

**UNIVERSIDADE TECNÓLOGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**NICOLAS AUGUSTO PAOLINI**

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E EXTRATO DE  
ROMÃ E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO EM FILMES  
POLIMÉRICOS**

**CURITIBA**

**2023**

**NICOLAS AUGUSTO PAOLINI**

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E EXTRATO DE  
ROMÃ E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO EM FILMES  
POLIMÉRICOS**

**Development of microparticles of chitosan and pomegranate extract and  
evaluation of its antimicrobial potential in polymeric films**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência em Tecnologia Ambiental

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Giselle Maria Maciel

Coorientador(a): Dr(a). Agne Roani de Carvalho Jorge

**CURITIBA**

**2023**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original.



**Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná  
Campus Curitiba**



NICOLAS AUGUSTO PAOLINI

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E EXTRATO DE ROMÃ  
E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO EM FILMES POLIMÉRICOS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 27 de Abril de 2023

Dra. Giselle Maria Maciel, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Agne Roani De Carvalho Jorge, Doutorado - Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial - Senai

Dra. Alessandra Cristina Pedro, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 28/04/2023.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família por todo o apoio durante esse período.

Agradeço imensamente a Profa. Dra. Giselle Maria Maciel e a Dra. Agne Roani de Carvalho Jorge pelas orientações recebidas neste trabalho de Mestrado, que ajudaram meu crescimento tanto pessoal quanto profissional.

Um agradecimento ao ISI Eletroquímica pela disponibilidade de infraestrutura, equipamentos e pelo conhecimento adquirido no período tanto do trabalho quanto dos anos anteriores. Foram tantas pessoas que pude conviver nesse período que não conseguiria mencionar e agradecer a todas aqui.

Um agradecimento em especial ao time de *Smart Materials* do Instituto pelos auxílios e trocas diárias de conhecimento.

Agradeço aos professores Charles Windson Isidoro Haminiuk e Alessandra Cristina Pedro por aceitarem participar da banca e pelas sugestões de melhoria do trabalho.

Um obrigado especial ao Dr. Richard Segal pela ajuda desde antes do começo. E de forma geral a todos que estiveram torcendo e auxiliando nessa etapa. Obrigado time!

## RESUMO

PAOLINI, Nicolas Augusto. **DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E EXTRATO DE ROMÃ E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO EM FILMES POLIMÉRICOS**. 2023. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2023.

O desenvolvimento de produtos com propriedades antimicrobianas apresenta grande relevância nos setores de saúde humana e industrial, considerando a necessidade de se controlar a proliferação e transmissão de microrganismos patogênicos causadores de doenças. Neste contexto, os revestimentos com propriedades antimicrobianas compõem uma vertente de pesquisa com aplicações potenciais em hospitais, indústrias e ambientes domésticos. Além disso, existe atualmente uma demanda por tecnologias de baixo impacto ambiental, como as que utilizam biopolímeros e extratos vegetais com propriedades antimicrobianas, e que são abordagens ecologicamente aceitas, possibilitando assim caminhar para a substituição do uso de compostos nocivos ambientalmente. Somado a isso, o desenvolvimento de um revestimento antimicrobiano para aplicação em superfícies, que valorize a quitosana, um produto abundante e derivado da quitina, é uma opção promissora que integra essas políticas ambientais. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um filme polimérico com propriedades antimicrobianas pela aditivação de micropartículas de quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP) contendo extrato de romã. Com o uso dessa técnica foi possível sintetizar micropartículas com eficiência de encapsulamento de 71%. As micropartículas foram caracterizadas por FTIR para avaliação da contribuição dos espectros dos materiais de parede e de núcleo. Os ensaios qualitativos de ação antimicrobiana demonstraram a eficiência antibacteriana do material sintetizado frente a cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bem como um possível efeito sinérgico entre a quitosana e o extrato de romã. Além disso, foi desenvolvido um filme polimérico a base de poli(álcool vinílico) (PVAL) e celulose microfibrilada (CMF) no qual foram incorporadas as micropartículas de quitosana. As caracterizações desses revestimentos por MEV e FTIR demonstraram a presença dos componentes nos filmes sendo possível verificar que enquanto o PVAL traz uma melhor estruturação para o revestimento a CMF torna o filme mais resistentes mecanicamente. A aditivação dos revestimentos com as partículas de quitosana com extrato de romã potencializaram as características do filme, resultando em um revestimento com ação antimicrobiana prolongada devido liberação controlada do extrato de romã, apresentando 75% de redução de UFC em relação ao revestimento base. Além disso, não ocasionaram nenhuma modificação morfológica ou nas propriedades físicas quando comparadas ao filme base, mantendo os valores de ângulo de contato similares (45 - 53 °) e valores de dureza ao lápis 9H.

**Palavras-chave:** Revestimento Antimicrobiano; Gelificação Iônica; Micropartículas de Quitosana; Extrato de Romã.

## ABSTRACT

PAOLINI, Nicolas Augusto. **DEVELOPMENT OF MICROPARTICLES OF CHITOSAN AND POMEGRANATE EXTRACT AND EVALUATION OF ITS ANTIMICROBIAL POTENTIAL IN POLYMERIC FILMS**. 2023. 67 f. Thesis (Master's in Environmental Science and Technology) – Federal University of Technology – Paraná, Curitiba, 2023.

The development of products with antimicrobial properties is of great relevance in the human and industrial health sectors, considering the need to control the proliferation and transmission of disease-causing pathogenic microorganisms. In this context, coatings with antimicrobial properties make up a research strand with potential applications in hospitals, industries and domestic environments. In addition, there is currently a demand for technologies with low environmental impact, such as those that use biopolymers and plant extracts with antimicrobial properties, and which are ecologically accepted approaches, thus making it possible to move towards replacing the use of environmentally harmful compounds. Added to this, the development of an antimicrobial coating for application on surfaces, that values chitosan, an abundant product derived from chitin, is a promising option that integrates these environmental policies. The objective of this work was to develop a polymeric film with antimicrobial properties by adding microparticles of chitosan and sodium tripolyphosphate (STPP) containing pomegranate extract. Using this technique, it was possible to synthesize microparticles with an encapsulation efficiency of 71%. The microparticles were characterized by FTIR to evaluate the contribution of the spectra of the wall and core materials. Qualitative antimicrobial assays demonstrated the antibacterial efficiency of the synthesized material against strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, as well as a possible synergistic effect between chitosan and pomegranate extract. In addition, a polymeric film based on poly(vinyl alcohol) (PVAL) and microfibrillated cellulose (MFC) was developed, in which chitosan microparticles were incorporated. The characterizations of these coatings by SEM and FTIR demonstrated the presence of the components in the films, being possible to verify that while the PVAL brings a better structure to the coating, the MFC makes the film more mechanically resistant. The addition of an additive to the coatings with chitosan particles and pomegranate extract enhanced the characteristics of the film, resulting in a coating with prolonged antimicrobial action due to the controlled release of the pomegranate extract, showing a 75% reduction in CFU compared to the base film. In addition, they did not cause any morphological or physical properties changes when compared to the base film, maintaining similar contact angle values (45 - 53 °) and pencil hardness values to 9H.

**Keywords:** Antimicrobial coating; Ionic gelatinization; Chitosan microparticles; Pomegranate Extract;

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de metabólitos secundários, sendo (a) um composto fenólico (Ácido Cafeico), (b) um terpeno (Limoneno) e (c) um composto nitrogenado (Pirrolidina).....	14
Figura 2 - Estrutura da punicalagina .....	18
Figura 3 - Obtenção da Quitosana a partir da desacetilação da Quitina. ....	20
Figura 4 - Processo de obtenção da quitosana.....	21
Figura 5. Representação dos principais mecanismos de ação das quitosanas frente a microrganismos .....	23
Figura 6 - Tipos de microcápsulas: (i) simples; (ii) matricial/microesfera; (iii) simples irregular; (iv) polinuclear; (v) multicamadas; (vi) agrupamento de microcápsulas. ....	25
Figura 7 - Esquema representativo de uma estrutura formada no modelo “Caixa de Ovo” .....	27
Figura 8 - Modelo de interação entre Quitosana e TPP. ....	29
Figura 9. Fluxograma da metodologia de síntese das micro/nanopartículas de quitosana contendo extrato de romã .....	31
Figura 10 - Representação adaptada da metodologia da ASTM E2149. ....	38
Figura 11. Fotografias do meio reacional nas diversas etapas da síntese, sendo (a) a solução de quitosana, (b) a solução de quitosana após homogeneização do extrato de romã, (c) a suspensão coloidal das partículas e (d) as partículas decantadas após as 24 horas em geladeira.....	38
Figura 12. Fotografia das soluções de micro/nanopartículas sintetizadas sendo utilizado (a) quitosana de baixa massa molecular e (b) quitosana de alta massa molecular.....	41
Figura 13 - Espectros de FTIR do TPP (verde), quitosana de baixo peso molecular (azul), extrato de romã (vermelho) e micropartículas (preto).....	43
Figura 14 - Espectros de FTIR da quitosana de alto peso molecular (azul), TPP (verde), extrato de romã (vermelho) e micropartículas (preto). ....	44
Figura 15. Aspecto visual de resultado do teste de difusão em disco contra <i>S. aureus</i> , utilizando as amostras: (B) quitosana de baixa massa sem extrato; (E) quitosana com adição de 50 mg extrato de romã; (F) quitosana com adição de 150 mg de extrato de romã; (+) controle positivo - antibiótico; (-) controle negativo – solução salina; disco central – extrato puro de romã. ....	45

Figura 16 - Fotografias dos filmes poliméricos, sendo (a) do filme contendo glicerol e (b) do filme sem adição de glicerol. ....	48
Figura 17. Imagens de MEV dos filmes poliméricos desenvolvidos, sendo (a) CMF (3% m/m), (b) PVAL (3% m/m), (c) CMF (3% m/m) - PVAL (3% m/m), e (d) CMF (3% m/m), PVAL (3% m/m) e Glicerol, nas magnificações: 400 e 1000 vezes, respectivamente. ....	50
Figura 18 - Espectros de FTIR dos materiais (a) Filme de PVAL (3% m/m) – CMF (3% m/m), (b) PVAL 3% (m/m) e (c) CMF 3% (m/m).....	51
Figura 19 - Espectros de FTIR dos materiais (a) PVAL, (b) CMF, (c) Glicerol e (d) Filme de PVAL (3% m/m) – CMF (3% m/m) – Glicerol. ....	52
Figura 20 - Fotografias dos revestimentos, sendo (a) um revestimento aditivado de Glicerol, tendo dureza mediana e (b) o revestimento sem glicerol, com dureza superior a 9H.....	53
Figura 21. Fotografias das formulações dos revestimentos, sendo (a) referente ao revestimento base, (b) ao revestimento aditivado das partículas de quitosana, (c) ao revestimento aditivado das partículas de quitosana contendo extrato de romã e (d) ao revestimento aditivado de nanopartículas de prata. ....	56
Figura 22 - Gráfico de viscosidade x Taxa de cisalhamento das formulações.....	57
Figura 23 - Fotografias dos revestimentos após aplicação por casting e após secos, sendo (a) revestimento base, (b) revestimento contendo partículas de quitosana, (c) revestimento contendo partículas de quitosana e extrato de romã e (d) revestimento contendo nanopartículas de prata. ....	58
Figura 24 - Espectros de FTIR separados e sobrepostos dos filmes secos, sendo (a) referente ao revestimento base, (b) ao revestimento aditivo com partículas de quitosana, (c) ao revestimentos aditivado com partículas de quitosana e extrato de romã e (d) ao revestimento aditivado com nanopartículas de prata.....	60
Figura 25 - Imagens de MEV dos filmes poliméricos desenvolvidos, sendo (a) filme base, (b) filme contendo partículas de quitosana, (c) filme contendo partículas de quitosana e extrato de romã e (d) filme contendo nanopartículas de prata, nas magnificações de 200 e 1000 vezes, respectivamente. ....	61
Figura 26 - Imagens de ângulo de contato dos filmes, sendo (a) filme base, (b) filme contendo partículas de quitosana, (c) filme contendo partículas de quitosana e extrato de romã e (d) filme contendo nanopartículas de prata. ....	62

Figura 27 - Fotografias dos filmes secos, sendo (a) o filme base, (b) o filme aditivado com partículas de quitosana, (c) o filme aditivado com partículas de quitosana e extrato de romã e (d) o filme aditivado de nanopartículas de prata. ....64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classe de substâncias encontradas na <i>Punica granatum</i> .....	17
Tabela 2 - Planejamento experimental e resultados das caracterizações das micro/nanopartículas. ....	39
Tabela 3 - Resultados do teste de difusão em disco das micropartículas de quitosana contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> .....	46
Tabela 4 - Planejamento experimental e resultados das caracterizações das micropartículas. ....	54
Tabela 5 - Resultados de redução de unidades formadoras de colônia dos revestimentos testados para bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> nos tempos de contato de 1h, 24h e 48h. ....	66

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
3.1 EXTRATOS VEGETAIS .....	14
3.1.1 Extrato de Romã.....	17
3.2 QUITOSANA .....	19
3.3 MICROENCAPSULAMENTO .....	24
3.3.1 GELIFICAÇÃO IÔNICA .....	26
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 SÍNTESE DAS MICRO/NANOPARTÍCULAS.....	30
4.2 DESENVOLVIMENTO DO FILME POLIMÉRICO .....	32
<b>4.3 CARACTERIZAÇÕES</b> .....	<b>32</b>
4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	32
4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	32
4.3.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta .....	33
4.3.4 Eficiência de Encapsulamento.....	33
4.3.4.1 Análise Estatística dos dados de Eficiência de Encapsulamento .....	35
4.3.5 Ensaio normatizados de dureza de filmes poliméricos.....	35
4.3.6 Análise de Ângulo de Contato .....	35
4.3.7 Análise de Reologia das formulações.....	35
4.3.8 Ensaio de Atividade Antimicrobiana.....	36
4.3.8.1 Método Qualitativo de Difusão em Disco.....	36
4.3.8.2 Método Quantitativo ASTM E2149-20 .....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS MICRO/NANOPARTÍCULAS .....	38
5.1.1 Ensaio Antimicrobiano .....	44
5.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO FILME POLIMÉRICO BASE .....	47
5.3 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO FILME POLIMÉRICO FINAL.....	53
5.3.1 Ensaio Antimicrobianos dos revestimentos.....	63
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Infecções causadas por microrganismos patogênicos podem ocorrer em diversas áreas, por exemplo, hospitalar, têxtil, alimentícia, doméstica, sendo de grande preocupação para a saúde. Somado a isso, a adesão e crescimento de microrganismos, em superfícies, gera gastos relevantes no ambiente industrial, pois interferem em sistemas de purificação de água, induzem o processo corrosivo e contribuem para o aumento de gastos de combustível em embarcações devido bioincrustação. Assim, o estudo de superfícies com propriedades antimicrobianas é de grande importância.

Nessa linha de pesquisa, inúmeros compostos químicos são avaliados quanto ao potencial de conferirem a funcionalidade antimicrobiana a um revestimento, sendo uma delas a possibilidade de incorporar em um revestimento, compostos que apresentem essa propriedade desejada, por exemplo: sais de amônio quaternário, metais ou óxidos metálicos, peptídeos, polímeros naturais ou sintéticos, entre outros.

Devido ao seu custo-benefício e sua eficaz ação antimicrobiana, as nanopartículas metálicas são amplamente utilizadas em diferentes materiais. Existem diversos estudos que aplicam diferentes nanopartículas metálicas para obter-se ação antimicrobiana, e relata-se que nanopartículas de prata (AgNP) são as mais eficientes e amplamente estudadas. Porém, existe uma preocupação quanto a utilização dessas partículas, reconhecidas como potenciais ameaças ambientais, e devido sua toxicidade atingindo principalmente o fígado, baço, pulmões e rins.

Alternativamente a esses compostos, a utilização de opções naturais, ecologicamente aceitas e com ação antimicrobiana comprovada traz diversos pontos positivos para uma aplicação em um revestimento antimicrobiano. Dentre as alternativas, os extratos vegetais mostram-se promissores devido ação comprovada e menor custo de produção quando comparados, por exemplo, a óleos essenciais.

Dentre os extratos com ação antimicrobiana comprovada, a extensa história da utilização da romã como um medicamento popular para inúmeras doenças vem sendo amparada por um número crescente de estudos. Atualmente tem-se o conhecimento que essa variedade de benefícios médicos está relacionada a sua riqueza em compostos, como polifenóis, flavonoides, antocianinas e taninos hidrolisados. Esses compostos apresentam forte ação antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de propriedades antioxidante, antivirais, antiinflamatória etc.

A maioria dos compostos bioativos apresentam sensibilidade a reações oxidativas. Antocianinas por exemplo são facilmente degradadas por alterações no pH, elevadas temperaturas ou exposição à luz e ao oxigênio. Devido a isso, o investimento em alternativas para compensar a limitação dos extratos para aplicações industriais é de grande valia. Um método de proteção é o micro/nano encapsulamento, técnica que consiste em criar uma camada protetora ao agente ativo, resguardando-o contra os fatores ambientais que possam degradá-lo; outras vantagens envolvem a possibilidade de liberação controlada/direcionada, aumentando a eficiência do ativo e seu tempo de vida útil. A escolha do método de encapsulação depende da aplicação do produto, mecanismos desejados para a liberação do composto encapsulado, propriedades físicas e químicas do núcleo e do material de parede, entre outros.

Dentre os métodos de microencapsulação encontrados na literatura aplicado a extratos vegetais, o método de gelificação iônica mostra-se um método interessante devido a eficiência, simplicidade e rapidez de preparo. O processo consiste na formação de estruturas gelatinosas, normalmente em formato esférico, decorrente da interação de polieletrólitos com cargas opostas.

Um dos polímeros amplamente utilizados nesses estudos é a quitosana, que pode ser obtida a partir da desacetilação alcalina da quitina, a qual é o segundo polissacarídeo mais abundante do mundo e um resíduo industrial (principalmente da indústria pesqueira, pela remoção da carapaça de crustáceos). Sua estrutura é composta de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina unidas por ligação glicosídica  $\beta(1\rightarrow4)$  e apresenta solubilidade em ácido acético, onde ocorre a protonação dos grupamentos amino conferindo carga positiva ao composto. Uma das vantagens deste polissacarídeo é sua ação antimicrobiana, e dentre os modelos que elucidam essa atividade, o mais aceito está relacionado com a interação entre essa carga superficial positiva do composto com as cargas negativas da parede celular microbiana, desencadeando diversos mecanismos que levam a morte celular.

O desenvolvimento de micro/nanopartículas de quitosana como material de parede e extrato de romã como material de núcleo torna-se pertinente pois, ao mesmo tempo em que o material de parede pode atuar como um composto com ação antimicrobiana “imediate”, ele também protege o ativo contra intempéries (pH, temperatura, radiação). O extrato, por sua vez, terá ação prolongada devido liberação gradual e controlada. Essa otimização de efeitos resulta num sistema duplamente responsivo analisando o campo da ação antimicrobiana.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antimicrobiana, e as propriedades químicas e mecânicas de um filme polimérico, aditivado com micro/nanopartículas de quitosana contendo extrato de romã como material de núcleo e comparar os resultados com o filme aditivado com nanopartículas de prata.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar micro/nanopartículas de quitosana contendo extrato de romã pela metodologia de gelificação iônica.
- Caracterizar as micro/nanopartículas por Microscopia, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta.
- Desenvolvimento de um filme polimérico baseado em PVAL e CMF, e incorporação das micro/nanopartículas na formulação.
- Avaliar a ação antimicrobiana das micro/nanopartículas e dos revestimentos desenvolvidos contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.
- Caracterizar o revestimento por MEV, FTIR, análises de reologia, ângulo de contato e realizar testes normatizados de dureza.
- Preparo de filmes aditivados de nanopartículas de prata e comparação dos resultados com os filmes desenvolvidos com extrato de romã.

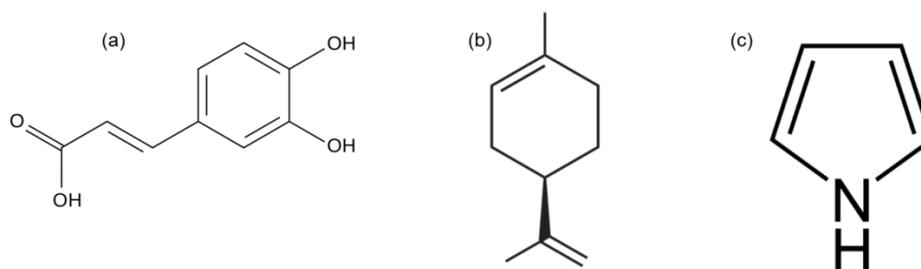
### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 EXTRATOS VEGETAIS

Plantas produzem uma grande diversidade de compostos que podem ser classificados como metabólitos primários ou secundários. Os primários são aqueles que toda planta produz e estão diretamente envolvidos em etapas de crescimento e desenvolvimento. Nesse grupo estão inclusas moléculas menores como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, lipídeos, e também moléculas maiores, como proteínas, polissacarídeos, DNA, RNA, entre outros.

Os metabólitos secundários, podem ser divididos em três grandes grupos de moléculas: os compostos nitrogenados, os terpenos, e os compostos fenólicos, todos provenientes do metabolismo da glicose, via ácido chiquímico e acetato. São compostos altamente específicos e desempenham um importante papel na evolução dos vegetais e na sua interação com seres vivos, estando relacionados com a proteção vegetal. Industrialmente são muito visados pelas indústrias de biotecnologia, farmacêutica, e de corantes e aroma (PACHECO BORGES; AMORIM, 2020).

**Figura 1 - Exemplos de metabólitos secundários, sendo (a) um composto fenólico (Ácido Cafeico), (b) um terpeno (Limoneno) e (c) um composto nitrogenado (Pirrolidina)**



Normalmente os metabólitos secundários são sintetizados no vegetal em pequenas quantidades, porém observou-se que fatores físicos/climáticos (sazonalidade, horários do dia, temperatura, altitude, índice pluviométrico) que normalmente influenciam no desenvolvimento da planta também influenciam concentração e nas características desses compostos sintetizados (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; RODRIGUES et al., 2016). Entre os metabólitos secundários de maior importância podemos citar os alcaloides, fenóis, óleos essenciais, taninos, flavonoides e as saponinas. Os alcaloides são compostos de bases nitrogenadas, apresentam

solubilidade em solventes apolares como éter e clorofórmio, e possuem funções vermícidas, anestésicas, hipertensiva e hipotensiva e estimulante do sistema nervoso central. Os fenóis apresentam em sua estrutura anéis aromáticos com grupo hidroxila, e apresentam funções antisséptica, antiangiogênica, anestésica, auxiliam no metabolismo de lipídeos, na respiração e na floração da planta. Óleos essenciais são compostos altamente voláteis, possuem em sua estrutura vários anéis aromáticos, e tem função antioxidante e aromatizante, podendo atuar na atração de agentes polinizadores, na defesa contra herbívoros e regular a decomposição da matéria orgânica. Os taninos são compostos fenólicos de alto peso molecular, possuindo solubilidade em água e álcool, e função antisséptica. Flavonoides possuem estrutura básica composta de 15 carbonos, e são responsáveis pela pigmentação das flores, além de possuírem efeitos aromatizantes, bactericida, fungicida, adstringente e anti-inflamatórios. Por fim, as saponinas são compostos com alto peso molecular, provenientes da hidrólise de moléculas de glicose, tendo efeitos antitumorais e atuam na produção de hormônios sexuais (PACHECO BORGES; AMORIM, 2020; RODRIGUES et al., 2016).

Os extratos vegetais são soluções concentradas desses metabólitos secundários extraídos a partir de diferentes matérias-primas vegetais, como raiz, caule, folhas, frutos e sementes.

A obtenção do extrato ocorre através de um processo que pode ser dividido em duas etapas. A primeira envolve a separação dos metabólitos secundários da planta por um solvente. Dos diversos métodos utilizados, o processo mais difundido e rentável é o de percolação devido facilidade da técnica, e menor custo e risco de reações entre soluto e solvente. Nesse processo o material é macerado e colocado em contato com um solvente específico. Após um período é posicionado no percolador, mantido em repouso por um tempo específico e em seguida, por gravidade ocorre uma filtração e gotejamento do extrato, que pode ainda retornar ao sistema para melhor aproveitamento. Dentre outros processos que podemos citar, porém estes com aplicação de temperatura, estão a extração por soxhlet, infusão ou decocção.

A segunda etapa envolve a concentração do extrato através da eliminação do solvente. Os métodos mais comuns são através da utilização de um rotaevaporador, ou por processos de liofilização ou secagem por spray-dryer (OLIVEIRA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016).

O uso de extratos vegetais como medicamento popular para inúmeras doenças está enraizado em diversas culturas ao redor do mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 80% da população mundial ainda utiliza da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde. O conhecimento de que extratos vegetais apresentam ação antimicrobiana frente a um amplo espectro de microrganismos data de décadas atrás. Em seu trabalho, Ríos e Recio (RÍOS; RECIO, 2005) dissertam sobre a trajetória dos estudos envolvendo o uso de plantas medicinais e sua ação antimicrobiana, apresentando estudos desde a década de 1970. Além de comentarem desse passado, dissertando que já nesses estudos tinha-se o conhecimento de que compostos fenólicos se mostram os ativos predominantes com ação antimicrobiana, os autores também dissertam sobre as diversas espécies vegetais que apresentam ação antimicrobiana, dando ênfase a um estudo em que foram compiladas 75 espécies em que o extrato apresenta boa atividade antimicrobiana.

Atualmente, tem-se o conhecimento que derivados naturais oferecem inúmeras oportunidades para novas descobertas de medicamentos, devido sua diversidade química, uma vez que extratos de plantas diferentes são compostos de diferentes moléculas em diferentes concentrações e com interações sinérgicas distintas. Um viés de estudo atual da aplicação de compostos naturais está relacionado ao combate a microrganismos resistentes a medicamentos, visto que através dos estudos com compostos naturais foram encontrados diversos fitoquímicos de plantas como alternativas seguras e eficazes para inibição desses microrganismos, e que ainda apresentaram menores efeitos colaterais. (SASIDHARAN et al., 2011).

Em geral considera-se os taninos como compostos tóxicos para microrganismos. Essas moléculas em solução criam complexos estáveis, principalmente com proteínas, ou íons metálicos (Fe ou Cu). A complexação com proteínas da parede celular diminui sua permeabilidade e reduz o transporte de substratos para dentro da célula. A interação com enzimas ocasiona sua alteração conformacional, inibindo assim os sítios ativos e consequentemente sua atividade enzimática. E a interação com íons metálicos diminui a disponibilidade destes para utilização em processos metabólicos internos das bactérias.

A presença majoritária de taninos em extratos vegetais, por exemplo da romã são pontos que evidenciam sua eficácia antimicrobiana. (VIUDA-MARTOS; FERNÁNDEZ-LÓAEZ; PÉREZ-ÁLVAREZ, 2010)

### 3.1.1 Extrato de Romã

A utilização da romã (*Punica granatum*) como um remédio popular tradicional para doenças ou infecções é de longa data, sendo suportado por um número crescente de estudos (SUNDARARAJAN et al., 2010).

A casca da romã compõe quase metade de seu peso e por não ser consumida acaba sendo descartada. A casca é caracterizada por conter quantidades consideráveis de substâncias ativas, sendo rica majoritariamente em taninos hidrolisados, também apresentando polifenóis, flavonoides e antocianina. Dentre as propriedades desses compostos estão sua ótima ação antimicrobiana, além de apresentarem propriedades anti-inflamatórias, antioxidante, entre outras (BORGUINI et al., [s.d.]; SOLTANZADEH et al., 2021). A Tabela 1 apresenta algumas classes e as respectivas substâncias encontradas na romã.

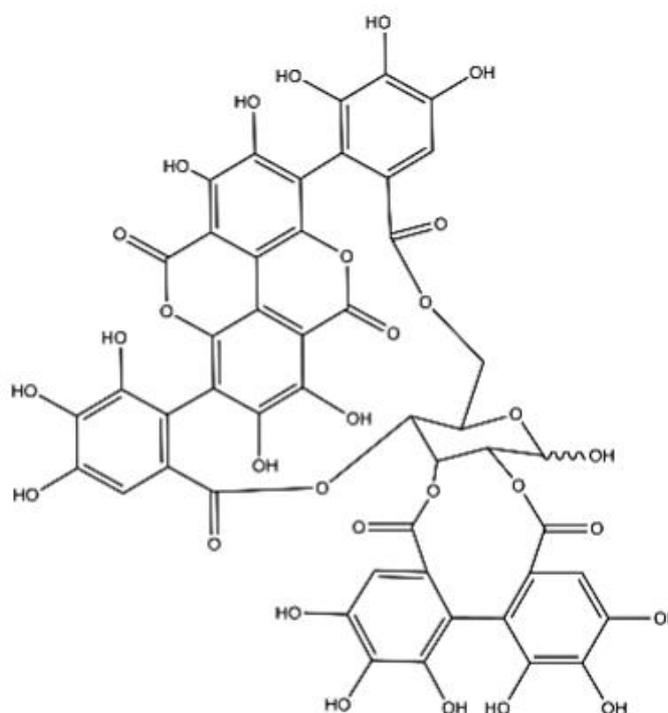
**Tabela 1 - Classe de substâncias encontradas na *Punica granatum*.**

<b>Classes</b>	<b>Substâncias</b>
<b>Taninos</b>	Punicalagina, punicalina, pedunculagina, telimagrandinal, punicafolina, ácido flavogalônico, ácidos gálico e elágico.
<b>Flavonóides</b>	Luteolina, quercetina, punicaone, apigenina, naringenina e naringina.
<b>Ácidos Graxos</b>	Ácido oleico, ácido punicico
<b>Triterpenos</b>	Ácido lantanólico, lupeol, ácido betulínico e ácido asiático, friedelina
<b>Antocianinas</b>	Delfinidina 3,5-diglicosídeo; cianidina 3,5-diglicosídeo; delfinidina 3-glicosídeo; pelargonidina 3,5-diglicosídeo; cianidina 3-glicosídeo; pelargonidina 3,5-diglicosídeo.
<b>Ácido fenólicos</b>	Caféico; clorogênico; ácido orto e para-cumárico; ácido elágico; ácido gálico.
<b>Alcalóides</b>	Peletierina, metilpeletierina, pseudopeletierina e isopeletierina.

**Fonte: (FLECK, 2016)**

Estudos prévios verificaram a ação inibitória do extrato de *P. granatum* sobre *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, além de outras bactérias e fungos. Em especial observou-se que o extrato dessa planta inibiu o crescimento de *S. aureus* com resistência ao antibiótico metilina, indicando que essas substâncias apresentavam potencial para aplicação no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes. A punicalagina (Figura 2), um composto da classe dos taninos, foi identificada como um dos compostos majoritários presentes no extrato, possuindo ação antimicrobiana, antioxidante, antiviral, antiproliferativa e imunossupressora. Também é citada como responsável pela atividade antimicrobiana frente a bactérias sensíveis ou multirresistentes a medicamentos. (FLECK, 2016; MICHELIN et al., 2005; XU et al., 2017)

Figura 2 - Estrutura química da molécula de punicalagina



Fonte: (BACH, 2020)

Em seu estudo de revisão sobre compostos funcionais da romã, Viuda-Martos *et.al.* (VIUDA-MARTOS; FERNÁNDEZ-LÓAEZ; PÉREZ-ÁLVAREZ, 2010) dissertam sobre os mecanismos de atuação dos compostos fenólicos, comentando que mesmo não estando totalmente claro, tem-se algumas hipóteses. A característica anfifílica das

moléculas pode explicar suas interações com biomembranas, uma vez que a parte hidrofílica da molécula interage com a parte polar da membrana, enquanto que o anel benzênico e as cadeias alifáticas laterais com a parte interna apolar. Outras hipóteses vinculam sua ação antimicrobiana com a presença de diversos grupos hidroxila na molécula e a sua acidez; a reações com grupos sulfidrilas (-SH) de proteínas; ou até mesmo interferência em secreções bacterianas.

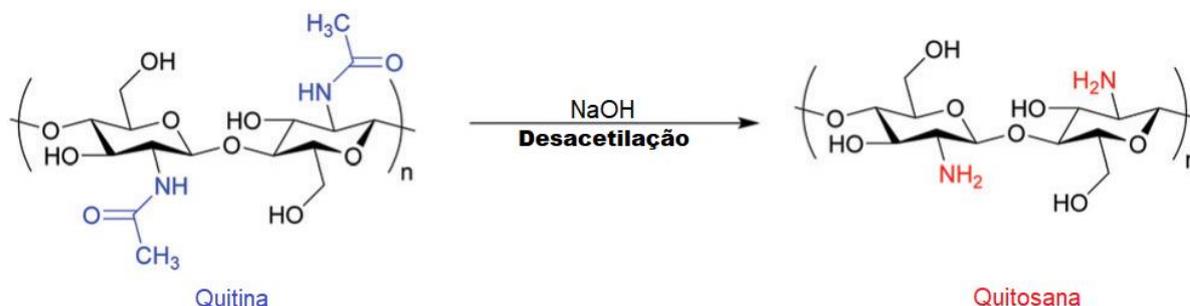
Xu *et.al* em seus estudos (XU et al., 2017) analisaram a ação antimicrobiana da punicalagina contra *S. aureus*, além de avaliarem seu efeito na formação de biofilme. Em resumo eles concluíram que a punicalagina apresentou bons efeitos antibacterianos e antibiofilme, observando que o composto afetou a membrana celular devido vazamento de compostos juntamente com alterações microestruturais analisadas por microscopia. Porém não foi observado lise celular. Esses resultados indicaram que a punicalagina tem potencial para aplicações biotecnológicas.

### 3.2 QUITOSANA

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo que na primeira posição encontra-se a celulose. A quitina é encontrada principalmente em exoesqueleto de animais marinhos, porém também pode ser encontrada na parede celular de fungos dos gêneros *Mucor*, *Aspergillus* e *Absidia*, além da classe *Zigomicetos*, cujos teores podem variar de 2 a 42%. A quitina apresenta estrutura fibrosa e função estrutural fundamental nesses organismos. (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009)

A obtenção da quitosana pode acontecer na natureza através de enzimas específicas como a quitinase ou através da ação de microrganismos, e industrialmente é obtida a partir da desacetilação alcalina, em temperatura elevada, da quitina. A Figura 3 apresenta o mecanismo de obtenção da quitosana através da reação de desacetilação em meio alcalino da quitina

Figura 3 - Obtenção da Quitosana a partir da desacetilação da Quitina.

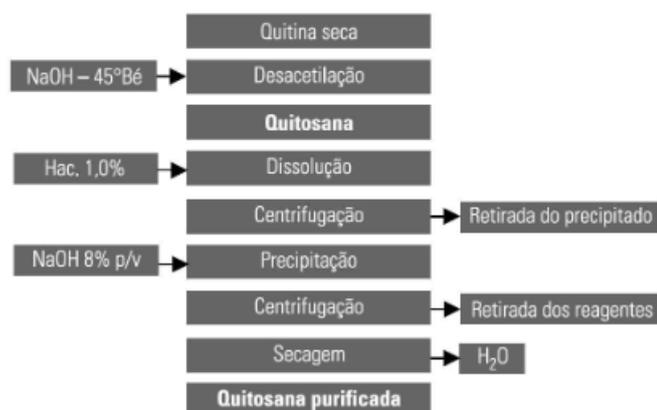


Adaptado de: (JIN et al., 2021)

A quitosana foi produzida pela primeira vez em escala industrial em 1971 no Japão, país este que em 1986 já possuía quinze fábricas produzindo quitina e quitosana em escala comercial (PAULA BESSA-JUNIOR; GONÇALVES, 2013). O fluxograma do processo de obtenção da quitosana está apresentado na Figura 4. Quimicamente a quitosana é composta de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina unidas por ligação glicosídica  $\beta(1\rightarrow4)$ , sendo também conhecida como o derivado N-desacetilado da quitina. Contudo mesmo que o grau correto de desacetilação que diferencie esses dois produtos não seja totalmente definido, aceita-se como “quitosanas” os compostos com grau superior a 75% e solúveis em ácidos, por exemplo acético, fórmico ou clorídrico. Em soluções ácidas ocorre a protonação dos grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) da quitosana, levando a formação de um íon amônio ( $-\text{NH}_3^+$ ) conferindo carga positiva ao composto. (MACEDO et al., 2022; SPIN-NETO et al., 2008)

Além do grau de desacetilação outra diferenciação comum entre as “quitosanas” envolve sua massa molecular. Mesmo não tendo um padrão específico que defina massa molecular, é aceito como quitosana de baixa massa aquelas com massa molecular  $< 50$  kDa; média massa entre 50-150 kDa; e alta massa  $> 150$  kDa. (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009).

**Figura 4 - Processo de obtenção da quitosana.**



**Fonte: (PAULA BESSA-JUNIOR; GONÇALVES, 2013)**

Dependendo do grau de desacetilação da quitosana, obtém-se tipos do material com diferentes solubilidades, pKa e viscosidade. O produto totalmente desacetilado é raramente obtido, pois devido ao tempo necessário para que a desacetilação completa ocorra, pode ocorrer a despolimerização da cadeia. Outros fatores que podem influenciar nas características estruturais da quitosana são a fonte de matéria-prima e os processos empregados para sua obtenção. Esses fatores exercem forte influência nas propriedades físico-químicas e biológicas desse polímero, como índice de polidispersão e massa molar média, por isso é necessário assegurar que contaminantes como proteínas, endotoxinas e metais tóxicos não influenciem a hidrólise do polímero. (LIMA, 2013).

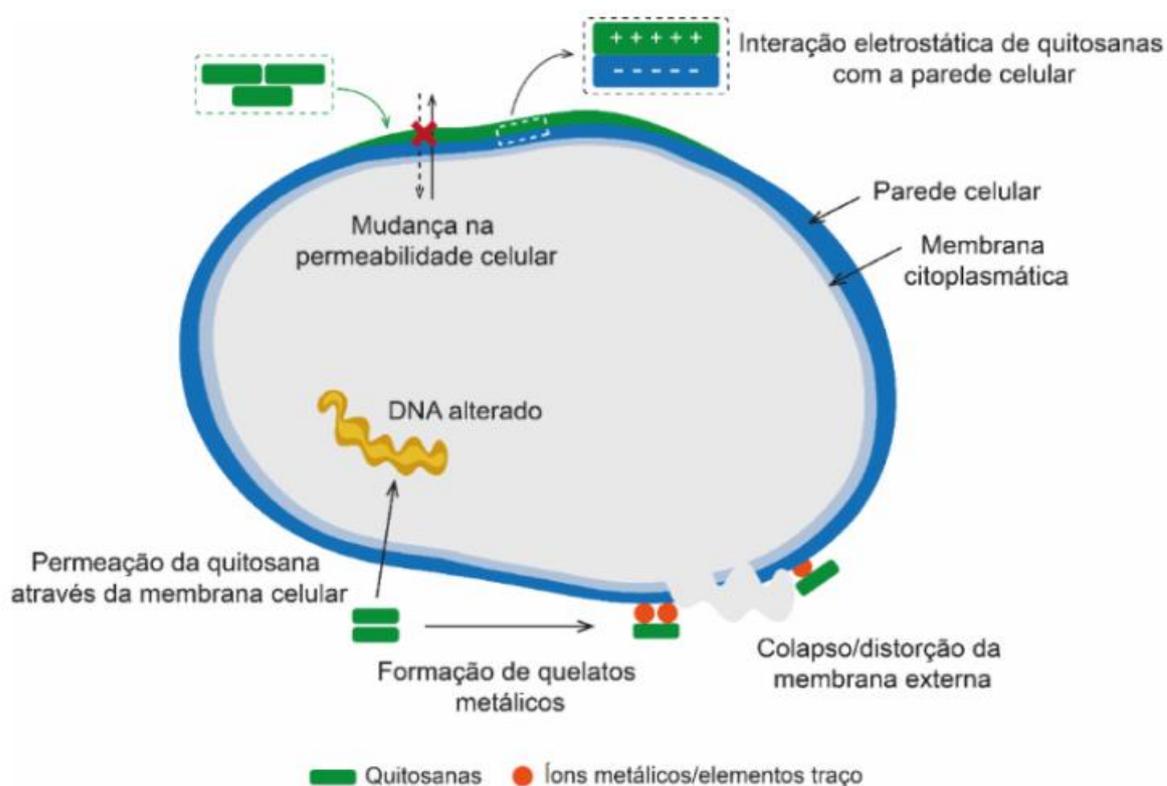
Por apresentar elevada densidade de cargas positivas em solução ácida, a estrutura química da quitosana possibilita uma forte interação eletrostática entre os grupamentos aminos, permitindo sua atuação como transporte de ativos ao se adsorver em superfícies carregadas negativamente. Do ponto de vista tecnológico por ser biocompatível, biodegradável, apresentar baixa toxicidade, e ótimas atividade antioxidante e antimicrobiana tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, a quitosana tem potencial de aplicação em diversos segmentos industriais, podendo ser utilizada na agricultura, indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica, odontológica, além das áreas da medicina e biotecnologia. (LIMA, 2013; MACEDO et al., 2022; SPIN-NETO et al., 2008)

No campo da ação antimicrobiana, diferentes mecanismos são propostos para explicar a ação da quitosana frente a microrganismos. De acordo com a literatura os

mecanismos mais aceitos envolvem: (i) interação eletrostática entre a quitosana e a parede celular do microrganismo causando seu rompimento; (ii) quelação de nutrientes (íon metálicos) essenciais para o crescimento microbiano pelas quitosanas; (iii) formação de um filme polimérico espesso sobre a superfície do microrganismo, dificultando em trocas gasosas e de nutrientes com o meio; (iv) interação entre a quitosana com o DNA do microrganismo, afetando a síntese de proteínas devido à inibição do RNA mensageiro. Sendo possível que mais de um desses mecanismo ocorra concomitantemente durante a atuação da quitosana. (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009; MACEDO et al., 2022)

Dentro dessas hipóteses, o mecanismo (i), sendo este o mais aceito, está normalmente relacionado com a interação eletrostática dos grupos positivos ( $-NH_3^+$ ) da quitosana com as cargas negativas presentes na membrana/parede celular dos microrganismos, essa interação pode conferir uma interferência dupla: promovendo a mudança na permeabilidade da membrana celular, provocando desequilíbrios osmóticos internos e conseqüentemente inibindo o crescimento de microrganismos; e hidrólise da camada de peptidoglicanos levando à perda de íons ou compostos intracelulares de baixa massa molecular (proteínas, ácido nucleicos, glicose). No mecanismo (ii) tem-se algumas controversas sob a forma de atuação da quitosana, sendo que alguns estudos relacionam essa atuação com interação com cargas positivas ( $-NH_3^+$ ) da molécula, obtida pela solubilização em meios ácidos. Entretanto, outros estudos dissertam sobre esse efeito dando enfoque aos grupamentos ( $-NH_2$ ) responsáveis por essa interação com cátions metálicos, por isso comenta-se sobre essa atuação ser mais eficiente em pH mais alto, uma vez que os grupos amino estão desprotonados e o par de elétrons do nitrogênio está disponível para doação de elétrons aos íons metálicos. O mecanismo (iii) é normalmente atribuído ao uso de quitosanas com alta massa molecular. Por fim, o mecanismo (iv) tem relação com quitosanas de baixa massa molecular em permear para o interior das células (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009; MACEDO et al., 2022). A Figura 5 apresenta esses diferentes mecanismos de ação frente a microrganismos.

**Figura 5. Representação dos principais mecanismos de ação das quitosanas frente a microrganismos**



Fonte: (MACEDO et al., 2022)

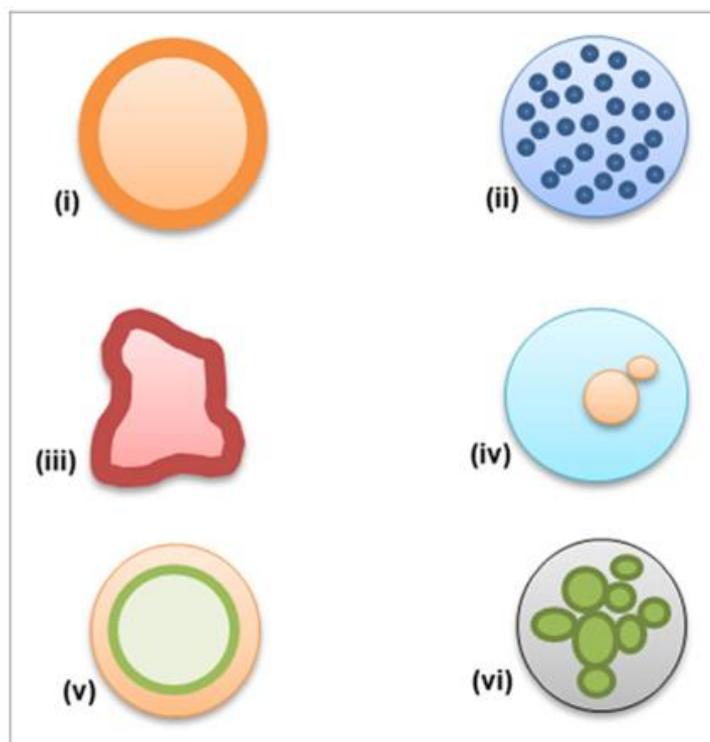
As aplicações da quitosana tem evoluído muito nas últimas três décadas, abrangendo desde uso como excipientes ou sistemas de liberação de fármacos na indústria farmacêutica até utilizações na área da engenharia tecidual atuando como moldes para formação de estruturas biológicas complexas. Por ser um biomaterial seletivamente permeável, a quitosana surgiu como uma boa opção como meio de liberação de medicamentos no meio gastrointestinal ou na mucosa oral, visto que estudos nessas áreas destacam a qualidade do material principalmente quando se há a necessidade de liberação lenta ou controlada. Na aplicação biotecnológica, devido sua estrutura apresentar similaridade com a do ácido hialurônico reiterasse a possibilidade do uso desse biopolímero como agente cicatrizante, pois a quitosana é capaz de aumentar as funções de células inflamatórias auxiliando na organização celular e atuando na cicatrização de feridas, outras aplicações nessa área envolvem a utilização como bioadesivos, como material de bandagem ou sutura, molde para enxerto de pele, dentre diversas outras aplicações em forma de filmes, géis, soluções, cápsulas ou microcápsulas (SPIN-NETO et al., 2008).

### 3.3 MICROENCAPSULAMENTO

O processo de micro/nanoencapsulamento pode ser definido como uma técnica utilizada para recobrir um material ativo (sólido, líquido ou gasoso), também conhecido como material de núcleo, por uma matriz protetora, conhecida como material de parede ou encapsulante. Dependendo da composição e natureza do material encapsulante, das propriedades físico-químicas do material ativo e do tipo de gatilho de liberação desejada, diferentes técnicas podem ser utilizadas, e conseqüentemente diferentes tipos de micro/nanocápsulas podem ser obtidos. Alguns modelos de microcápsulas estão apresentadas na Figura 6.

O material ativo, após ser encapsulado, geralmente permanece no núcleo da cápsula formada pelo agente encapsulante, que o protege contra fatores externos como: radiação UV, exposição ao oxigênio, variações de temperatura ou umidade, além de evitar a evaporação de compostos voláteis e mascarar odores ou sabores desagradáveis. Além disso o material de parede garante uma liberação controlada e gradual do ativo, permitindo desenvolvimento e aplicações de produtos com alto valor agregado. Essa liberação pode ser ocasionada por diversos mecanismos ou “gatilhos” como são comumente denominados, esses gatilhos podem ser a ação da temperatura, ruptura mecânica, variação de pH, solubilidade no meio, biodegradação, difusão, entre outros (AGUIAR et al., 2017; MENEZES CASTELO; CARVALHO DA SILVA; FERRO FURTADO, 2020).

Figura 6 - Tipos de microcápsulas: (i) simples; (ii) matricial/microesfera; (iii) simples irregular; (iv) polinuclear; (v) multicamadas; (vi) agrupamento de microcápsulas.



Fonte: (BAKRY et al., 2016)

Existe uma variedade de técnicas que podem ser utilizadas para a encapsulação de compostos ativos. A escolha da técnica depende de uma série de fatores, tais como: tamanho desejado da cápsula, propriedades físicas e químicas do material de núcleo e de parede, mecanismos desejados de liberação, escala de produção e custo. Os métodos mais comumente utilizados podem ser classificados em três tipos: processos químicos, físicos ou físico-químicos (DUBEY; SHAMI; RAO, 2009; ESSER-KAHN et al., 2011).

Os métodos químicos, amplamente utilizados para a obtenção de micro/nanocápsulas do tipo *core-shell* (núcleo-parede) sintetizadas a partir de polímeros sintéticos derivados do petróleo, ocorrem a partir da reação de polimerização do material de parede (monômero). No caso da polimerização *in situ*, por exemplo, essa reação ocorre na superfície de uma micela, a qual contém o material de núcleo estabilizado. Os monômeros e reagentes que irão formar o invólucro da cápsula são dissolvidos na fase contínua e após o fornecimento das condições necessárias para que a polimerização do material de parede se inicie, as cadeias poliméricas começam a crescer e se depositar sobre a superfície da micela.

A principal vantagem dessa técnica consiste no controle preciso do tamanho das nano/microcápsulas obtidas através da variação de parâmetros da síntese, como a agitação (ESSER-KAHN et al., 2011).

A técnica de *spray drying* consiste em um processo físico para o encapsulamento a partir da transformação de um produto no estado líquido (solução, emulsão ou suspensão) em um produto particulado (pó seco). Para que isso ocorra, a substância ativa é adicionada em uma solução que contém o material encapsulante, a qual é nebulizada (atomizada) em uma câmara aquecida, o que proporciona a formação das partículas pela evaporação do solvente. A micro/nanoencapsulação por *spray drying* é considerada econômica e flexível, podendo ser empregada para encapsular diferentes tipos de materiais de núcleo (óleos vegetais, compostos orgânicos e inorgânicos) tanto a partir de polímeros sintéticos derivados do petróleo, quanto a partir de polímeros de origem natural. Esta técnica é considerada um processo de encapsulação industrial de baixo custo e simplicidade experimental, além de resultar em elevados rendimentos de produto (RÉ, 1998, 2006).

Dentre os métodos físico-químicos, a coacervação é uma técnica frequentemente utilizada para encapsular materiais de núcleo de natureza hidrofóbica. Esta metodologia se baseia na separação espontânea de fases pela formação de um complexo insolúvel (complexo polieletrólítico ou coacervado), resultado de interações eletrostáticas entre as macromoléculas. O processo pode ser definido como coacervação simples, quando somente um tipo de polímero é envolvido, ou coacervação complexa, quando dois ou mais tipos de polímeros de cargas iônicas opostas estão presentes. A micro/nanoencapsulação ocorre quando os coacervados se auto organizam sobre a gotícula da substância lipofílica (material de núcleo), o que resulta na formação de um revestimento contínuo, dando origem à parede da cápsula. Os materiais encapsulantes comumente empregados por esta técnica são baseados na combinação entre polímeros de origem natural de caráter aniônico e proteínas (ESSER-KAHN et al., 2011)

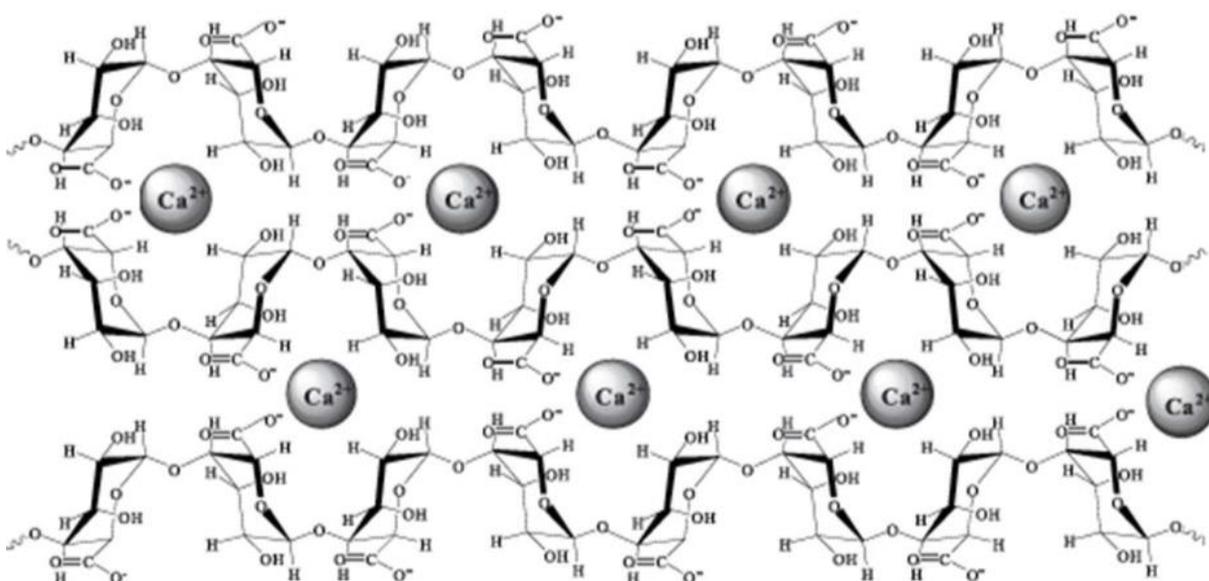
### 3.3.1 GELIFICAÇÃO IÔNICA

A técnica de gelificação iônica, ou gelificação ionotrópica, é um método útil e de baixo custo para aprisionar ativos dentro de uma membrana de gel. É um processo simples, que não requer altas temperaturas, agitação vigorosa, nem a utilização de

solventes orgânicos, o que torna a técnica muito visada nas áreas de alimentos e fármacos (MENEZES CASTELO; CARVALHO DA SILVA; FERRO FURTADO, 2020).

A formação das cápsulas ou partículas baseia-se na habilidade de diversos hidrocolóides (quitosana, alginato, pectinas, gomas, etc) em tornarem-se gel em meio aquoso na presença de contra-íons. A reticulação iônica ocasionada pela interação dos íons com grupos ativos de polissacarídeos resulta na formação de géis insolúveis, sendo que essas estruturas sólidas ou semissólidas normalmente apresentam formato esférico. Um modelo utilizado para exemplificar essa interação é o “modelo caixa de ovo”, como apresentado na Figura 7. Neste exemplo os grupos carboxilas das cadeias poliméricas do polissacarídeo interagem eletrostaticamente com os íons  $\text{Ca}^{2+}$  em solução, formando essa estruturação que remete a uma caixa de ovo. (LIMA, 2013; MENEZES CASTELO; CARVALHO DA SILVA; FERRO FURTADO, 2020)

**Figura 7 - Esquema representativo de uma estrutura formada no modelo “Caixa de Ovo”**



Fonte: (AMORIM et al., 2019)

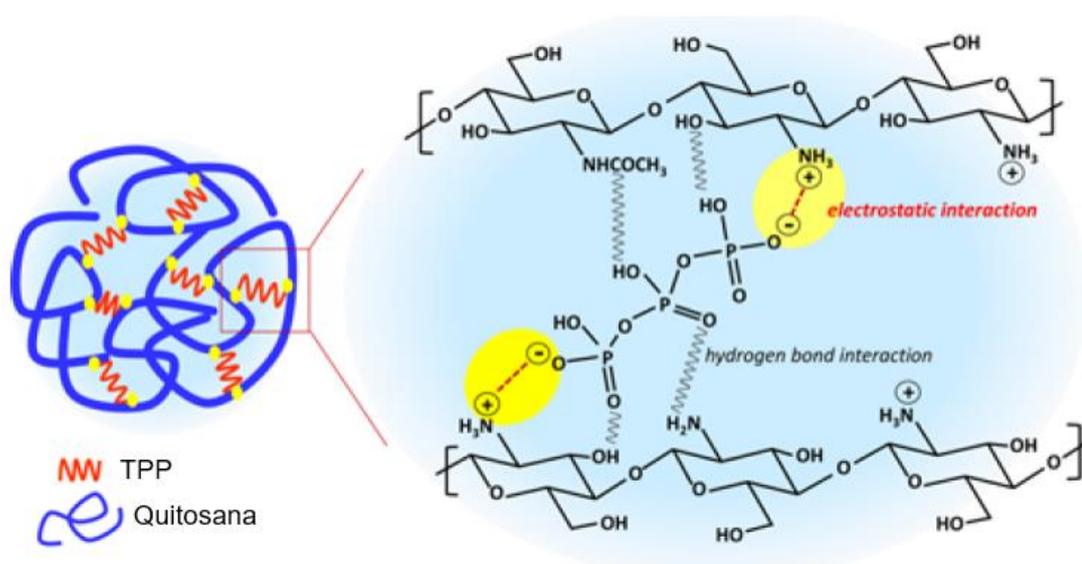
Uma das metodologias mais simples da formação das partículas envolve o gotejamento da solução de polissacarídeo, contendo ou não o ativo de interesse, sobre a solução de íons, levando a formação instantânea do material. Nesse caso o tamanho da partícula será resultante ao diâmetro da gota. Durante seu contato com essa solução de íons as partículas atingem a estabilidade e resistência mecânica necessária. (MENEZES CASTELO; CARVALHO DA SILVA; FERRO FURTADO, 2020)

Como pontuado anteriormente devido versatilidade, baixa toxicidade e outras inúmeras vantagens da quitosana, sua aplicação como matriz para a produção de nanopartículas pela técnica de gelificação iônica tem sido muito estudada, principalmente em aplicações farmacêuticas. (LIU; GAO, 2009; MAHMOOD et al., 2019; MENEZES CASTELO; CARVALHO DA SILVA; FERRO FURTADO, 2020; MODARESI et al., 2014)

Mahmood *et. al* em seu estudo (MAHMOOD et al., 2019) comenta que não somente a quitosana, como também seus derivados (glicol quitosana, carboximetil quitosana, quitosana tiolada, entre outros) apresenta recursos interessantes para exploração em sistemas encapsulados de liberação de fármacos, e dá ênfase que por causa da protonação da molécula em meio ácido proporcionando uma liberação favorável em pH baixo, a quitosana pode ser empregada em sistemas de liberação de fármacos contra câncer, uma vez que devido a microambiente tumoral ter uma má drenagem de resíduos, ele apresenta pH acidificado.

Uma das maneiras mais aplicadas de produção de micro/nanopartículas de quitosana envolve sua interação com o tripolifosfato de sódio (TPP) (KHOERUNNISA et al., 2021). A interação entre os grupos carregados negativamente do TPP com os grupos protonados da quitosana forma as estruturas da gelificação. A Figura 8 apresenta um modelo dessa interação eletrostática entre a quitosana e o TPP.

Figura 8 - Modelo de interação entre Quitosana e TPP.



Fonte: (KHOERUNNISA et al., 2021)

Kaspar et. al, em seus estudos (KAŠPAR; JAKUBEC; ŠTĚPÁNEK, 2013) a fabricação de micropartículas de quitosana reticuladas com TPP preparados pela técnica de *spray dryer*. Neste estudo confirmou-se a dependência da razão de TPP e a concentração da solução inicial de quitosana com o tamanho e a morfologia das micropartículas, apresentando características favoráveis à aplicações em microencapsulações.

Liu e Gao em seu trabalho (LIU; GAO, 2009) sintetizaram nanopartículas de quitosana e TPP contendo ciprofloxacina como material de núcleo. Os autores variaram parâmetros da síntese a fim de avaliar sua influência nas propriedades físicas das nanopartículas, na eficiência de encapsulamento e liberação do fármaco, e observaram que o tamanho das partículas, assim como sua carga superficial podem ser manipulados pela variação de razão e concentrações da quitosana e TPP, pH da solução, ou adição de NaCl. O material foi caracterizado como estruturas *core-shell* sendo estáveis e não citotóxicas, e o encapsulamento do fármaco e sua liberação podem ser moduladas pelo pH da solução ou qualidade do meio. Os autores também comentam que a técnica descrita por eles pode ser aplicada para outros tipos de fármacos, proteínas, enzimas, entre outros.

Outra vertente de estudos é para o encapsulamento de extratos vegetais. Soltanzadeh et. al. em seu trabalho (SOLTANZADEH et al., 2021) encapsularam

extrato da casca da romã como estratégia para proteção dos constituintes extrato. O estudo visava o desenvolvimento e caracterização das nanopartículas, abrangendo sua caracterização física e de propriedades antioxidantes e antimicrobianas. O material desenvolvido apresentou parâmetros físicos (diâmetro médio, distribuição de tamanho, potencial zeta) interessantes, e as caracterizações químicas confirmaram o encapsulamento do extrato de romã, bem como a preservação do extrato de uma liberação rápida. As nanopartículas também apresentaram resultados de ação antimicrobiana, sendo, segundo os autores, nanomateriais adequados para a proteção e entrega controlada de compostos naturais com propriedades antioxidantes/antimicrobianos, por exemplo o extrato de romã, para aplicações diversas.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

Quitosanas de alto e baixo peso molecular, Ácido acético > 99%, Ácido Gálico 97,5 – 102,5% (titration), Etanol 96° e Glicerol ReagentPlus®, ≥99.0% (GC) foram adquiridas da Sigma Aldrich. Folin – Ciocalteu (Reagente para Fenol) foi obtido da Alphatec. O extrato de romã concentrado, Lote 4, foi obtido da empresa Heide Extratos Vegetais. Tripolifosfato de Sódio P.A. (TPP) foi adquirido da empresa Reatec. Poli(vinil álcool) (PVAL) CAS number: 9002-89-5 e lote 911094 foi adquirido da Bandeirante Brazmo. Celulose microfibrilada (CMF), polpa de celulose microfibrilada branqueada de eucalipto em água (3% m/m), foi adquirido da Suzano Polpa e Papel. Ágar Triptona de Soja (TSA) 99% foi adquirido da OXOID. Agar Plate Count (PCA) foi obtido da KASVI. Caldo Mueller Hinton (MHB) pureza 99% foi obtido da HIMEDIA. Nanopartículas de Prata (NpAg\_925), foi adquirido da TNS Nano. As bactérias utilizadas *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) foram cedidas pela Fundação André Tosello. Todos os reagentes foram utilizados sem purificação prévia.

##### 4.1 SÍNTESE DAS MICRO/NANOPARTÍCULAS

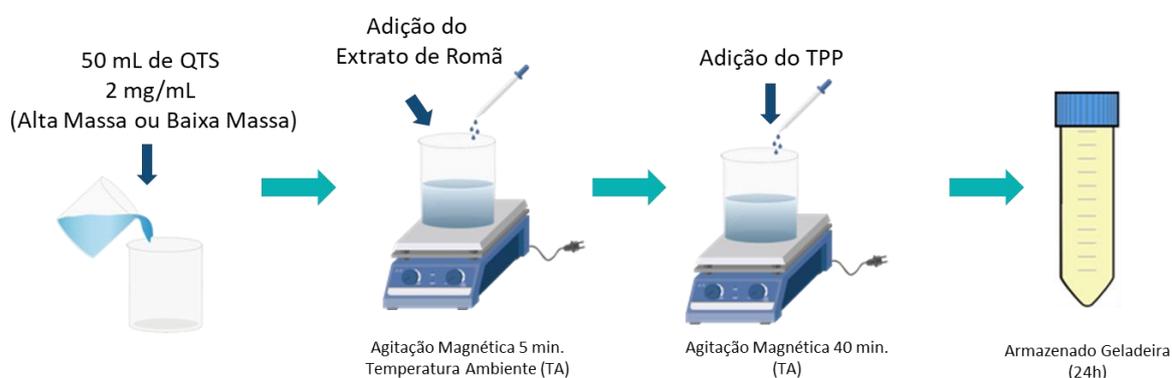
A síntese das partículas foi realizada com base no trabalho de Lima (LIMA, 2013) com algumas modificações. Inicialmente preparou-se a solução de quitosana (QTS), solubilizando as quitosanas (alta ou baixa massa molecular) em ácido acético

1 mol/L, a fim de se obter uma solução 2 mg/mL. A solução foi preparada em um agitador mecânico IKA RW 20, mantendo a solução sob agitação de 600 rpm *overnight*, e após preparada a solução foi mantida em geladeira até utilização.

A síntese das partículas de quitosana contendo extrato de romã foi realizada dispersando primeiramente o extrato de romã (50 a 150 mg) em 50 mL da solução de quitosana sob agitação magnética durante 5 minutos. Após dispersão gotejou-se o TPP (25 a 75 mg) previamente solubilizado em 5 mL de água ultrapura. Após total gotejamento a solução foi mantida sob agitação magnética por 40 min. Todas as etapas foram realizadas em agitador magnético multicanais (MS-H-S10).

Após esse tempo foi acondicionada a solução em um tubo Falcon de 50 mL e mantida em geladeira por 24 h para estabilização do material, sendo observado a decantação das partículas no fundo do tubo após esse tempo. Todas as análises de caracterização foram realizadas após essa etapa. O fluxograma do processo de síntese está apresentada na Figura 9.

**Figura 9. Fluxograma da metodologia de síntese das micro/nanopartículas de quitosana contendo extrato de romã.**



**Fonte: O Autor.**

Utilizou-se um estudo sistemático para avaliar a influência da variação da concentração de extrato de romã e de TPP na eficiência de encapsulamento das partículas. Empregou-se como ponto inicial do estudo as concentrações de 100 mg de extrato de romã e 50 mg TPP, valores aplicados baseando-se no estudo de (LIMA, 2013) e por estudos prévios. Para esses estudos iniciais foi avaliado tanto a quitosana de alta massa molecular quanto a de baixa massa, mantendo-se fixo a concentração (2 mg/mL) e o volume (50 mL) das quitosanas.

## 4.2 DESENVOLVIMENTO DO FILME POLIMÉRICO

O revestimento foi preparado conforme metodologia proposta por (WANG, 2018) com algumas modificações. Inicialmente preparou-se a solução de PVAL 3% (m/m) solubilizando o reagente em água Mili-Q sob agitação magnética (MA 085/CT/E), a 80 °C, por duas horas, até total dissolução do PVAL.

O preparo do revestimento foi realizado pesando-se em um béquer 5 g de CMF 3% (m/m), concentração fornecida pelo fornecedor, e adicionando-se 50 g da solução de PVAL 3% (m/m). Esse conjunto foi homogeneizado em um banho termostático, modelo SSDc 30L da marca MyLabor, a 90 °C, sob agitação mecânica de 600 rpm (IKA RW 20) durante 30 min. Nos revestimentos preparados com a adição de glicerol como plastificante, foi adicionado 1 g de glicerol juntamente com a CMF.

Os filmes foram formados pelo método de *casting*, adicionando-se 20 mL da solução em placas de Petri de vidro (10 x 1,5 cm), e secos em estufa a 50 °C por 12-16 horas.

Para os revestimentos aditivados de nanopartículas de prata ou de micro/nanopartículas de quitosana, o material foi adicionado após o resfriamento até temperatura ambiente da formulação, e homogeneizado manualmente por 5 minutos. Após a homogeneização, a formulação foi aplicada por *casting* e secos conforme descrito anteriormente.

## 4.3 CARACTERIZAÇÕES

### 4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos filmes formados pelas blendas poliméricas, assim como os filmes de seus componentes isolados foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com o auxílio do microscópio Hitachi TM3000, utilizando as ampliações de 400 vezes e 1000 vezes. Fragmentos dos filmes foram dispostos no porta-amostras do equipamento, com o auxílio de fitas adesivas de grafite. As imagens foram obtidas utilizando a tensão de aceleração do feixe de 15 kV.

### 4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise química das partículas e dos filmes formados, assim como de seus componentes isolados foi realizada através da técnica de Espectroscopia no

Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), utilizando o equipamento Bruker, modelo Vertex 70, operando no modo ATR (Refletância Total Atenuada) com cristal de diamante. As nanopartículas secas, os fragmentos dos filmes, ou as amostras em pó dos componentes foram depositados no porta-amostras do equipamento e as medidas foram realizadas na faixa de comprimento de onda do infravermelho médio (MIR, do inglês *Mid-Infrared*) entre  $4.000\text{ cm}^{-1}$  e  $400\text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , totalizando 32 varreduras.

A análise dos reagentes puros foi realizada posicionando os reagentes diretamente no módulo ATR do equipamento sem nenhum preparo prévio. No caso das quitosanas e do TPP foi realizado a análise do pó puro, e no caso do extrato, do líquido. Para a análise das nanopartículas foi retirado uma alíquota do decantado, disposto em uma lâmina de vidro e seco a temperatura ambiente. Esse procedimento foi realizado para diminuir a interferência das bandas de água no espectro. Mesmo utilizando esse procedimento observou-se em uma primeira caracterização das nanopartículas, não mostrada aqui, que as bandas características da água continuavam sobressalentes no espectro, interferindo a caracterização. Para contornar essa interferência as análises das nanopartículas foram realizadas efetuando o branco do equipamento em água ultrapura. Para os reagentes puros e os filmes o branco foi realizado em ar atmosférico.

#### 4.3.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta

As análises da carga eletrostática superficial (ou Potencial Zeta) e de tamanho de partícula por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) foram realizadas utilizando o equipamento ZetaPALS, da marca Brookhaven. As análises de dados foram feitas com o software incluído no sistema, o Particle Solutions. A solução das nanopartículas foi posicionada em cubeta de poliestireno para a realização das leituras no equipamento.

#### 4.3.4 Eficiência de Encapsulamento

O cálculo da eficiência de encapsulamento foi realizado pela quantificação dos polifenóis totais do extrato de romã. Para quantificar os polifenóis totais foi utilizado o método de Folin-Ciocateau (F-C). Esse é um método colorimétrico que tem como base

a redução do reagente de Folin-Ciocateau, que é composto pelos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, de coloração amarela. Os polifenóis, em condição alcalina, são protonados e reduzem os ácidos a óxidos de molibdênio e tungstênio, que possuem a cor azul. Esses compostos absorvem luz na faixa de 760 nm, sendo assim quantificados por espectrofotometria (VEBER et al. 2015). O procedimento utilizado nesse projeto foi adaptado do protocolo *Nature* (Ainsworth e Gillespie 2007).

Anterior a realização do ensaio foi construída uma curva analítica de absorbância em relação a concentrações de padrões de ácido gálico. Para a realização desse ensaio foram preparadas as seguintes soluções: solução de F-C 10% (v/v), solução de carbonato de sódio 7,5% (m/m) e as soluções padrões de ácido gálico nas concentrações de 5, 20, 35, 50, 65, 80 e 95  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura.

O ensaio foi realizado em microtubos de 2 mL, nos quais foram pipetados 0,2 mL da solução padrão e 0,4 mL da solução de F-C, para então serem homogeneizados com o auxílio de um vortex. Após 2 minutos, foram adicionados 1,6 mL da solução de carbonato de sódio, seguido novamente pela homogeneização no vortex. Após 10 minutos de repouso ao abrigo da luz, o volume total foi transferido para uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, e a alíquota foi analisada por um espectrofotômetro UV-vis, modelo UV-1900i da marca Shimadzu, no modo varredura. Sendo assim, foi possível determinar o comprimento de onda do ponto de maior absorção, que ocorreu em 776 nm. Esse foi o comprimento de onda utilizado durante os estudos. A curva analítica obtida, representada por  $y = 0,0096x + 0,0293$ , apresentou um coeficiente de correlação de 0,9995. Após obtenção da curva analítica foi possível calcular a eficiência de encapsulamento da síntese das micro/nanopartículas.

O procedimento utilizado foi análogo ao empregado na curva de calibração, substituindo o uso da solução padrão de ácido gálico pelo sobrenadante da solução de microcápsulas. O cálculo da porcentagem de extrato encapsulado foi realizado considerando esse valor obtido do sobrenadante como o ativo não encapsulado.

#### 4.3.4.1 Análise Estatística dos dados de Eficiência de Encapsulamento

A análise estatística dos dados de eficiência de encapsulamento foi realizada no software *Statistica 8.0*. A avaliação comparativa entre as médias dos resultados de eficiência de encapsulamentos das amostras foi realizada pela análise de variância (One-way ANOVA,  $p < 0,05$ ) seguida de teste Tukey (HSD, post-hoc).

#### 4.3.5 Ensaio normatizados de dureza de filmes poliméricos

Os ensaios de dureza dos filmes poliméricos desenvolvidos foram realizados a partir da norma ASTM D3363-05 com o auxílio de um *Pencil Hardness Tester* da marca BYK. Esta metodologia faz o uso de lápis normatizados de diferentes durezas, os quais são movidos por um aparato que permite a realização de um risco sobre a superfície submetida ao teste, sob um ângulo de  $45^\circ$  com uma pressão constante. Os lápis utilizados são classificados de acordo com o grau de dureza que apresentam, em uma escala de 9H a 6B, em que as letras H e B significam *hardness* (maior dureza) e *blackness* (maior maciez), respectivamente. Desta forma, nas extremidades da escala, o lápis 9H é o mais duro e o 6B é o mais macio: 6B – 5B – 4B – 3B – 2B – B – HB – F – H – 2H – 3H – 4H – 5H – 6H – 7H – 8H – 9H.

De forma geral, é feita uma avaliação visual para verificar qual a dureza do lápis que danifica a superfície. Assim, a dureza do revestimento é correlacionada com a dureza do lápis.

#### 4.3.6 Análise de Ângulo de Contato

A análise de determinação do ângulo de contato foi utilizada para avaliar as propriedades hidrofílicas ou hidrofóbicas, através do gotejamento de água sobre os revestimentos. Foi utilizado um tensiômetro SEO Phoenix Multi/Tilting, e para a análise dos dados o software SurfaceWare. Foram adquiridos 10 valores de ângulos de contato de cada amostra.

#### 4.3.7 Análise de Reologia das formulações

Para a realização da medida de viscosidade, foi utilizado um Reômetro ThermoScientific modelo Haake Mars III, com geometria de medida tipo Placa Placa

C60 Ti L. O controle de temperatura a 25°C foi realizado por uma placa peltier. O experimento realizado a partir de uma varredura de taxa de cisalhamento de 0,1 até 1000 s<sup>-1</sup> por ser uma faixa ampla de cisalhamento abrangendo desde um cisalhamento inicial de uma amostra em repouso até aplicação.

#### 4.3.8 Ensaio de Atividade Antimicrobiana

##### 4.3.8.1 Método Qualitativo de Difusão em Disco

A técnica de difusão de disco foi realizada segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), que padroniza esses testes de sensibilidade de antimicrobianos. O teste foi realizado em duplicata para cada uma das soluções testadas.

Foram preparados inóculos em caldo MHB de cada uma das cepas bacterianas, até que elas atingissem a escala 0,5 de McFarland. As culturas foram inoculadas na superfície do meio de cultura ágar TSA com auxílio de swab estéril, para uma cobertura uniforme do inóculo. Após secagem da sementeira, 10 minutos, iniciou-se a aplicação dos discos.

Para a aplicação no ensaio removeu-se o sobrenadante das soluções de micropartículas a fim de obter um concentrado do material. Neste concentrado foram imersos durante 30 segundos os discos estéreis de papel filtro (6 mm diâmetro) com o auxílio de uma pinça flambada. Posicionou-se os discos sobre o ágar exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão, e mantendo um espaçamento de, pelo menos, 3 cm entre cada disco e 1,5 cm entre o disco e a borda da placa.

Após incubação a 37 °C +/- 2,0 °C, durante 18 a 24 horas, foi observada a presença ou ausência da formação de halo de inibição. Como controle positivo, empregou-se uma solução 1,5 mg/mL do antibiótico ciprofloxacino (E.M.S), e como controle negativo uma solução salina estéril.

##### 4.3.8.2 Método Quantitativo ASTM E2149-20

Para a aplicação da norma ASTM E2149 (*Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions*), fez-se necessário algumas adaptações da normativa original. As colônias de bactérias crescidas no

caldo BHI foram suspensas em tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) concentração 0,3mM diluído em água ultrapura e padronizadas a 475 nm até obter-se absorvância de  $0,28 \pm 0,02$  correspondente a  $1,5-3,0 \times 10^8$  UFC/mL. Em seguida, realizou-se a diluição em solução de tampão fosfato até atingir a concentração de  $1,5-3,0 \times 10^5$  UFC/mL.

Adicionou-se 50 mL de inóculo em frascos Erlenmeyer (250 mL) esterilizados e colocou-se em cada frasco uma amostra dos revestimentos de 5x5 cm. Utilizou-se como controle negativo frascos contendo apenas o inóculo, sob as mesmas condições que as amostras. Todas as amostras foram colocadas em plataforma de agitação (100 rpm) sob temperatura de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , sendo retiradas amostras em tempo de 1, 24 h e 48h. Apenas a amostra controle que foi analisada imediatamente ao preparo ao invés de em 1 h. Após o período de agitação proposto, retirou-se 1 mL de cada frasco Erlenmeyer e fez-se diluições até  $10^{-4}$ , sendo plaqueado em placas de Petri em meio ágar (PCA) e incubado por 24 h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  para posterior contagem de células viáveis.

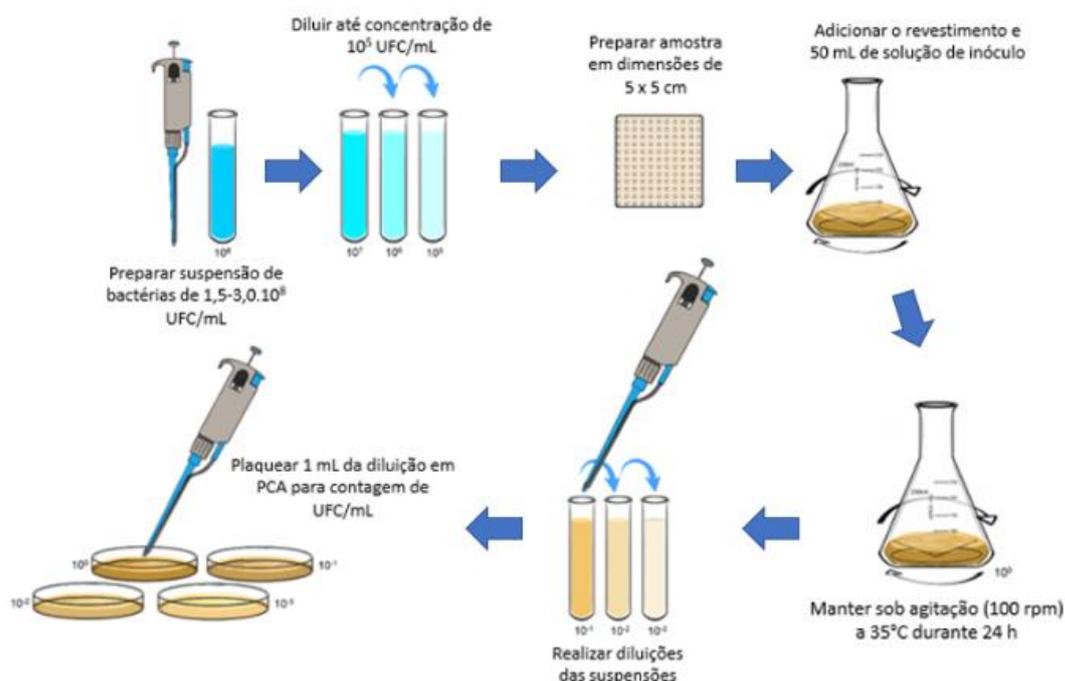
Utilizou-se a Equação 1 para determinar o número de unidades formadoras de colônias, sendo N correspondente ao número de células viáveis, C o número de colônias contadas em cada placa, D o fator de diluição e V o volume (mL) de solução. Em seguida, calculou-se o percentual de redução de bactérias por meio da Equação 2, sendo B as unidades formadoras de colônias para o grupo controle e A as unidades formadoras de colônias para o grupo de interesse.

$$N = C \cdot D \cdot V \quad (\text{Equação 1})$$

$$\% = [(B - A)/B] \cdot 100 \quad (\text{Equação 2})$$

A Figura 10 demonstra um esquema da metodologia da norma ASTM E2149.

Figura 10 - Representação adaptada da metodologia da ASTM E2149.

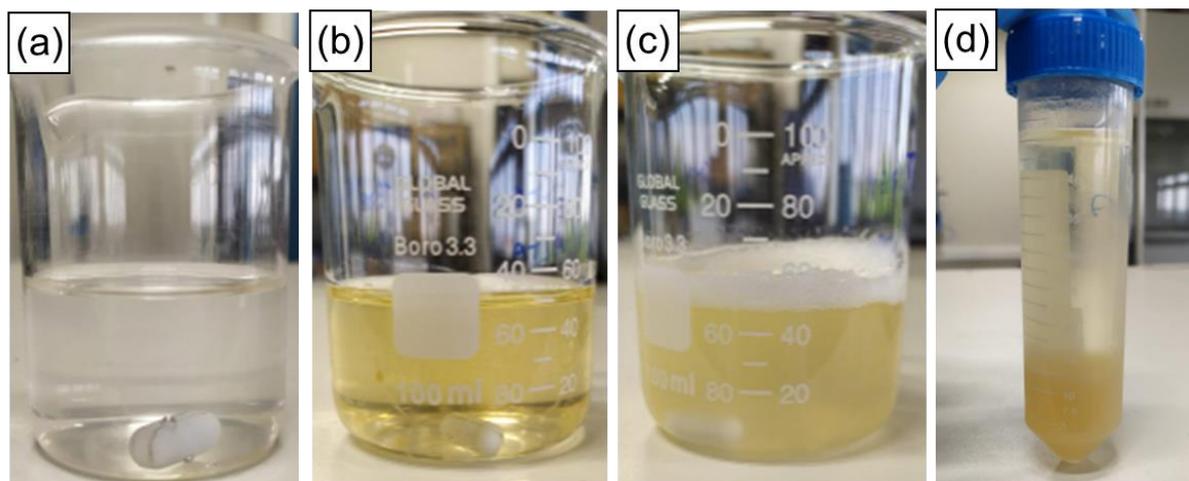


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS MICRO/NANOPARTÍCULAS

O procedimento de síntese das partículas foi iniciado com a dispersão do extrato hidroalcolólico de romã na solução de quitosana. Esse processo foi mantido até total homogeneização do extrato na solução e em seguida foi gotejado a solução de TPP. A solução foi mantida sob agitação magnética até o final do tempo de síntese e a formação das nanopartículas foi confirmada pela opalescência da solução, como descrito por (LIMA, 2013). A Figura 11 apresenta as fotografias do meio reacional após as etapas do processo de síntese, desde a adição dos reagentes (a) e (b) até a formação das partículas (c) e após estabilização do material (d).

Figura 11. Fotografias do meio reacional nas diversas etapas da síntese, sendo (a) a solução de quitosana, (b) a solução de quitosana após homogeneização do extrato de romã, (c) a suspensão coloidal das partículas e (d) as partículas decantadas após as 24 horas em geladeira.



Fonte: O Autor (2023)

Após realização das sínteses, os materiais foram caracterizados pelas técnicas de DLS para verificação do tamanho das partículas, por Potencial Zeta para análise da carga superficial e por UV-Vis pelo método de Folin-Ciocalteu para quantificação da eficiência de encapsulamento, esse último sendo o parâmetro mais importante analisado. Os dados planejamento experimental e das caracterizações das micro/nanopartículas sintetizadas estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2 - Planejamento experimental e resultados das caracterizações das micro/nanopartículas.**

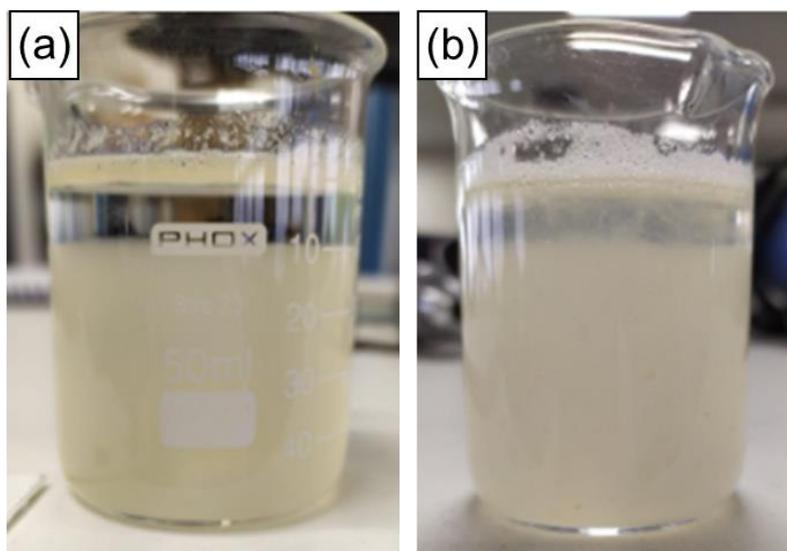
	Teste	Quitosana (mL)	Massa TPP (mg)	Massa Extrato (mg)	EE%*	Potencial Zeta (mV)	Tamanho ( $\mu\text{m}$ )
	1A	50	25	50	64,94 <sup>c</sup>	+4,96 $\pm$ 0,45	18,20 $\pm$ 14,07
Alta	2A	50	75	50	75,94 <sup>i</sup>	+4,02 $\pm$ 0,50	27,54 $\pm$ 16,20
Massa	3A	50	25	150	66,93 <sup>a</sup>	+4,20 $\pm$ 0,25	42,13 $\pm$ 46,21
Molecular	4A	50	75	150	67,64 <sup>f</sup>	+4,33 $\pm$ 0,41	33,52 $\pm$ 1,79
	5A	50	50	100	66,96 <sup>a</sup>	+4,29 $\pm$ 0,41	1,10 $\pm$ 0,12
	1B	50	25	50	65,27 <sup>d</sup>	+4,48 $\pm$ 1,13	1,51 $\pm$ 0,41
Baixa	2B	50	75	50	69,09 <sup>h</sup>	+7,88 $\pm$ 1,47	1,37 $\pm$ 0,90
Massa	3B	50	25	150	65,85 <sup>e</sup>	+8,55 $\pm$ 1,60	1,50 $\pm$ 0,19
Molecular	4B	50	75	150	68,77 <sup>g</sup>	+7,22 $\pm$ 2,57	1,19 $\pm$ 0,17
	5B	50	50	100	63,37 <sup>b</sup>	+5,91 $\pm$ 2,48	0,66 $\pm$ 0,052

\*Amostras representadas por letras iguais não apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) pelas análises One Way ANOVA e análise comparativa de Tukey. Amostras 3A e 5A são estatisticamente iguais

Uma das adaptações realizadas da metodologia proposta por Lima envolve a forma de separação do sobrenadante do material sintetizado. No trabalho utilizado como base o autor realiza a centrifugação das partículas a 3000 rpm por 10 minutos. Ao se realizar essa etapa no material sintetizado foi verificado que a centrifugação favorecia a liberação do material de núcleo das partículas. Como exemplo, para os testes 5A e 5B (apresentados na Tabela 2) em que passaram pela etapa de centrifugação os valores de EE% foram 41,83% e 37,24% respectivamente. Por isso, para a metodologia aplicada foi padronizado a decantação em geladeira como método de separação.

Para esse trabalho, os dados de tamanho de partícula serão apenas de caráter descritivo e não como limitantes para aplicação. De modo geral observou-se que o material sintetizado utilizando a quitosana de baixa massa apresentou tamanhos menores e um desvio padrão mais condizente do que a quitosana de alta massa. Essa diferença entre os dois materiais também foi observada a olho nu após a síntese das micropartículas. A solução final da quitosana de baixa massa teve aspecto mais homogêneo do que a de alta massa, que apresenta grumos e partículas com aspectos que remetem a fibras. Essa diferença pode estar relacionada justamente a diferença estrutural e de tamanho de molécula entre as duas quitosanas, visto que outros autores também descrevem essa irregularidade na quitosana de alta massa, assim como a presença de estruturas fibrosas, em formulações de filmes (FREITAS 2014). Essa diferença pode ser visualizada na fotografia apresentada na Figura 12, sendo a Figura 12a a solução de quitosana baixa e a de quitosana alta apresentada na Figura 12b.

**Figura 12. Fotografia das soluções de micro/nanopartículas sintetizadas sendo utilizado (a) quitosana de baixa massa molecular e (b) quitosana de alta massa molecular.**



**Fonte: O Autor (2023)**

Através dos dados de EE% obtidos verificou-se que para todos os estudos testados obteve-se uma eficiência superior a 60%, uma eficiência considerada boa para processos de encapsulamento. Além disso, pela análise estatística comparativa pelo método de Tukey dos resultados de eficiência de encapsulamento, os testes nomeados 3A e 5A apresentam uma eficiência estatisticamente igual. Na metodologia utilizada como base para esse trabalho o autor (LIMA 2013) obtém como melhor eficiência de encapsulamento o valor de 49,7%. Com os dados obtidos no trabalho mostra-se que teve sucesso na adequação da síntese para o sistema proposto, e a obtenção de valores de eficiência de encapsulamento maiores que a literatura base. Pelos resultados não foi observado uma correlação entre a variação da concentração do extrato com a EE%, existindo testes em que o aumento da concentração do extrato aumentou a EE% e outros em que essa maior eficiência foi observada com a diminuição da concentração. Por outro lado, observou-se uma influência direta da quantidade de TPP com a EE%, notando-se que os testes utilizando a maior concentração do reagente, testes 2 e 4, foram os que apresentaram a maior concentração do ativo encapsulado.

Esses resultados corroboram com o descrito na literatura sobre a função do TPP na síntese (LIU; GAO, 2009). O tripolifosfato de sódio atua como agente reticulante da quitosana, sendo as partículas formadas pela interação eletrostática entre as moléculas, como já apresentado no Tópico 3.3.1. Ao se aumentar a

concentração do TPP no meio reacional foi possível promover uma maior interação entre os reagentes auxiliando a formação das partículas.

Adicionalmente aos resultados de carga superficial das partículas apresentados na tabela, foi realizado uma análise das soluções quitosana, obtendo valores de  $+39,55 \pm 4,29$  mV para a quitosana de alta massa molecular e  $+35,45 \pm 2,46$  mV para a de baixa massa. Ramanery *et. al.* (RAMANERY; MANSUR; MANSUR, 2013) em seu estudo correlaciona o potencial zeta da quitosana com o pH da solução em que ela está solubilizada, demonstrando que entre a faixa de pH 3,5 a 6 a quitosana apresenta uma carga superficial positiva, tendo valores de potencial maiores em menores valores de pH, devido maior quantidade de grupamentos amino protonados. A solubilização da quitosana utilizada neste trabalho foi realizada em ácido acético 1 mol/L, apresentando pH final de 3,03, e por isso, considerando a literatura, a quitosana deve apresentar carga superficial positiva.

Os dados de potencial zeta da partículas sintetizadas estão condizentes com os observados na literatura de referência. Em seu trabalho LIMA (2013) obteve partículas com carga superficial positiva em todas as concentrações e pH testados, sendo a diminuição dos valores numéricos ao se comparar com a quitosana pura, relacionado a interação com o TPP.

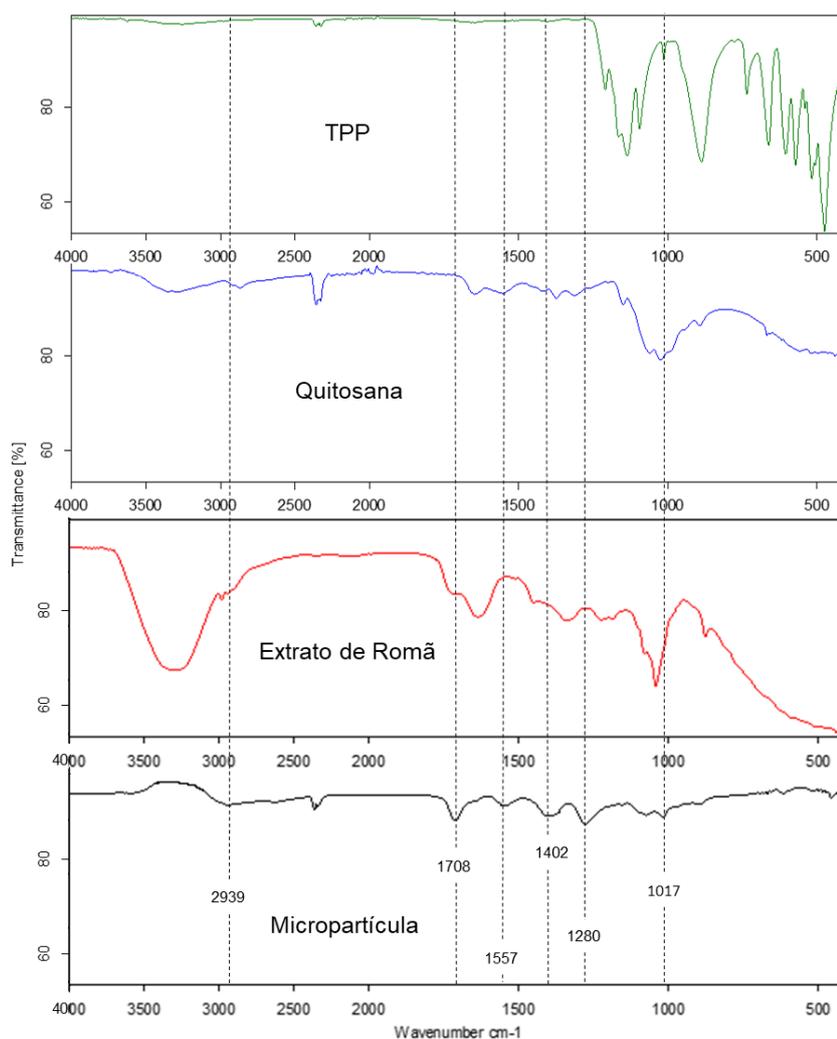
As partículas foram caracterizadas pela técnica de FTIR e comparado o espectro com o dos reagentes puros, a fim de observar uma contribuição dos materiais de parede (QTS e TPP) e do material de núcleo (extrato de romã) na incorporação das micropartículas.

A

Figura 13 apresenta separadamente os espectros das micropartículas de quitosana de baixa massa molecular e dos respectivos reagentes. Pela análise dos espectros foi observado a contribuição de todos os reagentes no espectro das micropartículas, o que confirma a formação de partículas de quitosana e TPP contendo o extrato de romã. A contribuição do espectro de quitosana foi observado pela presença das bandas em  $1557\text{ cm}^{-1}$  e  $1402\text{ cm}^{-1}$  referente a estiramentos C-H,  $1280\text{ cm}^{-1}$  atribuído as vibrações de hidroxilas, e  $1017\text{ cm}^{-1}$  envolvendo estiramento C-O. Essa banda em particular também pode estar correlacionada ao TPP, associados aos estiramentos vibracionais do  $\text{PO}_3$ . A contribuição do extrato de romã foi observada pela presença das bandas em  $2939\text{ cm}^{-1}$  atribuído aos estiramentos C-

H e  $1708\text{ cm}^{-1}$  referente a estiramentos C=O (LOUTFY et al., 2016; QUEIROZ et al., 2015; SOLTANZADEH et al., 2021).

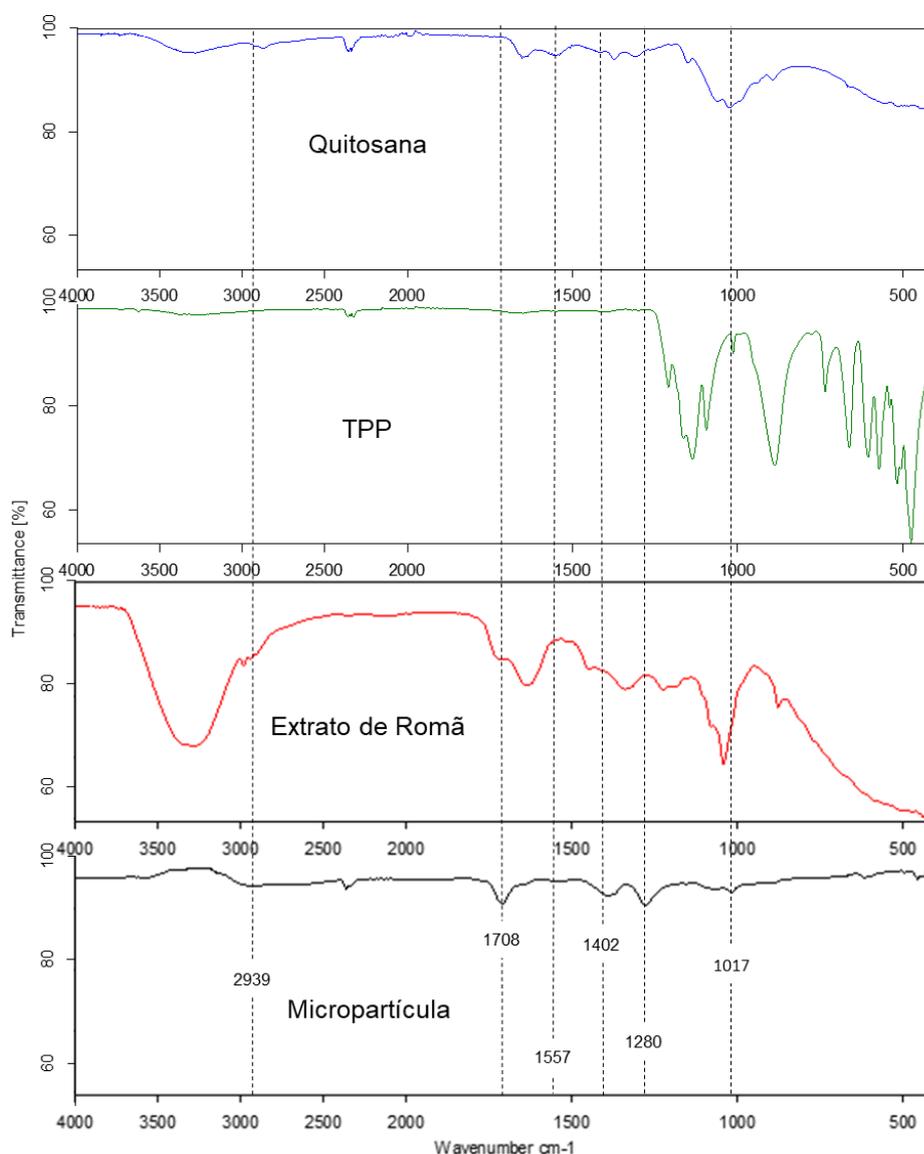
**Figura 13 - Espectros de FTIR do TPP (verde), quitosana de baixo peso molecular (azul), extrato de romã (vermelho) e micropartículas (preto).**



**Fonte: O Autor (2023)**

Analogamente a análise apresentada, caracterizou-se o material sintetizado utilizando a quitosana de alta massa molecular, cujos espectros estão apresentados na Figura 14. Foi observada a presença das mesmas bandas descritas anteriormente, indicando que novamente houve a formação de micropartículas de quitosana e TPP contendo extrato de romã.

**Figura 14 - Espectros de FTIR da quitosana de alto peso molecular (azul), TPP (verde), extrato de romã (vermelho) e micropartículas (preto).**



Fonte: Autor (2023)

### 5.1.1 Ensaio Antimicrobiano

Com o objetivo de avaliar a eficácia antimicrobiana das micropartículas foi realizado o teste de disco-difusão, ou difusão em disco. Foram utilizadas as micropartículas com melhores eficiências de encapsulamento, e como apresentado anteriormente na Tabela 2 os melhores resultados foram para os testes 2 e 4, tanto para a quitosana de baixa massa quanto de alta massa molecular.

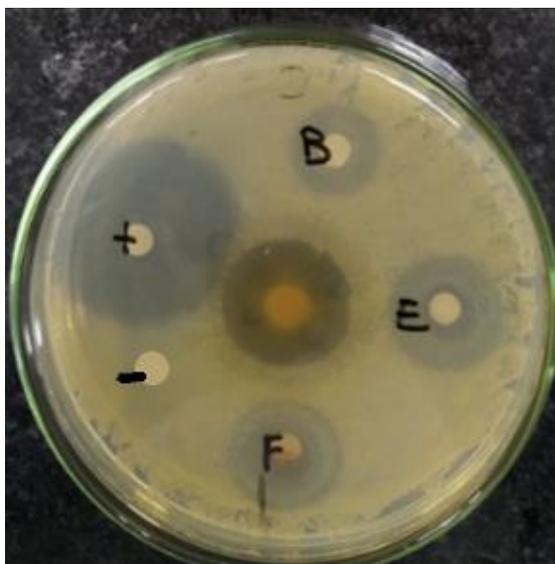
Os discos foram imersos no concentrado de micropartículas (MP), ou nas soluções controle por 30 segundos e foram posicionados no meio TSA já inoculado.

Para esse teste também foi realizada uma síntese de micropartículas sem a adição de extrato de romã, para avaliar a eficácia antimicrobiana da quitosana como material de parede. Também foi analisada a eficácia do extrato de romã puro.

Os testes foram realizados com caráter qualitativo da eficiência antimicrobiana do material, e portanto, após as 24 horas de incubação das bactérias, avaliou-se somente a presença ou ausência de halo de inibição. Foram realizadas duplicatas para cada teste frente às duas cepas avaliadas (*S. aureus* ATCC 6538P e *E. coli* 8739).

A Figura 15 apresenta a placa de Petri inoculada com *S. aureus* e com os discos posicionados, após o período de incubação da bactéria. Na Figura 15 é possível observar a presença do halo de inibição para as amostras analisadas, sendo B a síntese de quitosana de baixa massa sem adição de extrato, E a síntese com adição de 50 mg de extrato de romã e F com adição de 150 mg, assim como para o controle positivo e o extrato de romã puro (disco central).

**Figura 15. Aspecto visual de resultado do teste de difusão em disco contra *S. aureus*., utilizando as amostras: (B) quitosana de baixa massa sem extrato; (E) quitosana com adição de 50 mg extrato de romã; (F) quitosana com adição de 150 mg de extrato de romã; (+) controle positivo - antibiótico; (-) controle negativo - solução salina; disco central - extrato puro de romã.**



Fonte: Autor (2023)

Os resultados de todos os testes para as micropartículas de quitosana de alta massa e de baixa massa molecular, para as duas cepas, estão apresentados na Tabela 3. Os testes que apresentaram halo de inibição estão representados por (+) e os testes com ausência de inibição sinalizados com (-).

**Tabela 3 - Resultados do teste de difusão em disco das micropartículas de quitosana contra *S. aureus* e *E. coli*.**

TESTES		Halo de Inibição	
		<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
Quitosana Alta Massa Molecular	MP sem extrato	+	-
	2 A*	+	+
	4 A*	+	+
Quitosana Baixa Massa Molecular	MP sem extrato	+	-
	2 B*	+	-
	4 B*	+	+
	Extrato de Romã	+	-
	Controle Positivo	+	+
	Controle Negativo	-	-

2A\* - síntese utilizando quitosana de alta massa molecular, 75 mg TPP e 50 mg de extrato de romã  
4A\* - síntese utilizando quitosana de alta massa molecular, 75 mg TPP e 150 mg de extrato de romã  
2B\* - síntese utilizando quitosana de baixa massa molecular e 75 mg TPP e 50 mg de extrato de romã  
4B\* - síntese utilizando quitosana de baixa massa molecular, 75 mg TPP e 150 mg de extrato de romã

Como demonstrado na Tabela 3, observou-se que a bactéria *S. aureus* apresentou uma maior sensibilidade aos materiais testados do que a *E. coli*. Bactérias Gram-positivas, como é o caso da *S. aureus*, tendem a apresentar maior sensibilidade a agentes antimicrobianos, devido a menor seletividade da parede celular à penetração de compostos do que as Gram-negativas (*E. coli*). Essa seletividade ocorre por diferenças estruturais da parede celular das bactérias. A parede celular de bactérias Gram-positivas é formada por múltiplas camadas de peptidoglicano e ácidos teicóicos, já a parede das bactérias Gram-negativas apresenta poucas camadas de peptidoglicano, mas presença de periplasma e membrana externa lipopolissacarídica (MACEDO et al., 2022).

Os resultados do teste também indicaram que as micropartículas sintetizadas com maior concentração de extrato de romã (4A e 4B) tiveram ação frente às duas cepas, ao passo que para as micropartículas desenvolvidas com menor concentração de extrato, na utilização da quitosana de baixa massa molecular, não houve efeito contra a *E. coli*. Outro resultado observado foi que as micropartículas sintetizadas sem o extrato não apresentaram efeito contra a bactéria Gram-negativa, porém com a

adição do extrato houve a presença do halo de inibição. Essa tendência também foi observada para o extrato de romã puro, visto que nos testes realizados frente a *E. coli* o extrato puro não teve ação, porém quando o ativo foi encapsulado houve o halo. Esse resultado pode indicar um possível efeito sinérgico entre a quitosana e o extrato de romã agindo como materiais de parede e núcleo, respectivamente, das micropartículas.

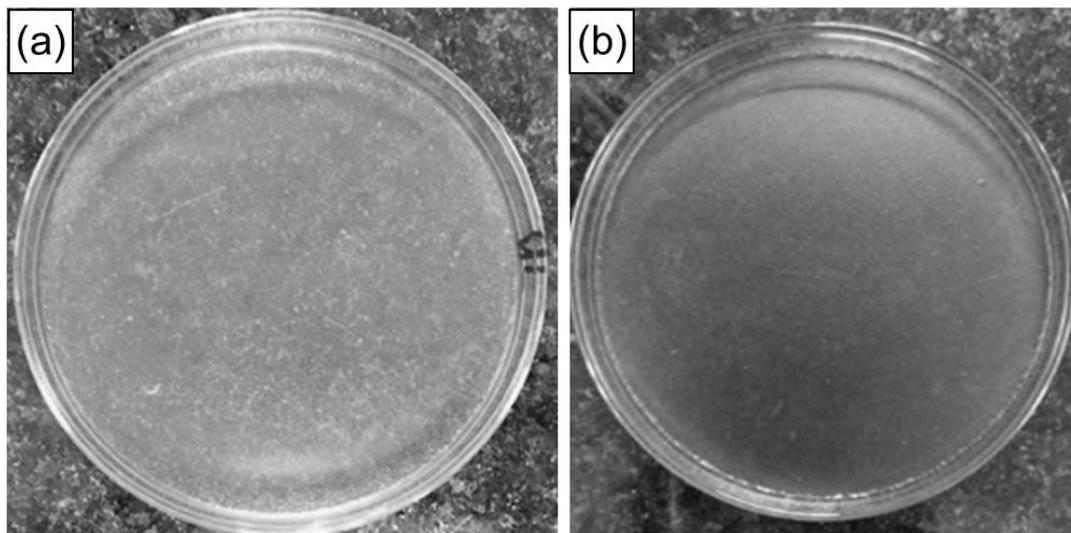
Um segundo teste foi realizado para avaliar a ação do ácido acético e do TPP frente as cepas, para descartar possíveis efeitos desses reagentes na ação antimicrobiana final das micropartículas. Para esses testes preparou-se uma solução de concentração 1,5 mg/mL de TPP em água ultrapura, e soluções de ácido acético 1 mol/L e 0,2 mol/L. Essa segunda diluição foi utilizada para verificar o resultado em soluções mais diluídas de ácido, aplicando-se a concentração utilizada no trabalho de Lima (LIMA, 2013).

Dessas soluções testadas somente a solução de ácido acético 1 mol/L apresentou halo de inibição frente as duas cepas testadas. Esses resultados podem indicar que o ácido acético, que é um agente antimicrobiano de conhecimento da literatura frente bactérias Gram positivas e Gram negativas (UTYAMA et al., 2006), pode ter influência na ação antimicrobiana das micropartículas. No entanto, o material avaliado nos primeiros testes foi o decantado do meio reacional que apresenta uma alta concentração de micropartículas, e os resultados da ação antimicrobiana não foram idênticos para todos (ou seja, todas as sínteses realizadas em meio de ácido acético 1 mol/L apresentaram ação antimicrobiana), deste modo esse efeito ainda não pôde ser confirmado.

## 5.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO FILME POLIMÉRICO BASE

Após desenvolvimento dos filmes poliméricos a solução foi aplicada em placas de Petri pelo método de *casting* e secos em estufa a 50 °C por 12-16 horas. A Figura 16 apresenta fotografias dos filmes já secos, sendo (a) referente ao filme com adição de Glicerol, (b) referente ao filme sem adição de glicerol.

**Figura 16 - Fotografias dos filmes poliméricos, sendo (a) do filme contendo glicerol e (b) do filme sem adição de glicerol.**



Fonte: O Autor (2023)

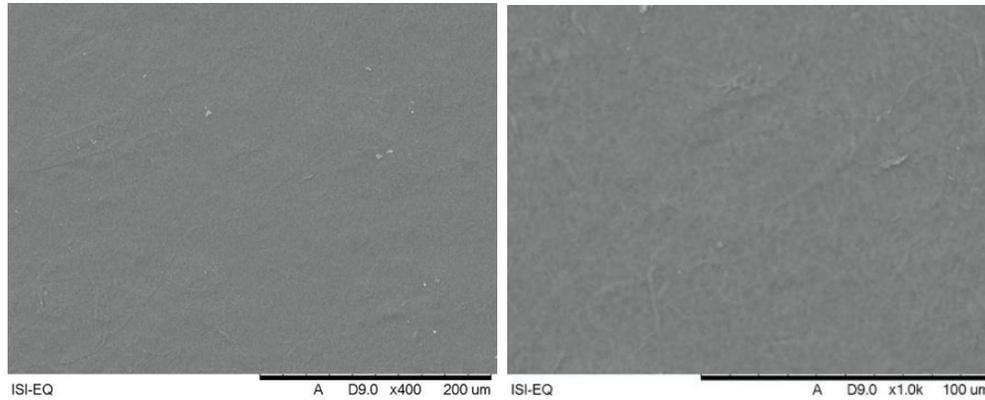
A partir das fotografias observou-se que as formulações resultaram em filmes homogêneos e contínuos, livres de bolhas ou imperfeições. Realizou-se uma comparação visual e qualitativa entre os dois filmes, e observou-se que a adição de glicerol torna o filme mais maleável e elástico, porém torna-o menos resistente que o filme sem a adição de glicerol, também se observou que a adição do glicerol não modifica a opacidade do revestimento.

As blendas poliméricas foram caracterizadas em relação a sua morfologia pelas análises de MEV. Além das blendas foram preparados filmes isolados de PVAL e CMF, aplicados também por *casting* e secos em estufa para realização das análises. A Figura 17 apresenta as imagens de MEV dos filmes isolados de CMF (3% m/m), PVAL (3% m/m), além dos filmes de CMF (3% m/m) – PVAL (3% m/m) com e sem a adição de Glicerol. A partir das imagens de MEV foi possível observar que o filme de PVAL isolado apresenta uma morfologia homogênea e sem rugosidades. Por outro lado, o filme de CMF apresenta uma rugosidade superficial mais elevada, devido às microfibras, que se assemelham a um emaranhado de fitas que compõem o filme. Ao se observar os filmes formados pelas blendas notou-se que os espaçamentos existentes entre as fibras da CMF foram preenchidos com o PVAL, resultando em um filme com uma morfologia densa contendo as fibras da CMF dispersas. A presença de microfibras de celulose, quando torcidas e entrelaçadas na estrutura de uma matriz

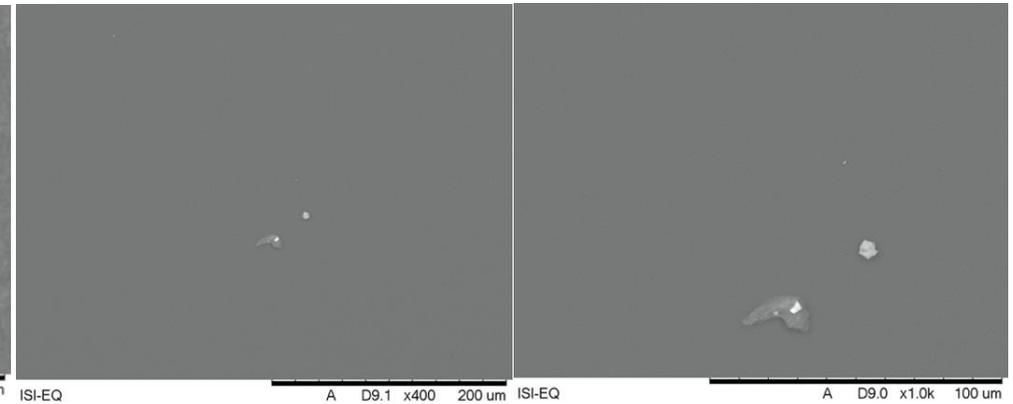
polimérica, confere um aumento na resistência mecânica do filme. Além disso, não se observaram diferenças visuais entre os filmes com e sem a adição de glicerol.

Figura 17. Imagens de MEV dos filmes poliméricos desenvolvidos, sendo (a) CMF (3% m/m), (b) PVAL (3% m/m), (c) CMF (3% m/m) - PVAL (3% m/m), e (d) CMF (3% m/m), PVAL (3% m/m) e Glicerol nas magnificações: 400 e 1000 vezes, respectivamente.

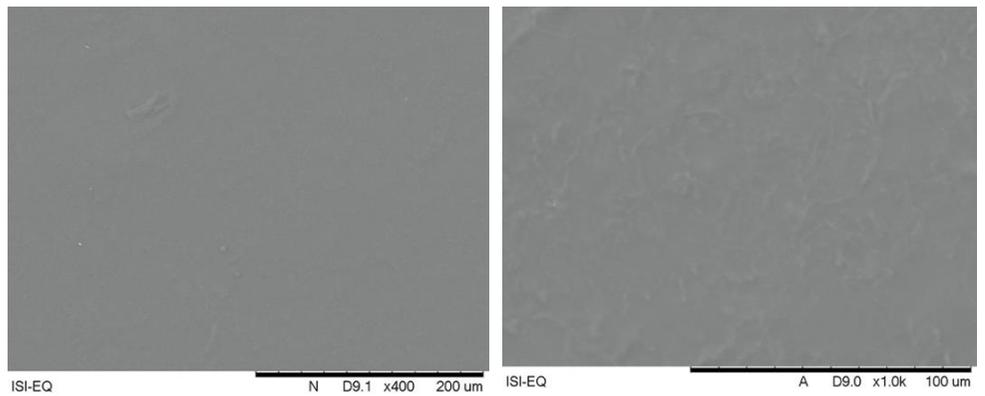
(a) Filme de CMF (3% m/m)



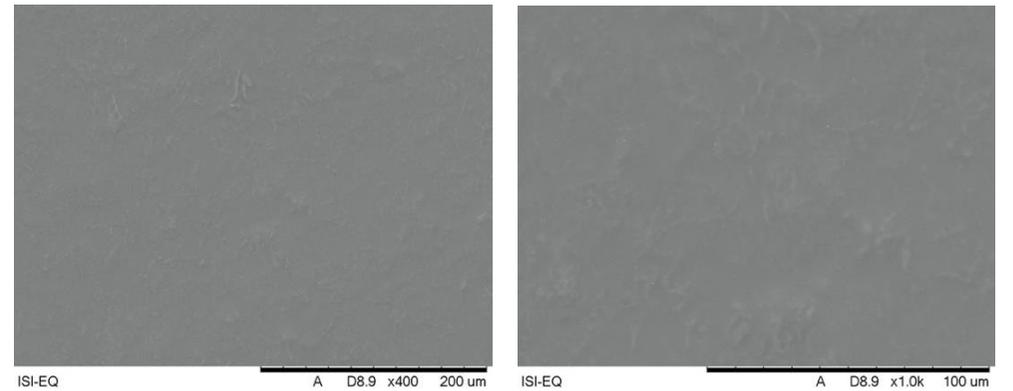
(b) Filme de PVAL (3% m/m)



(c) Filme de CMF (3% m/m) - PVAL (3% m/m)

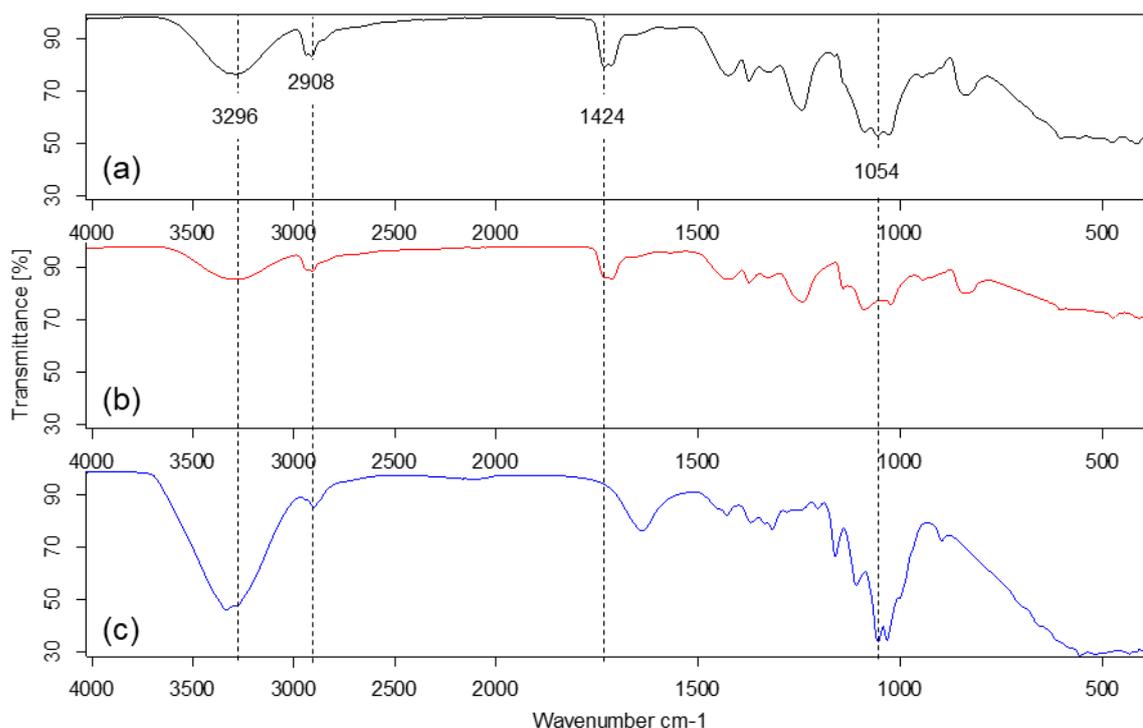


(d) Filme de CMF (3% m/m) - PVAL (3% m/m) e Glicerol



A caracterização química dos filmes foi realizada pela técnica de FTIR. A Figura 18 apresentam os espectros de FTIR do filme de PVAL (3% m/m) – CMF (3% m/m) e seus componentes isolados. Analisando o espectro do filme formado, é possível observar uma alta similaridade com o espectro do PVAL isolado, apresentando as mesmas bandas características, como a banda referente ao estiramento –O-H (hidroxila) em  $3296\text{ cm}^{-1}$ , ao estiramento –C-H em  $2908\text{ cm}^{-1}$ , e ao estiramento –C-H em  $1424\text{ cm}^{-1}$  (ABUREESH; OLADIPO; GAZI, 2016). Comparado com a CMF, nota-se uma contribuição mínima do espectro da celulose no espectro do filme, sendo possível observar somente uma banda em  $1054\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento –C-O da estrutura do polissacarídeo (CHANG et al., 2011; SINGH et al., 2017)

**Figura 18 - Espectros de FTIR dos materiais (a) Filme de PVAL (3% m/m) – CMF (3% m/m), (b) PVAL 3% (m/m) e (c) CMF 3% (m/m).**

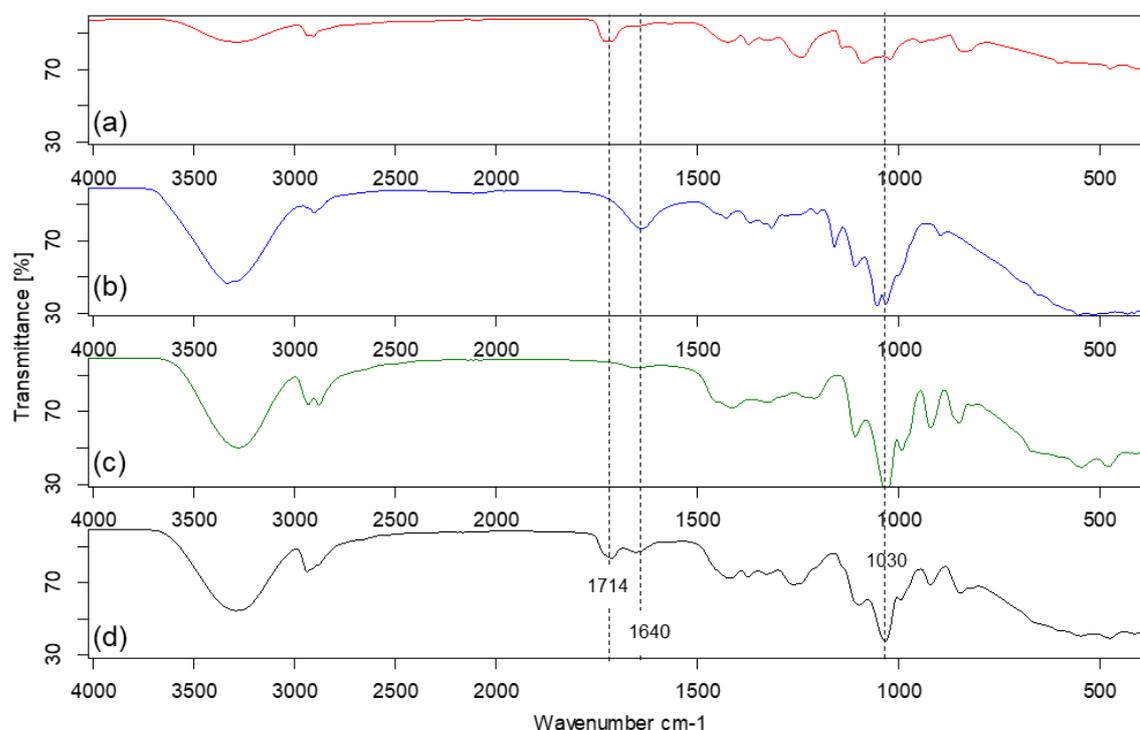


**Fonte: O Autor (2023)**

A Figura 19 apresenta os espectros de FTIR do filme aditivado de glicerol e seus componentes isolados. Diferentemente do espectro observado para o filme anterior, pode-se observar com maior clareza a contribuição dos três componentes isolados no espectro do filme. Observa-se a contribuição do PVAL devido à banda em  $1714\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento –C=O, a contribuição da CMF devido à banda em  $1640\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento –C=O, e a contribuição do Glicerol devido ao

estiramento  $\text{-CH-OH}$  em  $1030\text{ cm}^{-1}$  (FONSECA DOS REIS et al., 2006; LÓPEZ-DÍAZ et al., 2018).

**Figura 19 - Espectros de FTIR dos materiais (a) PVAL, (b) CMF, (c) Glicerol e (d) Filme de PVAL (3% m/m) – CMF (3% m/m) – Glicerol.**

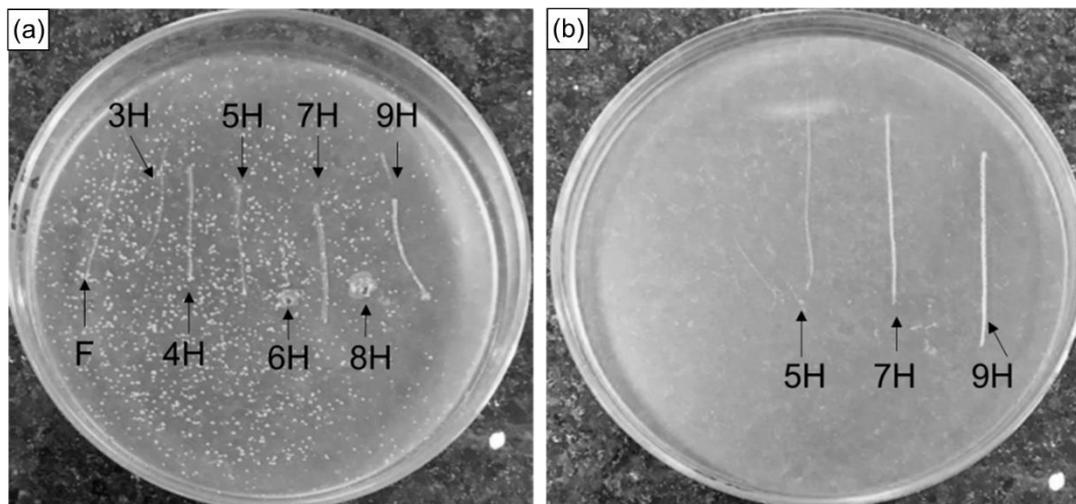


**Fonte: O Autor (2023)**

A dureza dos revestimentos desenvolvidos foi avaliada pelo método de *pencil hardness*, e os resultados obtidos indicaram que o revestimento de composição CMF-PVAL é classificado com dureza 9H, enquanto o filme de composição CMF-PVAL-Glicerol é classificado como dureza F.

De acordo com os dados, o filme de maior dureza foi o PVAL-CMF (9H). Constata-se também que a adição de glicerol na blenda à base de PVAL reduziu consideravelmente a dureza do filme formado, visto que o filme PVAL-CMF-Glicerol apresentou dureza (F). Na Figura 20 podem ser observadas as fotografias registradas dos dois filmes submetidos ao ensaio de dureza: (a) o filme PVAL-CMF-Glicerol apresenta uma dureza mediana, sendo possível observar os defeitos e rasgos no filme ao se aplicar os lápis com durezas superiores, como 8H e 9H, e a imagem (b) apresenta um revestimento com dureza superior a 9H, nota-se que o desgaste observado está relacionado ao desgaste do lápis sem apresentar defeitos no revestimento.

**Figura 20 - Fotografias dos revestimentos, sendo (a) um revestimento aditivado de Glicerol, tendo dureza mediana e (b) o revestimento sem glicerol, com dureza superior a 9H.**



Fonte: O Autor (2023)

Esses dados indicam que a adição do glicerol traz pontos positivos e negativos para o revestimento. Ao mesmo tempo em que ele torna o revestimento mais maleável e elástico, ele diminui a sua dureza. Essas informações são úteis, pois pode-se avaliar qual melhor revestimento se adequará para determinada aplicação.

### 5.3 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO FILME POLIMÉRICO FINAL

Para a formulação do revestimento final foi escolhido a formulação base sem a adição do agente plastificante, por apresentar as melhores propriedades mecânicas, por exemplo a maior dureza no ensaio normatizado. Para conclusão da síntese das partículas de quitosana com maior potencial para ser aplicado como aditivo na formulação, foram realizados novos ensaios aumentando a concentração do TPP (100 e 150 mg) adicionado no meio reacional. Como descrito anteriormente (Tópico 5.1) o aumento da concentração de TPP influenciou na eficiência de encapsulamento, e devido a não obtenção de uma correlação clara sobre a influência da concentração do extrato, esses ensaios foram realizados com as duas concentrações (50 e 150 mg). Os dados do planejamento experimental e das caracterizações das micropartículas sintetizadas estão apresentados na Tabela 4

Tabela 4 - Planejamento experimental e resultados das caracterizações das micropartículas.

	Teste	Quitosana (mL)	Massa TPP (mg)	Massa Extrato (mg)	EE%*	Potencial Zeta (mV)	Tamanho ( $\mu$ m)
Alta Massa Molecular	A	50	100	150	71,01 <sup>f</sup>	+4,64 $\pm$ 1,81	7,22 $\pm$ 0,75
	B	50	100	50	68,31 <sup>a</sup>	+0,80 $\pm$ 2,80	6,49 $\pm$ 1,17
	C	50	150	150	69,89 <sup>e</sup>	-1,41 $\pm$ 2,19	7,67 $\pm$ 2,10
	D	50	150	50	69,43 <sup>d</sup>	+6,12 $\pm$ 3,68	3,99 $\pm$ 1,98
Baixa Massa Molecular	E	50	100	150	68,32 <sup>a</sup>	+6,09 $\pm$ 1,52	6,73 $\pm$ 1,94
	F	50	100	50	69,21 <sup>b</sup>	+5,03 $\pm$ 1,18	5,43 $\pm$ 2,02
	G	50	150	150	69,29 <sup>b</sup>	+1,29 $\pm$ 4,45	4,20 $\pm$ 2,15
	H	50	150	50	67,85 <sup>c</sup>	+1,41 $\pm$ 2,16	5,51 $\pm$ 2,06

\*Amostras representadas por letras iguais não apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) pelas análises One Way ANOVA e análise comparativa de Tukey. Os conjuntos de amostras (B, E) e (F, G) são estatisticamente iguais

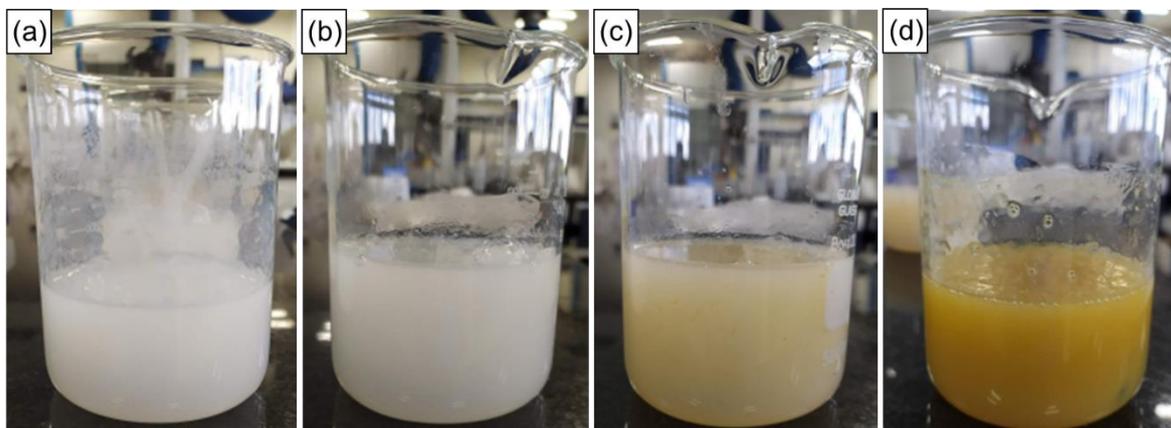
A partir dos resultados apresentados na Tabela 4 verificou-se que pela análise comparativa de Tukey, os conjuntos de testes nomeados (B, E) e (F, G) apresentaram resultados de eficiência de encapsulamento estatisticamente iguais. Ademais, a síntese das nanopartículas que resultou em uma maior eficiência de encapsulamento foi a realizada com os parâmetros do Teste A com a quitosana de alta massa molecular, obtendo valores de eficiência de encapsulamento de 71,01%. Além disso, por essa síntese apresentar um Potencial Zeta positivo (4,64 mV) indica que existem cargas positivas na superfície das partículas devido grupamentos da quitosana que não interagiram com o TPP. A presença de uma carga positiva residual nas partículas pode potencializar sua ação antimicrobiana, devido possíveis interações eletrostáticas com cargas negativas da parede celular do microorganismo, como descrito por (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009). Foram realizadas análises para verificar a ação antimicrobiana dessa síntese pelos ensaios qualitativos de difusão em disco, assim como descrito no Tópico 5.1.1, sendo observado ação antimicrobiana, confirmada pela presença de halo de inibição, para as duas cepas testadas (*E. coli* e *S. aureus*). Esses resultados auxiliaram na escolha dessa síntese para aplicação na formulação do revestimento final.

Após a definição da metodologia foi realizado a formulação de uma síntese das micropartículas de quitosana, seguindo a proporção do teste A apresentado na Tabela

4, porém sem adição do extrato de romã. Essa síntese, que também será aplicada na formulação do filme a fim de comparar a ação do conjunto material de núcleo e material de parede, resultou em um material com tamanho médio de  $2,03 \pm 0,43 \mu\text{m}$  e Potencial Zeta de  $+3,49 \pm 1,79 \text{ mV}$ . Esses resultados indicam que a adição do extrato de romã modifica a conformação das partículas, visto que as partículas com extrato apresentaram tamanho médio maior que as sem extrato, e os valores similares de carga superficial do material, podem indicar uma preferência da estruturação do extrato no interior das micropartículas.

Para formulação do revestimento, após o resfriamento do meio reacional até temperatura ambiente foi adicionado o concentrado de micropartículas equivalente a uma síntese em 50 mL de meio reacional na formulação. Optou-se por essa metodologia de adição do material para minimizar possíveis desestruturação das partículas devido a temperatura elevada da solução durante a síntese ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A adição das nanopartículas de prata foi realizada da mesma maneira, adicionando-se o produto até obtenção de uma concentração de 20g/L, concentração fornecida pelo fabricante para obtenção de ação antimicrobiana. As fotografias das formulações após a adição dos materiais estão apresentadas na Figura 21, em que (a) refere-se ao revestimento base, (b) ao revestimento aditivado das partículas de quitosana, (c) ao revestimento aditivado das partículas de quitosana contendo extrato de romã e (d) ao revestimento aditivado de nanopartículas de prata.

**Figura 21. Fotografias das formulações dos revestimentos, sendo (a) referente ao revestimento base, (b) ao revestimento aditivado das partículas de quitosana, (c) ao revestimento aditivado das partículas de quitosana contendo extrato de romã e (d) ao revestimento aditivado de nanopartículas de prata.**

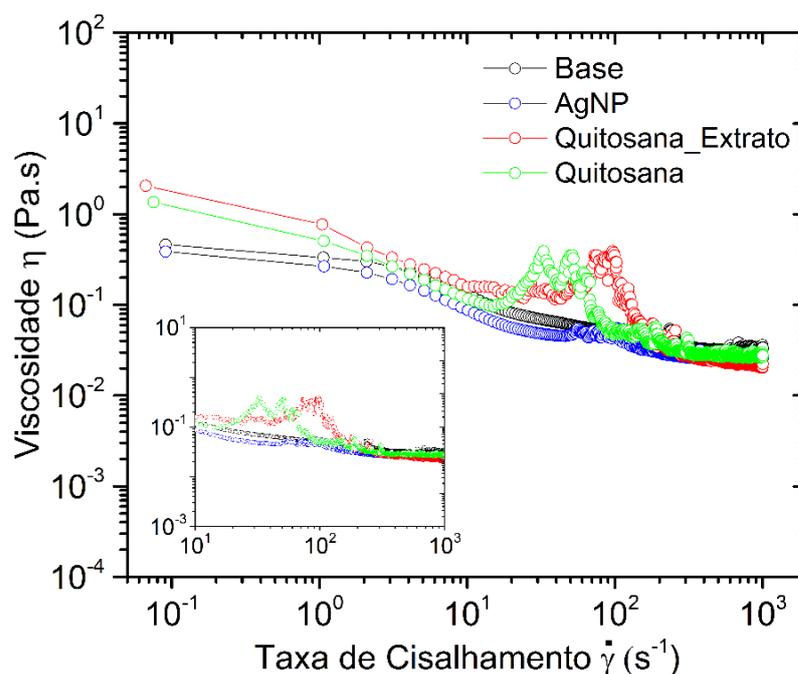


**Fonte: O Autor (2023)**

Observa-se na Figura 21, que a adição das partículas sintetizadas somente com quitosana não causam uma alteração visual tão expressiva na coloração final do meio. Contudo ao se analisar a adição das partículas sintetizadas com extrato de romã, tem-se uma mudança na coloração devido a cor do extrato. Por fim a adição das nanopartículas de prata foi o que causou a maior alteração de cor do meio, mudando seu aspecto para uma coloração amarelada.

As formulações foram caracterizadas por análises reológicas para avaliar possíveis alterações na viscosidade da formulação devido adição dos materiais. A Figura 22 apresenta os dados da viscosidade dos revestimentos.

Figura 22 - Gráfico de viscosidade x Taxa de cisalhamento das formulações.



A partir das curvas obtidas dos estudos reológicos foi possível verificar que as formulações apresentam características de fluidos não-newtonianos pseudoplásticos, visto que sua viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, propriedade muito comum em tintas ou revestimentos. Além disso, essa propriedade é desejável dependendo da aplicação (pincel, rolo ou spray), pois reduzem sua viscosidade quando submetidas a maiores tensões cisalhantes durante a aplicação, mas não tendem a escorrer após aplicadas, uma vez que ao se retirar a tensão cisalhante, a viscosidade da tinta aumenta (MACHADO 2022).

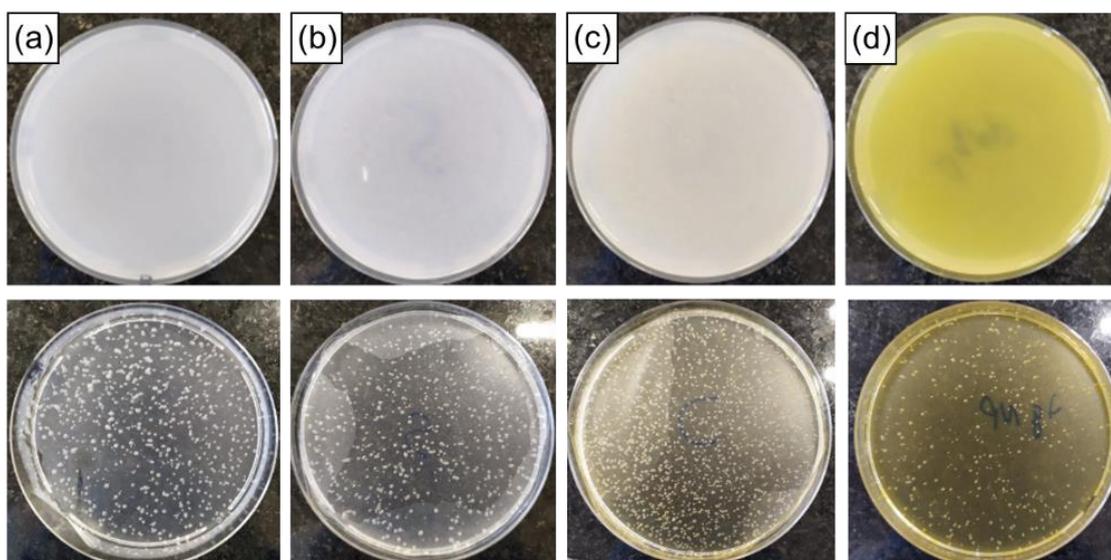
Foi possível verificar a partir da Figura 22 que para as formulações com adição das partículas de quitosana (com ou sem extrato) ou seja com a adição de sólidos na formulação, ocorreu o aumento da viscosidade nas etapas iniciais da análise (menores taxas de cisalhamento). Esse comportamento pode indicar que um aumento do teor dos sólidos e consequentemente, o aumento da viscosidade em baixas taxas de cisalhamento, dificulta o deslizamento e fluxo inicial das moléculas da formulação. (MACHADO 2022). Outro aspecto observado para essas duas formulações foi o aumento repentino da viscosidade próximo da taxa de cisalhamento de  $10^2 s^{-1}$ , esse comportamento pode estar relacionado a alguma movimentação interna das partículas de quitosana no meio, ou a formação de bolhas de ar. Contudo a viscosidade retorna ao patamar da formulação base e se mantém até a finalização da análise.

Comparativamente a formulação com adição das nanopartículas de prata foi a que apresentou um comportamento mais similar ao revestimento base, em toda a taxa de cisalhamento analisada, possivelmente devido menor tamanho das partículas não ocasionar uma influência tão expressiva na viscosidade.

As formulações foram aplicadas pela técnica de *casting* em placas de Petri de poliestireno e após a secagem realizadas as análises de FTIR, MEV, ângulo de contato e dureza a lápis. A aplicação foi realizada em placas de plástico pois em testes iniciais utilizando placas de vidro a alta aderência do revestimento no substrato impossibilitou a remoção do material para as análises. Essa característica foi intensificada para os revestimentos aditivados com as partículas de quitosana com e sem extrato.

A Figura 23 apresenta fotografias dos revestimentos logo após a aplicação por *casting*, e após secos. De maneira geral os revestimentos secos mantiveram a característica visualizada na formulação líquida, ou seja, o revestimento contendo nanopartículas de prata apresentou uma coloração mais amarelada do que o revestimento base e o contendo partículas de quitosana, e o revestimento contendo partículas de quitosana com extrato de romã apresentou uma coloração intermediária entre eles.

**Figura 23 - Fotografias dos revestimentos após aplicação por casting e após secos, sendo (a) revestimento base, (b) revestimento contendo partículas de quitosana, (c) revestimento contendo partículas de quitosana e extrato de romã e (d) revestimento contendo nanopartículas de prata.**



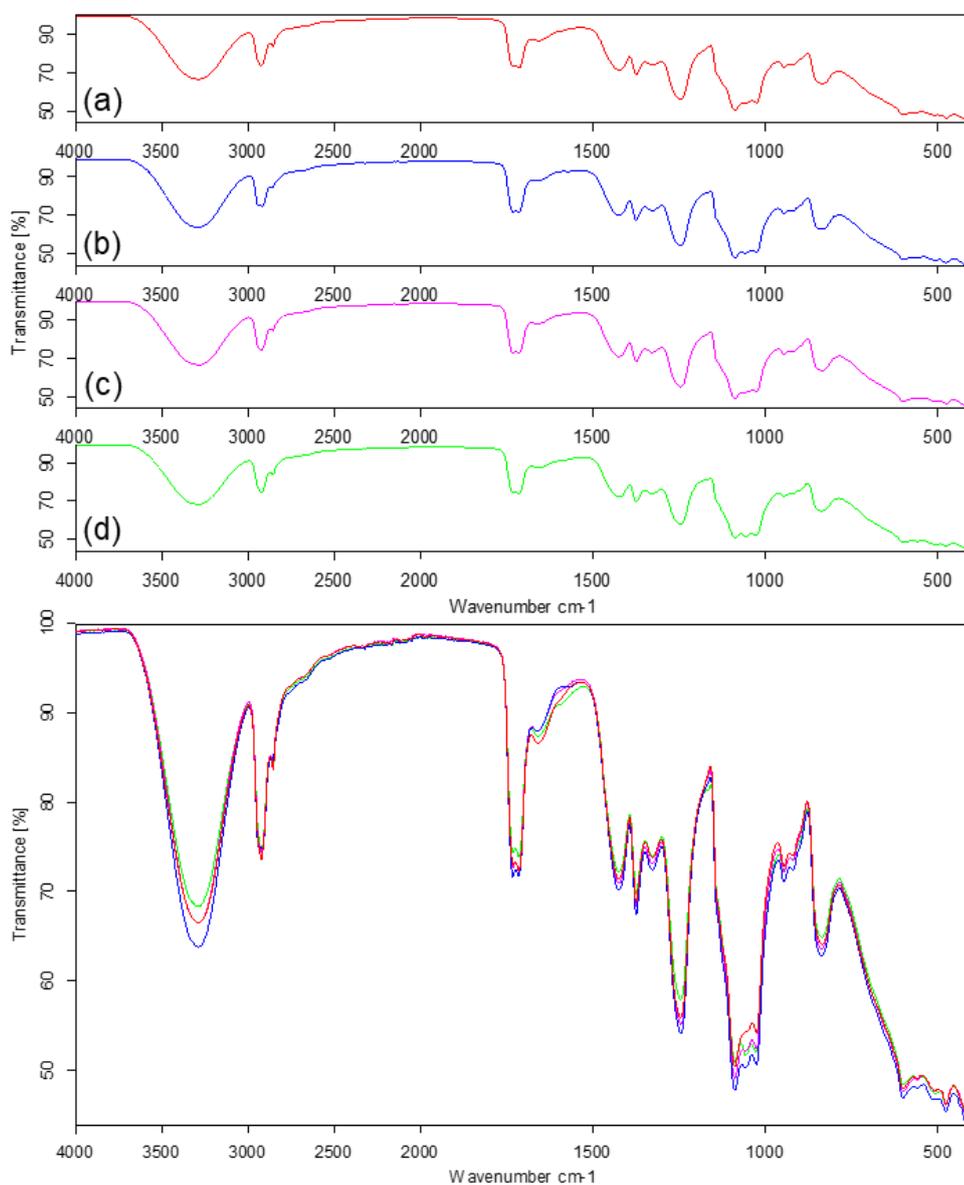
Fonte: Autor (2023)

Os filmes foram caracterizados química e morfológicamente pelas análises de FTIR e MEV, apresentadas respectivamente nas Figura 24 e Figura 25. Comparativamente por essas duas análises não foram observadas diferenças entre o filme base e os filmes aditivados com as partículas de quitosana ou as nanopartículas de prata. Avaliando os espectros de FTIR, a Figura 24 apresenta a sobreposição dos espectros dos quatro filmes analisados, sendo possível verificar uma correlação expressiva entre eles, e não observando surgimento ou deslocamento de bandas.

Adicionando a isso as análises de MEV também mostram morfologias similares entre os filmes, notando-se as microfibras características da CMF que compõem o filme, porém não é notado estruturas que possam remeter as partículas de quitosana.

Esses dois resultados podem indicar que após estabilização e conformação dos filmes os aditivos incorporados tendem a se estruturar e se organizar nas partes internas do filme, possivelmente aderidos as fibras de celulose que compõem sua estrutura. Com isso, devido as análises de FTIR e MEV caracterizarem superficialmente o filme não foi detectado mudanças em relação ao revestimento base.

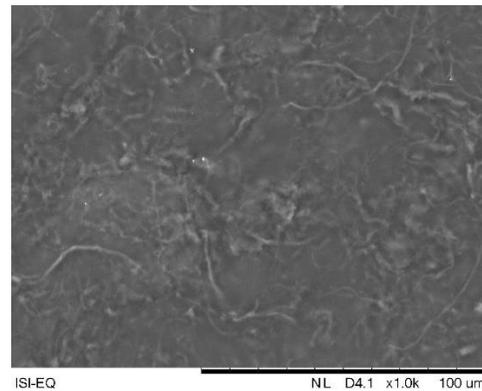
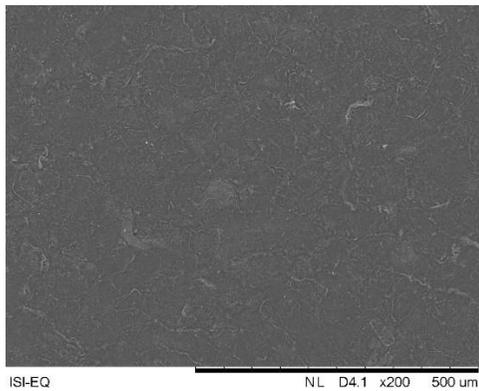
**Figura 24 - Espectros de FTIR separados e sobrepostos dos filmes secos, sendo (a) referente ao revestimento base, (b) ao revestimento aditivo com partículas de quitosana, (c) ao revestimentos aditivado com partículas de quitosana e extrato de romã e (d) ao revestimento aditivado com nanopartículas de prata.**



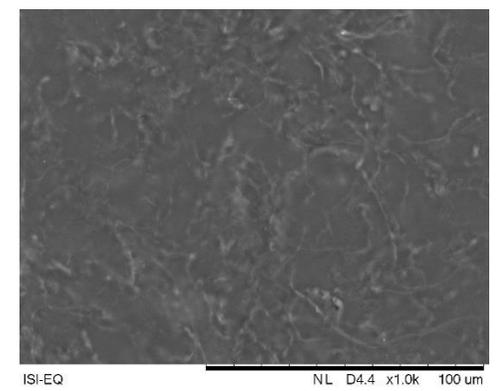
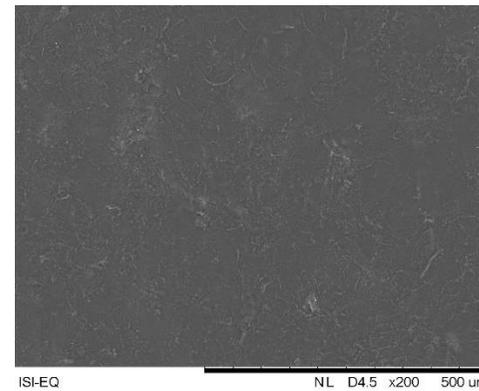
**Fonte: O Autor (2023)**

Figura 25 - Imagens de MEV dos filmes poliméricos desenvolvidos, sendo (a) filme base, (b) filme contendo partículas de quitosana, (c) filme contendo partículas de quitosana e extrato de romã e (d) filme contendo nanopartículas de prata, nas magnificações de 200 e 1000 vezes, respectivamente.

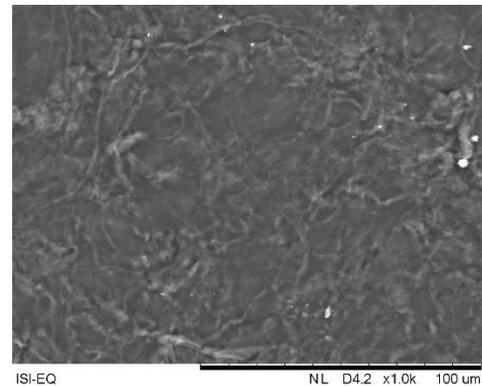
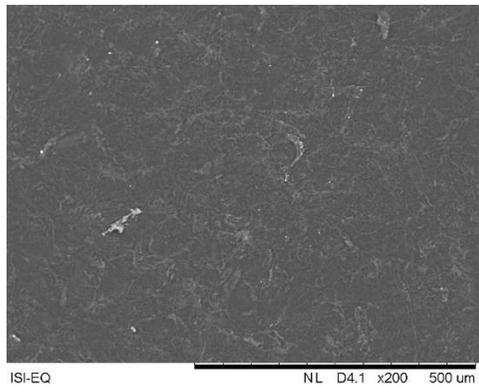
(a) Filme Base (PVAL 3% e CMF 3%)



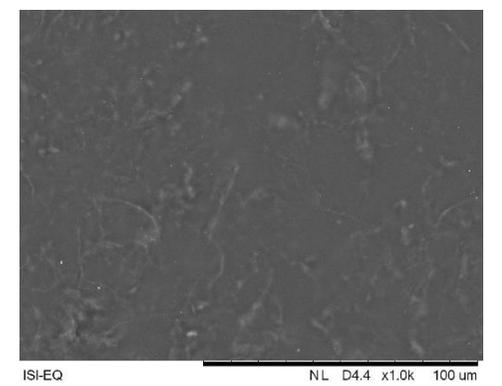
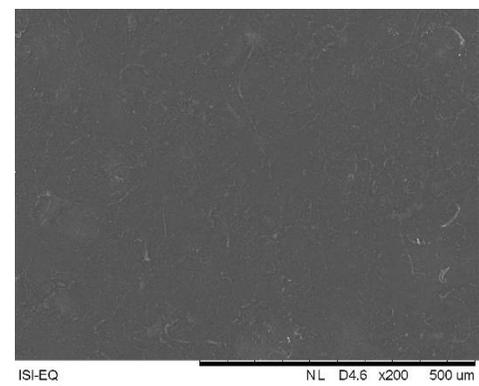
(b) Filme de PVAL 3% e CMF 3% contendo micropartículas de quitosana



(c) Filme de PVAL 3% e CMF 3% contendo micropartículas de quitosana e extrato de romã



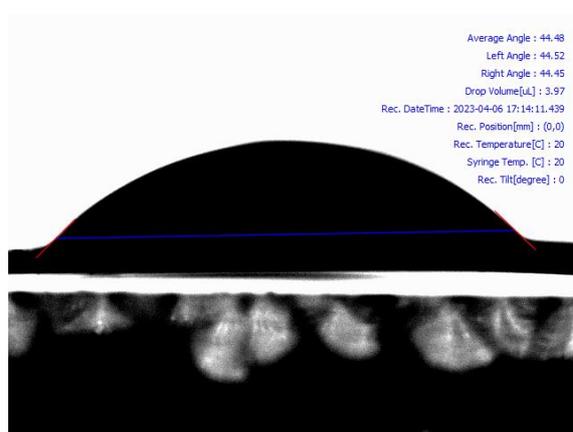
(d) Filme de PVAL 3% e CMF 3% contendo nanopartículas de prata



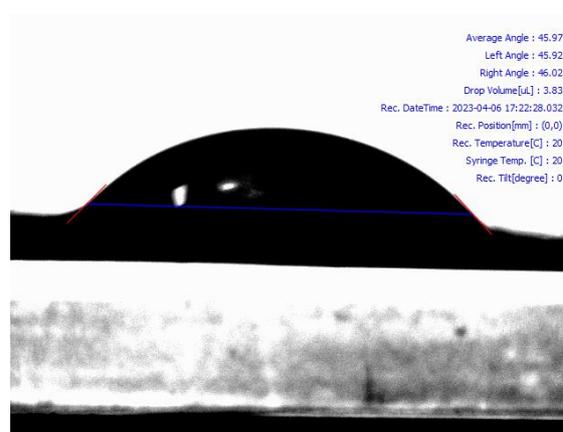
Os filmes foram caracterizados em relação ao ângulo de contato, para avaliar características de hidrofobicidade ou hidrofiliidade. A Figura 26 apresenta a imagem obtida do equipamento da gota disposta nos filmes assim como o valor da média obtida das 10 análises realizadas.

**Figura 26 - Imagens de ângulo de contato dos filmes, sendo (a) filme base, (b) filme contendo partículas de quitosana, (c) filme contendo partículas de quitosana e extrato de romã e (d) filme contendo nanopartículas de prata.**

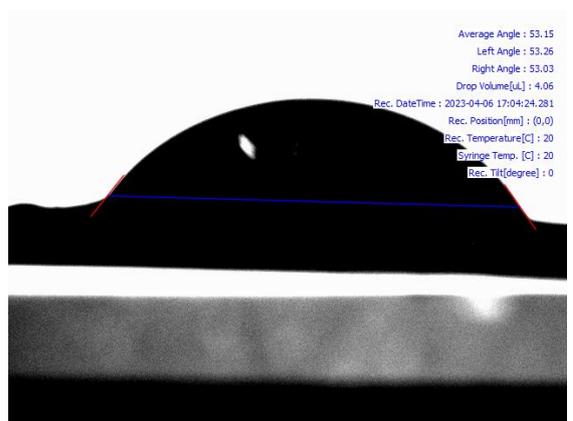
(a) Filme Base (PVAL 3% e CMF 3%)



(b) Filme de PVAL 3% e CMF 3% contendo micropartículas de quitosana



(c) Filme de PVAL 3% e CMF 3% contendo micropartículas de quitosana e extrato de romã



(d) Filme de PVAL 3% e CMF 3% contendo nanopartículas de prata



Fonte: O Autor (2023)

Todos os filmes obtiveram um ângulo de contato  $< 90^\circ$ , o que pela literatura indica que são revestimentos hidrofílicos (LI. X, et. al 2007). Além disso a adição dos materiais não influenciou expressivamente nos valores de ângulo de contato, sendo observado somente o aumento do ângulo para  $53^\circ$ , em comparação a média de  $45^\circ$  dos outros, no revestimento aditivado com micropartículas de quitosana e extrato de

romã, porém mesmo com esse aumento os revestimentos continuam sendo caracterizados como hidrofílicos.

Uma das possibilidades da aditivação dos compostos não alterar essa propriedade pode estar relacionada com as observações realizadas anteriormente nas análises de MEV e FTIR da organização desses materiais no filme. Por se organizarem internamente no filme a aditivação desses materiais não alterou propriedades superficiais do filme, como é o exemplo do ângulo de contato.

Esse dado também corroborou com o teste de dureza ao lápis realizado nos revestimentos, visto que todos mantiveram a dureza já estabelecida para o revestimento base, sendo assim, todos os revestimentos foram caracterizados como dureza 9H.

### 5.3.1 Ensaios Antimicrobianos dos revestimentos

Os ensaios antimicrobianos em que os filmes foram testados envolveram um teste de avaliação qualitativa (antibiograma) e uma análise quantitativa (ASTM E 2149). Os revestimentos desenvolvidos foram avaliados inicialmente pela metodologia qualitativa. Para essa análise ao invés de utilização de discos esterilizados, prosseguiu-se a análise posicionando os filmes secos para avaliação da ação antimicrobiana. Os controles positivos e negativos foram aplicados utilizando solução de ciprofloxacino e água ultrapura, respectivamente.

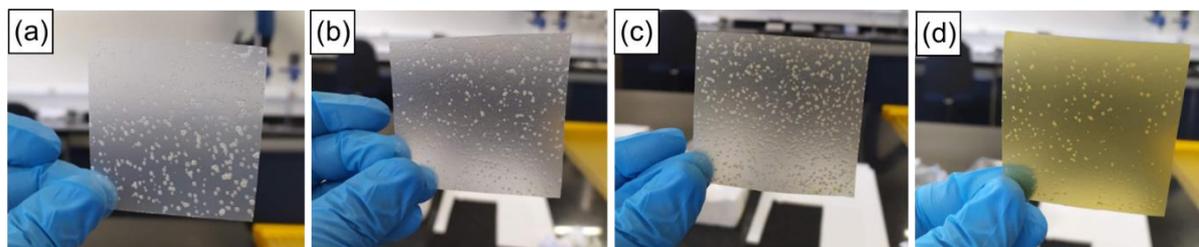
Através do ensaio foi possível verificar a presença de halos de inibição ao redor das amostras aditivadas com micropartículas de quitosana (com ou sem extrato) e nanopartículas de prata, e a ausência de halos para o revestimento base. Esse resultado foi observado para as duas bactérias analisadas. Dentro de um ensaio de antibiograma a presença de halos indica que o material apresenta ação antimicrobiana. Para aplicação no trabalho, esse ensaio foi realizado com caráter qualitativo, com o intuito de verificar de uma maneira rápida e preliminar a possível ação antimicrobiana dos revestimentos. Como conclusão das análises observou-se que a aditivação dos revestimentos com as partículas de quitosana contendo ou não o extrato de romã ou com nanopartículas de prata trouxeram uma ação antimicrobiana para o revestimento base, que se mostrou sem ação.

Com esse resultado positivo da ação antimicrobiana dos filmes, manteve-se a concentração e metodologia de formulação dos filmes e prosseguiu-se com o ensaio

quantitativo a fim de calcular a % de inibição dos filmes desenvolvidos. O primeiro ensaio foi realizado segundo a normativa JIS Z 2801 (*Antimicrobial products-Test for antimicrobial activity and efficacy*), umas das normas mais difundidas para determinação da ação antimicrobiana em tintas ou revestimentos. Essa normativa envolve a avaliação da ação antimicrobiana de contato entre o substrato e a solução de microrganismos, e para isso os materiais avaliados não podem ser porosos ou absorver água, pois a absorção da solução de inóculo pelo material gera uma variação no volume final que conseqüentemente interfere na contabilização das bactérias. Ao se analisar os filmes utilizando essa norma verificou-se que os revestimentos absorviam a solução de inóculo utilizada e por isso não foi possível avaliar com assertividade a ação antimicrobiana dos revestimentos utilizando essa norma.

Devido aos resultados, outras normativas foram avaliadas como opções para determinação da ação antimicrobiana dos revestimentos. A norma ASTM E2149 (*Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions*), foi selecionada pois possibilita a determinação da atividade antimicrobiana em materiais com características hidrofílicas. Essa norma assegura um bom contato entre o material a ser testado e a solução de inóculo devido imersão completa do substrato e constante agitação. A Figura 27 apresenta os revestimentos preparados no tamanho especificado pela norma para aplicação (5x5 cm). Por recomendação da norma também é realizado o preparo de uma solução somente de bactérias e realizadas as análises no mesmo tempo das amostras, para agirem como grupo controle.

**Figura 27 - Fotografias dos filmes secos, sendo (a) o filme base, (b) o filme aditivado com partículas de quitosana, (c) o filme aditivado com partículas de quitosana e extrato de romã e (d) o filme aditivado de nanopartículas de prata.**



Fonte: O Autor (2023)

Os resultados obtidos de % de redução após 1 h, 24 h e 48 h estão apresentados na Tabela 5. Os dados foram agrupados em comparativos entre o grupo de interesse, esse podendo ser o revestimento base ou os revestimentos aditivados

das partículas, e o grupo de comparação. Assim os dados apresentados de % de redução relaciona esse comparativo com o grupo de interesse. Os dados apresentados como 0% indica que não houve redução comparativa entre as amostras testadas. Os revestimentos aditivados com nanopartículas de prata apresentaram em todos os tempos de contato e para as duas bactérias a redução de 100%, por isso não foram colocadas como comparativo na tabela.

Tabela 5 - Resultados de redução de unidades formadoras de colônia dos revestimentos testados para bactérias *E. coli* e *S. aureus* nos tempos de contato de 1h, 24h e 48h.

Formulação Interesse	Comparativo	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
		% Redução (1 h)	% Redução (24 h)	% Redução (48 h)	% Redução (1 h)	% Redução (24 h)	% Redução (48 h)
<b>Base</b>	Controle	0	94,27	100	79,2	99,96	99,97
<b>Quitosana</b>	Controle	27,95	98,68	100	89,96	99,98	100
<b>Quitosana + Extrato</b>	Controle	39,74	98,84	100	94,8	99,97	100
<b>Quitosana</b>	Base	27,95	49,12	0	25	25,55	88,31
<b>Quitosana + Extrato</b>	Base	39,74	15,79	0	75	6,56	89,35
<b>Quitosana + Extrato</b>	Quitosana	16,37	-65,52	0	48,21	-76,92	17,17

Analisando inicialmente os filmes comparados com o controle para o tempo de 1h, nota-se um aumento da redução de bactérias com a progressão do sistema, ou seja, nota-se que o revestimento base apresentou uma certa inibição, porém ela aumenta com a adição das partículas de quitosana e é potencializada com a aditivação do material contendo extrato de romã. Essa progressão pode indicar justamente o efeito sinérgico descrito anteriormente (Tópico 5.1.1) entre a quitosana e o extrato. Após 24h de contato, analisando os dados de *S. aureus*, ainda é visualizado um leve aumento da ação, e para a *E. coli* os valores estão próximos entre si, e totalizando aproximadamente 100%, não sendo possível observar diferenças. Após 48h todos os sistemas apresentaram praticamente 100% de inibição. Para esse resultado deve-se levar em consideração que para o sistema controle o crescimento das bactérias ocorre sem interferência, e devido maior concentração de bactérias, as possíveis diferenças na quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) entre filmes testados se tornam irrelevantes.

Comparando-se os revestimentos aditivados de partículas com quitosana e o revestimentos base, para o período de 1h de contato tem-se uma melhora expressiva, principalmente para o sistema da *E. coli*, da ação antimicrobiana com a adição das partículas com extrato de romã como material de núcleo (75% de redução, comparado com 25% do filme aditivado somente com partículas de quitosana).

O revestimento aditivado somente com partículas de quitosana também apresentou uma melhora na ação antimicrobiana em 1h de contato comparado com o revestimento base, porém observou-se que esse revestimento tem seu ápice de atuação após 24h de contato. Nesse tempo de imersão é possível verificar que as partículas de quitosana tem uma melhora expressiva na ação, tornando-se mais efetivas que o material aditivado de extrato de romã. Esse efeito fica melhor evidenciado no último comparativo em que a revestimento aditivado de partículas de quitosana e extrato de romã apresenta um desempenho negativo ao se comparar com as partículas de quitosana pura.

Comparando-se os dois sistemas aditivados de micropartículas de quitosana (com e sem extrato), verifica-se que as partículas contendo extrato apresenta dois ápices de melhora da ação antimicrobiana, sendo essas no tempo inicial, para as duas bactérias e após 48h de contato para o sistema *E. coli*. Para o sistema *S. aureus* após 48 horas as amostras inibiram 100% das bactérias. Como mencionado anteriormente o encapsulamento auxilia numa liberação gradual e controlada do material de núcleo,

e esses resultados podem estar relacionados a esse fenômeno. A melhora na ação antimicrobiana no tempo inicial de contato pode estar relacionada, além da ação da quitosana, com a liberação inicial do extrato adsorvido ou encapsulado em partes mais externas da partícula, sendo liberada nesses estágios iniciais. Após 24 horas o sistema do particulado pode se manter estável, o que auxilia na preservação do extrato, porém pode influenciar negativamente na atuação da própria quitosana como agente antimicrobiano, visto que para os sistemas com partículas somente de quitosana, seu pico de ação ocorre em 24h. Por fim, após 48 horas de contato pode-se ter uma liberação expressiva do extrato o que potencializa a ação antimicrobiana desse revestimento nesse tempo de contato. Para confirmar essa teoria outras análises podem ser realizadas em trabalhos futuros a fim de avaliar a taxa de liberação do extrato, assim como monitoramento do potencial zeta das partículas após determinados tempos de contato com soluções utilizadas nessa norma.

Ao se comparar os filmes desenvolvidos com os aditivos a base de quitosana e extrato de romã com os filmes aditivados com nanopartículas de prata, os filmes com quitosana não obtiveram ação similar aos de prata para essa concentração testada, visto que logo em contato inicial (1 hora) as nanopartículas de prata inibiram em 100% o crescimento bacteriano.

## 6 CONCLUSÃO

A síntese de micropartículas e revestimentos com ação antibacteriana, utilizando Quitosana e TPP contendo Extrato de Romã como material ativo pelo método de gelificação iônica, e a aditivação desse material em um revestimento polimérico foram bem-sucedidas, cumprindo o objetivo proposto neste trabalho. A metodologia de síntese das micropartículas resultou em um material com eficiência de encapsulamento superior a 60% em todas as variações testadas no planejamento experimental. As caracterizações desse material demonstraram que as micropartículas desenvolvidas com a quitosana de baixa massa molecular resultaram em um material com menor diâmetro do que as desenvolvidas com a quitosana de alta massa molecular. Pela caracterização química foi possível observar contribuições dos materiais de parede e de núcleo nas micropartículas desenvolvidas, o que confirma que o material desenvolvido contém quitosana, TPP e extrato de romã. Os ensaios antimicrobianos demonstraram eficiência antimicrobiana do material sintetizado, bem como um possível efeito sinérgico entre a quitosana e o extrato de romã.

Além disso, foi realizado o desenvolvimento do filme polimérico base em que serão posteriormente aditivadas as micropartículas de quitosana. Foi desenvolvido duas variações desse revestimento, sendo um filme mais resistente, porém menos maleável, e o outro com maior maleabilidade e elasticidade, porém com uma menor dureza. As caracterizações desses revestimentos por MEV e FTIR demonstraram a presença do PVAL e da CMF nos filmes sendo possível verificar que enquanto o PVAL traz uma maior maleabilidade para o revestimento a CMF torna o filme mais resistentes mecanicamente, devido às características de reforço proporcionadas pela presença das fibras de celulose.

Para a formulação do revestimento final foi escolhido o revestimento sem adição do plastificante devido melhor resistência mecânica do filme. Novas sínteses das partículas de quitosana com extrato de romã foram realizadas extrapolando a concentração de TPP, sendo possível obter uma eficiência de encapsulamento de 71% para as partículas desenvolvidas com quitosana de alta massa molecular, que foram as escolhidas para os ensaios. A aditivação dos revestimentos com partículas de quitosana pura, com extrato ou com nanopartículas de prata não mudaram as características químicas e morfológicas dos filmes, como foram verificados pelas

análises de FTIR, MEV, ângulo de contato e ensaios de dureza. Uma mudança observada foi em relação a viscosidade das soluções líquidas, em que em menores taxas de cisalhamento os revestimentos aditivados com partículas de quitosana com ou sem extrato apresentaram maior viscosidade, devido maior quantidade de sólidos na solução.

Os ensaios antimicrobianos qualitativos demonstraram potencial antimicrobiano para os filmes desenvolvidos devido presença de halos de inibição. Os ensaios quantitativos demonstraram que a adição das partículas de quitosana com ou sem extrato, de maneira geral, potencializaram a ação antimicrobiana do revestimento base. Ademais a adição de partículas de quitosana contendo extrato de romã melhora a ação antimicrobiana no tempo inicial (1 hora), e em tempo prologando de exposição (48 horas). Para a exposição inicial esse resultado pode estar relacionado com a liberação inicial parcial do extrato adsorvido ou encapsulado em partes mais externas da partícula, sendo liberada nesses estágios iniciais. Após 48 horas de contato pode-se ter uma liberação expressiva do extrato o que potencializou a ação antimicrobiana do revestimento nesse tempo, possivelmente devido liberação gradual e prolongada proporcionada pela encapsulamento do material pela quitosana.

A partir desses resultados conclui-se que se obteve êxito na síntese de micropartículas de quitosana e extrato de romã e do filme polimérico para incorporação do material. A aditivação do filme com as partículas de quitosana potencializaram as características do filme, visto que resultaram em um revestimento com ação antimicrobiana prolongada devido liberação controlada do extrato de romã e não ocasionaram nenhuma modificação nas propriedades físicas analisadas dos filmes (morfologia, ângulo de contato e dureza). Acredita-se que investigações futuras devam ser conduzidas para avaliar outros parâmetros que auxiliem na eficiência de encapsulamento das partículas e possivelmente melhorem a ação antimicrobiana do material final. Dentre eles podemos citar: variações na concentração ou volume da solução de quitosana; continuação dos estudos de concentrações de TPP e material de núcleo; estudos de variações de parâmetros físicos da síntese (tempo de síntese, diferentes formas de agitação ou métodos de incorporação dos reagentes); entre outros. Outras investigações que também podem ser realizadas seria a incorporação das partículas desenvolvidas em outras formulações de revestimentos base e avaliação das características do material final. Por esse motivo, os resultados aqui obtidos abrem portas para o aprofundamento na área de estudo, o que pode gerar

mais resultados na linha de pesquisa, bem como no desenvolvimento de soluções aplicáveis.

## REFERÊNCIAS

ABUREESH, M. A.; OLADIPO, A. A.; GAZI, M. Facile synthesis of glucose-sensitive chitosan–poly(vinyl alcohol) hydrogel: Drug release optimization and swelling properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 90, p. 75–80, 1 set. 2016.

AGUIAR, J. et al. Design of microparticles containing natural antioxidants: Preparation, characterization and controlled release studies. **Powder Technology**, v. 313, p. 287–292, 15 maio 2017.

AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 875–877, abr. 2007.

AMORIM, L. M. M. C. et al. MÉTODO DE APLICAÇÃO DE ESFERIFICAÇÃO EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS. **CONEXÃO UNIFAMETRO: DIVERSIDADES TECNOLÓGICAS E SEUS IMPACTOS SUSTENTAVEIS**, v. ISSN: 2357-8645, 2019.

ASTM – American Society for Testing Materials. ASTM E 2149 – 20. Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents under Dynamic Contact Conditions. 2020

BACH, P. APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS DE LA GRANADA (*Punica granatum*) VARIEDAD WONDERFUL PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TECNOLOGÍAS LIMPIAS. TACNA, PERU: UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN, 2020.

BAKRY, A. M. et al. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143–182, 1 jan. 2016.

BORGUINI, R. G. et al. Avaliação do teor de punicalagina em cascas de romã cultivar wonderful. **EMBRAPA Agroindústrias de Alimentos**. Rio de Janeiro, RJ : 2014

CHANG, P. R. et al. Polysaccharides as stabilizers for the synthesis of magnetic nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 640–644, 10 jan. 2011.

DUBEY, R.; SHAMI, T. C.; RAO, K. U. B. Microencapsulation Technology and Applications. **Defence Science Journal**, v. 59, n. 1, p. 88–95, 2009.

ESSER-KAHN, A. P. et al. Triggered release from polymer capsules. **Macromolecules**, 26 jul. 2011.

FLECK, A. **Desenvolvimento de semissólidos a base de extratos padronizados de Punica granatum e avaliação da atividade cicatrizante**. Dissertação de Mestrado. Niterói: Universidade Federal Fluminense, 2016.

FONSECA DOS REIS, E. et al. Synthesis and Characterization of Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogels and Hybrids for rMPB70 Protein Adsorption. **Materials Research**, v. 9, n. 2, p. 185–191, 2006.

FREITAS, A. **DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DE QUITOSANAS COMERCIAIS PARA USO FARMACÊUTICO**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual da Paraíba. 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. **Quim. Nova**. Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.

GOY, R. C.; BRITTO, D. DE; ASSIS, O. B. G. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 241–247, 2009.

GOY, R. C.; DE BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polimeros**, v. 19, n. 3, p. 241–247, 2009.

JIN, T. et al. Chitin and chitosan on the nanoscale. **Nanoscale Horizons**. Royal Society of Chemistry, , 1 jul. 2021.

JIS – Japanese Industrial Standard. JIS Z 2801 : 2010 Antimicrobial Products – Test for Antimicrobial Activity and Efficacy. v. 60014, n. 815, p. 1–4, 2014.

KAŠPAR, O.; JAKUBEC, M.; ŠTĚPÁNEK, F. Characterization of spray dried chitosan-TPP microparticles formed by two- and three-fluid nozzles. **Powder Technology**, v. 240, p. 31, 2013.

KHOERUNNISA, F. et al. Physicochemical Properties of TPP-Crosslinked Chitosan Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. **Fibers and Polymers**, v. 22, n. 11, p. 2954–2964, 1 nov. 2021.

LIMA, L. A. **Nanopartículas de quitosana / tripolifosfato de sódio obtidas via gelatinização iônica para a nanoencapsulação de quercetina**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. 2013.

LIU, H.; GAO, C. Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 20, n. 7, p. 613–619, 2009.

LI, X. M.; REINHOUDT, D.; CREGO-CALAMA, M. What do we need for a superhydrophobic surface? A review on the recent progress in the preparation of superhydrophobic surfaces. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 8, p. 1350–1368, 10 jul. 2007.

LÓPEZ-DÍAZ, A. S. et al. Effect of short wave ultraviolet radiation on selected properties of edible films formulated with pomegranate juice and chitosan. **Revista Mexicana de Ingeniera Quimica**, v. 17, n. 1, p. 63–73, 1 jan. 2018.

LOUTFY, S. A. et al. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: In vitro liver cancer model. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 3, 1 set. 2016.

MACEDO, J. et al. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE QUITOSANAS E SEUS DERIVADOS: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS. **Química Nova**, Vol. 45, No. 6, 690-704, 2022.

MACHADO, A. M. L. et al. Estudo comparativo entre os parâmetros reológicos de tintas acrílicas arquitetônicas. **Ambiente Construído**, v. 22, n. 1, p. 223–240, dez. 2022.

MENEZES CASTELO, R.; CARVALHO DA SILVA, L.; FERRO FURTADO, R. GELIFICAÇÃO IÔNICA: TÉCNICA EFICAZ PARA ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS -UMA REVISÃO. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 18, n. ISSN: 1517-0276 / EISSN: 2236-5362, p. 546–560, 2020.

MICHELIN, D. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 15(4): 316-320, Out./Dez. 2005

MODARESI, S. M. S. et al. Preparation and characterization of self-assembled chitosan nanoparticles for the sustained delivery of streptokinase: An in vivo study. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 19, n. 5, p. 593–597, 2014.

OLIVEIRA, V. B. et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de Dicksonia sellowiana (Presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 230–239, 2016.

PACHECO BORGES, L.; AMORIM, V. A. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS. **Revista Agrotecnologia**. Ipameri, v.11, n.1, p.54-67, 2020

PAULA BESSA-JUNIOR, A.; GONÇALVES, A. A. Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão. **Acta Fish. Aquat. Res**, v. 1, n. 1, p. 13–28, 2013.

QUEIROZ, M. F. et al. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 141–158, 1 jan. 2015.

RAMANERY, F. P.; MANSUR, A. A.; MANSUR, H. S. One-step colloidal synthesis of biocompatible water-soluble ZnS quantum dot/chitosan nanoconjugates. **Nanoscale Research Letters**, 8:512 2013.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195–1236, 1998.

RÉ, M. I. Formulating drug delivery systems by spray drying. **Drying Technology**, 2006.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. Elsevier Ireland Ltd, , 22 ago. 2005.

RODRIGUES, F. A. et al. OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 23, p. 870–887, 24 jun. 2016.

SASIDHARAN, S. et al. EXTRACTION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PLANTS' EXTRACTS. **Afr J Tradit Complement Altern Med**. 8(1):1-10. 2011.

SINGH, P. et al. Development of carboxymethyl cellulose-chitosan hybrid micro- and macroparticles for encapsulation of probiotic bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 87–95, 1 nov. 2017.

SOLTANZADEH, M. et al. Chitosan nanoparticles as a promising nanomaterial for encapsulation of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract as a natural source of antioxidants. **Nanomaterials**, v. 11, n. 6, 2021.

SPIN-NETO, R. et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*. 37(2): 155-161. 2008.

SUNDARARAJAN, A. et al. Influenza virus variation in susceptibility to inactivation by pomegranate polyphenols is determined by envelope glycoproteins. **Antiviral Research**, v. 88, n. 1, p. 1–9, 2010.

UTYAMA, I. K. A. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do ácido acético e dos vinagres branco e tinto sobre bactérias hospitalares. **R. Ci. méd. biol**, v. 5, n. 2, p. 111–116, 2006.

VIUDA-MARTOS, M.; FERNÁNDEZ-LÓAEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 6, p. 635–654, nov. 2010.

WANG, W. **DEVELOPMENT OF A NOVEL ANTIMICROBIAL FOOD PACKAGING FILM CONTAINING SILVER NANOPARTICLES**. Tese de Doutorado. Missouri: University of Missouri, 2018.

XU, Y. et al. Antimicrobial Activity of Punicalagin Against *Staphylococcus aureus* and Its Effect on Biofilm Formation. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 5, p. 282–287, 1 maio 2017.