estruturais repetidas (monômeros), sendo que a denominação do polímero deriva das palavras gregas “polis”, que significa muitas, e “meros”, que significa partes (MANO et al., 2015).

A classificação dos polímeros depende da origem desses materiais, do método de preparação, da formação, estrutura química e do tipo de cadeia polimérica, do comportamento mecânico e da degradabilidade, conforme apresentado na Figura 1 (CANEVAROLO JR., 2006).

Figura 1: Organograma da classificação dos polímeros.



Fonte: Adaptado de CALLISTER e RETHWISCH (2016) e CANEVAROLO JR (2006).

Os polímeros geralmente são materiais resistentes a biodegradação, devido a sua estrutura química e elevada massa molar, porém atualmente existe a tendência a buscar soluções para a diminuição dos resíduos gerados por tais materiais. Tal fato leva a uma procura pela substituição de polímeros sintéticos por biopolímeros devido a biodegradabilidade, além da possibilidade de uso em áreas como as indústrias médica e alimentícia. Apesar destas vantagens, os polímeros biodegradáveis nem sempre possuem as propriedades físico-químicas ou mecânicas adequadas para aplicação direta nas áreas acima citadas, para isso torna-se necessário que sejam feitas mudanças em suas estruturas, seja através de transformações químicas, misturas poliméricas, formação de compósitos ou incorporação de aditivos (SANTOS, 2017).

Os polímeros naturais tendem a possuir cadeias proteicas ou polissacarídicas. A vantagem de uso desse tipo de polímero se deve à similaridade e compatibilidade com o ambiente de feridas e da matriz extracelular da pele. Entretanto, quando comparados aos polímeros sintéticos, tendem a apresentar maior heterogeneidade e variação de composição quanto à sua origem (DAVIS; MCLISTER, 2016).

Entre os polímeros naturais e sintéticos mais utilizados, destacam-se os polissacarídeos. Normalmente abundantes, os polissacarídeos são obtidos a partir de fontes renováveis, apresentam baixo custo de produção e propriedades peculiares, em que, dependendo do grupo funcional presente na estrutura, é possível fazer uma derivação química capaz de criar um polímero com novas propriedades (MATRICARDI et al., 2013).

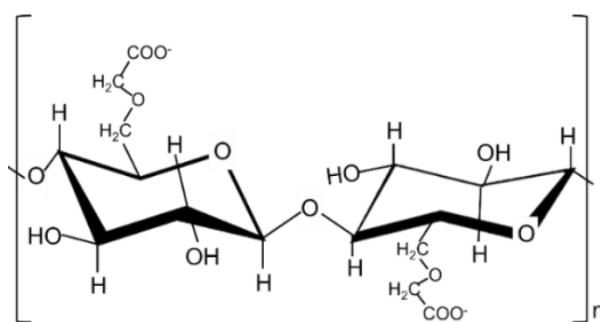
Os biopolímeros possuem aplicações importantes na área biomédica, especialmente devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e características físico-químicas. Além disso, são formadores de filme ou de gel, apresentando propriedades espessantes (RINAUDO, 2008). Na literatura são encontrados diversos estudos relacionados às aplicações do alginato, da zeína e da carboximetilcelulose como polímeros para produção de sistemas de liberação de fármacos, fato que demonstra seu potencial de aplicação na área.

Trevisol *et al.*, (2018) avaliaram a viabilidade de uso de filmes em mono e bicamada em diferentes proporções de alginato e carboximetilcelulose (CMC) para liberação controlada de diclofenaco de sódio em meio líquido visando sua aplicação como curativos. Canoff *et al.*, (2022) desenvolveram e caracterizaram filmes poliméricos contendo extrato de *P. cauliflora* com potencial de aplicação curativa diferenciada de lesões. Para o preparo dos filmes foi utilizado o agente polimérico biodegradável carboximetilcelulose, e glicerol como agente plastificante. Já Sousa *et al.*, (2018) realizaram a preparação e a caracterização de filmes de carboximetilcelulose sódica (NaCMC) impregnados com extratos de própolis marrom e avaliaram a capacidade antioxidante e a atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*.

2.2 Carboximetilcelulose

O CMC (Figura 2) é um copolímero de duas unidades: β -D-glucose e β -D-glucopiranosose 2-O-(carboximetil)-sal mono-sódico, distribuídas ao longo de macromoléculas interligadas via ligações β -1,4-glicosídica (TOGRUL; ARSLAN, 2003). Por apresentar uma pequena parte hidrofóbica em sua estrutura molecular e, ao mesmo tempo, vários grupos carboxil hidrofílicos, este polissacarídeo possui características anfifílicas, o que permite promover interação entre meios com diferentes polaridades (SU et al., 2010).

Figura 2: Estrutura molecular do polímero carboximetilcelulose



Fonte: FERNANDES (2021).

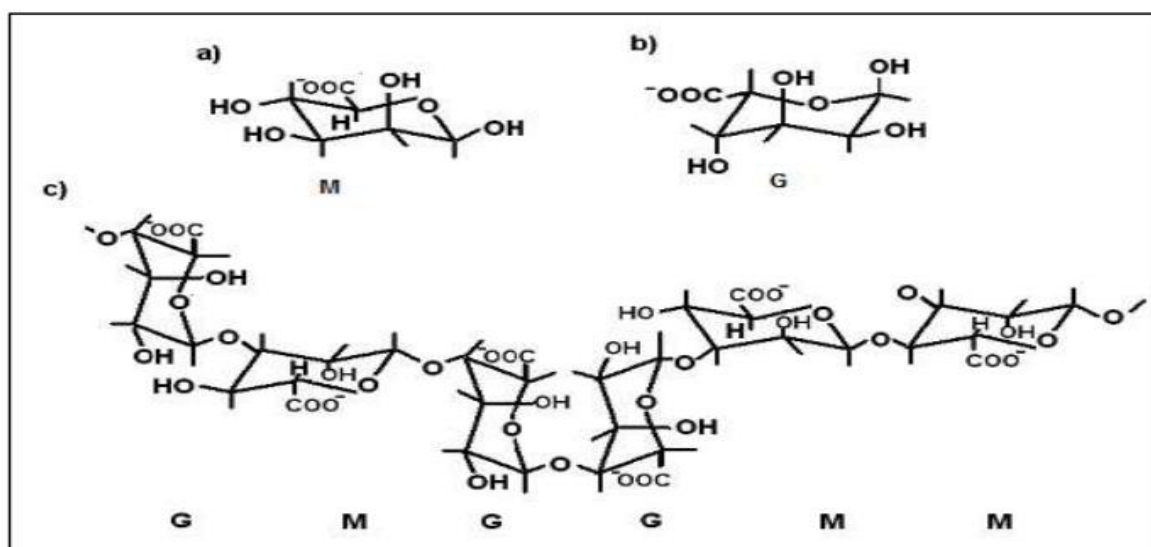
A carboximetilcelulose sódica é amplamente utilizada como espessante alimentar. Quimicamente ela é classificada como um polímero aniônico derivado de um éter carboximetílico de celulose. A celulose é o principal polissacarídeo constituinte dos vegetais. Na indústria a CMC é modificada quimicamente, transformando-se num produto similar à celulose, mas muito solúvel em água. Tem aspecto de pó de cor branco, ligeiramente amarelado, capaz de formar soluções viscosas e géis dependendo da concentração, apresenta potencial hidroscópico relativamente baixo (SANTOS, 2018).

O desenvolvimento de filme curativo com propriedade antibacteriana por Grumezescu e colaboradores (2014), possui em sua formulação CMC como polímero aniônico. Este filme mostrou atividade em diferentes funções vasculares e respostas inflamatórias, podendo ser usado como suporte de regeneração para pele, além de melhorar a resistência à colonização por *Staphylococcus aureus*. Neste contexto, o CMC não somente apresenta propriedades estruturais, mas também funcionais no processo de cicatrização.

2.3 Alginato

O ácido algínico (como também é chamado) é encontrado em alguns tipos de algas marrons e é similar à celulose (STEVENS, 2009). Considerado um copolímero linear, o alginato é formado pela repetição de dois monômeros distintos, o (1,4)- α -Lguluronato ou unidade G e o (1,4)- β -D-manuronato ou unidade M (Figura 3). Ele abrange cadeias de ácido glucurônico e ácido manurônico, com o comprimento e a quantidade de blocos glucurônicos tendo impacto direto em suas propriedades mecânicas e físicas (BEKIN *et al.*, 2014; SHALABY; BURG, 2004).

Figura 3: Representação da estrutura dos meros e do polímero natural alginato.



(a) meros dos ácidos β -D-manurônico (bloco M);

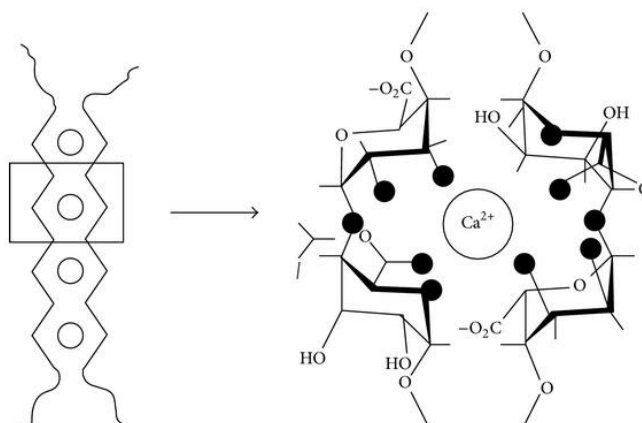
(b) α -L-gulurônico (bloco G);

(c) polímero natural alginato.

Fonte: ERTESVÁG; VALLA (1998); SANKALIA *et al.*, (2007).

As propriedades mecânicas dos filmes de alginato estão diretamente relacionadas ao número de sítios “caixas de ovos” (Figura 4). Assim, as características do filme tais como resistência mecânica, propriedades de barreira, coesão e rigidez podem ser melhoradas. Apesar do mecanismo de gelificação do alginato ainda não ser completamente compreendido, acredita-se que os cátions metálicos polivalentes tendem a quelar os grupos carboxilato e hidroxila do alginato. Esta quelação é uma espécie de ponte entre o íon metálico e os dois grupos carboxilatos e um ou mais pares dos grupos hidroxila ocorre através de ligações parcialmente iônicas e parcialmente coordenadas, respectivamente (KAFRANI; SHEKARCHIZADEH; BEHABADI, 2016).

Figura 4: Modelo “caixa de ovos” para o alginato



Fonte: Adaptado de I. Braccini and S. Perez (2001).

Os alginatos são atualmente processados como polímeros biocompatíveis de alta pureza e baixa toxicidade (MATA et al., 2011; YOO et al., 2006). Esses compostos têm sido comumente aplicados em sistemas de microencapsulação e liberação controlada, especificamente para proteína (GEORGE; ABRAHAM, 2006; MÖBUS et al., 2012) e enzimas (HAIDER; HUSAIN, 2008) visto que podem formar um gel com elevada porosidade em temperatura ambiente, permitindo altas taxas de difusão de macromoléculas, podendo ainda se dissolver e biodegradar em condições fisiológicas normais (GOMBOTZ; WEE, 2012).

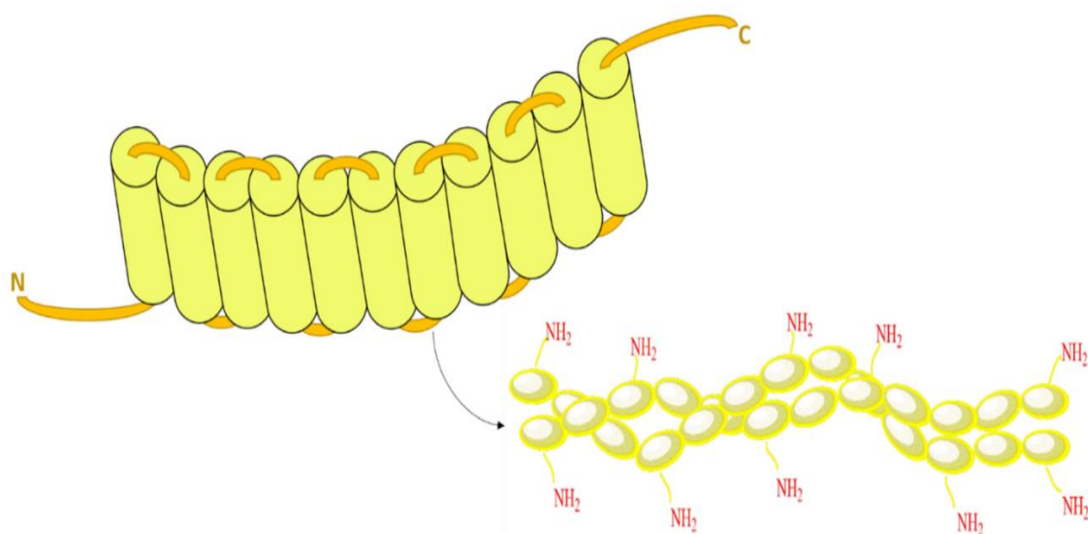
Pesquisas relacionadas a biofilmes de alginato de sódio mostram que eles se adequam bem aos propósitos farmacêuticos/medicinais. Segundo Patel (1993), eles têm sido constantemente utilizados como curativos, sem apresentação de reações alérgicas na pele. Em vista da sua alta capacidade de absorção pela formação de um forte gel hidrofílico, podem ser utilizados para o tratamento de lesões secretoras, diminuindo a contaminação bacteriana. Os alginatos geram sinais pró-inflamatórios que, com a ativação de macrófagos humanos, propiciam o processo de cicatrização (THOMAS *et al.*, 2000). Além disso, são capazes de manter o ambiente de cicatrização fisiologicamente úmido, favorecendo a formação do tecido de granulação, onde há a proliferação de células endoteliais vasculares e fibroblastos, e a consequente cura (MOTTA, 1989).

2.4 Zeína

A zeína é um dos polímeros naturais mais amplamente usados e é responsável por cerca de 50% da proteína do milho (LUO; WANG, 2014). Presente predominantemente no endosperma dos grãos de milho e pertencente ao grupo das prolaminas, tem sido o foco de pesquisa atual sobre o encapsulamento de compostos bioativos (LIU et al., 2019).

A estrutura principal da zeína (Figura 5) é descrita como uma conformação helicoidal de roda contendo nove unidades de repetição homólogas de uma forma antiparalela (ARGOS et al., 1982). A solubilidade e a alta reatividade química da zeína são determinadas pela presença de seus grupos funcionais. Devido à presença de grupos hidrocarbonetos nas cadeias laterais, a zeína é insolúvel em água, mas é solúvel em misturas de água com álcoois alifáticos, tais como etanol e isopropanol, e também em vários solventes orgânicos, contendo hidroxilas, carbonilas, amina e outros grupos polares (MARK, 2014; LASZTITY, 2017).

Figura 5: Estrutura da unidade monomérica de zeína.



Fonte: ABDELSALAM et al, (2021).

O interesse científico na zeína deve-se entre outros, à sua capacidade para formar filmes biodegradáveis, flexíveis, de baixo custo em comparação a outros polímeros e resistentes, que fornecem proteção contra ataques microbianos, indicando sua eficácia para a produção de micro/nanopartículas usadas como sistema de entrega de nutrientes e drogas (LUO; WANG, 2014; SHUKLA; CHERYAN, 2001).

As zeínas tem sido de interesse para os processadores comerciais desde a sua descoberta. Revestimentos de zeína parecem ser uma das suas aplicações mais

promissoras. Durante os anos 1970, cerca de 75% da produção anual de 500 toneladas, foi utilizado na forma de revestimento de comprimidos medicinais (REINERS, 1973).

A estrutura de polímero anfifílico de zeína permite que ela apresente pequenos glóbulos com diâmetros entre 150 e 550 nm em solução aquosa de etanol. A molécula tem forma semelhante a um tijolo e, assim, permite que ela transporte outras moléculas dentro dela (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; LAI; GUO, 2011). Um exemplo é o medicamento digitalico “gitoxina”, em que a zeína promoveu o encapsulamento e liberação sustentada do ativo (ZHONG; JIN, 2009)

2.5 *Lithraea brasiliensis* Marchand

A *Lithraea brasiliensis* conhecida popularmente como “aroeira”, “aroeira-brava” ou aroeira-preta”, pertencente à família Anacardiaceae, compreendendo três espécies de plantas que são comuns em partes da América do Sul: *Lithraea caustica*, presente na Argentina e Chile, *Lithraea mielloide*, e *Lithraea brasiliensis*, presente no Brasil, Uruguai e Argentina (ALÉ et al., 1997; PIENNAR, TEICHMAN, 1998).

Lithraea brasiliensis é uma árvore, de 6 a 8 metros de altura, tem folhas verde-escuras simples ou compostas com 3 a 5 folíolos, variando de 3 a 7 cm, em forma de lança e apiculados (apontado para a ponta) (Figura 6). Florescem na primavera com flores agrupadas branco-amareladas que são seguidas por flores globosas e frutos branco-esverdeados. Os frutos são dispostos em panículas axilares, surgindo entre o ramo e a folha talo. A madeira *Lithraea* é frequentemente queimada como fonte de calor e energia (ALÉ et al., 1997).

Figura 6: Frutos de *Lithraea brasiliensis*



Fonte: Calenga (2021)

As espécies dessa família são caracterizadas por possuírem propriedades irritantes e causarem dermatites de contato, e suas atividades biológicas envolvem atividade

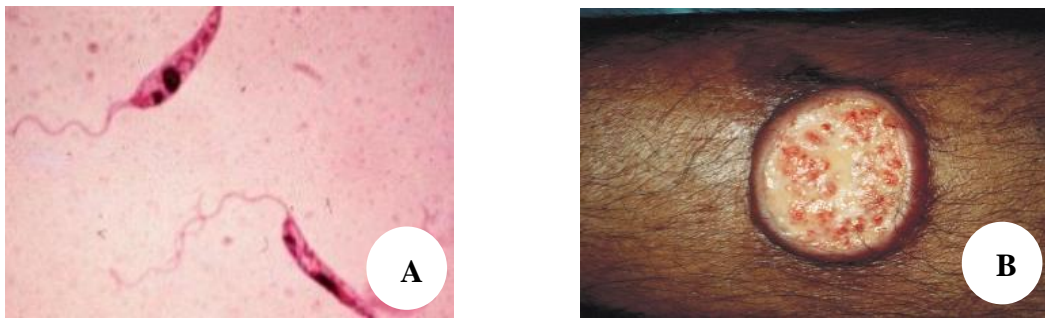
promissora contra microorganismos quando testados os extratos vegetais extraídos das folhas de aroeira (SHIMIZU et al., 2006), antiviral e citotóxicas (RUFFA et al., 2002), acaricida e com baixa toxicidade em modelo *in vivo* usando *Artemia salina* (crustáceo) (LIMA et al., 2021). O óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* possui atividade anti-promastigota contra os parasitos das espécies *Leishmania amazonenses* e *Leishmania infantum* (ASSENÇO et al., 2022).

2.6 A Leishmaniose

Das 133 doenças ou grupos de doenças listado no Observatório de Saúde Global (WHO, 2020), 101 têm ligações significativas com o meio ambiente. Dentre essas, encontram-se as Leishmanioses, um grupo de doenças de caráter antroponozoonótico (Figura 7a), com alta prevalência em regiões subtropicais, causadas por mais de 20 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, sendo reconhecida pela OMS como uma doença negligenciada, a qual globalmente tem cerca de 27% dos casos relacionados com as condições ambientais (WHO, 2020).

As leishmanioses compreendem uma série de patologias marcadas pelo amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde infecções assintomáticas até manifestações mais graves, como a forma visceral. Podem ser divididas em leishmaniose cutânea, mucocutânea, difusa e visceral (PINHEIRO, 2013). A leishmaniose visceral é caracterizada pela infecção crônica de órgãos viscerais como fígado, baço e medula óssea, pode causar febre irregular de longa duração, perda de peso, hepatoesplenomegalia, chegando a ser fatal se não for tratada. Em relação às manifestações tegumentares, a forma cutânea de maior prevalência, é caracterizada pela presença de úlceras na pele em geral indolores (Figura 7b), bem delimitadas, apresentando bordas elevadas, a forma mucocutânea na qual os parasitos são disseminados pelo sistema linfático ou hematogênico e parasitam a mucosa nasal e orofaríngea, é caracterizada por lesões ulceradas e infiltradas na mucosa da boca, nariz e faringe e a forma cutânea-difusa produz lesões crônicas e disseminadas, e estas lesões múltiplas contêm alto número de parasitos (PINHEIRO, 2013; WHO, 2023).

Figura 7: Ilustração do protozoário *Leishmania* (a), Lesão cutânea de leishmaniose (b).



Fonte: Google imagens.

Em relação ao número de casos, segundo o Boletim Epidemiológico emitido em 2021, no ano de 2019 foram confirmados 2.529 novos casos de leishmaniose visceral no Brasil sendo a região Nordeste responsável pelo maior registro de casos no país (49,1%), e a taxa de letalidade 9%, a mais elevada dos últimos 10 anos. Em relação a leishmaniose tegumentar, no mesmo ano foram confirmados 15.484 novos casos no Brasil com os maiores percentuais de casos registrados na região Norte (42,8%). Em ambas as formas da doença, os maiores números de casos encontram-se na população jovem e do sexo masculino. (BRASIL, 2021).

Os principais medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose tegumentar estão na forma de formas farmacêuticas sólidas e líquidas. Sendo que, as sólidas compreendidas por comprimidos e cápsulas, contendo princípio ativo e adjuvantes, possuem melhor estabilidade físico-química, facilidade na administração e precisão na dosagem, porém não é possível ajustar a dose no produto final. Já as líquidas são apresentadas como soluções e suspensões injetáveis estéreis, ambas atribuídas à administração por via parenteral, utilizadas principalmente quando é desejável resposta rápida, quando o princípio ativo é inativado por outra via de administração ou incompatível com outro tipo de forma farmacêutica (AULTON; TAYLOR, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo deste estudo foi elaborar e caracterizar biofilmes a base de carboximetilcelulose combinados com alginato de sódio ou zeína que incorporam o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*, bem como avaliar a atividade leishmanicida e a citotoxicidade.

3.2 Específicos

- ✓ Produzir filmes a base de carboximetilcelulose combinados com alginato ou zeína que incorporam o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*;
- ✓ Caracterizar os filmes produzidos utilizando técnicas: FTIR, DSC, TG, MEV e Taxa de transmissão de vapores de água;
- ✓ Avaliar toxicidade *in vitro* e *in vivo* da formulação;
- ✓ Avaliar potencial leishmanicida *in vitro* da formulação;

4 METODOLOGIA

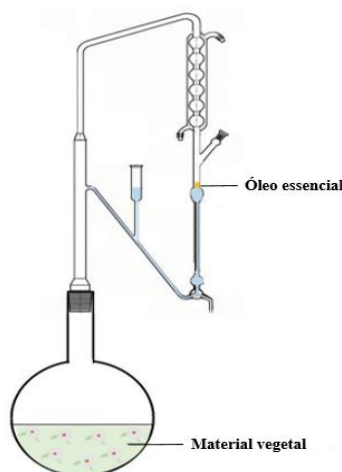
4.1 Materiais e Reagentes

Reagente	Fórmula	Pureza	Procedência
Álcool Etílico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	>99,0%	Êxodo
Alginato de Sódio	$(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na})_x$	>98,0%	Êxodo
Carboximetilcelulose de Sódio	$[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2(\text{OH})_2\text{OCH}_2\text{COONa}]_n$	>98,0%	Sigma-Aldrich
Cloreto de Sódio	NaCl	>99,0%	Dinâmica
Glicerina Bidestilada	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	>99,5%	Êxodo
Sílica Gel Azul	SiO_2	>99,0%	Cinética
Sulfato de Sódio	NaSO_4	>99,0%	Cinética
Tween 20	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	>99,0%	Êxodo
Zeína	-----	> 98,0%	Sigma-Aldrich

4.2 Extração do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*

O acesso e a coleta de recurso genético no Brasil foram autorizados pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen nº A0FCC6A). O óleo essencial foi extraído de 100 gramas do fruto de *Lithraea brasiliensis*., aonde foram trituradas e misturadas a 200 mL de água destilada. Foi realizada uma hidrodestilação em sistema de Cleveger modificado acoplado a um balão de fundo redondo de 100 mL (Figura 8), mantendo-se a temperatura a 100°C com o auxílio de uma manta de aquecimento. Em seguida, o óleo foi seco por meio de percolação com Na_2SO_4 anidro.

Figura 8: Sistema de hidrodestilação



Fonte: Adaptado de Council of Europe 2010

4.3 Produção de filmes

Os filmes autossuportados foram obtidos a partir da adaptação da técnica “Solvent Casting Method”, denominada como método de moldagem com solvente, feita por Ferreira et al. (2017), empregando a evaporação lenta do solvente, a temperatura ambiente e pressão atmosférica. Para isso, quatro composições foram testadas tendo como base uma solução biopolimérica de CMC preparada empregando a água como solvente, a qual foi combinada com soluções de diferentes concentrações de alginato de sódio (AS) ou zeína (ZN), a saber: i) 1% (m/m) de CMC, 0,5% (m/m) de AS; ii) 1% (m/m) de CMC, 0,25% (m/m) de AS; iii) 1% (m/m) CMC, 0,5% Zeína (ZN) e; iv) 1% (m/m) CMC, 0,25% ZN. As soluções de alginato foram preparadas a partir de 30 mL de água bidestilada, enquanto as de zeína foram preparadas utilizando-se 30 mL de uma solução hidroalcolica a 70% (v/v). Em seguida, foi adicionado às soluções 1,5% (m/m) de glicerol e 0,2% (m/m) de Tween[®] 20, juntamente com 0,18% (m/m) do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*. Uma vez homogeneizada, cada solução é transferida para uma placa de Petri, permitindo que a evaporação lenta do solvente a temperatura ambiente. As formulações de cada biofilme são sumarizadas na tabela 1.

Tabela 1. Concentração (m/m) dos componentes do filme.

Amostra	Alginato de Sódio	Zeína	Carboximetilcelulose	Glicerol	Tween 20	OE <i>Lithraea brasiliensis</i>
CMC–AS 0,5%	0,5	0,0	1,0	1,5	0,2	0,18
CMC–AS 0,25%	0,25	0,0	1,0	1,5	0,2	0,18
CMC-ZN 0,5%	0,0	0,5	1,0	1,5	0,2	0,18
CMC-ZN 0,25%	0,0	0,25	1,0	1,5	0,2	0,18

Fonte: próprio autor.

4.4 Caracterização dos materiais

4.4.1 Taxa de transmissão de vapores de água (TVA)

Os valores de TVA foram determinados com o método gravimétrico, baseado na norma ASTM E96-12. Para cada tipo de filme foram utilizadas 3 amostras moldadas em círculos e fixadas nas células de permeabilidade padronizadas (Figura 9). Foram depositadas em cada uma das células aproximadamente 10 g de sílica gel, em seguida foram introduzidas em um dessecador com uma solução de cloreto de sódio a 70% (m/v). A taxa de transmissão do vapor de água foi obtida a partir da inclinação da linha resultante traçando o peso do vapor de água transmitida vs. tempo.

Figura 9: Células de permeabilidade



Fonte: Próprio autor

4.4.2 Teste de solubilidade

O teste de solubilidade dos filmes foi determinado segundo a metodologia adaptada proposta por Irissin-Mangataet al. (2001), onde foram testados em três pHs diferentes que simulam o encontrado na pele e em fermentos (4,6; 5,2 e 6,8), (SILVA et al, 2016). As soluções foram preparadas utilizando PBS, o pH de cada solução foi ajustado com solução de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio, afim de se obter os pHs necessários. Os filmes foram recortados em formato circular com 20 mm de diâmetro e pesados, sendo então mergulhados em béquer contendo 50 mL de água destilada e agitados lentamente por 24 h, a 25°C em um agitador. Após este período as amostras foram removidas e secas (100°C por 24h) em uma estufa para determinar o peso do material que não foi solubilizado. A solubilidade é expressa pela porcentagem de material seco solubilizado conforme a Equação 1:

$$\%MS = \left(\frac{PI - PF}{PI} \right) * 100 \quad (1)$$

Onde: %MS é a porcentagem de material seco solubilizado, PI é o peso inicial do material seco e PF é o peso final do material seco não solubilizado.

4.4.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises dos filmes e do óleo essencial foram realizadas em um Espectrômetro Shimadzu IR-Prestige-21, com acessório de ATR. Os espectros foram obtidos com resolução de 2 cm^{-1} , na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} .

4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a obtenção das imagens utilizou-se o microscópio JEM-2100 da marca JEOL operando a 200 kV . As amostras dos filmes foram preparadas com recobrimento de ouro antes das análises. As fraturas dos biofilmes para obtenção das imagens da secção transversal foram feitas através de imersão da amostra de interesse em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, permitindo o corte limpo da amostra.

4.4.5 Análises térmicas

4.4.5.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em um equipamento Shimadzu DSC-60 sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As análises foram realizadas em cadinho de alumina no intervalo de temperatura de 30 a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.4.5.2 Análise termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria derivada (DTG)

As curvas TGA/DTG foram obtidas em uma termobalança Shimadzu DTG-60 sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Os experimentos foram conduzidos no intervalo de temperatura de 30 a $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ com uma razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em cadinho de alumina. Foram utilizados entre 5 - 10 mg de cada amostra nas análises.

4.4.6 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

As amostras foram analisadas em um Cromatógrafo a Gás (CG-2010) acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM QP2010 Plus), ambos da Shimadzu, utilizando uma coluna capilar DB-5M ($30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$). O fluxo do gás de arraste de hélio numa velocidade linear de $47,5\text{ cm/sec}$ e fluxo da coluna $1,0\text{ mL/min}$. A programação do forno foi de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 6 min com rampa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ até $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ e permanecendo por 10 min , até o final da corrida. A temperatura do injetor e da fonte de íons de $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. O modo de injeção Split com razão de $1/30$,

Tempo de Corrida 36,50 min. A quantificação foi realizada por normalização das áreas dos picos, e a identificação através da Biblioteca do Equipamento NIST08 (*National Institute of Standards and Technology*).

4.5 Ensaios biológicos

4.5.1 Teste de hemólise com eritrócitos de carneiro

A atividade hemolítica dos filmes de zeína (ZN – 0,5; ZN – 0,25) alginato (AS – 0,5; AS- 0,25) *in vitro* foi realizada em conformidade com a norma International Standard Organization 10993 partes 5 (ISO). Na qual foi seguida a recomendação da metodologia de Almaaytah *et al.*, (2014), de forma adaptada. Foram coletados 10mL de sangue de carneiro em um tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), disponibilizado pelo biotério da Universidade Federal do Maranhão, o mesmo foi submetido ao comitê de ética e pesquisa de uso de animais, tendo recebido o seguinte parecer: Processo n. 23115.005441/2017-62 (CEUA). O sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 20 °C. O plasma foi removido e os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato salina (PBS). Os filmes de 6mm de diâmetro foram incubados em contato direto com 100 uL de solução de 5% de eritrócitos (v/v, em solução salina 0,9% m/v) por 1h a 37°C, nas seguintes concentrações de alginato (0,5 e 0,25 mg) e zeína (0,5 e 0,25 mg), contendo 5,95 µg/mL de OLB. Os controles positivo e negativo receberam 100 µL de Triton x-100 a 1% e PBS, respectivamente, também foram utilizados filmes sem OLB incorporados, OLB (5,95 µl/mL) e Tween 20. Após 1 hora de incubação a 37°C, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a 20°C. Foi retirado o sobrenadante (100 ou 150 µL), transferido para uma microplaca e suas absorbâncias medidas a 450 nm.

A atividade hemolítica foi expressa em relação a ação do Triton x-100 e calculada pela seguinte fórmula:

Hemólise % = [(Abs₄₅₀ amostra tratada com o extrato – Abs₄₅₀ amostra tratada com PBS) / (Abs₄₅₀ amostra tratada com Triton x-100-Abs₄₅₀ tratada com PBS)]*100.

$$\text{Hemólise \%} = \frac{(\text{Abs}_{450}/\text{extrato} - \text{Abs}_{450}/\text{PBS})}{(\text{Abs}_{450}/\text{Triton x-100} - \text{Abs}_{450}/\text{PBS})} \cdot 100$$

Onde: Abs₄₅₀/extrato é Abs₄₅₀ amostra tratada com o extrato; Abs₄₅₀/PBS é Abs₄₅₀ amostra tratada com PBS); e Abs₄₅₀/Triton é Abs₄₅₀ amostra tratada com Triton.

4.5.2 Ensaio de citotoxicidade celular *in vitro*

Macrófagos de linhagem murina RAW 264.7 (doadas pelo Laboratório de Imunologia Aplicada – Rio de Janeiro) foram mantidos em garrafas de cultura estéreis com meio RPMI 1640 (SIGMA) contendo penicilina (100 µg/mL), estreptomicina (100 U/mL), anfotericina B (0,25 µg/mL) e suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) em estufa a 5% de CO₂ à 37 °C.

Para a realização do ensaio de citotoxicidade, foi utilizada a metodologia padronizada pela *International Standard Organization* 10993 partes 5 (ISO), por contato direto, na qual utilizou-se 5x10⁷ /mL (5x10⁵ por poço) de células em meio RPMI-1640 suplementado com 1% de SFB. As células foram adicionadas num volume de 100 µL por poço em placas de 96 poços de fundo chato. Em seguida os macrófagos foram acondicionados por 1 hora em estufa de CO₂ a 5% para aderência ao fundo da placa.

Após esse período, os macrófagos foram incubados com diferentes concentrações de alginato (0,5 – 0,25 mg/mL) e zeína (0,5 – 0,25 mg/mL). Como controles foram utilizadas células com 100 µL DMSO (controle positivo) e células apenas com meio RPMI (controle negativo). Após incubação por 48 horas, MTT (Sigma, EUA) (5 mg/mL) foi adicionado na cultura, sucedendo-se nova incubação (3 h/37° C). A viabilidade das células foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor da absorbância gerada em espectrofotômetro, sob comprimento de onda igual a 540 nm. Após as 3 horas de incubação, adicionou-se 100 µL de DMSO por poço e leu-se em leitor de Elisa 540 nm, a porcentagem de citotoxicidade foi realizada de acordo com o cálculo: (% citotoxicidade = (1 - Densidade ótica do teste/ Média do controle negativo) X 100. A citotoxicidade foi expressa em porcentagem, utilizando o programa GraphPad Prism 8.

4.5.3 Citotoxicidade promastigotas (*Leishmania amazonensis*)

As formas promastigotas (5x10⁵/mL) de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas no Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia (UFMA) em garrafas para cultura estéreis contendo meio Schneider (SIGMA), gentamicina (50 µg/mL) e suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) 10%, sendo acondicionadas em câmara de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) à 27°C. As mesmas foram obtidas na fase estacionária, em culturas de 5 dias.

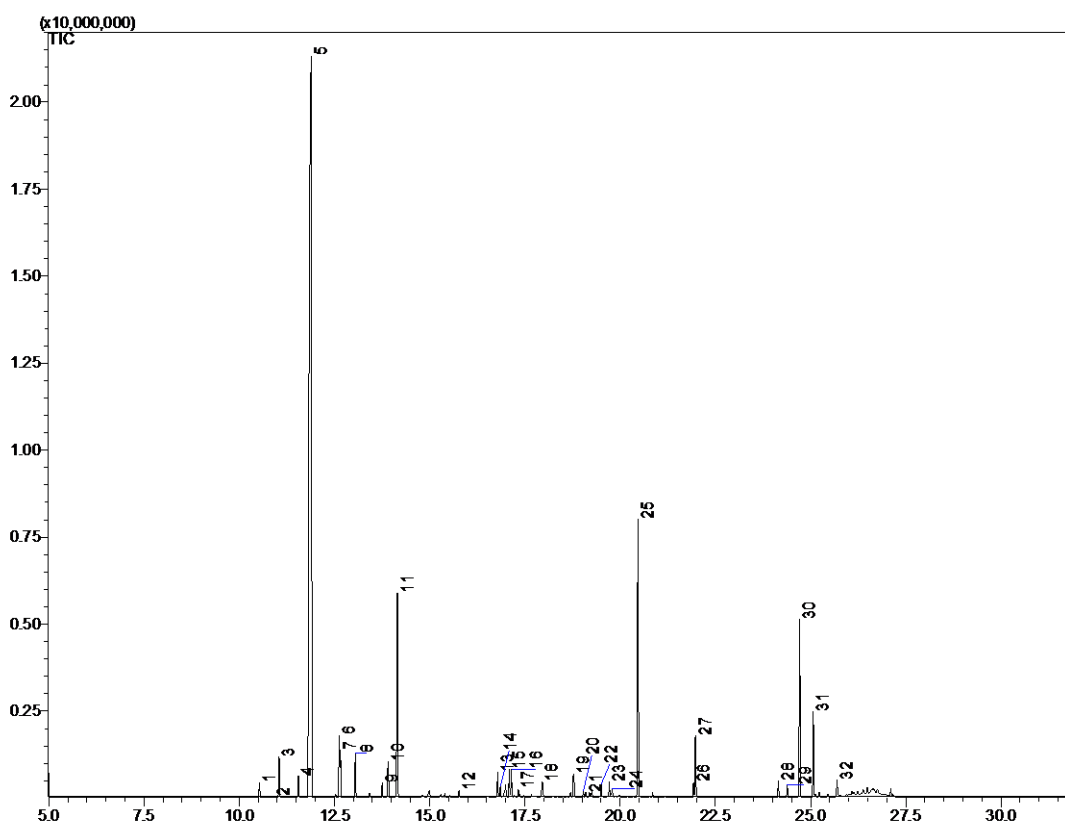
O efeito anti-*Leishmania* dos biofilmes foi estudado em promastigotas (5×10^7 /mL - 10 μ L), que foram adicionadas em placas de 96 poços (5×10^5 por poço), na presença de diferentes concentrações de alginato (0,5; 0,25 mg/mL) e zeína (0,5; 0,25 mg/mL) incorporadas ou não com óleo de *L. brasiliensis*. Como controle positivo foi utilizada anfotericina B (10 μ g/mL) e o controle negativo foi preparado apenas com o meio de cultura Schneider. Após 48 horas de incubação foi adicionado 10 μ L de MTT 5mg/mL e novamente incubado por 3 h para haver a formação dos cristais de formazan. Finalmente, foi adicionado 100 μ L de DMSO a 10% e suas absorbâncias medidas em espectrofotômetro a 540 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*

Após a análise do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* em Cromatografia em fase Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-MS), foi constatado que o composto apresenta uma variedade de substâncias e consequentemente uma considerável quantidade de picos (Figura 10), sendo identificados 32 compostos entre eles β -mirceno, nerolidol, e ácido 4-octanóico éster metílico, que se encontra de forma detalhada na Tabela 2.

Figura 10: Cromatograma do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*.



Fonte: Próprio autor

Os resultados da análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (Tabela 2) apresentou 32 picos. O óleo essencial foi composto principalmente por β -Mirceno (58,30%), ácido 4-octenóico (6,83%) e nerolidol (8,96%). Shimizu et al., (2006) analisando o óleo essencial de *Lithraea molleoides* (Vell.) utilizando a cromatografia gasosa detectou a presença de compostos majoritários: limoneno (89,89%), alfa-pineno (3,48%), beta-pineno (2,63%), alfa-terpineol (1,27%), mirceno (0,64%), o

que indica que a composição do óleo varia consideravelmente de acordo com as espécies do mesmo gênero da planta do fruto analisado.

Tabela 2. Concentração (m/m%) dos componentes do óleo.

PICOS	RT (min)	ÁREA	AREA%	COMPOSTOS – BIBLIOTECA DO EQUIPAMENTO - NIST08
1	10,530	656814	0,43	1R-,alfa,-Pineno, Biciclo[3,1,1]hept-2-eno, 2,6,6-trimetil-, (1R)-
2	10,919	67919	0,04	Canfeno, Biciclo[2,2,1]heptano, 2,2-dimetil-3-metileno-
3	11,049	1783819	1,18	Hexano, 3-metil-4-metileno-2-Etil-3-metil-1-penteno
4	11,552	993037	0,66	Biciclo[3,1,1]heptano, 6,6-dimetil-2-metileno-, (1S)-
5	11,890	88180220	58,30	<i>β-Mirceno</i>
6	12,626	2943603	1,95	1,2,4-Oxadiazol-5-carboxamida, N-[3-(2-metil-1H-imidazol-1-il)propil]-3-[4-(trifluorometil)fenil]-
7	12,658	1792363	1,18	beta,-Felandreno, Ciclohexeno, 3-metileno-6-(1-metiletil)-
8	13,050	1791098	1,18	2-octeno, 2-metil-6-metileno-2-etil-6-metil-1,5-heptadieno
9	13,758	603224	0,40	Ciclohept-4-enol
10	13,912	1993433	1,32	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimetil-
11	14,155	10335565	6,83	Ácido 4-octenóico, éster metílico
12	15,774	266195	0,18	Ácido 5-heptenóico, ácido 2,6-dimetil-2-vinil-,2,6-dimetil-2-vinil-5-heptenóico
13	16,786	1012638	0,67	1,6,10-Dodecatrieno, 7,11-dimetil-3-metileno-, (Z)- (Z)-,beta,-Farneseno
14	16,860	461681	0,31	o-Menth-8-eno, 1-Isopropenil-2-metilciclohexano
15	17,091	1171179	0,77	Ácido 4-decenóico, éster metílico, dec-4-enoato de metila, éster metílico do ácido 4-decenóico
16	17,147	1177353	0,78	Ciclohexeno, 3-(3-metil-1-butenil)-, (E)-3-[(1E)-3-Metil-1-butenil]-1-ciclohexeno
17	17,325	308398	0,20	Ácido 2,6-octadienóico, 3,7-dimetil-, éster metílico, geranato de metila
18	17,957	902267	0,60	Furano, 3-(4-metil-3-pentenil)-Perileno
19	18,776	1495930	0,99	1,6,10-Dodecatrieno, 7,11-dimetil-3-metileno-, (E)-,beta,-Farneseno
20	19,035	253522	0,17	3,7-Nonadien-2-ol, 4,8-dimetil-4,8-Dimetil-3,7-nonadien-2-ol
21	19,105	203631	0,13	1,6,10-Dodecatrieno, 7,11-dimetil-3-metileno-, (Z)-(Z)-,beta,-Farneseno (ISOMERO)
22	19,502	540630	0,36	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, álcool 3,7,11-trimetil-farnesílico

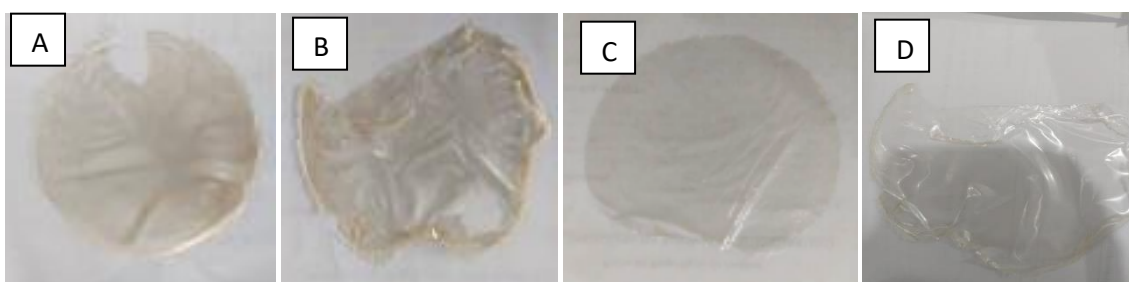
24	19,717	563651	0,37	Ciclopropanometanol, 2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-[2-Metil-2-(4-metil-3-pentenil)ciclopropil]metanol
24	19,793	399799	0,26	ácido cis-7,10,13,16-docosatetraenóico, éster metílico
25	20,470	13557178	8,96	<i>Nerolidol</i>
26	21,930	616039	0,41	Metil 6,9-octadecadienoato
27	21,979	2659478	1,76	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico, éster metílico, (Z,Z,Z)-
28	24,155	707059	0,47	Ciclohexeno, 1-metil-4-(5-metil-1-metileno-4-hexenil)-, (S)-
29	24,350	253522	0,17	3,7-Nonadien-2-ol, 4,8-dimetil-4,8-Dimetil-3,7-nonadien-2-ol
30	24,605	203631	0,13	1,6,10-Dodecatrieno, 7,11-dimetil-3-metileno-, (Z)-(Z)-, beta-, -Farneseno (ISOMERO)
31	25,102	540630	0,36	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, álcool 3,7,11-trimetil-farnesílico
32	25,717	563651	0,37	Ciclopropanometanol, 2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-[2-Metil-2-(4-metil-3-pentenil)ciclopropil]metanol

Fonte: Próprio autor.

5.1.1 Caracterização físico-química dos biofilmes que incorporam o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*

Os filmes poliméricos com alginato apresentaram-se macroscopicamente homogêneos, flexíveis, aderentes e sem rachaduras, já os filmes que continham zeína aparentaram ser menos flexíveis e com algumas rachaduras. (Figura 11)

Figura 11: (A) CMC – ZN 0,25%, (B) CMC – ZN 0,5% , (C) CMC – AS 0,25% e (D) CMC – AS 0,5%.



Fonte: Próprio autor.

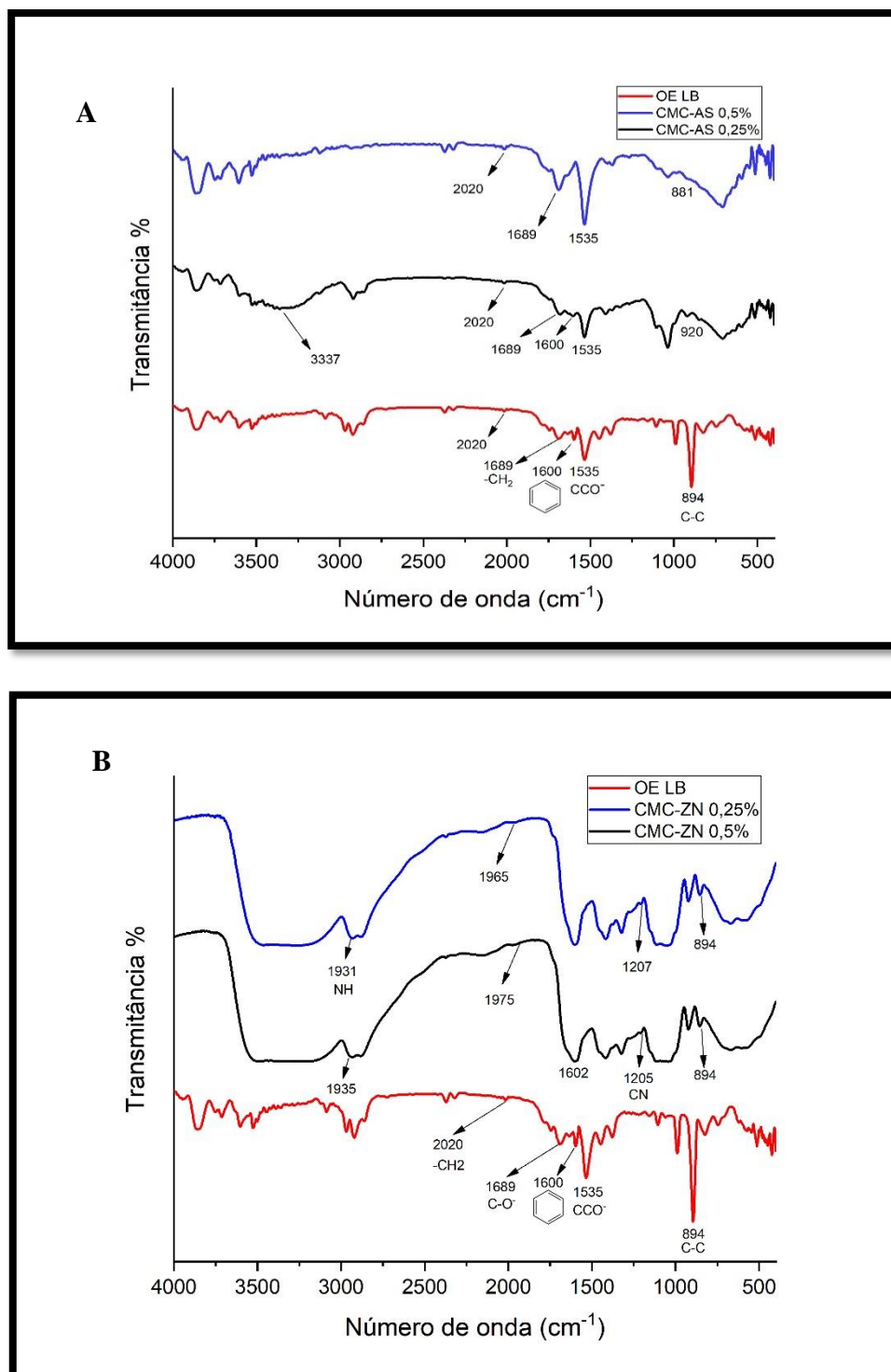
Com o intuito de investigar a estrutura e possíveis interações entre os biopolímeros e o óleo essencial na formulação, conduziu-se análises dos materiais estudados utilizando a espectroscopia na região do Infravermelho. Na Figura 12 é apresentado os espectros de FTIR para o óleo essencial puro e dos seus respectivos biofilmes. No caso dos filmes biopoliméricos que contém o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*, observa-se que a ampla banda de absorção entre 3600-3250 cm⁻¹ está

relacionada com as vibrações intra e intermoleculares de -OH (vibrações de estiramento OH livre e ligado a H, respectivamente) (JAHED et al., 2017). As bandas de absorção destes são correlacionados principalmente aos seus alongamentos O-H presentes na estrutura do CMC e do biopolímero alginato de sódio (CARPINÉ et al., 2016).

Nos espectros de FTIR dos biofilmes, é possível evidenciar de uma forma geral uma banda na faixa de 1610 a 1520 cm^{-1} referente ao estiramento assimétrico de COO^- presente na estrutura de todos os biopolímeros empregados no estudo, bem como compostos pertencentes ao óleo essencial. Com relação aos espectros dos biofilmes a base de CMC e AS (Figura 12a), é observado bandas mais intensas correspondentes ao alginato em aproximadamente 1020 cm^{-1} associado a vibrações de estiramento do grupo C-O presente na estrutura do polissacarídeo, bem como uma nova banda larga em 3317 cm^{-1} atribuída a presença de hidroxilas, incrementando possíveis ligações de hidrogênio entre ambos os biopolímeros. Adicionalmente, ainda que em ambos os biofilmes CMC-AS preparados apresentam bandas referentes ao óleo essencial, é possível evidenciar que a formulação com maior quantidade de alginato (CMC-AS 0,5) apresenta um conjunto de sinais associados ao óleo essencial que pode ser facilmente evidenciados, sugerindo uma melhor eficiência de encapsulação nesta formulação, o qual pode ser atribuído a uma melhora do processo de interação entre os polímeros, favorecendo assim, a uma maior retenção dos compostos do óleo essencial na rede biopolimérica formada.

Por outro lado, os biofilmes a base de CMC-ZN (Figura 12b) exibem quatro bandas características de proteínas (MAGOSHI et al., 1992; CORRADINI, 2004): i) entre 2900 a 3400 cm^{-1} a qual é relativa aos estiramentos das ligações N-H e O-H dos aminoácidos das proteínas, denominada amida A; ii) em 1659 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo carbonila (C=O) associada ao grupo peptídico amida I, e; iii) a banda em 1244 cm^{-1} é relativa às vibrações de deformação axial da ligação C-N. Por outro lado, as principais bandas vibracionais do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* estão presentes nas seguintes números de onda: 895 cm^{-1} (estiramento C-C); 1600 cm^{-1} (ressonância anel aromático); 1640 cm^{-1} a 1690 cm^{-1} (C-O); 1930 cm^{-1} a 2020 cm^{-1} (estiramento $-\text{CH}_2$). Assim, a presença de bandas características do óleo essencial corrobora a encapsulação do composto ativo na matriz biopolimérica.

Figura 12: Espectros FTIR do óleo essencial e biofilmes de CMC-AS (a) e CMC-Z (b) que incorporam o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*.

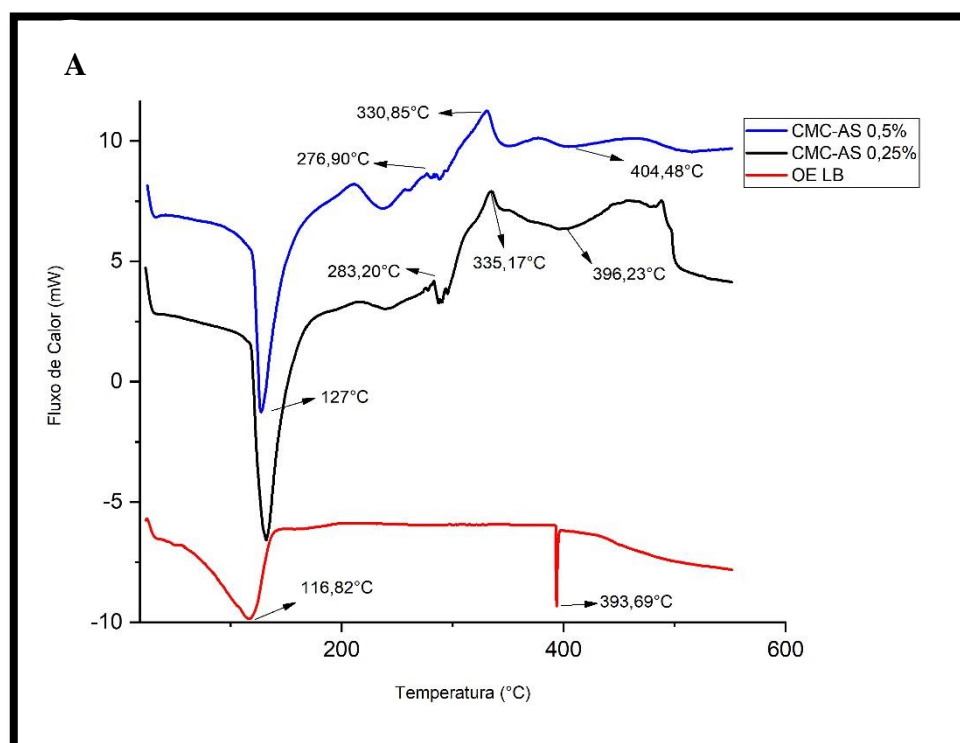


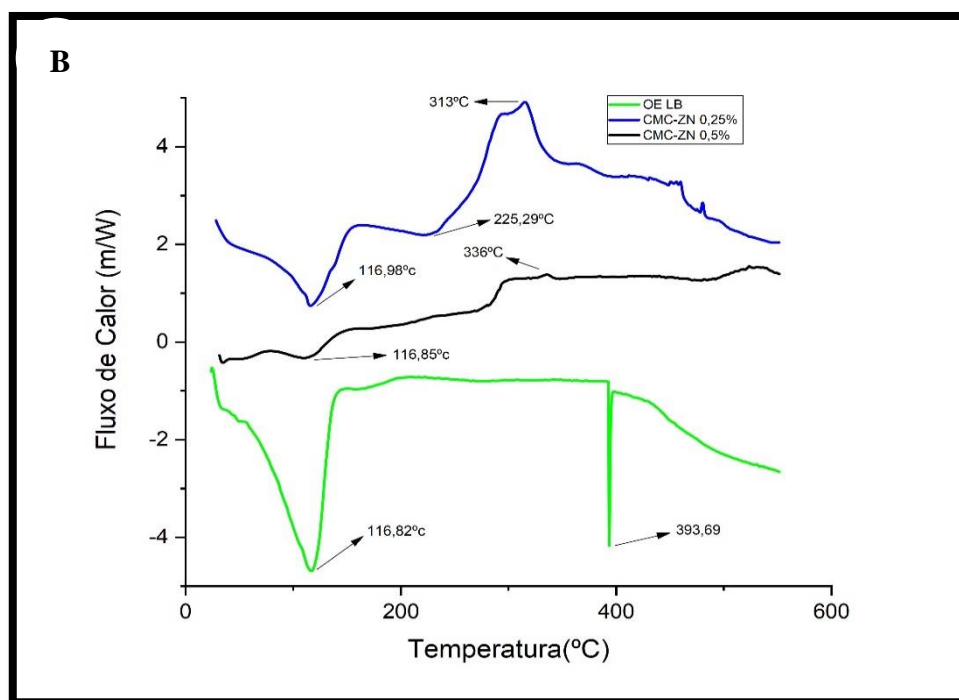
Fonte: Próprio autor

Estudos empregando as técnicas de DSC e TGA/DTG foram conduzidos com o intuito de avaliar as propriedades térmicas dos materiais sintetizados. Os dados das análises de DSC são apresentados na Figura 13. Para o óleo essencial puro, é observado

em torno de 116 °C um pico endotérmico referente a evaporação de substâncias voláteis, sendo observado nos filmes a base de alginato (CMC-AS, Figura 13a) e zeína (CMC-Z, Figura 13b) deslocamentos a maiores temperaturas relacionados a este evento, juntamente com a eliminação de moléculas de água e glicerol, sendo apresentado o incremento de até 10 °C no filme CMC-AS 0,5 em comparação ao óleo essencial livre, indicando que a volatilização do composto ativo é desfavorecida com a encapsulação na matriz biopolimérica. O pico endotérmico em 393,6 °C o qual está relacionado a decomposição dos ácidos graxos do óleo essencial, também é deslocado à maiores temperaturas nos filmes que possuem alginato na sua composição (Figura 13a), sendo registrado para este caso temperaturas de até 405 °C, aproximadamente (SANTOS et al, 2004). Os eventos em 335,17 e 330,85 °C nos filmes de CMC-AS 0,25 e CMC-AS 0,5, respectivamente, são referentes à decomposição dos biopolímeros. Por outro lado, os eventos registrados nas temperaturas compreendida entre 200 a 325 °C biofilme de CMC-ZN (Figura 13b), podem estar associados aos desdobramentos da estrutura tridimensional da proteína ou à despolimerização parcial das cadeias da zeína.

Figura 13: Curvas de DSC do óleo essencial e biofilmes de CMC-AS (a) e CMC-ZN (b) que incorporam o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*





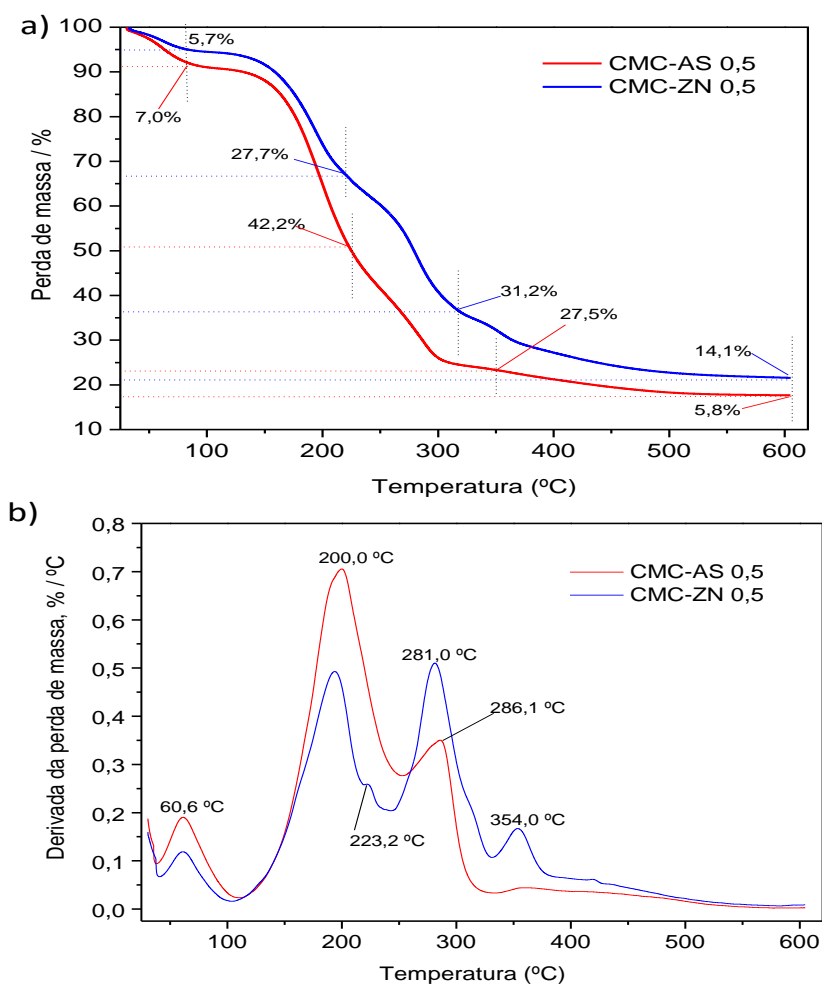
Fonte: Próprio autor

As curvas de TGA e DTG para os biofilmes de CMC combinados com 0,5% de AS ou ZN que incorporam óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* são apresentadas na Figura 14. De uma forma geral, em temperaturas até 100 °C é observada pela curva de TGA (Figura 14a), uma primeira perda de massa de 5,7% e 7,0 % para os biofilmes de CMC-ZN 0,5 e CMC-AS 0,5, respectivamente, as quais estão relacionadas a eliminação de moléculas de água fisicamente adsorvida, bem como volatilização de compostos de baixo peso molecular associados ao óleo essencial e glicerol utilizado como plastificante. Um segundo evento de perda de massa de até 42,2 % para o filme de CMC-AS 0,5 entre 90 e 210 °C (Figura 14a), com temperatura máxima de decomposição registrada pela curva de DTG (Figura 14b) de 200 °C para ambos os filmes estudados, está associada basicamente ao processo de degradação dos biopolímeros os quais podem ser constituídos por vários processos simultâneos como: despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas da fração celulósica e algínica, bem como a liberação de ácidos graxos da fração proteica zeína, por exemplo (ARAKI et al., 1998). O terceiro evento de decomposição térmica dos biofilmes é registrado entre 240 e 320 °C, e pode ser atribuído à oxidação e a quebra dos resíduos carbonizados para formação de produtos gasosos de baixo peso molecular (ROMAN; WINTER, 2004; TEIXEIRA et al., 2010).

Ainda que ambos os filmes possuem eventos térmicos em temperaturas semelhantes, é observado que o biofilme de CMC que possui ZN em sua composição,

CMC-ZN 0,5, apresenta mais eventos de decomposição térmica comparados ao filme análogo de CMC-AS, sendo registrado pela análise de DTG um outro evento centrado em 354 °C, o que poderia indicar uma baixa homogeneidade do filme, ou ainda, possível presença de domínios entre os compostos do filme. Ao final do processo de decomposição térmica é revelado uma menor porcentagem de resíduo carbonizado para o filme CMC-AS 0,5, (17,5%) em comparação ao filme CMC-ZN 0,5 (21,7 %), provavelmente devido a uma maior presença de compostos voláteis encapsulados no filme que contêm alginato na sua composição.

Figura 14: Curvas de TGA (a) e DTG (b) obtidas para os biofilmes de CMC-AS 0,5 e CMC-ZN 0,5 que incorporam o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* sob atmosfera de N₂.



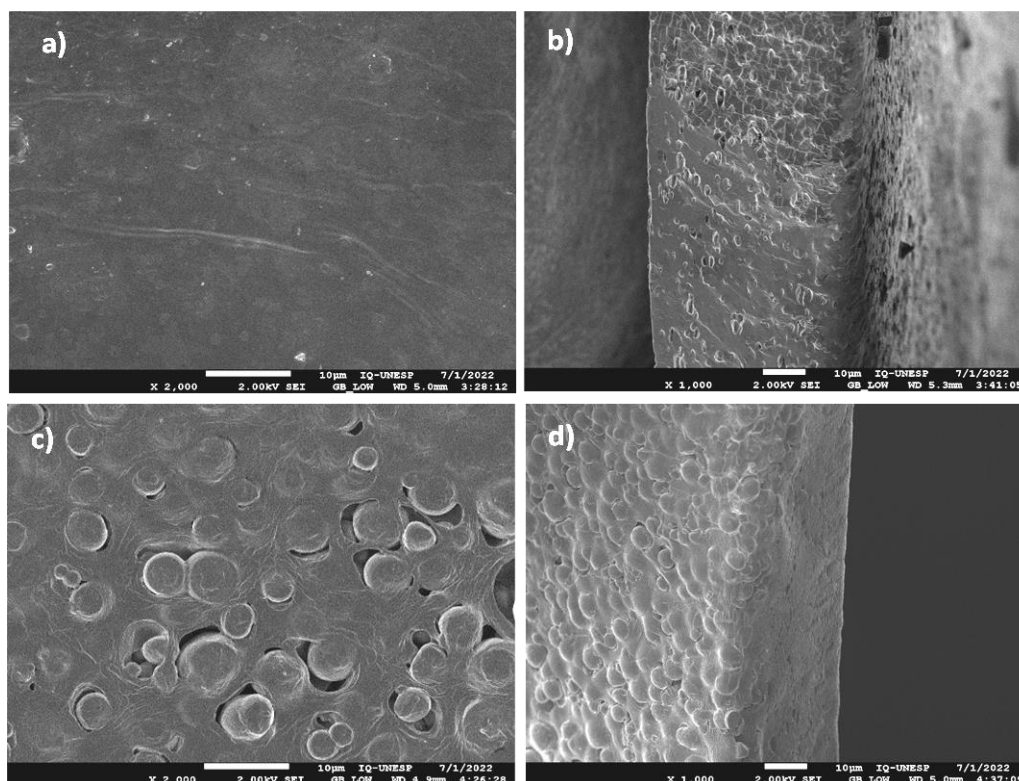
Fonte: Próprio autor.

A microestrutura dos biofilmes de CMC que possuem 0,5 % de AS ou ZN na sua composição e incorporam o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* foram reveladas utilizando a técnica de MEV, onde as micrografias dos filmes são apresentadas na Figura 15. No filme de CMC-AS 0,5 contendo o óleo essencial, apresenta uma superfície externa relativamente compacta e bastante homogênea (Figura 15a); no entanto, seu corte transversal (Figura 15b) revela uma superfície rugosa com presença isolada de alguns poros, o que pode ser causado por gotículas lipídicas incorporadas na matriz homogênea. Este comportamento é análogo a aqueles observados por Gómez-Guillén et al. (2007), em filmes de gelatina que incorporam extratos de murtilla, onde é relatado que a incorporação do extrato modificou a morfologia interna dos filmes tornando a superfície dos mesmos mais rugosa e irregular quando comparada à dos filmes sem o extrato.

Em contraste, nos filmes carreadores do óleo essencial que contem ZN em sua composição (Figura 15c), é observado a presença de uma microestrutura de forma circular irregular, o que poderia caracterizar a presença de possíveis heterogeneidades no material, tal como observados por outros autores em filmes que contem zeína (PENA-SERNA; LOPES FILHO, 2013; LIANG et al., 2015). Tal microestrutura pode ser associada à agregação de glóbulos de zeína devido à exposição de superfícies hidrofílicas da proteína em presença de uma alta concentração de carboximetilcelulose e etanol (KIM; XU, 2008). Também, é reportado que a interação de glicerol em regiões hidrofílicas de zeína possivelmente pode facilitar essa agregação pelo aumento da viscosidade (PENA-SERNA; LOPES-FILHO, 2013).

A presença de heterogeneidade em todo o filme torna-se mais clara ao observar o seu corte transversal (Figura 15d), onde é facilmente evidenciada a presença de domínios globulares, os quais são características da zeína, corroborando assim as diversas etapas de comportamento térmico observados pela análise de TGA/DTG (Figura 14). Morfologias semelhantes em filmes que contêm esta proteína já foram amplamente relatadas na literatura e estão associadas à natureza hidrofóbica desta proteína, uma vez que a zeína é considerada uma molécula polar em partes específicas, como as regiões em que possui aminoácidos com grupamentos polares, como o grupo amino e o grupo carboxila. Entretanto, a natureza hidrofóbica das cadeias laterais da zeína sobrepõem-se às regiões polares, tornando a proteína principalmente hidrofóbica.

Figura 15: Imagens de MEV dos biofilmes de CMC-AS 0,5 (a,b) e CMC-ZN 0,5 (c,d) que incorporam o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*.



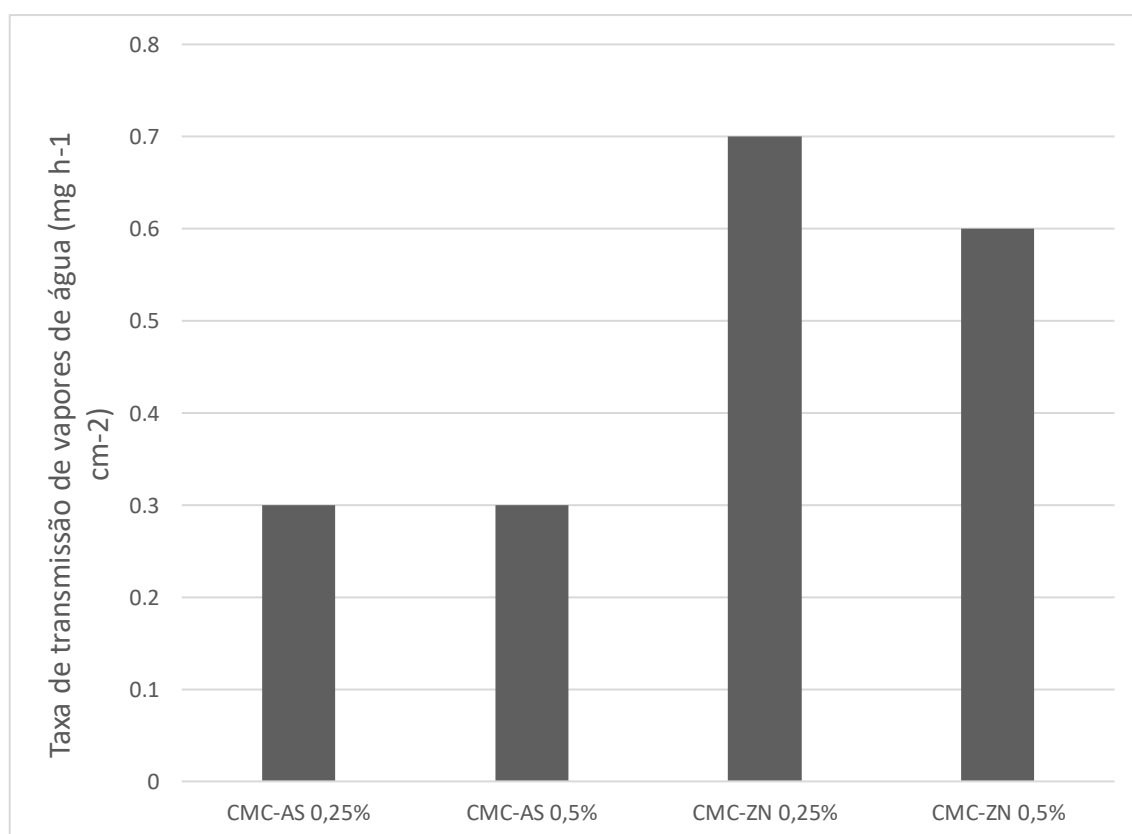
Fonte: Próprio autor.

A taxa de transmissão à vapores de água (TVA) é uma análise importante para filmes com vistas à aplicação em biomedicina, desde que é uma propriedade importante para o desenvolvimento de curativos, pois garante a realização de trocas de vapores entre o meio interno (ferida) e o externo, proporcionando que a lesão não fique completamente vedada com a utilização do curativo, propiciando um ambiente em condições melhores para a cicatrização. As medidas de TVA realizadas em triplicata para todas as amostras, foi calculada através da inclinação da curva peso x tempo, que é relativa à quantidade em massa de umidade permeada pelo filme e absorvida pela sílica gel no período de 20 h, onde os resultados são representados na Figura 16.

De forma geral, observa-se que a presença de diferentes concentrações de alginato no filme de CMC não interfere na TVA revelando uma taxa fixa de $0,3 \text{ mg h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ para ambos os filmes estudados. No entanto, estes valores são consideravelmente mais baixos quando comparados a aqueles análogos que possuem zeína em sua composição, apresentando neste último caso valores de $0,7$ e $0,6 \text{ mg h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ para os filmes CMC-ZN 0,25 e CMC-ZN 0,5, respectivamente. Desde que a TVA depende do número de grupos

-OH disponíveis no material (LI et al., 2008), e como observado pelas análises de FTIR (Figura 12a), sugere-se que os filmes de CMC-AS possui maiores possibilidades de interações entre os componentes do filme envolvendo agrupamentos hidroxila, tal como ligações de hidrogênio, por exemplo, e que causaria um bloqueio desses grupos para interações com vapores de água, refletindo diretamente nos valores de TVA. No entanto, os filmes contendo zeína apresentaram maiores valores de TVA que os que continham alginato, possivelmente devido à desuniformidade das partículas na matriz causadas pela presença de grupos hidrofóbicos da proteína, favorecendo disponibilidade de grupos mais hidrofílicos na superfície do filme, aumentando a difusão de vapores de água. Resultado análogo também foi reportado por Gontard et al. (1994), Batista (2004), Villalobos et al. (2005) e Sztuka, Kołodziejska (2009), onde é discutido que a heterogeneidade na dispersão dos componentes na matriz polimérica favorece a migração da umidade, fazendo estes biofilmes mais permeáveis aos vapores de água.

Figura 16: Taxa de transmissão de vapores de água dos biofilmes estudados.



Fonte: Próprio autor

Outro parâmetro estudado foi o percentual de solubilidade dos mesmos em soluções tampões de pH os quais simulam exsudados de feridas e pH da pele. De acordo com dados sumarizados na tabela 3, os filmes de CMC que possuem alginato, apresentaram maior percentual de solubilidade em pH ácido, muito provavelmente a sensibilidade do filme a componentes da solução PBS. Já os filmes com zeína tiveram maior percentual de solubilidade em pH mais próxima ao neutro (6,8), o qual pode estar relacionado principalmente pela alta reatividade química da proteína que são determinadas pela presença de seus grupos funcionais. No entanto, cabe destacar que esses resultados podem sofrer influência do óleo essencial na formulação, que podem ocasionar heterogeneidades e falhas tal como reveladas por MEV (Figura 15), as quais podem favorecer a desintegração do filme.

Tabela 3. Percentual de solubilidade dos filmes

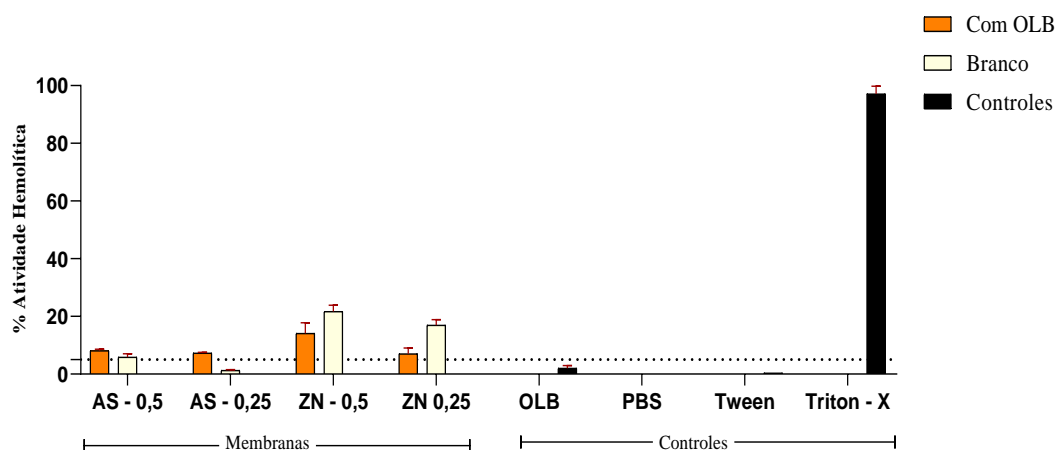
Filme	Solubilidade (%)		
	pH 4,6	pH 5,2	pH 6,8
CMC-AS 0,5%	94,77%	85,13%	84,37%
CMC-AS 0,25%	96,39%	88,29%	87,21%
CMC-ZN 0,5%	85,37%	85,58%	95,40%
CMC-ZN 0,25%	82,79%	88,82%	97,66%

Fonte: Próprio autor

5.2 Teste de hemólise com eritrócitos de carneiro

Foi avaliado o efeito citotóxico do alginato e zeína reticulados com óleo de *L. brasiliensis* em eritrócitos de carneiro, por meio do ensaio *in vitro* da atividade hemolítica. Foi observada baixa atividade hemolítica dos filmes de alginato reticulados com OLB, entretanto não houve diferença estatística entre os filmes de alginato com ou sem a presença do óleo. Ao analisar os filmes de zeína, em ambas as concentrações o percentual hemolítico foi maior nos filmes que não continham o óleo. Quando comparadas as membranas testadas com o controle positivo (Triton-x) a porcentagem de hemólise foi baixa (Figura 17).

Figura 17: Percentual de hemólise dos biofilmes de alginato e zeína em eritrócitos de carneiro. A porcentagem de hemólise foi avaliada em várias concentrações de alginato e zeína, incorporados ou não com óleo de *L. brasiliensis* em eritrócitos de carneiro. Os resultados correspondem a (médias \pm SD) de amostras individuais testadas em triplicata. (*) $p < 0,05$, em comparação ao controle positivo (Triton x-100 a 1%).



Fonte: Próprio autor.

Foi observado que a membrana de alginato e zeína contendo o óleo foram consideradas hemolíticas, segundo a norma ASTM F756-00, que classifica como hemólise um índice igual ou superior a 5%. Entretanto, a depender da finalidade de utilização do polímero, segundo Filho (2019), se utilizados como curativo em feridas, esses índices de hemólise não limitariam sua aplicação, uma vez que os próprios curativos comerciais apresentam alto índice de atividade hemolítica.

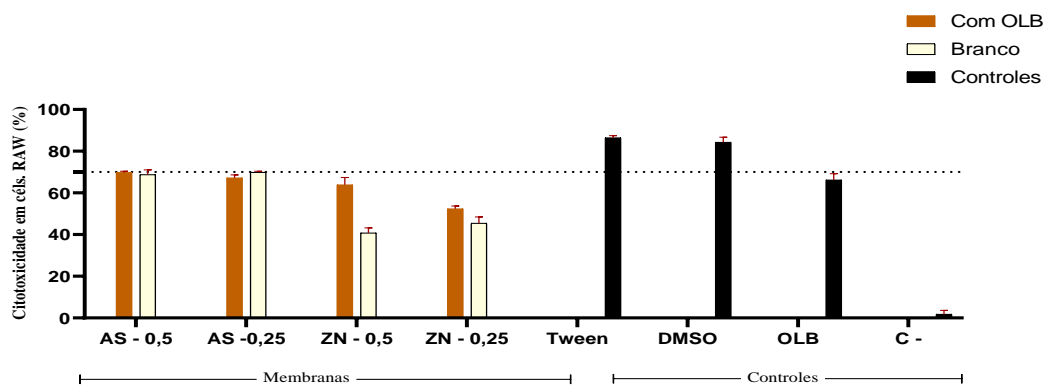
Sobre a hemocompatibilidade, estudos realizados com outros tipos de polímeros sugerem que devido a interação de grupos amino livres com as proteínas sanguíneas, podem desencadear uma resposta trombogênica ou hemolítica (BALAN; VERESTIUC, 2014; SOCRATES et al., 2019).

Quanto aos filmes CMC-AS 0,25% e CMC-ZN 0,25%, os que foram incorporados o óleo apresentarem menor atividade hemolítica, dessa forma pode-se entender que o óleo pode ter conferido proteção aos eritrócitos, pois foi observado uma citotoxicidade inferior a 5%, quando testado isolado. Resultados semelhantes também foram encontrados no estudo de Assenço (2022), ao testar concentrações de 50 a 0,39 $\mu\text{g/mL}$ de óleo de *L. brasiliensis* em eritrócitos de carneiro.

5.3 Ensaio de citotoxicidade em células RAW-264.7

Foi avaliado o efeito citotóxico dos filmes em células de linhagem RAW, através do ensaio *in vitro*. Houve menor citotoxicidade no óleo testado puro (5,95 µg/mL) quando comparado com o controle positivo (DMSO). Ao analisar a citotoxicidade dos filmes, os resultados evidenciaram que houve menor citotoxicidade nos filmes de zeína incorporados com o óleo (0,5 – 0,25 mg/mL) (Figura 18).

Figura 18: Percentual de citotoxicidade dos filmes de alginato e zeína em células RAW. A citotoxicidade foi avaliada em concentrações de Alginato (0,5 – 0,25 mg/mL) e Zeína (0,5 – 0,25 mg/mL), incorporados ou não com óleo de *L. brasiliensis* em células de linhagem RAW. Os resultados correspondem a (médias ± SD) de amostras individuais testadas em triplicata. (*) $p < 0,05$, em comparação com o controle positivo (DMSO).



Fonte: Próprio autor

De acordo com a norma da ISO 10993 é considerado citotóxico quando ocorre a redução de 70% da viabilidade, em relação ao controle, assim todas as amostras testadas neste experimento foram consideradas biocompatíveis.

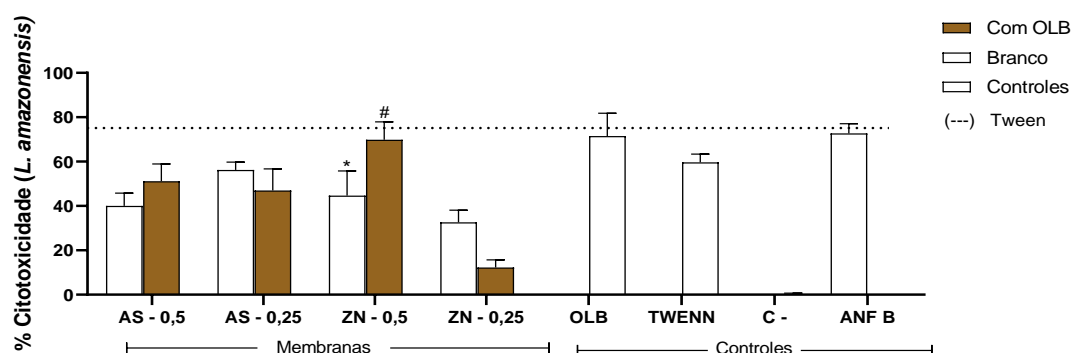
Outro fato importante sobre a diminuição da citotoxicidade pode ser explicado pela presença dos biopolímeros em sua composição, que com suas redes poliméricas podem gerar uma ação protetiva às células. Destaca-se que fatores como a composição química do óleo essencial estudados e o tipo de reagente e solvente utilizado para produção dos filmes, possivelmente podem ter influenciado na sua toxicidade.

5.4 Avaliação da atividade em promastigotas de *L. amazonensis*

Também foi avaliada a atividade Leishmanicida dos biofilmes de alginato e zeína sobre promastigotas de *L. amazonensis*. Os biofilmes de alginato e zeína incorporados com óleo essencial apresentaram maior atividade nas concentrações de 0,5 mg, sendo o

filme de zeína semelhante ao controle positivo na concentração (anfotericina B) de 10 µg/mL e ao óleo essencial sozinho (5,95 µg/ml) (Figura 19).

Figura 19. Citotoxicidade dos biofilmes de Alginato e Zeína em promastigotas *L. amazonensis*. Foi avaliada a citotoxicidade em várias concentrações de Alginato (0,5 – 0,25 mg/mL) e Zeína (0,5 – 0,25 mg/mL), incorporados ou não com óleo de *L. brasiliensis*. Os resultados correspondem a (médias ± SD) de amostras individuais testadas em triplicata. (*) p<0,05, em comparação com o óleo sozinho; (#) p<0,05 comparado com o controle positivo (anfotericina B).



Fonte: Próprio autor.

A ação leishmanicida pode estar associada a incorporação do óleo em sua composição. Em estudo realizado por Assenço (2022), o óleo de *L. brasiliensis* inibiu o crescimento *in vitro* de promastigota de *L. amazonensis* nas concentrações de 1000 – 62,5 µg/mL, apresentando um efeito dose dependente.

Quanto à diminuição do efeito das membranas, acredita-se que está relacionada à liberação controlada do óleo que é proporcionada pelas membranas, dessa forma, esses polímeros podem ser classificados como potenciais terapêuticas para o tratamento tópico de leishmaniose, uma vez que a utilização de curativos com transporte de fármacos diminui a necessidade de frequências desses e evitam a alta concentração da droga no organismo, tendendo a mantê-la no nível terapêutico (BOATENG; CATANZANO, 2015). Muitos curativos modernos apresentam essas propriedades de liberação de fármacos de maneira controlada, podendo ser aplicados, para isso, na forma de filmes, géis, espumas ou *scaffolds* (BOATENG *et al.*, 2008).

Segundo Gholipourmalekabadi *et al.* (2019) um curativo ativo controla a interação entre a ferida e fármacos ou moléculas sinalizadoras presentes e tem como propriedade a liberação sistemática, durante determinado tempo e taxa, de drogas em um local de ação. Esse tipo de sistema possibilita propriedades excepcionais de liberação de drogas, ação

sítio-específica e capacidade de carreação de fármacos com estabilidades física, química e térmica.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram obtidos com sucesso biofilmes a base de carboximetilcelulose combinados com alginato de sódio ou zeína que incorporam com óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*, onde os filmes receberam diferentes proporções dos biopolímeros.

Os biofilmes foram obtidos a partir da técnica de Solvent casting. A caracterização visual evidenciou que os filmes de alginato foram em sua maioria homogêneos, flexíveis, e sem rachaduras. No entanto, os filmes de zeína apresentaram ser mais rugosos, possivelmente por conta de sua morfologia de agregação de glóbulos.

Os espectros de FTIR demonstrou que a existência de bandas características do óleo essencial que também se fazem presentes no espectro dos filmes sintetizados, comprovam o encapsulamento dos compostos ativos nas matrizes biopoliméricas dos filmes.

As análises térmicas permitiram entender como a estabilidade dos filmes se comportou frente ao processo de incorporação do óleo essencial. Percebe-se que houve um aumento da estabilidade térmica dos compostos ativos. Esse comportamento pode ser confirmado a partir do gráfico das curvas de DSC que demonstrou o aumento progressivo dos parâmetros dos eventos térmicos do material.

A partir da análise das micrografias eletrônicas de transmissão dos filmes, foi possível constatar que a junção dos biopolímeros gerou materiais sem fissuras e compactos, principalmente nos filmes com alginato. Além disso, a semelhança entre as micrografias das superfícies dos filmes puros encontrados na literatura e incorporados com o óleo essencial permite concluir que a presença do mesmo não interferiu significativamente na morfologia da superfície dos materiais, salvo o aparecimento de algumas regiões lipídicas de concentração do óleo.

Os filmes incorporados ao óleo essencial dos frutos de *Lithraea brasiliensis* apresentaram baixa toxicidade para as células de linhagem RAW e eritrócitos de carneiro. Além de possuir atividade anti-promastigota contra os parasitos das espécies de *Leishmania amazonensis*.

Os filmes que continham alginato demonstraram melhores resultados com as análises feitas que em comparação com os de zeína, principalmente em relação a

encapsulamento do óleo, melhoramento da resistência térmica e ensaios biológicos como ação leishmanicida apresentando uma liberação mais controlada do óleo essencial, formando materiais com aplicações promissoras nos seguimentos do estudo de nanotecnologia, matérias e farmacêutico.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, S.; et al. Fabrication of polymeric nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by self-assembly. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 81-92, 2015.

ABDELSALAM, Ahmed M. et al. Surface-Tailored Zein Nanoparticles: Strategies and Applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1354, 2021.

ALÉ, I.S. et al. Allergic Contact Dermatitis Caused by *Lithraea molleoides* and *Lithraea braziliensis*: Identification and Characterization of the Responsible Allergens. **American Journal of Contact Dermatitis**, v. 8, n. 3, p. 144-149, 1997.

ALMAAYTAH, A.; TARAZI, S.; ALSHEYAB, F.; AL-BALAS, Q.; MUKATTASH, T. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Mauripoin, a Multifunctional Scorpion Venom Peptide. **Int J Pept Res Ther**, v. 20, n. 4, p. 397-408, 2014.

ARAKI, J., WADA, M., KUGA, S., OKANO, T. Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 142, n. 1, p. 75-82, 1998.

ARGOS, P. et al. A structural model for maize zein proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 17, p. 9984-9990, 1982.

ASSENÇO, J. N. F. **Caracterização química e atividade leishmanicida do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* Marchand**. 2022.71 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

ASTM 1989. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. **Annual Book of ASTM Standards**. Designation: E96-80.

ASTM INTERNATIONAL. ASTM F756-00: Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials. West Conshohocken: ASTM, 2000.

AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. Aulton Delineamento de Formas Farmacêuticas. 4ª ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2016.

BALAN, V.; VERESTIUC, L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. **European Polymer Journal**, v. 53, n. 1, p. 171–188, 1 abr. 2014.

BARBOZA, A. C. R. N. **Liberção sustentada do antisséptico clorexidina em micropartículas de quitosana e alginato**. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

BATISTA, J. A. **Desenvolvimento, caracterização e aplicações de biofilmes a base de pectina, gelatina e ácidos graxos em bananas e sementes de brócolis**. 2004. 140f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BAZZO, G. C. et al. Effect of preparation conditions on morphology, drug content and release profiles of poly (hydroxybutyrate) microparticles containing piroxicam. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 914-921, 2008.

BEKIN, S. et al. Synthesis, characterization and bending behavior of electroresponsive sodium alginate/poly (acrylic acid) interpenetrating network films under an electric field stimulus. **Sensors and Actuators B**, v. 202, p. 878-892, 2014.

BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 11, p. 3653–3680, 2015.

BOATENG, J. S.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N. E.; ECCLESTON, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008.

BONIFÁCIO, B. V. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014.

BRACCINI, Isabelle; PÉREZ, Sérgio. Base molecular da gelificação induzida por Ca²⁺ em alginatos e pectinas: o modelo egg-box revisitado. **Biomacromoléculas**, v. 2, n. 4, pág. 1089-1096, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico**. Número especial, Mar. 2021.

CALENGA, Marcelo Calegari. *Lithraea brasiliensis Marchand*. 2021. 1 fotografia. 372x497 pixels. Disponível em: <https://identify.plantnet.org/pt/the-plant-list/species/Lithraea%20brasiliensis%20Marchand/data>. Acesso em: 02 de março 2023.

CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 9ª Edição, Ed. LTC, Rio de Janeiro, 2016,

CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2ª edição. Ed. Artliber Editora, São Paulo, 2006, p. 21-60 e 139-168, 2006.

CANOFF, J. R. de A., et al. **Bioprospecção de filme polimérico contendo extrato de *Plinia cauliflora* com potencial aplicação curativa diferenciada de lesões**. 2022. Dissertação (Mestrado em Plantas Medicinais e Fitoterápicos na Atenção Básica) – Universidade Paranaense, Brasil, Paraná, 2022.

CARVALHO, C. E. S. et al. Anti-Leishmania activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. **Experimental parasitology**, v. 175, p. 59-67, 2017.

CARPINE, Danielle et al. Effect of the natural surfactant *Yucca schidigera* extract on the properties of biodegradable emulsified films produced from soy protein isolate and coconut oil. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 364-371, 2016.

CHEN, Guanying et al. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy. **Chemical reviews**, v. 116, n. 5, p. 2826-2885, 2016.

COUNCIL OF EUROPE (STRASBOURG) et al. **European Pharmacopoeia: Published in Accordance with the Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia (European Treaty Series No. 50)**. Council of Europe, 2010.

CORRADINI, E. et al. Mechanical, thermal and morphological properties of poly (epsilon-caprolactone) /zein blends. **Polym. Adv. Technol.**, v. 15, p. 340-345, 2004.

CYBORAN, S.; et al. Phenolic content and biological activity of extracts of black currant fruit and leaves. **Food Research International**, v. 65, p. 47- 58, 2014.

DA SILVA, G. D. et al. produção e caracterização de filmes comestíveis à base de alginato e pectina. **blucher chemical engineering proceedings**, v. 1, n. 2, p. 4658-4665, 2015.

DAVIS, J.; MCLISTER, A. **Smart Bandage Technology: Design and Application**. Elsevier Inc., 2016.

DEDAVID, B. A; GOMES, C. I; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras**: Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DE FÁRMACOS, S. D. L. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784-93, 2007.

DE VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of controlled release**, v. 161, n. 1, p. 38-49, 2012.

ERTESVÅG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**. v. 59, n. 1-3, p. 85-91, 1998.

FALANGA, V. Wound healing and chronic wounds. **Journal of cutaneous medicine and surgery**, v. 3, p. S1-1, 1998.

FERNANDES, Larissa Santos. Biodegradação de fertilizantes de eficiência melhorada baseados em carboximetilcelulose/quitosana/zeólita incorporados com macro e micronutrientes. 2021.

- FERREIRA, Anderson O. et al. Orodispersible Films for Compounding Pharmacies. **International journal of pharmaceutical compounding**, v. 21, n. 6, p. 454-461, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/322568776_Orodispersible_Films_for_Compounding_Pharmacies. Acesso em: 01/11/2021.
- FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v.34, n.6, p. 968-972, 2011.
- FREIRE AC, PODCZECK F, SOUSA J, VEIGA F. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal. v. 42, n. 3, 2006.
- FRESHNEY, R. I. Culture of specific cell types. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**, 2005.
- GEORGE, M; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan - a review. **Journal of controlled release**, v. 114, n. 1, p. 1-14, 2006.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; IHL, M.; BIFANI, V.; SILVA, A.; MONTERO, P. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1133–1143, 2007.
- GOMBOTZ, W; WEE, S. F. “Protein release from alginate matrices”. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n.3, p. 194-205, 2012.
- GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994.
- GRUMEZESCU, A. M. et al. Anionic polymers and 10 nm Fe₃O₄@UA wound dressing support foetal stem cells normal development and exhibit great antimicrobial properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, p. 146-154, 2014.

HAIDER, T.; HUSAIN Q. Concanavalin A layered calcium alginate–starch beads immobilized β -galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, p. 1-6, 2008.

HALAL, S. L. M. E.; ZAVAREZE, E. R.; ROCHA, M.; PINTO, V. Z.; NUNES, M. R.; LUVIELMO, M. M.; PRENTICE, C. Films based on protein isolated from croaker (*Micropogonias furnieri*) and palm oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 7, p. 2478-2485, 2016.

HAN, Y.; YU, M.; WANG, L. Physical and antimicrobial properties of sodium alginate/carboxymethyl cellulose films incorporated with cinnamon essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, p. 35-42, 2018.

IRISSIN-MANGATA, J.; BAUDUIN, G.; BOUTEVIN, B.; GONTARD, N. New plasticizers for wheat gluten films. **European Polymer Journal**, v.37, p.1533-1541, 2001.

ISO 10993-1:2018. Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 1: Avaliação e teste dentro de um processo de gerenciamento de risco. Genebra: Organização Internacional de Normalização, 2018.

JAHED, Eisa et al. Physicochemical properties of Carum copticum essential oil loaded chitosan films containing organic nanoreinforcements. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 325-338, 2017.

JOICE, V. C. O. et al. The acute cytotoxicity and lethal concentration (LC50) of *Agaricus sylvaticus* through hemolytic activity on human erythrocyte. **International Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 4, n. 1, p. 19-23, 2012.

JOUKI, M. et al. Characterization of antioxidant–antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 537-546, 2014.

KAFRANI, E. T.; SHEKARCHIZADEH, H; BEHABADI M.M. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v.137, p.360-74, 2016.

KHURSHID, M. F.; HUSSAIN, T.; MASOOD, R.; HUSSAIN, N. Development and evaluation of a controlled drug delivery wound dressing based on polymeric porous microspheres on polymeric porous. **Journal of Industrial Textile**, p. 1–14, 2015.

KIM, S.; XU, J. Aggregate formation of zein and its structural inversion in aqueous ethanol. **Journal of Cereal Science**, v. 47, n. 1, p. 1-5, 2008.

LASZTITY, R. **The chemistry of cereal proteins**. 2^a ed. 664 p. London, CRC press, 2017.

LAI, L. F.; GUO, H. X. Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. **International journal of pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 317-323, 2011.

LIANG, J et al. Influence of glycerol on the molecular mobility, oxygen permeability and microstructure of amorphous zein films. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 94-100, 2015.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 26-39, 2008.

LIMA, A.S. et al. Acaricide activity of extract and an isolated compound of *Lithraea brasiliensis* on *Rhipicephalus microplus* and selectivity actions against a non-target organism. *Veterinary Parasitology* 300 (2021) 109597.

LIU, Q. et al. Encapsulation of curcumin in zein/caseinate/sodium alginate nanoparticles with improved physicochemical and controlled release properties. **Food Hydrocolloids**, v. 93, p. 432-442, 2019.

LYRA, M. A.-S. (2 de julho de 2007). Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, pp. 784-793.

LUO, Y.; WANG, Q. Zein-based micro-and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 16, 2014.

MAGOSHI, J.; NAKAMURA, S.; MURAKAMI, K. I. Structure and physical-properties of seed proteins.1. Glass-transition and crystallization of zein protein from corn. **Revista Appl. Polymer Sci.**, v. 45, p. 2043–2048, 1992.

MANO, E. B.; MENDES, L. C.; **Introdução a Polímeros**. 2ª Ed. Ver. E ampl. - São Paulo: Edgard Blucher, 2015.

MATA, E et al. Enhancing immunogenicity to PLGA microparticulate systems by incorporation of alginate and RGD-modified alginate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 1–2, p. 32-40, 2011.

MATRICARDI, P; et al. Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, p. 1172-1187, 2013.

MARK, H. **Encyclopedia of polymer science and technology**, 15 volume set. New York, NY, USA: Wiley, 2014.

MATSUSHIMA, N. et al. Three-dimensional structure of maize alpha-zein proteins studied by small-angle X-ray scattering, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1339, p. 14-22, 1997.

MITSUKA, M. **Correlações entre estrutura química, superestrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano**. 2007. 119 f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MÖBUS, K.; SIEPMANN, J.; BODMEIER R. Zinc-alginate microparticles for controlled pulmonary delivery of proteins prepared by spray-drying. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 121-130, 2012.

MOLINA, M. et al. Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, n. 17, p. 6161–6186, 2015.

MOREIRA FILHO, RN F. **Caracterização e avaliação de membranas de alginato de cálcio com papaína imobilizada para o uso como curativo bioativo**. 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

MOTTA, G. J. *Calcium alginate* topical wound dressings: a new dimension in the cost-effective treatment for exudating dermal wounds and pressure sores. **Ostomy/wound management**, v. 25, p. 52-56, 1989.

NEDOVIC, V. et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806–1815, 2011.

NEVES, M. A.; HASHEMI, J.; PRENTICE, C. Development of novel bioactives delivery systems by micro/nanotechnology. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 7-12, 2015.

NGUYEN, T. et al. Thermal analysis of lignocellulosic materials: Part I. Unmodified materials. **Journal of Macromolecular Science Reviews in Macromolecular Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 1-65, 1981.

NOFIANI, R.; KURNIADI, R.; ARDININGSIH, P. Antimicrobial, antioxidant, hemolytic activities and toxicity of ethyl acetate extract from an unidentified coralassociated fungus, *Aspergillus brevipes* RK06. **Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention**, v. 2, n. 2, p. 211-215, 2011.

Norma ASTM E96, 2012. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. 1, 1–12. Doi:10.1520/E0096.

PALIWAL, R.; PALAKURTHI, S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 189, p. 108-122, 2014.

PATEL, H. A. **Process for preparing the alginate-containing wound dressing**. U.S. Patent n. 5,470,576, 1995.

PEÑA, C.; et al. Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6836–6842, 2010.

PENA-SERNA, Carolina; LOPES-FILHO, José Francisco. Influence of ethanol and glycerol concentration over functional and structural properties of zein–oleic acid films. **Materials Chemistry and Physics**, v. 142, n. 2-3, p. 580-585, 2013.

PIENNAR, M.E; TEICHMAN, I.V. The generic position of *Lithraea brasiliensis* Marchand (Anacardiaceae): evidence from fruit and seed structure. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 126, n. 4, p. 327-337, 1998.

PINHEIRO, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, v.16, nº 7-8, p. 79-82, 2013.

POTHAKAMURY, U. R.; BARBOSA-CANOVÁS, G. V. Fundamental aspects of controlled release in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 12, p. 397-496, 1995.

REINERS, R.A., WALL, J.S., INGLETT, G.E., 1973. **Corn proteins: Potential for their industrial use**. In: Pomeranz, Y. (Ed.), Industrial Uses of Cereals. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, p. 285–302.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, [s. l.], v. 57, p. 397–430, 2008.

ROMAN, M.; WINTER, W. T. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1671-1677, 2004.

RUFFA, M. J. et al. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, n.3, p.335-339, 2002.

SANKALIA, M. G. et al. Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 215-232.

SANTOS, J.C.O.; SANTOS, I.M.G.; SOUZA, A.G. Effect of heating and cooling on reological parameters of edible vegetable oils. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 4, p. 401-405, 2004.

SANTOS, Samantha Fonseca dos. **Análise de filmes poliméricos densos de AcC/PHAmcl por técnicas de DSC, DMA, XPS, Ângulo de Contato e AFM**. 2017.. 70 f. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado) -Curso de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2017.

SANTOS, V. de S. **Avaliações e caracterizações de biofilme comestível de carboximetilcelulose contendo Curcuma longa e nanopartículas de quitosana**. 2018. 77 f., Dissertação (Mestrado Ciência dos Materiais.) Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2018.

SHALABY, S. W.; BURG, K. J. L. **Absorbable and biodegradable polymers**. USA: Florida, 289 p., 2004.

SHIMIZU, M.T. et al. 2006. Essential oil of *Lithraea Molleoides* (vell.): chemical composition and antimicrobial activity. *Braz. J. Microbiol.* 37, 556–560. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400028>.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 3, p. 171-192, 2001.

SILVA, Leandro de Oliveira. **Estudo de membranas à base de acetato de celulose com morfologia controlada para liberação de anti-inflamatórios**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

SOCRATES, R. et al. Biomimetic fabrication of mineralized composite films of nanosilver loaded native fibrillar collagen and chitosan. **Materials Science and Engineering: C**, v. 99, p. 357–366, 2019.

SOUZA, Juliana Paes Leme de Mello, et al. **Estudo da composição química, do potencial antioxidante e da atividade antimicrobiana da própolis marrom Brasileira e a aplicação de extratos de própolis em filmes de carboximetilcelulose sódica**. 2019. 151 f. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, Rio de Janeiro, 2019.

STEVENS, M. P. **Polymer chemistry**: an introduction. 3. ed. New York: Oxford University Press, 2009, 551 p.

SU J., HUANG, Z., WANG X, LI M., Structure and properties of carboxymethylcellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions, **Carbohydrate Polymers**, v.79, p. 145-153, 2010.

SZULC, J.; et al. Beeswax-Modified Textiles: Method of Preparation and Assessment of Antimicrobial Properties. **Polymers**, v. 12, n. 2, p. 344-358, 2020.

SZTUKA, K.; KOŁODZIEJSKA. I. The influence of hydrophobic substances on water vapor permeability of fish gelatin films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n.1-8, p. 1062-1064, 2009.

TEIXEIRA, E.de M. et al. Nanofibras de algodão obtidas sob diferentes condições de hidrólise ácida. **Polímeros**, v. 20, p. 264-268, 2010.

THASSU, D.; DELLERS, M; PATHYAK, Y. Nanoparticulate Drug Delivery Systems. Informa Healthcare – Collection. **Drugs and Pharmaceutical Sciences**, v. 166, 2007.

THOMAS, A.; HARDING, K. G.; MOORE, K. Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor. **Biomaterials**, **Guildford**, v. 21, n. 17, p. 1797–802, 2000.

TOGRUL H., ARSLAN N., Production of carboxymethylcellulose from sugar beet pulp cellulose and rheological behavior of carboxhylcellulose, **Carbohydrate Polymers Journal**, v.54, p.73- 82, 2003.

TORRES, S. J. V. et al. **Caracterização Mecânica e Absorção de Água de Blendas a base de Poli (álcool vinílico) e Zeína**. In: Congresso Brasileiro de Polímeros, 12, 2013. Anais., Florianópolis-SC, 2013.

TÔRRES, A.R. et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.373-380, 2005.

TREVISOL, Thalles Canton et al. **Filmes em mono e bicamada de alginato e carboximetilcelulose com liberação controlada de diclofenaco de sódio**. 2018. 12 f. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, Santa Catarina, 2018.

VILLALOBOS, R. et al. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactantes as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 19, n. 1-6, p. 53-61, 2005.

YOO, S.H.; SONG, Y. B.; CHANG, P. S.; LEE H.G. Microencapsulation of alpha-tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 38, n. 1, p. 25-30, 2006.

WANG, Y.; SU, C-P.; SCHULMERICH, M.; PADUA, G. W. Characterization of core-shell structures formed by zein. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 487-494, 2013.

ZHONG, Q. JIN, M. Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersion. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2380-2387, 2009.

World Organization Health-Who. (2020). Health Topics: Leishmaniasis.

WORLD ORGANIZATION HEALTH. **Leishmaniose**, 12 jan., 2023. Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 02 jan. 2023.