

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**

**Rubia Silva Bueno**

**Desenvolvimento de filmes funcionais incorporando extrato de  
*Acmella oleracea* para fins cosméticos e antimicrobiano**

**Uberaba**

**2019**

**Rubia Silva Bueno**

**Desenvolvimento de filmes funcionais incorporando extrato de  
*Acmella oleracea* para fins cosméticos e antimicrobiano**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

**Orientação:** Profa. Dra. Ana Claudia Granato Malpass

**Co-orientação:** Profa. Dra. Rafaela Cristina Sanfelice

**Uberaba**

**2019**

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

B944d Bueno, Rúbia Silva  
Desenvolvimento de filmes funcionais incorporando extrato de  
*Acmella oleracea* para fins cosméticos e antimicrobiano / Rúbia Silva  
Bueno. -- 2019.  
64 f. : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica) –  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019  
Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Granato Malpass  
Coorientadora: Profa. Dra. Rafaela Cristina Sanfelice

1. Cosméticos - Indústria. 2. Jambú. 3. Filmes finos. I. Malpass,  
Ana Claudia Granato. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro.  
III. Título.

CDU 665.58

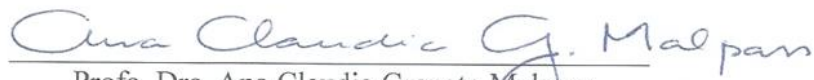
RÚBIA SILVA BUENO

DESENVOLVIMENTO DE FILMES FUNCIONAIS INCORPORANDO  
EXTRATO DE *ACMELLA OLERACEA* PARA FINS COSMÉTICOS E  
ANTIMICROBIANO


Trabalho de conclusão apresentado ao  
Programa de Mestrado Profissional em  
Inovação Tecnológica da Universidade Federal  
do Triângulo Mineiro, como requisito para  
obtenção do título de mestre.

Uberaba, 23 de abril de 2019

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Claudia Granato Malpass  
Orientadora – UFTM

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Mônica Hitomi Okura  
Membro Titular – UFTM

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Tatiana Aparecida Pereira  
Membro titular – UNIUBE

Dedico este trabalho aos meus pais Euza e Gismar que me proporcionaram essa vitória e ao meu noivo Augusto pelas palavras de apoio e incentivo.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço primeiramente a Deus pela vida. Aos meus pais por todo o amor, carinho, amparo e incentivo.

Ao meu noivo por estar presente nos momentos mais difíceis dessa caminhada, me impedindo de desistir, me dando forças para continuar.

A minha orientadora e co-orientadora por todos os ensinamentos e por terem aceitado este desafio.

À EMBRAPA São Carlos, Dr. Daniel Souza Correa e a Dra. Rafaela da Silveira André, pela colaboração e realização dos MEV dos filmes estudados.

Agradeço também ao Ênio, secretário do Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica e a FAPEMIG por possibilitarem a realização deste trabalho.

“Antes de julgar a minha vida ou o meu caráter... calce os meus sapatos e percorra o caminho que eu percorri, viva as minhas tristezas, as minhas dúvidas e as minhas alegrias. Percorra os anos que eu percorri, tropece onde eu tropecei e levante-se assim como eu fiz. E então, só aí poderás julgar. Cada um tem a sua própria história. Não compare a sua vida com a dos outros. Você não sabe como foi o caminho que eles tiveram que trilhar na vida.”

Clarice Lispector

## RESUMO

A procura por produtos antienvhecimento aumenta a cada dia, existe uma busca incessante por produtos que mantenham a pele jovem por mais tempo. Em razão disso as empresas vêm investindo cada vez mais em formulações antienvhecimento. Um dos produtos mais utilizados é a toxina botulínica, porém esta apresenta muitos efeitos colaterais, então pesquisas por alternativas naturais que tenham o mesmo efeito, paralisar a ação dos músculos da face, estão cada vez em maior número. Dentre essas alternativas está o extrato da *Acmella oleracea*. Este trabalho teve como objetivo desenvolver filmes a base de alginato de sódio e quitosana incorporando extrato de *A. oleracea* e comparar as propriedades desses filmes. Foram produzidos três tipos diferentes de filme, com alginato de sódio passando por um processo de reticulação em uma solução reticuladora de íons  $Ca^{2+}$ , filmes de alginato de sódio sem passarem por um processo reticulador e filmes de quitosana. Os filmes foram avaliados quanto: sua estrutura por MEV, espessura, teor de umidade, solubilidade, grau de intumescimento e atividade antibacteriana. O extrato inibiu 100% o crescimento de todas as bactérias usadas, apresentando alta atividade antibacteriana. Os filmes de quitosana apresentaram-se serem mais finos. Já os filmes de alginato reticulados mostraram os melhores valores de conteúdo de umidade, solubilidade e grau de intumescimento. O filme de alginato reticulado com alta concentração de extrato de *A. oleracea* apresentou-se como a melhor opção para ser produzido tanto como curativo antimicrobiano, por ter apresentado a melhor atividade antimicrobiana, quanto como adesivo anti-idade.

Palavras-chave: alginato de sódio, quitosana, Jambú, cosméticos, filmes antimicrobianos



## ABSTRACT

The demand for antiaging products increases every day, there is an incessant search for products that keep the skin young longer. As a result, companies are increasingly investing in anti-aging formulations. One of the most used products is botulinum toxin, but it has many side effects, so research for natural alternatives that have the same effect, paralyze the action of the muscles of the face, are increasing in number. Among these alternatives is the *Acmella oleracea* extract. This work aimed to develop films based on sodium alginate and chitosan incorporating *A. oleracea* extract and to compare the properties of these films. Three different types of film were produced with sodium alginate undergoing a crosslinking process in a  $\text{Ca}^{2+}$  ion crosslinker solution, sodium alginate films without going through a crosslinking process and chitosan films. The films were evaluated for their structure by SEM, thickness, moisture content, solubility, degree of swelling and antibacterial activity. The extract inhibited 100% the growth of all the bacteria used, presenting high antibacterial activity. Chitosan films were thinner. The crosslinked alginate films showed the best values of moisture content, solubility and degree of swelling. The crosslinked alginate film with high concentration of *A. oleracea* extract presented the best option to be produced both as an antimicrobial dressing, because it presented the best antimicrobial activity, and as an anti-aging adhesive.

Key words: sodium alginate, chitosan, Jambú, cosmetics, antimicrobial films

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação esquemática da pele humana.....	16
Figura 2:	Vias de penetração dérmica.....	16
Figura 3:	Planta <i>Acmella oleracea</i> .....	20
Figura 4:	Estrutura química do espilantol (1) e alguns de seus derivados.....	22
Figura 5:	Estrutura da molécula de alginato de sódio.....	25
Figura 6:	Modelo caixa de ovos para o alginato.....	25
Figura 7:	Gelificação do alginato com associações intra e intermoleculares.....	27
Figura 8:	Estrutura da molécula de quitosana.....	28
Figura 9:	Processo de obtenção do extrato de <i>A. oleracea</i> .....	33
Figura 10:	Preparo dos filmes de alginato e quitosana incorporando-se extrato de <i>A. oleracea</i> .....	35
Figura 11:	Foto das placas utilizadas nos bioensaios antibacterianos com o extrato de <i>A. oleracea</i> .....	39
Figura 12:	Pico com tempo de retenção de 6,667 min, referente ao biciclo[7.2.0]undec-4-eno.....	41
Figura 13 :	Pico com tempo de retenção de 6,967 min, referente ao Z-1,6-tridecadieno.....	41
Figura 14:	Pico com tempo de retenção de 7,146 min, referente ao 1-trideceno.....	41
Figura 15:	Pico com tempo de retenção de 9,846 min, referente ao 1,3-bis(cinamoiloximetil)adamantano.....	42
Figura 16:	Pico com tempo de retenção de 10,563 min, referente ao N-isobutil-2(E),6(Z),8(E)-decatrienamida, o espilantol.....	42
Figura 17:	Pico com tempo de retenção de 11,783 min, referente ao Ácido n-hexadecanóico.....	42
Figura 18:	Pico com tempo de retenção de 13,379 min, referente ao (9Z,12Z)-ácido octadecadienóico.....	43
Figura 19:	Pico com tempo de retenção de 13,538 min, referente ao ácido oxálico.....	43
Figura 20:	Pico com tempo de retenção de 13,613 min, referente ao Ácido octadecanóico.....	43
Figura 21:	Pico com tempo de retenção de 14,021 min, referente ao 2-acetoxi-1,1,10-trimetil-6,9-epidioxidocalina.....	44
Figura 22:	Pico com tempo de retenção de 14,842 min, referente ao n-octacosano.....	44
Figura 23:	Pico com tempo de retenção de 16,479 min, referente ao n-tetracosano.....	44
Figura 24:	Estrutura dos compostos presentes no extrato de <i>A. oleracea</i> .....	47
Figura 25:	Imagens de MEV dos filmes preparados neste estudo.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Espessura dos filmes preparados neste estudo.....	50
Tabela 2:	Dados de conteúdo de umidade dos filmes estudados.....	51
Tabela 3:	Dados de solubilidade em água dos filmes estudados.....	53
Tabela 4:	Dados de grau de intumescimento dos filmes estudados.....	54
Tabela 5:	Dados das zonas de inibição (mm) dos filmes estudados contra <i>B.cereus</i> , <i>E.coli</i> e <i>S.aureus</i> .....	55

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas
MEV	Microscopia Eletrônica de varredura
SFF	Solução formadora de filme

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivos gerais.....	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1	A pele.....	15
3.2	Cosméticos anti-envelhecimento.....	17
3.3	Plantas do gênero <i>Spilanthes</i> .....	19
3.4	Filmes funcionais.....	23
3.5	Alginato de Sódio.....	24
3.6	Quitosana.....	28
3.7	Plastificantes .....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	Moagem das flores secas e extração por solvente da planta <i>A. oleracea</i> .....	32
4.2	Atividade antibacteriana do extrato de <i>A. oleracea</i> .....	33
4.3	Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas (CG-EM).....	34
4.4	Preparação dos filmes de alginato de sódio com incorporação de extrato de <i>A. oleracea</i> .....	34
4.5	Preparação dos filmes de quitosana com incorporação de extrato de <i>A. oleracea</i> .....	35
4.6	Espessura dos filmes.....	36
4.7	MEV.....	36
4.8	Conteúdo de umidade dos filmes ( <i>W</i> ) .....	36
4.9	Solubilidade em água dos filmes ( <i>S</i> ) .....	37
4.10	Grau de intumescimento dos filmes ( <i>Swelling</i> ).....	37
4.11	Atividade antibacteriana das Soluções Formadoras de Filmes (SFF).....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	Moagem e extração da planta <i>A. oleracea</i> .....	39
5.2	Atividade antibacteriana do extrato de <i>A. oleracea</i> .....	39
5.3	Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas (CG-EM) do extrato de <i>A. oleracea</i> .....	40
5.4	MEV dos filmes.....	48
5.5	Espessura dos filmes.....	49

5.6	Conteúdo de umidade dos filmes ( <i>W</i> ).....	50
5.7	Solubilidade em água dos filmes ( <i>S</i> ).....	52
5.8	Grau de intumescimento dos filmes ( <i>Swelling</i> ).....	53
5.9	Atividade antibacteriana dos filmes.....	55
6	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

## 1 INTRODUÇÃO

O maior órgão do corpo humano é a pele e essa apresenta várias funções. Conforme envelhecemos, a pele perde a elasticidade, a capacidade de regular as trocas gasosas e, dessa forma, surgem sinais físicos na pele que denotam esse processo. Por isso, existe uma busca constante por produtos que tenham a capacidade de manter a pele jovem por mais tempo. Desta forma, as empresas cosméticas vêm investindo cada vez mais em formulações antienvelhecimento, com o objetivo de devolver a integridade funcional da pele e melhorar a aparência física desta.

Muitas das alterações da pele comumente associadas ao envelhecimento como alterações na pigmentação e rugas profundas são, na verdade, o resultado da exposição ao sol. As áreas mais expostas ao sol, como o rosto, pescoço, tórax, mãos e antebraços, são os locais onde essas mudanças ocorrem com mais frequência. Como forma de se evitar o envelhecimento da pele o uso adequado de protetores solares aliado ao uso de cosméticos anti-envelhecimento tem sido mundialmente utilizado. Com isso, a pesquisa por novos produtos anti-envelhecimento aumenta a cada ano o que também colabora com a economia mundial consideravelmente. Um dos produtos utilizado com excelentes resultados é a toxina botulínica. Entretanto, o alto custo, além de efeitos colaterais, contribui negativamente no uso desse produto (HELFRICH; SACHS; VOORHEES, 2008).

Desta forma, a pesquisa por alternativas mais naturais que tenham o mesmo efeito que o botox aumentou consideravelmente. Dentre essas alternativas está a planta *Acmella oleracea*. O extrato da planta *Acmella oleracea* apresenta várias atividades biológicas, dentre elas, é capaz de bloquear a ação muscular local (mesmo efeito apresentado pela toxina botulínica), atuar como agente de elevação tópica para rugas, além de estimular, reorganizar e fortalecer a rede de colágeno e não é tóxico. Entretanto, o odor e a cor do extrato não são agradáveis, portanto, algum processamento deste se faz necessário para seu uso.

Géis adesivos, hidrogéis e filmes finos têm sido desenvolvidos para liberação controlada de agentes medicamentosos no local específico de aplicação (CLOUTIER; MANTOVANI; ROSEI, 2015; GORRASI, 2015; ZILBERMAN et al., 2015). Esses constituem uma das alternativas terapêuticas mais adequadas à administração tópica, uma vez que produzem efeitos prolongados e são fácil aplicação (ANISREE;

RAMASAMY; JOHN, 2012; KARKI et al., 2016). Um filme ideal deve ser baseado em um polímero biocompatível e não-tóxico, ser flexível, elástico e macio (KARKI et al., 2016; PEREIRA, et al., 2014).

Assim sendo, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de filmes a base de alginato de sódio e quitosana incorporando-se extrato de *A. oleracea* que podem ser utilizados como cosmeceútico anti-envelhecimento. Por ser um de fácil utilização o produto na forma de filme, provavelmente, terá ampla aceitação e menor custo quando comparado à toxina botulínica, sendo ainda indolor. Devido à alta atividade antibacteriana, os filmes poderão ser utilizados como curativo antibacteriano no tratamento de feridas cutâneas infectadas. No melhor do conhecimento esse trabalho é inédito e representa uma inovação tecnológica no segmento.



## 2 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho estão especificados a seguir.

### 2.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo desenvolver filmes funcionais a base de alginato de sódio e quitosana incorporando-se extrato de *A. oleracea* e comparar as propriedades destes filmes para serem utilizados como curativos antimicrobianos e como cosmético anti-idade.

### 2.2 Objetivos específicos

- Moer as flores de *Acmella oleracea* secas em moinho de facas;
- Realizar a extração por solvente da planta moída;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato bruto de *A. oleracea*;
- Avaliar os componentes dos extratos obtidos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas;
- Preparar filmes a base de alginato de sódio incorporando-se extrato de *A. oleracea* em diferentes concentrações (5, 10 e 20% m/m em relação ao alginato), realizando a reticulação em uma e duas etapas;
- Preparar filmes a base de quitosana incorporando-se extrato de *A. oleracea* em diferentes concentrações (5, 10 e 20% m/m em relação à quitosana);
- Avaliar os filmes preparados por MEV;
- Avaliar a espessura, o teor de umidade, a solubilidade e o grau de intumescimento dos filmes preparados e compará-los;
- Avaliar e comparar a atividade antibacteriana dos filmes preparados;

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A pele

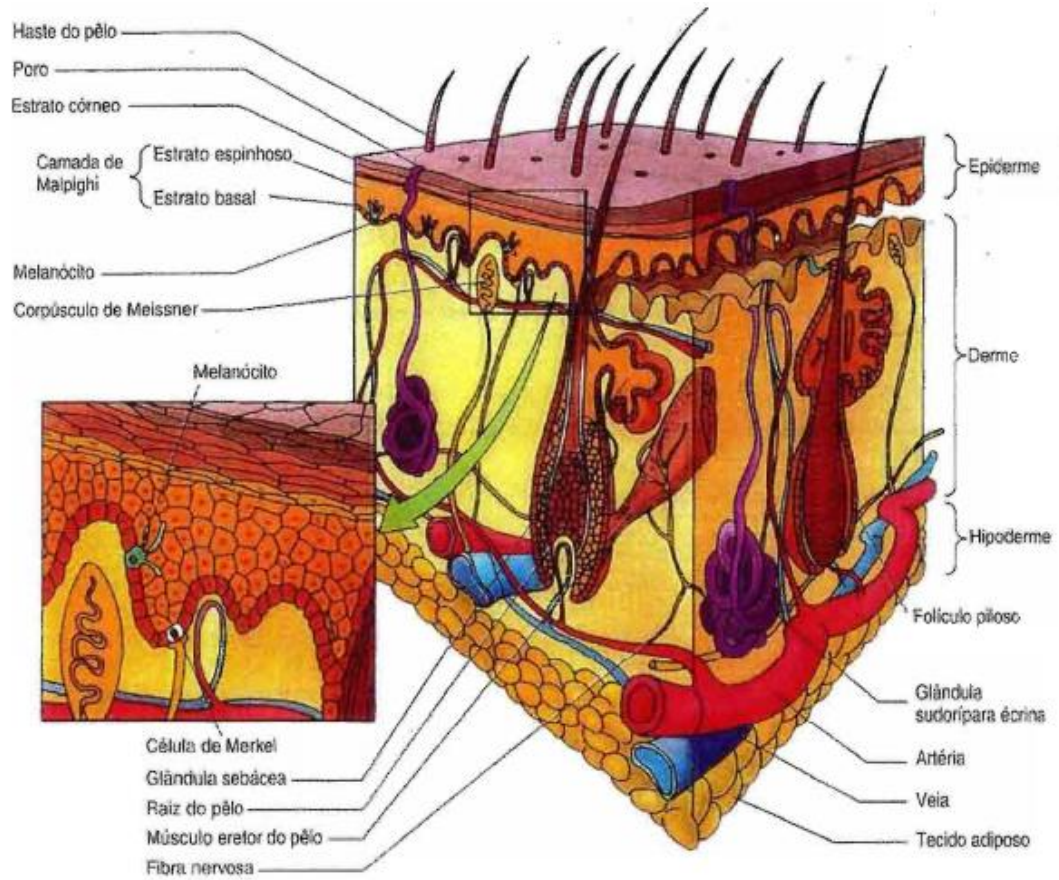
A pele é o órgão que reveste e molda o corpo, além de assegurar as relações entre o meio interior e exterior. Anatomicamente, é um órgão integrante do sistema tegumentar, juntamente com o cabelo, pêlos, unhas e as glândulas sudoríparas e sebáceas. A pele é o revestimento externo, considerado o maior órgão do corpo humano e o mais pesado. Consiste num grande órgão estratificado, que em um adulto médio pesa cerca de 3,6 kg. Constitui entre 10-15% da totalidade do corpo, cobrindo uma superfície superior a 20.000 cm<sup>2</sup> e apresentando variadas funções e propriedades (LANCEROTTO *et al.*, 2011; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2010).

Além das funções de aparência que incluem a moldagem do corpo, a pele tem muitas outras funções. A principal é, sem dúvida, a proteção do organismo das ameaças físicas externas, consistindo numa barreira de defesa microbiana, química, térmica e elétrica, dotada de resistência, flexibilidade ou plasticidade, impermeabilidade e com capacidade de renovação (MENDES, 2013).

Do ponto de vista anatômico a pele possui diversas camadas histológicas, mas em geral, é descrita em termos de duas camadas de tecidos: a epiderme, a derme e a uma camada adiposa subcutânea ou hipoderme, como mostra a Figura 1. Os medicamentos de ação tópica devem ser formulados de modo a assegurar que os compostos ativos atravessem adequadamente as diferentes camadas de tecido, de modo a exercer a sua eficácia máxima. É a camada mais externa, que exerce a maior ação de barreira à permeação dos fármacos (LANE, 2013).

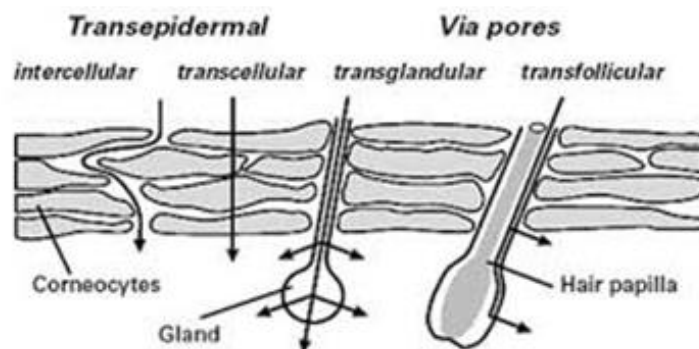
O objetivo da terapia dermatológica é a obtenção da ação terapêutica desejada, em áreas específicas do tecido epidérmico. A maioria das doenças dermatológicas, reside na epiderme viável ou parte superior da derme, o que requer penetração da pele por difusão ou absorção percutânea (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2010). Os compostos ativos podem penetrar na pele através das células ou através dos poros, como mostra a figura 2 (TROMMER; NEUBERT, 2006).

Figura 1: Representação esquemática da pele humana.



Fonte: GARTNER; HIATT, 2007.

Figura 2: Vias de penetração na pele.



Fonte: TROMMER; NEUBERT, 2006.

Quando a pele é lesada, as bactérias oportunistas podem causar infecções e estas podem exigir tratamento intensivo e de longo prazo. Às vezes, isso pode ser consequência de queimaduras ou outras lesões cutâneas graves e, em outros casos, revelam deficiências imunológicas, afetando tanto a pele (epiderme, derme e tecido conjuntivo subcutâneo) quanto mucosas (bucal, ocular ou vaginal) (TROMMER; NEUBERT,2006).

### **3.2 Cosméticos anti-envelhecimento**

Entre 2011-2016, o mercado global de cosméticos cresceu quatro por cento ao ano. Os cuidados com a pele é a categoria líder de mercado (40% do mercado global) e acredita-se que continue a ser a categoria de produtos mais rentável, já que espera-se que o mercado cresça 20,1 bilhões de dólares entre 2016 e 2019. Os Estados Unidos são o maior mercado de cosméticos do mundo, com uma receita total estimada de cerca de US\$ 62,46 bilhões (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos – ABIHPEC).

Segundo dados da ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos) a indústria brasileira de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos apresentou um crescimento médio de 11,4% aa nos últimos 20 anos, tendo passado de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 42,6 bilhões em 2015. Dados do IBGE mostram que o setor responde por 1,8% do PIB brasileiro, isto é o Brasil responde por 2,8% da população mundial e 9,4% do consumo mundial de HPPC. De acordo com a *Euromonitor International*, o Brasil é o quarto maior mercado consumidor do setor, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China, com 16,5% e 10,3% do consumo mundial, respectivamente.

Observa-se que as pessoas que mais se expõem ao sol apresentam espessamento e coloração acastanhada nas áreas mais expostas e essas mudanças também estão associadas a um aumento do número de cânceres de pele. Como forma de se evitar o envelhecimento da pele deve-se aliar o uso adequado de protetores solares ao uso de cosméticos anti-envelhecimento. Com isso a pesquisa por novos produtos anti-envelhecimento tem aumentado a cada ano o que também tem colaborado com a economia mundial consideravelmente.

A luz solar também tem um efeito cumulativo sobre a pele (fotoenvelhecimento) que ocorre ao longo da vida de cada indivíduo e afeta diretamente a atividade

pigmentaria cutânea. A radiação penetra na pele e devido seu comprimento de onda age de formas diferentes nas camadas ou estruturas da pele. A radiação de ondas curtas (UVB) atinge a epiderme afetando os queratinócitos e a de ondas longas (UVA) atinge as mesmas células da epiderme e dos fibroblastos da derme (ANDRADE; HIGUCHI; 2014).

O aumento da quebra e a diminuição da produção de colágeno são as mudanças na pele causada pelo foto-envelhecimento. A exposição à luz UV induz uma resposta subsequente de reparação, deixando uma "cicatriz solar". A exposição repetitiva à luz UV ao longo da vida leva ao desenvolvimento de uma "cicatriz solar" visível, que se manifesta como rugas visíveis. A combinação do aumento da quebra e a diminuição da síntese de colágeno resulta em uma diminuição geral dos níveis de colágeno na derme. Essas são as mudanças moleculares na pele cronologicamente envelhecida (HELFRICH; SACHS; VOORHEES, 2008).

O tratamento para combater o envelhecimento da pele inclui medidas para prevenir os danos causados pela luz UV, como os protetores solares, e também, medicamentos e procedimentos para reverter o dano existente. Dentre eles, destacam-se os cosmecêuticos, que são produtos cosméticos que contêm ingredientes biologicamente ativos e estão disponíveis sem receita médica. Produtos cosméticos contendo peptídios, antioxidantes e agentes botânicos são exemplos de cosmecêuticos (HELFRICH; SACHS; VOORHEES, 2008).

Os peptídios são polímeros naturais constituídos de aminoácidos que são fragmentos de grandes proteínas, como colágeno. Existem evidências que essas macromoléculas podem penetrar na derme e estimular a produção de colágeno. Os antioxidantes são moléculas que agem reduzindo radicais livres, que são gerados por danos causados pela luz UV e levam à quebra de colágeno.

Os radicais livres atuam no processo de envelhecimento, atingindo direta e constantemente células e tecidos. Em condições normais, a principal via de produção de radicais livres nas células ocorre através da atividade respiratória que se localiza nas matrizes mitocôndrias. O encurtamento dos telômeros se baseia no fato de que a cada divisão celular ocorre uma diminuição das extremidades dos cromossomos e, desse modo, ocorre o encurtamento progressivo dos cromossomos, causando a inviabilidade reprodutiva das células e o envelhecimento celular (ANDRADE; HIGUCHI, 2014).

Existe muito interesse no uso de antioxidantes tanto por via oral como por via tópica para combater o envelhecimento da pele (HELFRICH; SACHS; VOORHEES, 2008).

Já a toxina botulínica (Botox<sup>®</sup>, Allergan Inc., Irvine, CA) é uma neurotoxina usada para paralisar vários grupos musculares da face para a melhoria cosmética das rugas. O Botox<sup>®</sup> é mais utilizado para tratar as rugas das regiões da glabella, testa e região periorcular. Essa neurotoxina funciona por inibição neuromuscular de acetilcolina e os efeitos duram de 3 a 6 meses. Os efeitos colaterais das injeções de Botox<sup>®</sup> incluem dor, hematomas e paralisia dos nervos que controlam a função das pálpebras, sem contar o alto custo do tratamento (HELFRICH; SACHS; VOORHEES, 2008).

Nesse sentido, os metabólitos secundários de plantas podem ser usados diretamente ou como intermediários na produção de medicamentos ou como aditivos na produção de cosméticos.

### **3.3 Plantas do gênero *Spilanthes***

A *Acmella oleracea* é uma planta medicinal da Amazônia pertencente à família Compositae e que é popularmente conhecida como jambu. O extrato de suas folhas possui o espilantol, que é uma N-isobutilamida com atividade anestésica e é utilizada popularmente no tratamento de males da boca e da garganta, bem como anestésico para dor-de-dente (TIWARI; JADHAV; JOSH, 2011).

As plantas do gênero *Spilanthes* são reconhecidas por suas atividades biológicas e usos medicinais. As plantas desse gênero pertencem à família Asteracea e existem em, aproximadamente, 60 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e sub-tropicais. Essas apresentam cerca de 40-60 cm de altura, as hastes são prostradas em algumas espécies e eretas em outras, com folhas lanceoladas triangulares opostas e margens dentadas ou quase inteiras. As flores são amarelas, com formato de cone ou ovoides, pedúnculos longos e solitários. Em algumas espécies as flores podem ainda apresentar uma mancha vermelha central, como mostra a Figura 3.

Figura 3: Planta *Acmella oleracea*.



Fonte: ABECEDÁRIO, 2009.

Tiwari, Jadhav e Joshi (2011) reportam a presença de vários tipos de compostos orgânicos em plantas do gênero *Spilanthes*, como alcaloides, glicosídeos, flavonóides, taninos, antraquinonas, saponinas e alquilamidas. Esses últimos são os compostos mais abundantes nas plantas do gênero *Spilanthes* e são os responsáveis pela atividade biológica destas plantas. A alquilamida mais abundante é o espilantol (Figura 4) que está presente em todas as partes das plantas, mas concentra-se mais nas flores.

Espilantol na forma de um extrato de *Acmella oleracea*, inibe suas contrações nos músculos subcutâneos, notadamente os da face e pode ser usado como um produto anti-rugas (DEMARNE; PASSARO, 2009).

O espilantol ou afinina [(N-2-Metilpropil)-2,6,8-decatrienamida ou N-isobutil-2E,6Z,8E-decatrienamida] é uma alcanamida alifática de fórmula molecular  $C_{14}H_{23}NO$ , descrita como um óleo viscoso ardente, de coloração amarelo pálido a amarelo claro, que produz um efeito anestésico e de formigamento sobre a língua (CAVALCANTI, 2018).

O espilantol é normalmente encontrado com uma segunda alcanamida (N-2metilbutil-2E,6Z,8E-decatrienamida) em menor quantidade denominada também homoespilantol (CAVALCANTI, 2018).

O espilantol (1) apresenta um gosto pungente e causa efeito adstringente e anestésico (TIWARI; JADHAV; JOSHI, 2011). As alquilamidas estão estruturalmente relacionadas aos endocanabinóides animais e são altamente ativas no sistema nervoso central. Em particular, a anandamida é um neurotransmissor cerebral canabinóide endógeno. O espilantol foi isolado em 1945 a partir do extrato etanólico de *Spilanthes acmella*. Até agora, o espilantol está comercialmente disponível na forma de extrato alcoólico (65% EtOH) (PRACHAYASITTIKUL et al., 2013).

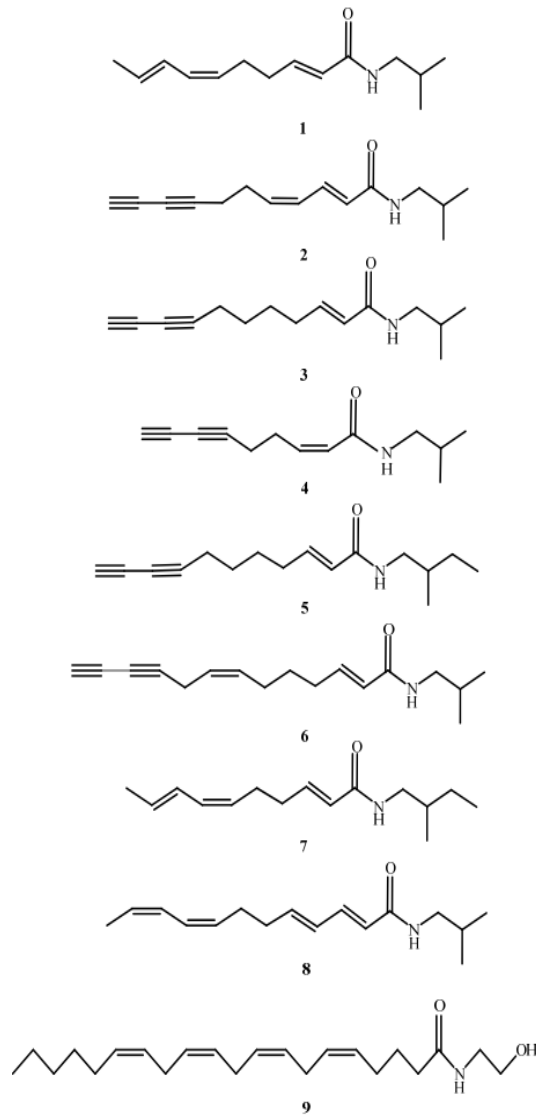
As plantas do gênero *Spilanthes* apresentam várias atividades biológicas como, diurética, larvicida, antimalária, vasorelaxante, antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, imunomoduladora, antiviral, anestésica, dentre outras. A atividade anestésica local de plantas de gênero *Spilanthes* foi estudada em modelos animais através da pápula intracutânea em cobaias e anestesia de plexo em sapos (PRACHAYASITTIKUL et al., 2013). O extrato aquoso aéreo de *S. acmella* apresentou atividade significativa que pode ser devido à presença de alquilamidas. Seu mecanismo de ação envolve o bloqueio de canais de  $\text{Na}^+$  com entrada de tensão (PRACHAYASITTIKUL et al., 2013).

A atividade antioxidante dos extratos de *S. acmella* obtidos a partir de solventes polares e não polares também foi investigada. Verificou-se que o extrato acetato de etila de flores de *S. acmella* exibiu a maior atividade de eliminação de radicais livres (ensaios DPPH e ABTS). Isso pode ser devido à presença de compostos fenólicos e cumarínicos presentes nos extratos (PRACHAYASITTIKUL et al., 2013). Além disso, o extrato de *S. acmella* apresenta ação relaxante muscular rápida e atua como agente de elevação tópica para rugas, que pode ser essencial no tratamento anti-envelhecimento, além de estimular, reorganizar e fortalecer a rede de colágeno (PRACHAYASITTIKUL et al., 2013).

O espilantol vem sendo utilizado como um ativo anti-sinais de envelhecimento. Segundo Cavalcanti (2018), com a contração muscular, as estruturas da derme sofrem microtensões que alteram sua estrutura e funcionalidade. Com o tempo e a repetição dos movimentos, formam-se vincos nestes pontos de tensão da pele. O espilantol atua descontraindo e diminuindo estas microtensões e, conseqüentemente, reduz a formação e profundidade das rugas de expressão.



Figura 4: Estrutura química do espilantol (1) e alguns de seus derivados.



Fonte: PRACHAYASITTIKUL et al., 2013.

Demarne e Passaro (2009) utilizaram co-cultura do músculo nervoso, que é um modelo de cultura utilizado para recriar a inervação das células musculares estriadas humanas utilizando *explants* da coluna vertebral e do gânglio espinhal de embriões de ratos. O modelo de co-cultura do músculo nervoso é um modelo adequado para estudar a influência de uma substância sobre a frequência de contração muscular, bem como, para estudar a recuperação da contratura após o bloqueio das contrações musculares causadas por uma substância. Através desse estudo os autores demonstraram que em uma concentração de  $600 \times 10^{-5} \%$ , o extrato de *A. oleracea* bloqueia a frequência de contração do músculo após 6 horas de incubação. E após a

lavagem das culturas, os músculos recuperam totalmente sua atividade contrátil em 1 hora. Já em concentrações de  $1.200 \times 10^{-5} \%$  e  $2.400 \times 10^{-5} \%$ , o extrato bloqueia a frequência de contração do músculo após 5 minutos de incubação, sendo que após a lavagem das culturas, os músculos recuperam totalmente sua atividade contrátil em 1 hora. Os autores afirmam que dada a sua capacidade de inibir a atividade contrátil, o extrato de *A. oleracea* possui o mesmo potencial anti-rugas que a toxina botulínica (DEMARNE; PASSARO, 2009).

Desta forma, fica claro que plantas do gênero *Spilanthes*, especialmente *A. oleracea* apresentam ativos de interesse cosmético, que podem ser utilizados em formulações para obter-se um efeito equivalente ao obtido pela toxina botulínica. Além disso, ainda apresenta atividade antimicrobiana e assim pode ser utilizado no tratamento de infecções. No melhor do nosso conhecimento, não existem pesquisas científicas sobre o desenvolvimento de filmes incorporando-se o extrato ativo de *A. oleracea*, o que faz desse trabalho inédito.

### **3.4 Filmes funcionais**

Os filmes e recobrimentos biodegradáveis são aqueles formados a partir de polímeros naturais, de origem animal ou vegetal, como polissacarídeos, lipídios e proteínas e que quando lançados no meio ambiente, convertem-se em compostos simples, mineralizados, que, redistribuídos através dos ciclos de carbono, nitrogênio e enxofre não agredem o biosistema (CHANDRA; RUSTGI, 1998). Existem alguns requisitos específicos para o seu uso, tais como: boa aceitabilidade sensorial, propriedades de barreira e mecânicas adequadas, estabilidade bioquímica, físico-química e microbiológica, ser inócuo, não-polvente, de processamento simples e de baixo custo (DEBEAUFORT; QUEDAZA-GALLO; VOILLEY, 1998). Esses filmes também devem ser, de preferência, transparentes e ter aderência suficiente para serem removidos facilmente (ASSIS; LEONI, 2003).

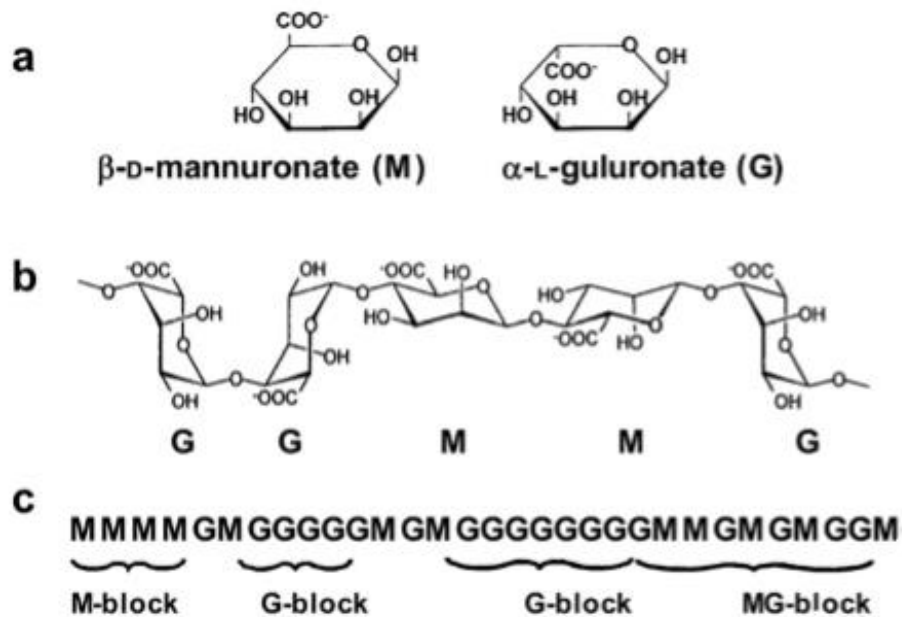
A elaboração de filmes biodegradáveis requer a utilização de pelo menos um constituinte capaz de formar uma matriz contínua e de coesão adequada, sendo este um polímero. Dentre essas destacam-se os alginatos e a quitosana (GUILBERT; CUQ; GONTARD., 1997).

### 3.5 Alginato de sódio

O alginato de sódio é um polissacarídeo linear natural que pode ser isolado de algas marrons (*Laminaria digitata* e *Ascophyllum nodosum*) e das paredes celulares, onde está presente como os sais de cálcio, magnésio e sódio do ácido alginico. Também pode ser sintetizado por microrganismos. O alginato (Figura 5a e b) é um polissacarídeo solúvel em água aniônico linear que consiste de unidades monoméricas de (1,4)- $\alpha$ -D-manuronato (M) e  $\beta$ -L-guluronato (G), distribuídos em diferentes proporções ao longo da cadeia (SMIDSRÖD; SKJAK-BRAEK, 1990; JOHNSON; CRAIG; MERCER, 1997; KAFRANI, SHEKARCHIZADEH; BEHABADI, 2015). Por ser o único polissacarídeo que naturalmente contém grupos carboxílicos em cada constituinte residual, ele possui características interessantes, apresentando ação gelificante e espessante, biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade, além de ser relativamente econômico, o que permite um amplo leque de aplicação em diferentes setores industriais, como o químico, o alimentício, o farmacêutico e o cosmético. (KAFRANI, SHEKARCHIZADEH; BEHABADI, 2015; KING, 1983; MOE et al., 1995).

A cadeia polimérica de alginato é composta de 3 tipos de regiões ou blocos em diferentes proporções e diferentes distribuições na cadeia (Figura 5c). Nestas, as propriedades físicas dos alginatos dependem da proporção relativa desses 3 blocos. Os blocos G contêm apenas unidades derivadas do ácido L-gulurônico que causam maior força do gel, os blocos M são inteiramente baseados no ácido D-manurônico (blocos homopoliméricos), e os blocos MG consistem em unidades alternadas de ácido D-manurônico e ácido L-gulurônico (blocos heteropoliméricos) que determinam a solubilidade de alginatos (KAFRANI, SHEKARCHIZADEH; BEHABADI, 2015).

Figura 5: Estrutura da molécula de alginato de sódio.



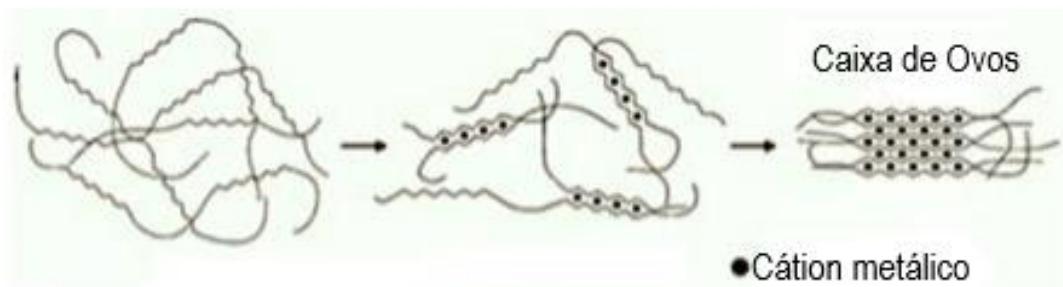
Fonte: KAFRANI; SHEKARCHIZADEH; BEHABADI, 2016.

A composição e a sequência do monômero de alginato afetam seriamente as propriedades finais dos géis de alginato, já que a ligação seletiva de íons é um pré-requisito para a formação de gel. A proporção M/G e a distribuição dos blocos M e G na cadeia de alginato afetam as propriedades físicas do alginato. As relações  $M/G < 1$  indicam uma grande quantidade de ácido gulurônico, que tem a capacidade de formar fortes junções. As relações  $M/G > 1$  são indicativas de uma menor proporção gulurônica, o que pode resultar em estruturas mais macias e elásticas (KAFRANI; SHEKARCHIZADEH; BEHABADI, 2016).

O gel forte ou o polímero pouco solúvel, refere-se à capacidade do alginato de reagir com os cátions metálicos polivalentes, especificamente os íons de cálcio. Esses íons auxiliam na formação de associação entre os blocos M e G. O comprimento de blocos G determina a capacidade e seletividade do alginato para formar essas interações. A difusão de íons na solução de alginato causa um processo de troca iônica onde o alginato solúvel em água tem que trocar seus contra-íons com  $\text{Ca}^{2+}$  para obter uma transição sol/gel. Essa ligação cruzada iônica é formada por um rápido ajuste a frio e gel termicamente estável. Ao formar géis de alginato, dois resíduos gulurônicos contínuos, diaxialmente ligados, formam uma cavidade que atua como um

local de ligação para íons de cálcio, este arranjo é conhecido como modelo "caixa de ovos" (Figura 6) (KAFRANI; SHEKARCHIZADEH; BEHABADI, 2015).

Figura 6: Modelo caixa de ovos para o alginato.

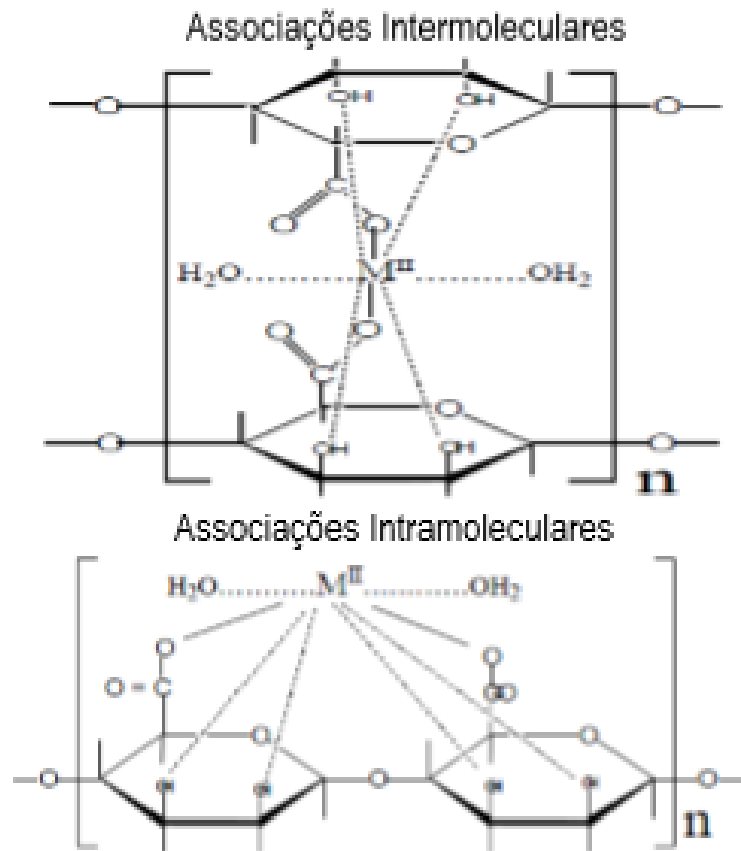


Fonte: Adaptado de KAFRANI; SHEKARCHIZADEH; BEHABADI, 2016.

As propriedades mecânicas dos filmes de alginato estão diretamente relacionadas ao número de sítios “caixas de ovos”. Assim, as características do filme resistência mecânica, propriedades de barreira, coesão e rigidez podem ser melhoradas. Apesar do mecanismo de gelificação do alginato ainda não ser completamente compreendido, acredita-se que os cátions metálicos polivalentes tendem a quelar os grupos carboxilato e hidroxila do alginato. Esta quelação é uma espécie de ponte entre o íon metálico e dois grupos carboxilatos e um ou mais pares dos grupos hidroxila ocorre através de ligações parcialmente iônicas e parcialmente coordenadas, respectivamente. Desta forma, um mecanismo em dois estágios para essa quelação (Figura 7) tem sido sugerido por numerosos estudos (KAFRANI; SHEKARCHIZADEH; BEHABADI, 2016):

- primeiro, a formação de associações de dímeros unidos por ligações intramoleculares forte com contribuições importantes de van der Waals e interações de ligação de hidrogênio nas quais os grupos funcionais envolvidos nas quelações pertencem às mesmas cadeias;
- em seguida a formação de associações de dímeros intermoleculares mais fracos nas quais os grupos funcionais carboxilato e hidroxila estão relacionados a cadeias diferentes que não apresentam especificidade particular sendo governados, principalmente, por interação eletrostática;

Figura 7: Gelificação do alginato com associações intra e intermoleculares.



Fonte: Adaptado de KAFRANI; SHEKARCHIZADEH; BEHABADI, 2016.

Este polímero está sujeito a sofrer o intumescimento de sua estrutura tridimensional. Entretanto, apresentando grau de reticulação adequado (processo que pode ser realizado para corrigir a reticulação natural da molécula), tem grande diminuição em sua permeabilidade. Como resultado, a liberação do agente incorporado é lenta, permitindo então seu uso em sistemas que demandam um maior controle sobre a liberação de suas substâncias (TURBIANI; KIECKBUSCH; GIMENES, 2011).

Pesquisas relacionadas a biofilmes de alginato de sódio mostram que eles se adequam bem à propósitos farmacêuticos/medicinais. Segundo Patel (1993), eles têm sido amplamente utilizados como curativos, sem apresentar reações alérgicas na pele. Devido à sua alta capacidade de absorção por formarem um forte gel hidrofílico, podem ser utilizados para o tratamento de lesões secretoras, minimizando a contaminação bacteriana. Os alginatos geram sinais pró-inflamatórios que, com a ativação de macrófagos humanos, propiciam o processo de cicatrização (THOMAS et

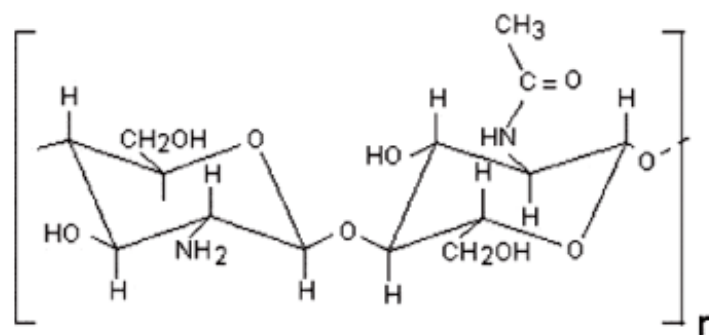
al., 2000). Além disso, são capazes de manter o ambiente de cicatrização fisiologicamente úmido, favorecendo a formação do tecido de granulação, onde há a proliferação de células endoteliais vasculares e fibroblastos, e a consequente cura (MOTTA, 1989).

Entretanto, biofilmes de alginato de sódio não apresentam propriedades antimicrobianas. Dessa forma, se a ferida for contaminada, o processo de cicatrização é prejudicado. Por isso, faz-se necessário o uso de aditivos que tragam essa propriedade ao biofilme, sejam eles orgânicos, inorgânicos, ou até mesmo óleos essenciais naturais.

### 3.6 Quitosana

A quitosana (Figura 8) é um polissacarídeo filmogênico que pode ser obtido através de subprodutos de processos da indústria alimentícia. Ela possui três grupos funcionais, que permitem diferentes modificações em sua estrutura (HROMIŠet al., 2016). Essa possui excelente biocompatibilidade, citocompatibilidade, baixa toxicidade e atividades imunoestimuladoras. Devido a estas propriedades, a quitosana apresenta boa biocompatibilidade e efeitos positivos na cicatrização de feridas. Também pode acelerar o reparo de diferentes tecidos e facilitar a contração de feridas. Esse biopolímero também tem sido usado em curativos comerciais, como o ChitoSamTM®, o ChitoGauze XR Pro®ChitoFlex® e o Axiostat®, que são curativos hemostáticos de alto desempenho (HAMEDI et al., 2018).

Figura 8: Estrutura da molécula de quitosana.



Fonte: JANEGITZ, 2007, apud HAMEDI et al., 2018.

A quitina, poli ( $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina) é um polissacarídeo natural, que forma uma parte da matriz extracelular de certos organismos vivos, como um proteoglicano, por exemplo insetos (cutículas) e crustáceos (esqueletos), como caranguejo, camarão e lagosta. É o polímero mais abundante após a celulose. A quitosana, é obtida pela desacetilação parcial da quitina sob condições alcalinas, por tratamento enzimático em altas temperaturas e a partir da fermentação de paredes celulares fúngicas (HAMED I et al., 2018).

Muitos estudos comprovam que os produtos degradados da quitosana são não-tóxicos, não-imunogênicos e não-carcinogênicos. Ainda segundo os autores esse biopolímero apresenta biocompatibilidade, bioabsorvibilidade, é biodegradável e ainda não apresenta efeitos tóxicos em células. A quitosana apresenta atividade antimicrobiana contra muitas bactérias, fungos filamentosos e leveduras, com amplo espectro de atividade e altas taxas de morte contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de baixa toxicidade para as células de mamíferos (AHMED; IKRAM, 2016; HAMED I et al., 2018).

Entretanto, a atividade antibacteriana da quitosana é dependente de fatores intrínsecos, incluindo o tipo de quitosana, o grau de polimerização, o hospedeiro, o constituinte natural dos nutrientes, a composição química ou nutriente dos substratos e as condições ambientais (por exemplo, atividade de água, umidade do substrato ambos) (AHMED; IKRAM, 2016). A quitosana apresenta atividade antibacteriana maior contra bactérias gram-positivas do que bactérias gram-negativas. Aparentemente, o tamanho das partículas de quitosana desempenham um papel importante na ativação do inflamassoma, que é um complexo citosólico responsável pela ativação de respostas inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ . Os glicanos que passaram por filtros de tamanho definido (<20  $\mu$ m), induziram a maior clivagem de pró-IL-1 $\beta$  e a liberação da citocina madura (HAMED I et al., 2018).

A quitosana induz a analgesia, proporcionando um efeito fresco, agradável e reconfortante quando aplicado a uma ferida aberta. Devido aos efeitos anti-inflamatórios da quitosana, esta pode ser utilizada no tratamento da inflamação prolongada no local da ferida. A quitosana diminui significativamente a secreção e a expressão de citocinas pró-inflamatórias. A quitosana exerce efeitos antiinflamatórios inibindo a expressão da proteína prostaglandina E2 e da ciclooxigenase-2 e atenuando as citocinas pró-inflamatórias (AHMED; IKRAM, 2016).



Devido às propriedades já citadas anteriormente, os biofilmes de quitosana também se enquadram bem no uso farmacêutico/medicinal, uma vez que apresentam propriedades antibacterianas e cicatrizante. Alguns estudos clínicos prospectivos demonstram a eficiência da quitosana no tratamento de feridas. Um estudo utilizando um curativo de fibra gelificante de quitosana (Kytocel®) mostrou que esse é um curativo altamente absorvente composto de fibras de quitosana que se ligam ao exsudato da ferida para formar patógenos claros que absorvem o gel e é compatível com o leito da ferida. Ao longo de um período de 4 semanas de utilização ou até a cicatrização completa da ferida, examinou-se o vazamento, a velocidade de cicatrização, dor e mau odor. Observou-se que o curativo tem a capacidade de gelificar quando em contato com o fluido da ferida, tornando sua retirada menos dolorosa, bioburden reduzido, e mantém o hemostase.

Outro estudo clínico realizado 90 pacientes com feridas crônicas não curadas, incluindo úlceras de pressão, úlceras vasculares, úlceras do pé diabético e feridas com infecções menores, ou em risco de infecção, foram tratados com curativo de quitosana ou gaze de vaselina tradicional como controle. Os biofilmes de quitosana apresentaram boas propriedades de barreira para gases, além de possuírem boas propriedades mecânicas. Após 4 semanas de tratamento, a redução da área da ferida foi significativamente maior no grupo teste do que no grupo controle e o nível médio de dor diminuiu consideravelmente no grupo de teste (HAMED I et al., 2018).

Os sistemas de liberação controlada fornecem uma abordagem alternativa para regular a biodisponibilidade de agentes terapêuticos em biofilmes. Em sistemas de administração de fármacos controlados, um agente ativo é incorporado numa rede polimérica e o fármaco é liberado da estrutura de uma maneira predefinida. Dependendo da formulação e aplicação do medicamento, o tempo de liberação do medicamento pode ser de algumas horas a vários meses. De acordo com a aplicação de curativos e os tipos de feridas, vários tipos de medicamentos podem ser utilizados (HAMED I et al., 2018).

### **3.7 Plastificantes**

A formação de filmes depende da solubilização da macromolécula no solvente (água, etanol, ácido acético, outros), da adição de plastificante e/ou da adição de um

agente reticulante, para a obtenção de um gel. Esse gel envolve ligações inter e intramoleculares cruzadas entre cadeias de polímeros, formando uma matriz tridimensional semirrígida que envolve e imobiliza o solvente utilizado (KESTER; FENNEMA, 1986).

O gel submetido à posterior secagem para a formação de um filme biodegradável apresenta uma coesividade que está diretamente ligada à estrutura do polímero, processo e parâmetros de fabricação (temperatura, tipo de solvente utilizado, técnica de aplicação e evaporação, entre outros), e da presença de agentes plastificantes (GUILBERT, 1986). Com a secagem do gel, o filme está formado e sua flexibilidade será tanto maior ou menor em função da interação entre as cadeias do polímero. Filmes mais rígidos são aqueles que apresentam interações mais fortes e como consequência disso, são menos permeáveis a gases, vapor d' água e líquidos (KESTER; FENNEMA, 1986). Para atenuar a alta rigidez é necessário adicionar ao filme um plastificante, a fim de torná-lo mais manuseável, menos quebradiço e mais flexível.

Os plastificantes são definidos como substâncias com alto ponto de fusão e baixa volatilidade que quando adicionados a outro material provocam mudanças nas propriedades físicas, químicas e mecânicas dos mesmos (MCHUGH; KROCHTA, 1994). Além disso, em sua maioria apresentam caráter hidrofílico e, por serem normalmente moléculas pequenas, são facilmente acoplados entre as cadeias poliméricas devido à sua habilidade de reduzir a formação de ligações hidrogênio entre elas, diminuindo as forças de atração intermoleculares, causando um aumento do volume livre ou da mobilidade molecular do polímero (BODMEIER; PAERATAKUL, 1997).

A escolha do plastificante a ser adicionado aos filmes depende da compatibilidade deste com o polímero e do solvente utilizado, isto é, deve ser miscível no polímero e no solvente, de forma a evitar a separação prematura no decorrer do processo de secagem, causando uma diminuição na flexibilidade do filme. A concentração de plastificante usado na elaboração de filmes geralmente varia de 10 a 60g/100g de matéria seca de polímero, dependendo da flexibilidade desejável no filme (GUILBERT, 1986).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia do trabalho se deu da seguinte forma:

### 4.1 Moagem das flores secase extração por solvente da planta *A. oleracea*

Vinte caixas de flores de *A. oleracea* compradas de Ervas Finas Ltda em Campo Limpo-SP foram moídas em um moinho de facas e passada em peneiras granulométricas para avaliar o tamanho das partículas. Em seguida, as flores moídas (72,59 g) foram extraídas, por extração por solvente, utilizando 800 ml de hexano. O processo (Figura 9) consistiu em manter o material vegetal em contato com hexano por nove dias com troca do solvente a cada três dias em um ambiente protegido da luz. A cada três dias, o solvente foi evaporado em um sistema de rotaevaporação e a massa de extrato quantificada. O material foi acondicionado em frasco âmbar, pesado, envolto em papel alumínio e armazenado em geladeira (CAVALCANTI, 2018)

O rendimento do extrato foi obtido usando a seguinte Equação:

$$R\% = \frac{\text{massa de extrato obtida}}{\text{massa de planta utilizada}} \times 100$$

Figura 9: Processo de obtenção do extrato de *A. oleracea*.



Fonte: Da autora, 2019.

#### 4.2 Atividade antibacteriana do extrato de *A. oleracea*

Nestes bioensaios, a atividade antimicrobiana do extrato de *A. oleracea* obtido foi testada contra diferentes microrganismos (Bactéria Gram-negativa: *E. coli* ATCC 35218e Bactérias Gram-positivas: *S. aureus* ATCC 29213 e *B. cereus* ATCC 11778). Para avaliar o comportamento antibacteriano do extrato, a cultura de bactérias foi diluída para uma concentração final de  $10^6$  células/mL e 500 $\mu$ L desta solução foi espalhada sobre novas placas de ágar com meio Muller-Hinton seguido pelo posicionamento dos diferentes substratos. As placas foram então colocadas em uma incubadora a 37°C durante 24 h. Após esse período foi feita a leitura das zonas de inibição (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2003).

### **4.3 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas (CG-EM)**

Os espectros de massas dos extratos obtidos foram adquiridos, em colaboração com a empresa Ourofino Agrociência de Uberaba-MG, através de ionização por elétrons (IE) a 70 eV em espectrômetro Shimadzu , modelo QP-2010, com detector seletivo de massas (MSD) quadrupolo, equipado com coluna Capilar Rxi-5MS, com 30 m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25um de espessura de filme. A temperatura do injetor foi mantida a 220 °C e a programação do forno de 60 a 250 °C, com taxa de aquecimento 3 °C/min. A identificação dos componentes foi realizada através da comparação dos espectros de massa com os padrões contidos no banco de dados da biblioteca de espectros, “*NIST Mass Spectral Library*” do equipamento.

### **4.4 Preparação dos filmes de alginato de sódio com incorporação de extrato de *A. oleracea***

Os filmes de alginato de sódio foram obtidos segundo a técnica de *casting* de duas formas de acordo com a metodologia de Norajit, Kim, Ryu (2010) com modificações:

- em uma etapa, somente com a pré-reticulação;
- em duas etapas, com pré-reticulação na formulação e pós secagem dos filmes;

Para a obtenção dos filmes de alginato em duas etapas, 2g de alginato de sódio e 0,01 g de CaCl<sub>2</sub> foram solubilizado em 100 mL de água destilada a 80 °C com agitação mecânica. Em seguida, foi adicionado o glicerol (1.5 g/g alginato de sódio) e o extrato de *A. oleracea* (5, 10 e 20% m/m em relação ao alginato de sódio). A solução formadora de filme foi depositada em formas de silicone, nas formas maiores foram depositados 7 ml de solução formadora de filme e nas formas menores foram depositados 4 ml, e secas em estufa a 40° C por 24 h. Após a secagem os filmes foram mergulhados em uma solução de CaCl<sub>2</sub> 2% por 30 s e secos novamente a 40° C até que soltassem da forma facilmente.

Para a obtenção dos filmes em uma única etapa, não foi realizada a reticulação com a solução de CaCl<sub>2</sub> 2% após a secagem dos filmes.

Filmes controle, sem o extrato, também foram preparados (em uma e duas etapas) e submetidos à todas as avaliações posteriores.

#### 4.5 Preparação dos filmes de quitosana com incorporação de extrato de *A. oleracea*

Os filmes de quitosana foram obtidos segundo a técnica de *casting* de acordo com a metodologia de Siripatrawan&Harte (2010) modificada. A solução formadora de filme foi preparada dissolvendo-se 1% de quitosana em uma solução de ácido acético 1%. Essa solução ficou em agitação mecânica por 24 horas. Em seguida foi adicionado glicerol (30% m/m em relação à quitosana) e extrato de *A. oleracea* (5, 10 e 20% m/m em relação à quitosana). A solução formadora de filme foi depositada em formas de silicone e secas em estufa a 40° C por 24h. A Figura 10 ilustra o processo de preparação dos filmes.

Figura 10:Preparo dos filmes de alginato e quitosana incorporando-se extrato de *A. oleracea*.



Fonte: Da autora, 2019.

#### 4.6 Espessura dos filmes

O controle da espessura dos filmes foi feito utilizando-se um micrômetro digital (MITUTOYO, modelo MDC-25S, resolução 0,001mm, EUA). A espessura final foi calculada pela média aritmética de dez medidas aleatórias sobre uma área fixa.

#### 4.7 MEV

As análises por Microscopia Eletrônica de Varredura foram feitas em colaboração com o Dr. Daniel Souza Correa e a Dra. Rafaela da Silveira André na EMBRAPA Instrumentação, em São Carlos/SP. As imagens foram obtidas em um aparelho Jeol, modelo 6510, utilizando 10 kV de tensão, 10 cm de distância de trabalho e *spot size* de 20. As amostras foram recobertas com ouro.

#### 4.8 Conteúdo de umidade dos filmes (*W*)

A massa total de uma amostra de filme de 2,5 cm de diâmetro foi quantificada e na sequência levada em estufa mantida a 105°C durante 24 h. Após este período, a massa seca final foi quantificada novamente (TURBIANI, 2007). As análises foram feitas em triplicata. O conteúdo de umidade do filme (*W*) foi expresso em função da massa seca inicial do filme através da Equação:

$$W = \frac{(M_i - M_{sf})}{M_i} \times 100$$

Na qual:

*W* – é a umidade final do filme (%);

*M<sub>i</sub>* – é a massa inicial da amostra (g);

*M<sub>sf</sub>* – é a massa seca final da amostra (g);

#### 4.9 Solubilidade em água dos filmes (S)

Para a determinação da solubilidade dos filmes em água, uma amostra de filme de 2,5 cm de diâmetro foi imersa em excesso de água destilada e o sistema mantido sob agitação branda a 25°C por 24 h, utilizando-se um Shaker orbital. A massa seca final foi determinada submetendo-se esta amostra à secagem (105°C/ 24 h) (TURBIANI, 2007). As análises foram feitas em triplicata. A solubilidade do filme (S) foi expressa em função da massa seca inicial do filme através da Equação:

$$S = \frac{(M_{si} - M_{sf})}{M_{si}} \times 100$$

Na qual:

S – é a quantidade de matéria solúvel (%);

$M_{si}$  – é a massa inicial da amostra (g);

$M_{sf}$  – é a massa seca final da amostra (g);

#### 4.10 Grau de intumescimento dos filmes (Swelling)

A massa inicial total de uma amostra de filme foi quantificada e o material foi imerso em água destilada durante 40 minutos. A cada 10 minutos o filme foi retirado da água, sua massa total determinada e a amostra retornada à água, até estabilização da massa do filme. O excesso de umidade na superfície das amostras foi retirado, colocando o filme entre duas folhas de papel de filtro, antes de cada pesagem (TURBIANI, 2007). As análises foram feitas em triplicata. O grau de intumescimento (GI) será calculado segundo a Equação:

$$GI = \frac{(M_u - M_i)}{M_i}$$

Na qual:

GI – é o Grau de Intumescimento do filme;

$M_u$  – é a massa da amostra retirada da solução (g);

$M_i$  – é a massa inicial da amostra (g);



#### 4.11 Atividade das Soluções Formadoras de Filmes (SFF)

Nestes bioensaios, a atividade biológica dos das SFF foram testadas contra diferentes microrganismos (Bactéria Gram-negativa: *E. coli* e Bactérias Gram-positivas: *S. aureus* e *B. cereus*). Para avaliar o comportamento de antibacteriano das SFF, as culturas de bactérias foram diluídas para uma concentração final de  $10^6$  células/mL e 500 $\mu$ L destas soluções foram espalhadas sobre placas de Petri, separadamente, contendo Ágar Muller Hinton. Às placas foram depositados discos impregnados com as SFF. As placas de Petri foram incubadas em estufa a 37°C por 24 h e, em seguida, o tamanho das zonas de inibição foram aferidas. As análises foram feitas em triplicata (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2003).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos seguem abaixo.

### 5.1 Moagem e extração de compostos da planta *A. oleracea*

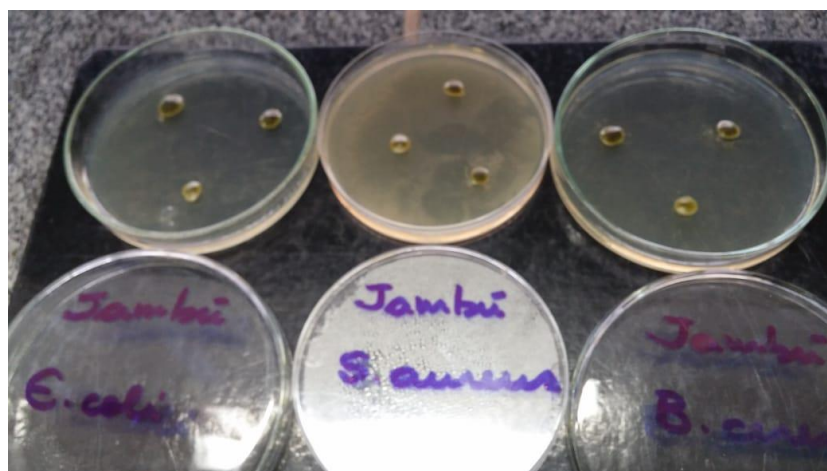
Após a moagem das flores secas de *A. oleracea*, as mesmas foram peneiradas em peneiras granulométricas. O pó obtido das flores moídas apresentava granulometria < 70 mesh, 0,210 mm. Após a extração, foram obtidos 3,5 g de extrato de *A. oleracea*, assim, o rendimento percentual obtido foi de 4,822%.

O rendimento percentual obtido é realmente baixo devido ao fato de ter sido realizado somente com hexano, isto é, foi obtido um extrato apolar, para ter um extrato concentrado em espilantol.

### 5.2 Atividade antibacteriana do extrato de *A. oleracea*

Nos bioensaios realizados com o extrato de *A. oleracea* e as bactérias estudadas o extrato inibiu 100% o crescimento de todas as bactérias testadas, como mostra a Figura 11.

Figura 11: Foto das placas utilizadas nos bioensaios antibacterianos com o extrato de *A. oleracea*.



Fonte: Da autora, 2019.

Os resultados obtidos mostram a alta atividade antibacteriana do extrato de *A. oleracea*, tanto contra bactérias Gram-positivas, como contra bactérias Gram-negativas. Como em estudos anteriores já ficou comprovado que o extrato dessa planta não apresenta toxicidade, esse pode ser utilizado no tratamento de infecções bacterianas. Mas, esses resultados também são promissores para a incorporação desse extrato no preparo de filmes antimicrobianos para serem utilizados como curativo antimicrobiano.

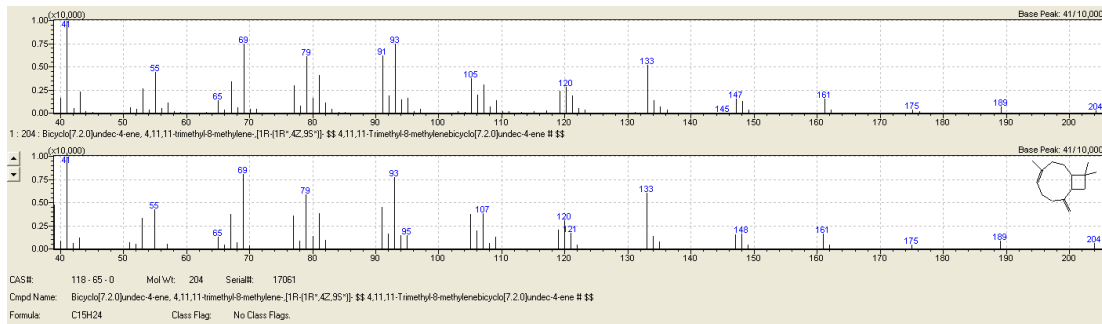
### 5.3 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas (CG-EM) do extrato de *A. oleracea*

O extrato de *A. oleracea* foi submetido a análise por CG-EM para análise dos compostos constituintes do extrato. O Quadro 1 apresenta os compostos que constituem o extrato bruto estudado. As Figuras 12-23 os espectros de Massas dos picos constituintes do extrato bruto.

Quadro 1: Constituintes do extrato bruto de *A. oleracea*.

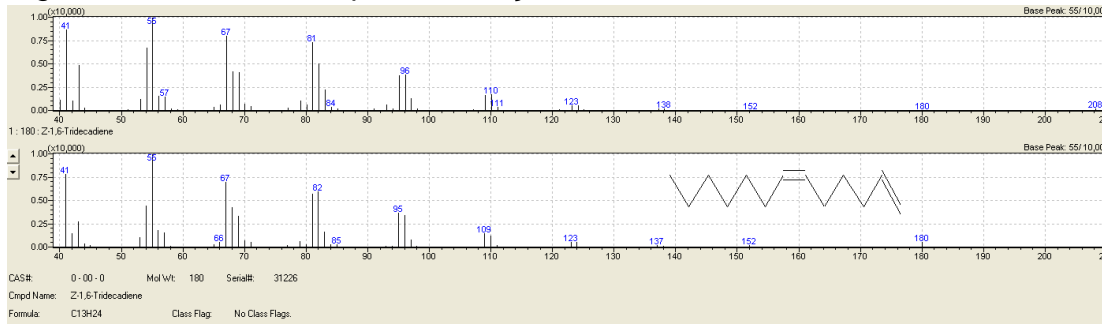
Biciclo[7.2.0]undec-4-eno
Z-1,6-tridecadieno
1-trideceno
1,3-bis(cinamoiloximetil)adamantano
N-isobutil-2(E),6(Z),8(E)-decatrienamida, o epilantol
Ácido n-hexadecanóico
(9Z, 12Z)-ácido octadecadienóico
Ácido oxálico
Ácido octadecanóico
2-acetoxi-1,1,10-trimetil-6,9-epidioxidecalina
n-octacosano
n-tetracosano

Figura 12: Pico com tempo de retenção de 6,667 min, referente ao biciclo[7.2.0]undec-4-eno.



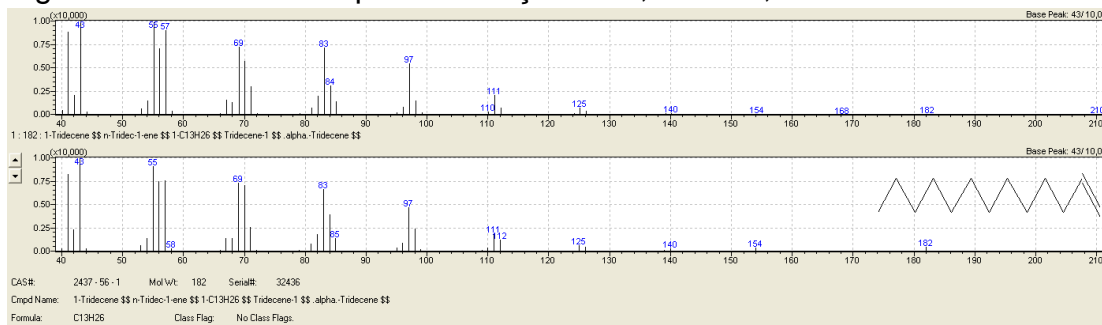
Fonte: Da autora, 2019.

Figura 13: Pico com tempo de retenção de 6,967 min, referente ao Z-1,6-tridecadieno.



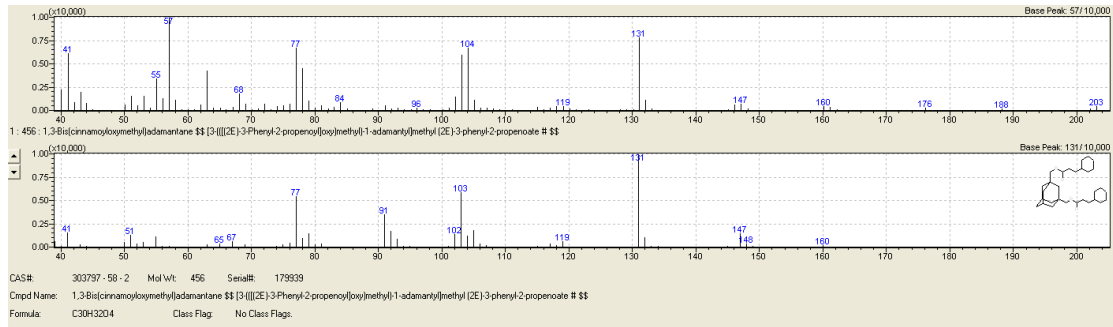
Fonte: Da autora, 2019.

Figura 14: Pico com tempo de retenção de 7,146 min, referente ao 1-trideceno.



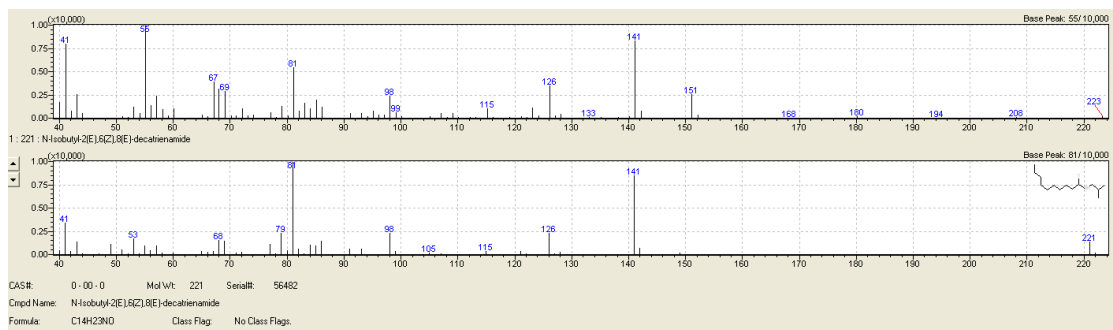
Fonte: Da autora, 2019.

Figura 15: Pico com tempo de retenção de 9,846 min, referente ao 1,3-bis(cinamoiloximetil)adamantano.



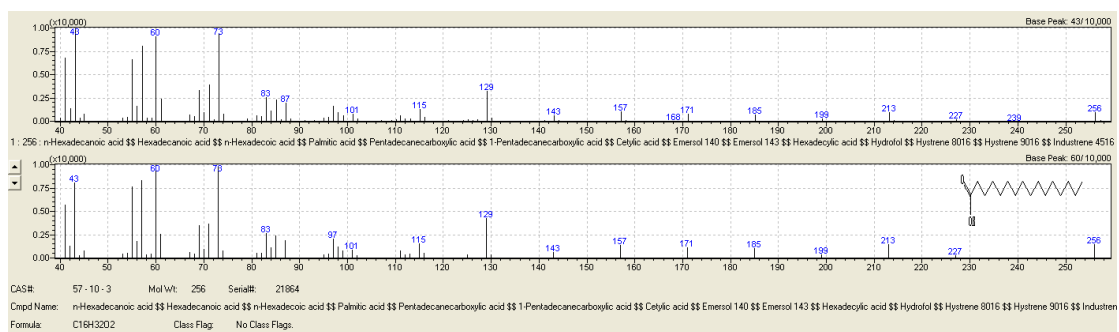
Fonte: Da autora, 2019.

Figura 16: Pico com tempo de retenção de 10,563 min, referente ao N-isobutil-2(E),6(Z),8(E)-decatrienamida, o espilantol.



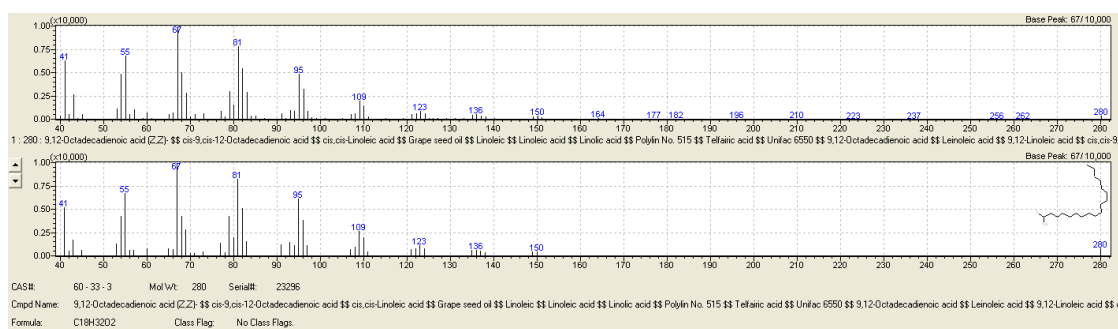
Fonte: Da autora, 2019.

Figura 17: Pico com tempo de retenção de 11,783 min, referente ao Ácido n-hexadecanóico.



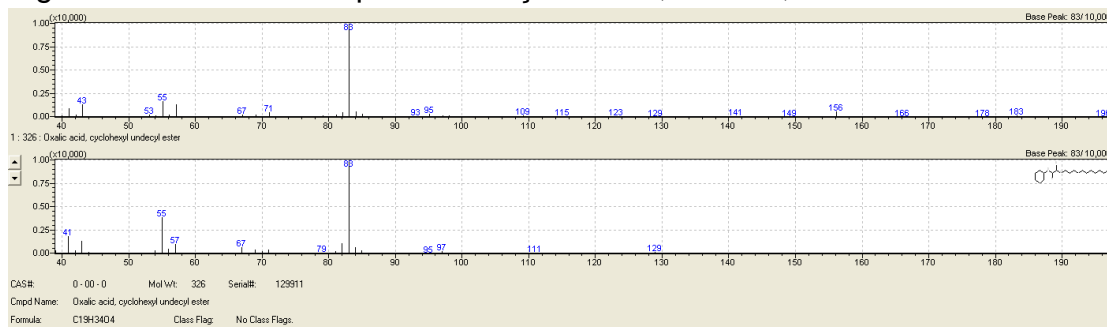
Fonte: Da autora, 2019.

Figura 18: Pico com tempo de retenção de 13,379 min, referente ao (9Z, 12Z)-ácido octadecadienóico.



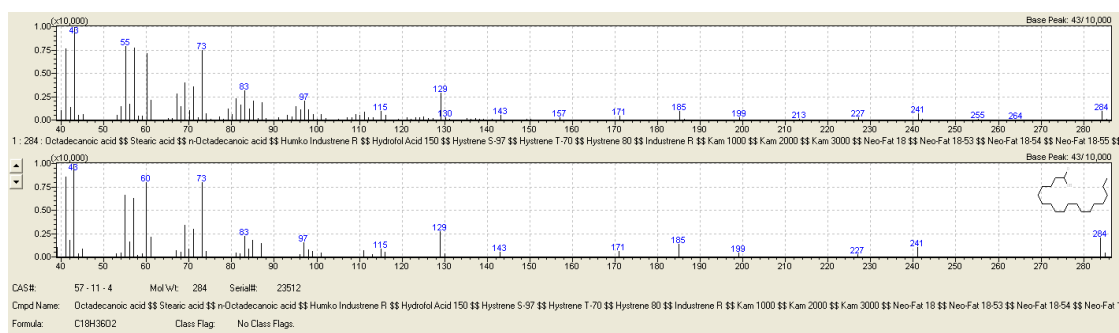
Fonte: Da autora, 2019.

Figura 19: Pico com tempo de retenção de 13,538 min, referente ao ácido oxálico.



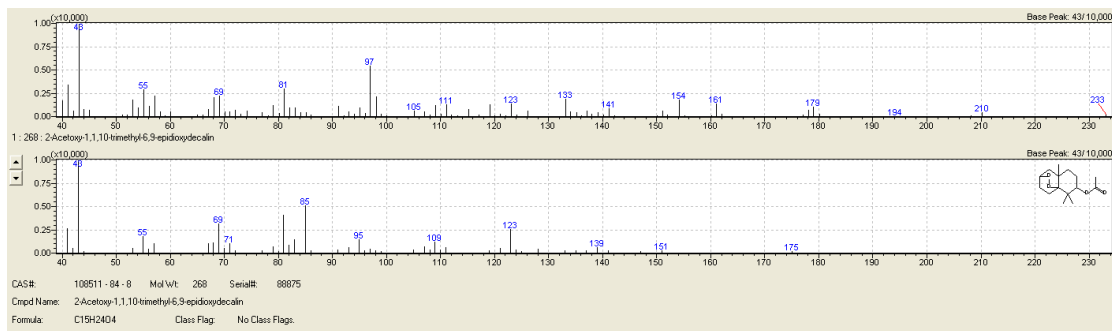
Fonte: Da autora, 2019.

Figura 20: Pico com tempo de retenção de 13,613 min, referente ao Ácido octadecanóico.



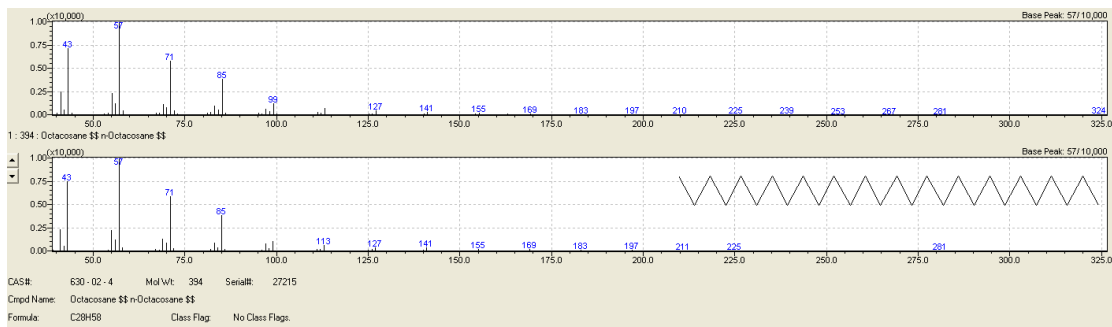
Fonte: Da autora, 2019.

Figura 21: Pico com tempo de retenção de 14,021 min, referente ao 2-acetoxi-1,1,10-trimetil-6,9-epidioxidecalina.



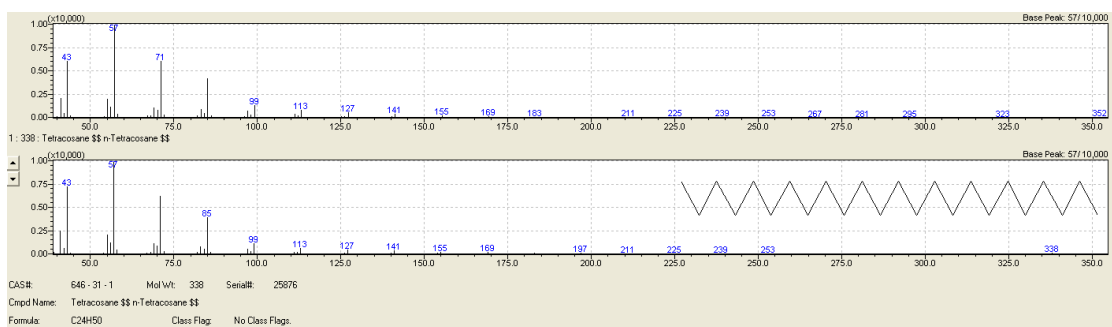
Fonte: Da autora, 2019.

Figura 22: Pico com tempo de retenção de 14,842 min, referente ao n-octacosano.



Fonte: Da autora, 2019.

Figura 23: Pico com tempo de retenção de 16,479 min, referente ao n-tetracosano.



Fonte: Da autora, 2019.

A Figura 24 traz as estruturas dos compostos presentes no extrato de *A. oleracea*. De acordo com Barbosa et al. (2016), o espilantol é um alcaloide N-alquilamida com atividade antibacteriana e que tanto o espilantol como o extrato de plantas do gênero *Spilanthes* são utilizadas em pastas de dente e géis bucais

(Buccaldol® e Indolphar®) por conta desse efeito. O espilantol apresenta várias atividades farmacológicas como atividade analgésica (RIOS; OLIVO, 2014; DANDIN et al., 2014), atividade antioxidante (ABEYSIRI et al., 2013), antimutagênica (ARRIAGA-ALBA; RIOS; DÉGICA-CAMPOS, 2013), antiinflamatória (DIAS et al., 2012) dentre outras.

De acordo com Paulraj, GovindarajanePalpu (2013) as alquilamidas são responsáveis pelas atividades: anestésica local, analgésica, antibacteriana e antifúngica. Dentre as alquilamidas, o espilantol é considerado uma das alquilamidas mais potentes encontradas em plantas de gênero *Spilanthes*.

A atividade analgésica do espilantol é atribuída ao aumento da liberação de GABA no córtex temporal cerebral (RIOS; AGUILAR-GUADARRAMA; GUTIERREZ, 2007). Já a atividade antiinflamatória do mesmo composto é atribuída à sua capacidade de inibir duplamente a COX e a LOX e pela diminuição nas prostaglandinas, PGE2 e PGF2 (HERNANDEZ et al., 2009).

Nenhum estudo científico sobre o mecanismo de ação antibacteriana do espilantol ou do extrato de plantas do gênero *Spilanthes* foi encontrado. Entretanto, de acordo com Juven et al. (1994) e Sikkema, De Bont, Poolma (1995) os componentes dos óleos essenciais podem agir sobre proteínas celulares nas membranas citoplasmáticas, através de sua acumulação na dupla camada lipídica e, desta forma, destruir a interação lipídeoproteína. Neste estudo não foi utilizado óleo essencial, mas sim o extrato hexânico de *A. oleracea*, porém, como os componentes desse extrato também são apolares, i.e., lipofílicos, é possível que ocorra uma interação entre esses compostos e a (s) porção (ões) hidrofóbica (s) das proteínas (JUVEN et al., 1994; SIKKEMA et al., 1995). Portanto, provavelmente, o espilantol seja o composto responsável pela alta atividade antibacteriana, contra *B. cereus*, *E. coli* e *S. aureus*, apresentada pelo extrato de *A. oleracea* obtido neste trabalho.

Além disso, o espilantol em extratos de *A. oleracea* L. inibiu as contrações dos músculos subcutâneos, especialmente os da face, e pode ser usado como um produto anti-rugas (DEMARNE; PASSARO, 2009). Assim, existem alguns produtos anti-envelhecimento contendo espilantol como Gatuline®, SYN-COLL® e ChronOline™ (BARBOSA et al., 2016). E ainda, segundo Boonen et al. (2010) que estudaram a permeação transdérmica do espilantol em duas soluções, 65% Etanol e 10% Polietinogilcol, combinadas com três fluidos receptores, aplicados à pele humana, esse permeia perfeitamente a pele em todas essas circunstâncias estudadas

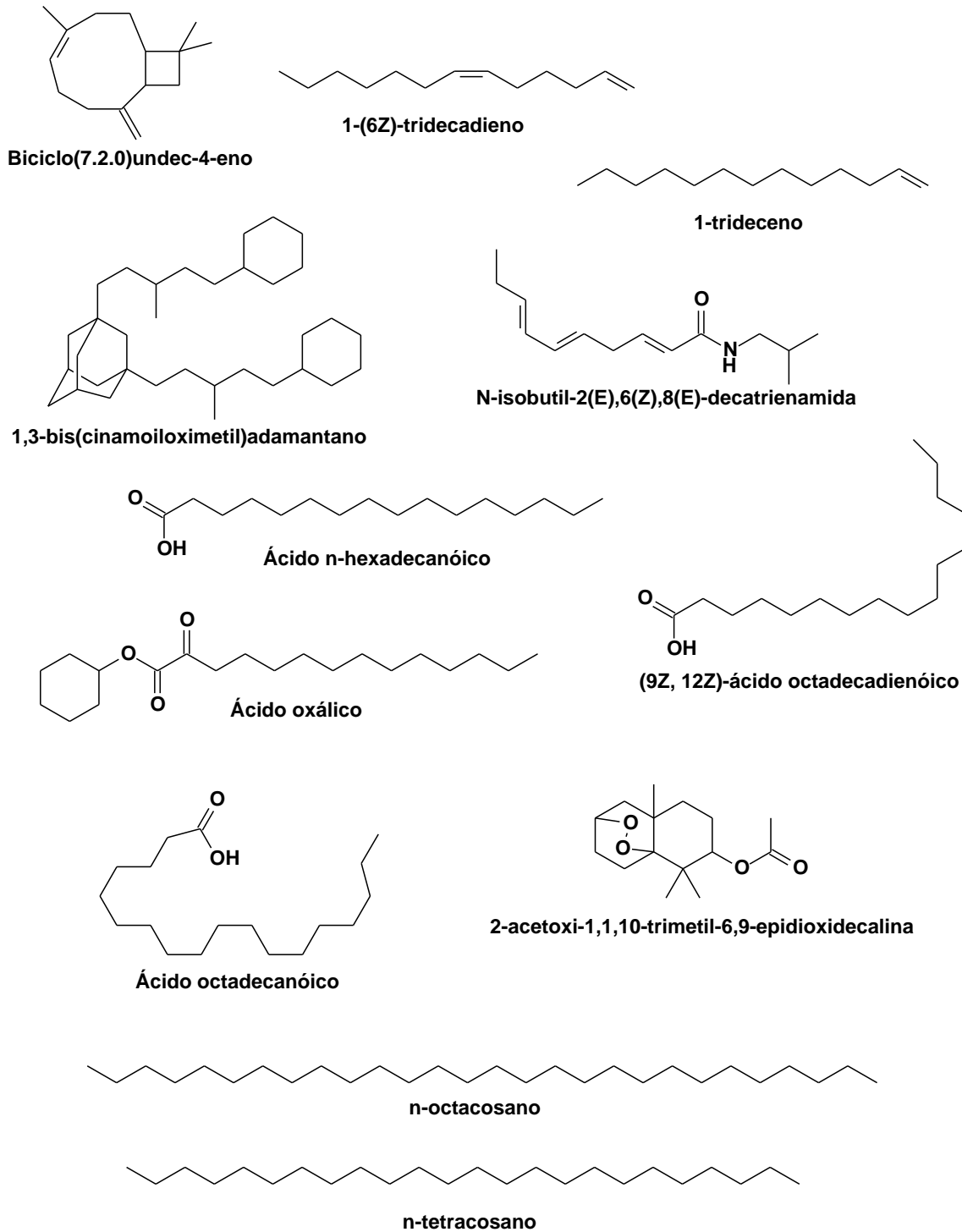


(BOONEN et al., 2010). Desta forma, o preparo de filmes funcionais incorporando-se o extrato de *A. oleracea* é uma inovação tecnológica de duas frentes:

- cosmética - na qual o filme pode ser utilizado como produto anti-rugas, como um cosmético anti-envelhecimento;
- médica - na qual o filme incorporando-se o extrato antibacteriano pode ser utilizado no tratamento de feridas infectadas por bactérias, como um curativo medicamentoso.

De forma geral, pode-se dizer que o espilantol é um metabólito secundário com grande potencial industrial por conta de suas várias propriedades biológicas e efeitos na saúde.

Figura 24: Estrutura dos compostos presentes no extrato de *A. oleracea*.

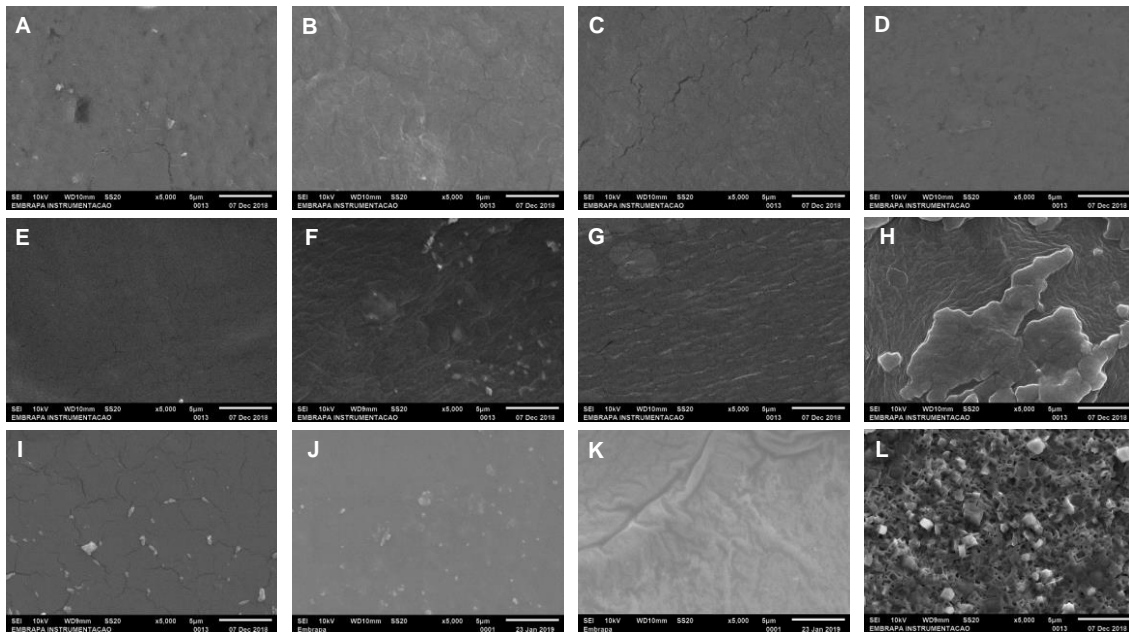


Fonte: Da autora, 2019.

## 5.4 MEV dos filmes

Os filmes preparados neste estudo foram avaliados por Microscopia Eletrônica de Varredura. A Figura 25 apresenta as imagens de MEV obtidas.

Figura 25: Imagens de MEV dos filmes preparados neste estudo.



Fonte :Da autora, 2019.

Legenda: **A**-Filme de quitosana; **B**-Filme de quitosana com baixa (5%) concentração de *A. oleracea*; **C**- Filme de quitosana com média (10%) concentração de *A. oleracea*; **D**- Filme de quitosana com alta (20%) concentração de *A. oleracea*; **E**- Filme de alginato sem reticulação **F**- Filme de alginato sem reticulação com baixa (5%) concentração de *A. oleracea*; **G**- Filme de alginato sem reticulação com média (10%) concentração de *A. oleracea*; **H**- Filme de alginato sem reticulação com alta (20%) concentração *A. oleracea*; **I**-Filme de alginato com reticulação; **J**- Filme de alginato com reticulação com baixa (5%) concentração de *A. oleracea*; **K**- Filme de alginato com reticulação com média (10%) concentração de *A. oleracea*; **L**- Filme de alginato com reticulação com alta (20%) concentração de *A. oleracea*.

As imagens da Figura 25 A a D representam a superfície dos filmes a base de quitosana, sendo que a imagem A representa o filme controle, e as imagens B, C e D representam as superfícies dos filmes contendo baixa, média e alta concentração de extrato de *A. oleracea*, respectivamente. Como é característico de filmes formados a base de quitosana, as imagens mostram uma superfície homogênea, sem a presença de grandes aglomerados.

Já as imagens da Figura 25 E, F, G e H são referentes aos filmes a base de alginato sem reticulação, sendo controle, contendo baixa, média e alta concentração

de extrato de *A. oleracea*, respectivamente. Neste caso observa-se que o filme controle apresenta uma superfície bastante lisa e homogênea. Entretanto, a medida que se aumenta a concentração de extrato, nota-se que diminui a homogeneidade da superfície do filme e para o filme contendo alta concentração de extrato (Figura 25H) observa-se a presença de grandes aglomerados ao longo de toda a superfície analisada.

As imagens I, J, K, L da Figura 25 são referentes aos filmes a base de alginato com reticulação sendo controle, baixa 5%, média 10% e alta 20 % concentração de extrato de *A. oleracea*, respectivamente. Nestes casos, observa-se que a reticulação muda a característica da superfície do filme, assim como, é possível observar visualmente. O filme controle (Figura 25 I) apresenta algumas ranhuras ao longo da superfície analisada, característica do processo de reticulação. Com o aumento da concentração de extrato, essas ranhuras vão desaparecendo, e no filme contendo alta concentração de extrato, observa-se a formação de aglomerados com formato característicos ao longo de toda a superfície analisada. Esses aglomerados são referentes ao excesso de extrato que não interagiu com a matriz do filme.

## 5.5 Espessura dos filmes

Os filmes preparados neste estudo foram avaliados quanto a espessura. A Tabela 1 apresenta a média e os desvios padrão obtidos para cada filme estudado. A partir dos resultados apresentados na Tabela 1 observa-se que há uma diferença considerável na espessura dos filmes estudados. Os filmes de alginato sem reticulação são significativamente mais finos que os filmes com reticulação. Isso pode estar relacionado com a modificação estrutural na cadeia polipeptídica que a reticulação impõe. Com a quelatação da estrutura pelos íons  $\text{Ca}^{2+}$  a estrutura tridimensional assume uma conformação que ocupa mais espaço e por isso a maior espessura dos filmes reticulados.

Já comparando-se os filmes de alginato sem reticulação com os filmes de quitosana observa-se que com exceção do filme de quitosana incorporando-se a maior concentração de extrato de *A. oleracea*, os demais filmes de quitosana são bem mais finos que os filmes de alginato.

Tabela 1: Espessura dos filmes preparados neste estudo.

		Concentração de extrato de <i>A. oleracea</i>			
		Controle	Baixa 5%	Média 10%	Alta 20%
Alginato sem reticulação	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	225,000	206,500	323,750	315,750
	desvio padrão	0,051	0,008	0,005	0,055
Alginato com reticulação	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	1120,500	1545,330	1042,000	1261,000
	desvio padrão	0,731	0,260	0,285	0,426
Quitosana	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	112,000	148,000	228,750	378,500
	desvio padrão	0,031	0,064	0,121	0,233

Fonte: Da autora, 2019.

Os filmes obtidos são muito mais espessos que os filmes de alginato obtidos por Turbiani, Kieckbusch, Gimenes (2011). Entretanto, a autora não incorporou extrato aos filmes estudados. Assim, supõe-se que a incorporação do extrato de *A. oleracea* afetou a espessura dos filmes.

## 5.6 Conteúdo de umidade dos filmes (*W*)

A partir dos experimentos realizados para a determinação do conteúdo de umidade nos filmes estudados foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 2. Destaca-se que os resultados apresentados são as médias dos dados obtidos com seus respectivos desvios padrão.

Através dos dados apresentados na Tabela 2 observa-se que os filmes de alginato sem reticulação apresentam maior conteúdo de umidade e os filmes de quitosana apresentando o menor conteúdo de umidade. Para os filmes de alginato, o controle apresenta conteúdo de umidade menor que para os filmes incorporando-se o

extrato de *A. oleracea*, com exceção do filmes de alginato sem reticulação incorporando-se alta concentração de extrato

Tabela 2: Dados de conteúdo de umidade dos filmes estudados.

		<b>Concentração de extrato de <i>A. oleracea</i></b>			
		<b>Controle</b>	<b>Baixa 5%</b>	<b>Média 10%</b>	<b>Alta 20%</b>
<b>Alginato sem reticulação</b>	<b>W (%)</b>	66,461	72,450	69,503	61,501
	<b>desvio padrão</b>	6.84	6.16	3.79	3.88
<b>Alginato com reticulação</b>	<b>W (%)</b>	17,647	26,830	25,000	19,444
	<b>desvio padrão</b>	0.87	7.81	10.2	4.94
<b>Quitosana</b>	<b>W (%)</b>	14,286	9,130	12,143	15,357
	<b>desvio padrão</b>	2.50	13.4	4.38	5.70

Fonte: Da autora, 2019.

Dentre os filmes de alginato, os filmes reticulados apresentam menores conteúdos de umidade, mostrando que a reticulação na segunda etapa interfere no conteúdo de umidade, diminuindo esse. Já para os filmes de quitosana, exceto o filme de média concentração de extrato, o controle apresenta menor conteúdo de umidade que os filmes incorporando-se o extrato de *A. oleracea*. O valor de umidade do filme controle reticulado apresenta valores muito parecidos com os de Turbiani (2007) que também realizou a reticulação por meio de imersão na solução reticuladora. Isso mostra que a incorporação do extrato de *A. oleracea* aumenta a absorção de umidade.

Observa-se pela Tabela 2 que os maiores de umidade para os filmes de alginato (reticulado e não reticulado) foram obtidos em concentração baixa de extrato e os menores valores de umidade foram obtidos com altas concentrações de extrato. Percebe-se então que a adição de extração nos filmes de alginato diminuiu a umidade dos filmes. Assim, o extrato pode ter atuado como plastificante nesses filmes.

Entretanto, para os filmes de quitosana observa-se exatamente o inverso, o filme com menor valor de umidade apresenta a maior concentração de extrato. Isso pode estar relacionado a como o extrato de *A. oleracea* interage com a estrutura da

matriz polissacarídica. Nos filmes de alginato, o extrato de *A. oleracea* provavelmente se ligar aos mesmos sítios que as moléculas de água na matriz polimérica. Assim, com o aumento da concentração do extrato observa-se diminuição do conteúdo de umidade. Já para quitosana o extrato provavelmente se liga a sítios diferentes aos que as moléculas de água se ligam na matriz polimérica, pois com o aumento da concentração do extrato observa-se um aumento do conteúdo de umidade nos filmes. Nesses filmes o extrato não atuou como plastificante.

Assim sendo os filmes de alginato não reticulado e os de quitosana apresentaram melhor em relação a umidade.

### **5.7 Solubilidade em água dos filmes (S)**

A partir dos experimentos realizados para a determinação da solubilidade em água dos filmes estudados foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 3. Destaca-se que os resultados apresentados são as médias dos dados obtidos com seus respectivos desvios padrão. Não foi possível calcular a solubilidade dos filmes de alginato sem reticulação e de quitosana pois os mesmos dissolveram totalmente na água.

Os filmes de quitosana e alginato sem reticulação solubilizaram-se totalmente na água não sendo possível fazer uma comparação entre os filmes. Pode-se dizer então que a reticulação é um processo fundamental para a produção de filmes funcionais.

A partir da Tabela 3 observa-se que com o aumento da concentração do extrato de *A. oleracea* aumenta a solubilidade dos filmes em água. Isso pode ter acontecido provavelmente por uma reticulação compacta na superfície dos filmes (TURBIANI; KIECKBUSCH; GIMENES, 2011) contendo maior concentração do extrato, não permitindo a difusão de íons  $CA^{2+}$  para o interior da matriz. Que resulta em maior solubilidade em água.

Tabela 3: Dados de solubilidade em água dos filmes estudados.

		Concentração de extrato de <i>A. oleracea</i>			
		Controle	Baixa 5%	Média 10%	Alta 20%
<b>Alginato com reticulação</b>	<b>S (%)</b>	66,667	55,778	65,667	72,000
	<b>S desvio padrão</b>	9.25	13.11	5.79	-

Fonte: Da autora, 2019.

Em futuros trabalhos, pode-se testar a adição de íons  $\text{Ca}^{2+}$  em maior concentração na pré-reticulação dos filmes.

### 5.8 Grau de intumescimento dos filmes (*Swelling*)

A partir dos experimentos realizados para a determinação da grau de intumescimento dos filmes estudados foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4. Destaca-se que os resultados apresentados são as médias dos dados obtidos com seus respectivos desvios padrão. Não foi possível calcular o grau de intumescimento dos filmes de quitosana pois durante os primeiros 10 minutos imersos em água os filmes haviam se dissolvido completamente.

De acordo com a Tabela 4 pode-se observar que os filmes sem reticulação com 10 minutos de imersão em água tem um intumescimento de 0,65 GI, com 20 minutos houve um leve aumento na absorção da água mas a partir de 30 minutos os filmes param de intumescer. Acredita-se que a partir de 30 minutos os filmes passaram a se dissolver na água o que explica a perda de massa Turbiani, Kieckbusch, Gimenes (2011) constata em seu trabalho que mesmo após 36 minutos na água os filmes ainda permanecem com características semelhantes às originais, porém alguns de seus filmes chegaram a ficar até 40 minutos em imersão na solução reticuladora, o que reforça a tese de que um maior tempo de reticulação poderia diminuir a solubilidade e a facilidade de absorção de água por parte desses filmes. Já o filme controle não reticulado obteve um grau de intumescimento maior se comparado ao reticulado, porém seguiu o mesmo parâmetro houve um pico com 10 minutos houve uma queda, depois permaneceu constante.

Os filmes de alginato não reticulados incorporando-se baixa concentração de extrato com 30 minutos de imersão na água se dissolveram completamente. Já para



os filmes reticulados percebe-se que com 10 minutos na água eles intumescem, absorvem a água e aumentam sua massa porém a partir dos 20 minutos eles começam a perde massa e diminuem seu grau de intumescimento.

Os polímeros não são solúveis em água, apenas tem afinidade, a parte superior hidrata e absorve água e vai aumentando massa até um ponto em que a parte hidratada se descola, causando assim uma redução na massa total do filme.

Tabela 4: Dados de grau de intumescimento dos filmes estudados.

	Temp o (min)	Controle [Média GI (Desvio Padrão)]	Concentração de extrato de <i>A. oleracea</i>		
			Baixa 5% [Média GI (Desvio Padrão)]	Média 10% [Média GI (Desvio Padrão)]	Alta 20% [Média GI (Desvio Padrão)]
	0				
<b>Alginato sem reticulação</b>	10	0,65(0,34)	0,25(0,39)	0,23(0,08)	0,26(0,13)
	20	0,68(0,43)	-0,27(0,46)	0,01(0,09)	0,27(0,23)
	30	0,42(0,27)	-	0,15(0,06)	0,38(0,35)
	40	0,25(0,19)	-	0,39(0,36)	0,31(0,23)
	0				
<b>Alginato com reticulação</b>	10	1,17(3,04)	3,64(1,06)	4,61(0,68)	4,23(0,86)
	20	1,49(0,12)	3,04(1,26)	4,30(0,65)	3,62(1,24)
	30	1,46(0,04)	2,77(1,46)	3,92(0,92)	3,32(1,23)
	40	1,46(0,04)	2,62(1,69)	3,67(1,04)	2,57(1,78)

Fonte: Da autora, 2019.

Para Turbiani, Kieckbusch, Gimenes (2011), a ocorrência de um máximo de absorção de água pode ser explicado pelo fato que os filmes absorvem rapidamente água e então ocorre uma relaxação em sua estrutura reticular que facilita a solubilização e difusão dos solutos lixiviados pela água. Assim, de acordo com a autora, a diminuição do grau de intumescimento ocorre não só pela menor retenção de água pela estrutura reticular enfraquecida, mas também pela perda de massa lixiviada.

### 5.9 Atividade antibacteriana dos filmes

A atividade antibacteriana foi realizada levando-se em conta as soluções formadoras de filme (SFF). Nesta, as SFF foram impregnadas em papéis de filtro estéreis, e esses depositados sobre o meio de cultura e as bactérias inoculadas.

A partir dos experimentos realizados para a determinação da atividade antibacteriana das SFF estudadas foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 5. Os resultados apresentados na Tabela 5 são as médias dos dados obtidos com seus respectivos desvios padrão.

A partir dos dados de atividade antibacteriana das SFF (Tabela 5), observa-se que contra *B. cereus* a solução formadora de filme de quitosana com extrato de *A. oleracea* em baixa e média concentração apresentaram melhor atividade biológica que as SFF de alginato. Levando-se em conta a bactéria *E. coli*, nenhum dos filmes estudados com extrato de *A. oleracea* apresentou atividade maior que a atividade das SFF controle. Já para *S. aureus*, as SFF de quitosana com média concentração de *A. oleracea*, bem como os filmes de alginato com média e alta concentração de extrato de *A. oleracea* apresentaram as melhores atividades biológicas. Sendo que a solução formadora filme de alginato com alta concentração de extrato de *A. oleracea* apresentou a mais alta atividade microbiológica dentre todos as outras SFF estudadas estudados.

Tabela 5: Dados do halo de inibição (mm) dos soluções formadora de filme estudadas contra *B. cereus*, *E. coli* e *S. aureus*.

	Bactérias	Zonas de inibição em mm (desvio padrão)			
		Controle	Concentração de extrato de <i>A. oleracea</i>		
			Baixa 5%	Média 10%	Alta 20%
Alginato sem reticulação	<i>B. cereus</i>	7,00 (0,00)	10,67 (1,15)	11,00 (1,00)	12,00 (1,73)
	<i>E. coli</i>	14,00 (1,00)	9,00 (0,00)	13,00 (3,00)	11,33 (0,58)
	<i>S. aureus</i>	9,66 (0,57)	10,33 (0,57)	16,33 (1,53)	<b>23,67 (3,21)</b>
Quitosana	<i>B. cereus</i>	10,67 (0,58)	12,67 (0,58)	12,67 (2,08)	12,33 (2,31)
	<i>E. coli</i>	16,67 (1,53)	9,00 (0,00)	10,00 (0,00)	7,00 (0,00)
	<i>S. aureus</i>	14,33 (2,08)	12,67 (4,62)	17,67 (4,93)	12,67 (4,62)

Fonte: Da autora, 2019.

Apesar do extrato de *A. oleracea* ter inibido 100% das três bactérias testadas, aparentemente, nas soluções formadoras de filme, o extrato deve encontrar-se em retículos internos da estrutura polissacarídica com pouca liberação, desta forma, a quantidade liberada no tempo de avaliação não causa nenhuma sensibilidade contra *E. coli*. Ou seja, as solução formadora de filme contendo o extrato de *A. oleracea* não apresentam sensibilidade contra bactérias Gram-negativas.

Já contra bactérias Gram-positivas, especialmente *S. aureus*, mesmo com possível pouca liberação do extrato por parte das SFF, essa quantidade foi suficiente para inibir essa bactéria com zonas de inibição consideráveis. Assim sendo, a solução formadora de filme de alginato com alta concentração de extrato de *A. oleracea* apresentou-se como a melhor condição, das estudadas neste trabalho, para ser utilizado como curativo medicamentoso.

Não foram encontrados curativos antimicrobianos utilizando-se extrato de *A. oleracea*, nem mesmo produtos cosméticos aliando a praticidade dos filmes adesivos e os efeitos cosméticos do extrato de *A. oleracea*. Assim, esse trabalho propõe um produto inovador, que traz praticidade na utilização, pois as pessoas precisam somente aplicar os filmes na região dos olhos, glabella e sulcos nasogenianos. Os filmes poderão ser preparados em formas específicas para se moldar a essas regiões faciais ou serem utilizados como duas formas tópicas líquidas e o filme se formar na pele dos consumidores. Ambas as formas são práticas e de simples utilização. Como curativos antimicrobianos os filmes poderão ser preparados em diferentes tamanhos para se adaptar a feridas de diferentes tamanhos.

## 6. CONCLUSÕES

Após o desenvolvimento dos filmes e as análises foi possível observar que:

- O extrato inibiu 100% o crescimento de todas as bactérias testadas.
- O processo de extração foi efetivo e levou a obtenção de um extrato rico em espilantol, confirmado pela análise por CG-EM.
- Os filmes de alginato sem reticulação são mais finos que os reticulados.
- Os filmes de quitosana, exceto com alta concentração de extrato, são mais finos que os de alginato não reticulado.
- Os filmes de alginato sem reticulação apresentam maior valor de umidade e os de quitosana menor, dentre os filmes estudados.
- Os filmes de quitosana e alginato sem reticulação solubilizaram totalmente na água.
- Os filmes de alginato reticulados tiveram o maior grau de intumescimento que os filmes de alginato não reticulados.
- A SFF de alginato com alta (20%) concentração de extrato de *A. oleracea* apresentou a maior atividade antimicrobiana;
- Assim, o filme de alginato reticulado incorporando-se alta (20%) concentração de extrato de *A. oleracea* apresentou-se como a melhor opção dentre os filmes estudados para ser utilizado como curativo antimicrobiano e como filme ativo com efeito botox.

## REFERÊNCIAS

- ABECEDÁRIO vegetal: comer bem é viver melhor ainda. *Jambu*. [S.l.], 8 dez. 2009. Disponível em: <https://abecedariovegetal.wordpress.com/category/jambu/>. Acesso em: 10 dez. 2017.
- ABEYSIRI, G. R. P. I.; ABEYSINGHE, D. C.; DHARMADASA, R. M.; SAMARASINGHE, K. Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Spilantes acmella* Murr. (Asteraceae), a natural remedy for toothache. *Industrial Crops and Products*, Amsterdam, 50, p. 852-6, 2013.
- AHMED, S.; ANDIKRAM, S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. *Achievements in the Life Science*, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 27-37, June 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2078152015300298>. Acesso em: 13 dez. 2018.
- ANDRADE, D. M. da S.; HIGUCHI, C. T. Análise crítica e comparative de uma marca cosmética com apelo antienvelhecimento. *InterfacEHS*, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 43-63, 2014.
- ANISREE, G.; RAMASAMY, C.; JOHN, W. I. Fabrication and evaluation of domperidone transdermal films. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, Panchkula, 289, 167–78, 2012.
- ARRIAGA-ALBA, M.; RIOS, M.Y.; DÉCIGA-CAMPOS, M. Antimutagenic properties of affinin isolated from *Heliopsis longipes* extract. *Pharmaceutical Biology*, Lisse, v. 51, n. 8, p. 1035–9, 2013. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2013.775161>. Acesso em: 13 jun. 2018.
- ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M. Filmes comestíveis de quitosana. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, DF, v. 30, p. 33-8, jan./jun. 2003. Disponível em: <http://www.debiq.eel.usp.br/~joabatista/nuevas%20aplicaciones.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2018.
- BARBOSA, A.F.; CARVALHO, M. G. de; SMITH, R. E.; SABAA-SRUR A. U. O. Spilanthal: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v. 26, p. 128-33, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v26n1/0102-695X-rbfar-26-01-0128.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2017.
- BODMEIER, R.; PAERATAKUL, O. Plasticizer uptake by aqueous colloidal polymer dispersions used for the coating of solid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam, v.152, n. 1, p.17-26, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517397048825>. Acesso em: 10 jul. 2018.
- BOONEN, J.; BAERT, B.; ROCHE, N.; BURVENICH, C.; SPIEGELEER B. De. Transdermal behaviour of the N-alkylamidespilanthal (affinin) from *Spilanthus*

acmella (Compositae) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 127, n. 1, p. 77–84, Jan. 2010. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109006060?via%3Dihub>.  
 Acesso em: 18 nov. 2017.

CAVALCANTI, V. M. S. *Extração de espilantol de Spilanthes acmella var oleracea com dióxido de carbon supercrítico*. 2008. 144f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, Amsterdam, v.23, n.7, p.1273-335, 1998. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670097000397?via%3Dihub>.  
 Acesso em: 12 jul. 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada. Coordenação da tradução: Sílvia Figueiredo Costa; revisores: Ana Gales e Antonia Maria de Oliveira Machado. 8. ed. Wayne, PA: CLSI, 2003. 58p. (NCCLS; M2-A8). Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf)

CLOUTIER, M.; MANTOVANI, D.; ROSEI, F. Antibacterial coatings: challenges, perspectives, and opportunities. *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, v. 33, n. 11, 637–52, 2015. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779915001882>. Acesso em: 3 ago. 2018.

DANDIN, V.S.; NAIK, P. M.; MURTHY, H. N.; PARK, S. Y. ; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Rapid regeneration and analysis of genetic fidelity and scopoletin contents of micropropagated plants of *Spilanthes oleracea* L. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, London, v. 89, n. 1, 79–85, 2014. Disponível em:  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14620316.2014.11513052>. Acesso em: 18 dez. 2017.

DEBEAUFORT, F.; QUEDAZA-GALLO, J. A.; VOILLEY, A. Edible films and coatings, tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in Food Science*, Oxfordshire, v.38, n. 4, p. 299-313, 1998. Disponível em:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9626488>. Acesso em: 25 nov. 2017.

DEMARNE, F.; PASSARO, G. *Use of an Acemella oleracea extract for the botulinum toxin-like effect thereof in an anti-wrinkle cosmetic composition*. US 7,531,193 B2, 2009. Disponível em:  
<https://patentimages.storage.googleapis.com/96/78/36/5844762669a791/US7531193.pdf>. Acesso em: 23 out. 2017.

DIAS, A. M. A.; SANTOS, P.; SEABRA, I. J.; JUNIOR, R. N. C.; BRAGA, M. E. M.; SOUSA, H. C. de. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, Amsterdam, 61, p. 62–70, Jan. 2012. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844611004219>. Acesso em: 19 dez. 2017.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. *Tratado de histologia em cores*. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

GORRASI, G. Dispersion of halloysite loaded with natural antimicrobials into pectins: characterization and controlled release analysis. *Carbohydrate Polymers*, Amsterdam, v. 127, 47–53, Aug. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861715002635>. Acesso em: 23 ago. 2018.

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In: *Food packaging and preservation*. M. Mathlouthi (ed.). New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. p. 371-94

GUILBERT, S.; CUQ, B.; GONTARD, N. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. *Food Additives and Contaminants*, London, v. 14, n. 6-7, p. 741-51, 1997. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652039709374585>>. Acesso em: 26 out. 2017.

HAMED, H.; MORADI, S.; HUDSON, S. M.; TONELLI, A. E. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: a review. *Carbohydrate Polymers*, Amsterdam, v. 199, p. 445-60, Nov. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861718307690>. Acesso em: 15 dez. 2018.

HELFRICH, Y. R.; SACHS, D. L.; VOORHEES, J. J. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatology Nursing*, Pitman, v. 20, p.177-83, 2008. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/51423323\\_Overview\\_of\\_skin\\_aging\\_and\\_photoaging](https://www.researchgate.net/publication/51423323_Overview_of_skin_aging_and_photoaging). Acesso em: 10 ago. 2017.

HERNÁNDEZ, I.; MARQUEZ, L.; MARTINEZ, I.; DIEGUEZ, R.; DELPORTE C.; PRIETO, S. *et al.* Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids-derived from *Heliopsis longipes* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 124, n. 3, p. 649–52, July 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109002888?via%3Dihub>. Acesso em: 16 out. 2018.

HROMIŠ, N.; LAZIC, V.; POPOVIC, S.; MARKOV, S.; VASTAG, Z.; SUPUT, D. *et al.* Investigation of a product-specific active packaging material based on chitosan biofilm with oleoresins. *Journal of Food and Nutrition Research*, Newark, v.55, p.78-88, 2016. Disponível em: [www.vup.sk/en/download.php?bullID=1874](http://www.vup.sk/en/download.php?bullID=1874). Acesso em: 16 out. 2018.

JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. *Química Nova*, São Paulo, v.30, p.879-84, 2007. Disponível em: [http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol30No4\\_879\\_21-AR06203.pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol30No4_879_21-AR06203.pdf). Acesso em: 14 jan. 2019

JOHNSON, F.A., CRAIG, D.Q.M., MERCER A.D. Characterization of the block structure and molecular weight of sodium alginates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Belfast, p.639-43, 1997.

JUVEN, B. J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, London, v.76, n. 6, p. 626–31, 1994.

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

KARKI, S. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 559-74, Oct. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1818087616300368>. Acesso em: 6 dez. 2018.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, v. 40, n. 12, p. 47-59, 1986.

KING, A. H. Brown seaweed extracts (Alginates). *Food Hydrocolloids*, Amsterdam, v. 2, p. 115-88, 1983.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.; KANIG, J. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010. 2v.

LANCEROTTO, L.; STECCO, C.; MACCHI, V.; PORZIONATO, A.; STECCO, A.; CARO, R. D.Layers of the abdominal wall: anatomical investigation of subcutaneous tissue and superficial fascia. *Surgical and Radiologic Anatomy*, Paris, v. 33, n. 10, p. 835-42, Jan. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21212951>. Acesso em: 13 set. 2018.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam, v. 447, n. 1/2, p. 12-21, Apr. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23462366>. Acesso em: 16 out. 2018

McHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Permeability properties of edible films. In: *Edible coatings to improve food quality*. Edited by JonhM. Krochta, Elizabeth A. BalwinandMyrnaNisperos-Carriedo. Boca Raton: CRC Press, 1994. chapter. 7, p. 139-187.

MENDES, S. T. O. *Desenvolvimento de formas farmacêuticas de ação tópica com potencial antifúngico derivadas da cortiça*. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica) - Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal, 2013.

MOE, S. T. *et al.* Alginates. In: A. M. Stephen (ed.). *Food polysaccharides and their applications*. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 245-86.

MOTTA, G.J. Calcium alginate topical wound dressings: a new dimension in the cost-effective treatment for exudating dermal wounds and pressure sores.



*OstomyWoundManage*, Malvern, v. 25, p. 52–6, 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2610818>. Acesso em: 23 out. 2018.

NORAJIT, K.; KIM, K.M.; RYU, G.H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, London, 98, v. 3, 377–84, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026087741000021X>. Acesso em: 20 jan. 2019.

PATEL, H.A. *Process for preparing the alginate-containing wound dressing*. US5470576A. p. 470-576, 1993. Disponível em: <https://patentimages.storage.googleapis.com/70/1b/e9/519960388c1bbc/US5470576.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2018.

PAULRAJ, J.; GOVINDARAJAN, R.; PALPU, P. The genus *Spilanthes* ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological properties: a review. *Advances in Pharmacological Sciences*, London, v. 2013, ID 510298, 2013. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/aps/2013/510298/>. Acesso em: 23 nov. 2017.

PEREIRA, G.G.; GUTERRES, S. S.; BALDUCCI, A. G.; COLOMBO, P.; SONVICO, F. Polymeric films loaded with vitamin E and *Aloe vera* for topical application in the treatment of burn wounds. *BioMed Research International*, London, v. 24, ID 641590, 2014. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/641590/>. Acesso em: 29 dez. 2017.

PRACHAYASITTIKUL, V.; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: a review. *EXCLI Journal Experimental and Clinical Sciences*, Dortmund, v.12, p.291-312, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4827075/>. Acesso em: 12 set. 2017.

RIOS, M. R., OLIVO, H. F. Natural and synthetic alkylamides: applications in pain therapy. In: ATTA-UR-Rahman (Ed.). *Studies in natural products chemistry*. New York: Elsevier, 2014. p. 79–118.

RIOS, M. Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; GUTIERREZ, M. D. 2007. Analgesic activity of affinin, an alkalamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 110, n. 2, p. 364–367, Oct. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874106005010?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jul. 2018.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 59, n. 2, p.201-222, June 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239360/>. Acesso em: 14 dez. 2018.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B.R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, Amsterdam, 24, n. 8, 770-5, Nov./Dec. 2010. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X10000652>. Acesso em: 14 dez. 2018.

SMIDSROD, O.; SKJAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnology*, Amsterdam, v.8, p.71, 1990.

THOMAS, A.; HARDING, K. G.; MOORE, K. Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor. *Biomaterials*, Guildford, v. 21, n. 17, p. 1797–802, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961200000727?via%3Dihub>. Acesso em: 12 out. 2018

TIWARI, K. L.; JADHAV, S. K.; JOSHI, V. An updated review on medicinal herb of genus *Spilanthes*. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, Beijing, v.9, p.1170-9, 2011.

TROMMER, H.; NEUBERT, R. Overcoming the *Stratum corneum*: the modulation of skin penetration. *Skin Pharmacology and Physiology*, Basel, v. 19, n. 2, p. 106-121, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16685150>. Acesso em: 12 out. 2018.

TURBIANI, F. R. B. *Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de alginato de sódio reticulados com benzoato de cálcio*. 2007, 116f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

TURBIANI, F. R. B.; KIECKBUSCH, T. G.; GIMENES, M. L. Liberação de benzoato de cálcio de filmes de alginato de sódio reticulados com íons cálcio. *Revista Polímeros*, São Carlos, v. 21, p. 175-81, 2011. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-14282011000300004&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282011000300004&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 28 fev. 2019.

ZILBERMAN, M.; EGOZI, D.; SHEMESH, M.; KEREN, A.; MAZOR, E.; BARANES-ZEEVI, M. *et al.* Hybrid wound dressings with controlled release of antibiotics: structure-release profile effects and in vivo study in a guinea pig burn model. *Acta Biomaterialia*, Oxford, v. 22, p. 155–63, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706115002007?via%3Dihub>. Acesso em: 4 out. 2018.