

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

José Alberto Paris Junior

**FILMES BIOPOLIMÉRICOS DO MESOCARPO DE *Citrullus*
lanatus PARA USO COMO SUPORTE DE CLOREXIDINA**

Araraquara, SP

2024

José Alberto Paris Junior

**FILMES BIOPOLIMÉRICOS DO MESOCARPO DE *Citrullus
lanatus* PARA USO COMO SUPORTE DE CLOREXIDINA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Ap. Resende Nogueira

Coorientador: Prof. Dr. Hernane Barud da Silva

Araraquara, SP

2024

Ficha Catalográfica.

P259f Paris Junior, José Alberto

Filmes biopoliméricos do mesocarpo de *citrullus lanatus* para uso como suporte de clorexidina/José Alberto Paris Junior. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2024.

76f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal – UNIARA

Orientador: Profa. Dra. Flávia Aparecida Rezende Nogueira

1. Mesocarpo de melancia.
2. Filme de superfície antimicrobiana.
3. Materiais à base de biopolímeros.
4. Citotoxicidade.
5. Genotoxicidade. I. Título.

CDU 60

JOSÉ ALBERTO PARIS JUNIOR

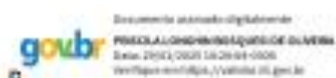
Tese apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 18 de dezembro de 2024.

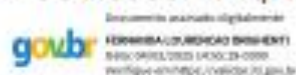
BANCA EXAMINADORA




Profª Drª FLÁVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA (Orientadora)
Universidade de Araraquara – UNIARA



Profª Drª BOSQUESI DE OLIVEIRA
Universidade de Araraquara – UNIARA



Profª Drª FERNANDA LOURENÇÃO BRIGHENTI
Universidade de Odontologia de Araraquara – UNESP


Prof. Dr. RODRIGO CASSIO SOLA VENEZIANI
Universidade de Franca – UNIFRAN


Profª Drª DENISE CRISPIM TAVARES
Universidade de Franca – UNIFRAN

Esta tese intitulada “**FILMES BIOPOLIMÉRICOS DO MESOCARPO DE *Citrullus lanatus* PARA USO COMO SUPORTE DE CLOREXIDINA**” foi realizada com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 - Número do Processo: 88887.614526/2021-00.

Dedico este trabalho ao Senhor meu Criador, que sempre esteve ao meu lado, orientando-me em todos os momentos de minha jornada e zelando por mim com Seu amor infindável. Expresso minha dedicatória à minha querida família Rute Guerra, Raquel Guerra e Isabela Martins que estiveram ao meu lado, proporcionando-me apoio para seguir adiante em minha trajetória acadêmica. Serei eternamente grato por tudo que fizeram por mim. Deixo esta dedicação, também, em memória dos meus saudosos avós Derovaldo e Isabel Guerra (In Memoriam), cujo amor, carinho e admiração permanecerão vivos em meu coração, mesmo que não estejam mais fisicamente presentes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao Senhor Jesus pela vida, amor e cuidado que sempre teve comigo e com minha família e por ter me guiado até aqui, muito obrigado Senhor.

Agradeço a minha família por todo amor e dedicação que tiveram comigo, agradeço a vocês por todas as lutas e esforços que fizeram para que eu chegasse até aqui e para que meu sonho se tornasse realidade.

Agradeço a minha mãe Rute S. Guerra, a minha tia Raquel S. Guerra e a minha Irmã Isabela M. Branco por tudo que fizeram e ainda estão fazendo por mim. Por fim, a minha saudosa avó, Isabel L. Guerra (In Memoriam), e ao meu cunhado, Matheus Crispim por toda amizade e parceria que tem comigo.

Agradeço ao grupo do Laboratório de Mutagênese e Toxicidade (LAMUT), à Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira, por todos os ensinamentos passados e por toda a paciência, apoio, orientação e confiança, também ao Dr. Hernane da Silva Barud por todos os ensinamentos compartilhados comigo, e a todos os alunos de Iniciação Científica (Paula, Isabela, Nicole e Mel).

Agradeço ao Lucas, meu amigo de pesquisa e de conhecimento que caminhou comigo durante essa jornada acadêmica. Ao Igor, agradeço por sempre trazer risadas para o laboratório, tornando o ambiente mais descontraído. Também expresso minha gratidão à Yasmim Valente, com quem, em pouco tempo, construí uma amizade sólida que levarei comigo.

Por fim, registro meu agradecimento à Lucimara e ao Marcelo pelos momentos de conversa e descontração que enriqueceram nosso convívio.

Também quero expressar meu agradecimento especial à Jéssica por toda amizade e companheirismo ao longo do tempo que compartilhamos no laboratório, tornando nossos encontros mais leves e divertidos.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – UNIARA por contribuir com a minha formação, ao Coordenador do Programa Prof. Dr. André Capaldo Amaral e as secretárias Sandra Pavanelli e Rosana Parize.

Agradeço à agência Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (Capes) pela bolsa e apoio financeiro (código de financiamento 001), além do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, nº 309371/2021-0) e Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Por fim, expresso minha gratidão aos amigos e colegas do Programa de Biotecnologia que estiveram comigo ao longo desses anos.

SÚMARIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3. 1 PRODUÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS DERIVADOS DO MESOCARPO DE MELANCIA CONTENDO CLOREXIDINA (M-CXD).....	23
3. 2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES M-CXD	24
3.2.1 <i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	24
3.2.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	24
3.2.3 <i>Análise térmica</i>	24
3.2.4 <i>Propriedades de Barreira</i>	24
3.2.5 <i>Medição do ângulo de contato aparente</i>	26
3.2.6 <i>Liberção de CXD</i>	26
3.2.7 <i>Avaliação das propriedades mecânicas</i>	27
3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	27
3.3.1 <i>Método de difusão em ágar</i>	27

3.3.2 Método de microdiluição em caldo	28
3.3.3 Linhagem celular e condições de cultivo	29
3.3.4 Ensaio de citotoxicidade em modelo celular 2D	30
3.3.5 Esferoides	31
3.3.6 Ensaio Cometa.....	32
3.3.7 Ensaio do micronúcleo (MN) com bloqueio da citocinese.....	33
3.3.8 Mutagenicidade - Ensaio de mutação gênica reversa com Salmonella Typhimurium (Teste de Ames).....	35
3.4 Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS	37
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	37
4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	47
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS	64
ANEXO.....	76

RESUMO

Resíduos de frutas e vegetais representam uma fonte promissora para a produção de filmes poliméricos funcionais, alinhando-se à necessidade urgente de substituir polímeros à base de petróleo devido a seus impactos ambientais e limitada sustentabilidade. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um filme biopolimérico antimicrobiano derivado do mesocarpo da melancia contendo clorexidina na forma de digluconato (M-CXD), com aplicabilidade para revestimento de superfícies 2D e dispositivos médicos. O processo de produção envolveu etapas hidrotérmicas e casting, seguido de caracterização por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura, análise térmica, propriedades de barreira à água, capacidade de manuseio de fluidos, ângulo de contato, cinética de liberação de fármacos, propriedades mecânicas, além de testes antibacterianos, citotóxicos e mutagênicos. Os filmes M-CXD apresentaram propriedades físico-químicas promissoras, ausência de atividade mutagênica pelo teste de Ames e atividade antibacteriana com zonas de inibição de crescimento bacteriano ao redor dos filmes M-CHX de $22,0 \pm 1,0$ mm para *Staphylococcus aureus*, $15,3 \pm 1,5$ mm para *Pseudomonas aeruginosa* e $17,3 \pm 0,7$ mm para *Escherichia coli*, potencial que foi confirmado por ensaios de microdiluição. No entanto, foi observada citotoxicidade significativa em monocamadas de células e modelos tridimensionais, com redução da viabilidade celular em concentrações de eluatos a partir de 6,25% nos ensaios 2D e 12,5% nos ensaios 3D. Além disso, os ensaios Cometa e de Micronúcleos evidenciaram danos ao DNA e aumento significativo na frequência de micronúcleos em queratinócitos (células HaCaT) expostos às concentrações de 6,25% e 12,5% de eluato. Embora os filmes M-CXD demonstrem elevado potencial antimicrobiano, seus efeitos citotóxicos e genotóxicos destacam a necessidade de cautela no uso direto sobre a pele. Assim, os resultados obtidos indicam que esses biopolímeros são promissores para aplicações extracorpóreas que demandam inibição do crescimento microbiano, contribuindo para a crescente demanda por materiais sustentáveis e de alto desempenho.

Palavras-chave: Mesocarpo de melancia; filme de superfície antimicrobiana; materiais à base de biopolímero; citotoxicidade; genotoxicidade.

ABSTRACT

Fruit and vegetable residues represent a promising source for the production of functional polymeric films, addressing the urgent need to replace petroleum-based polymers due to their environmental impact and limited sustainability. In this context, the present study aimed to develop an antimicrobial biopolymer film derived from watermelon mesocarp containing chlorhexidine digluconate (M-CXD), with applicability for coating 2D surfaces and medical devices. The production process involved hydrothermal and casting steps, followed by characterization through Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy, thermal analysis, water barrier properties, fluid handling capacity, contact angle, drug release kinetics, mechanical properties, and antibacterial, cytotoxic, and mutagenic tests. The M-CXD films exhibited promising physicochemical properties, absence of mutagenic activity in the Ames test, and antibacterial activity, with bacterial growth inhibition zones of 22.0 ± 1.0 mm for *Staphylococcus aureus*, 15.3 ± 1.5 mm for *Pseudomonas aeruginosa*, and 17.3 ± 0.7 mm for *Escherichia coli*, which was confirmed by microdilution assays. However, significant cytotoxicity was observed in cell monolayers and three-dimensional models, with reduced cell viability at eluate concentrations starting from 6.25% in 2D assays and 12.5% in 3D assays. Additionally, the Comet and Micronucleus assays revealed DNA damage and a significant increase in micronucleus frequency in keratinocytes (HaCaT cells) exposed to eluate concentrations of 6.25% and 12.5%. Although M-CXD films demonstrate high antimicrobial potential, their cytotoxic and genotoxic effects highlight the need for caution in direct skin applications. Thus, the results indicate that these biopolymers are promising for extracorporeal applications requiring microbial growth inhibition, contributing to the growing demand for sustainable and high-performance materials.

Keywords: Watermelon mesocarp; antimicrobial surface film; biopolymer-based materials; cytotoxicity; genotoxicity.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABS – Absorvência;

AMH – Ágar Mueller-Hinton;

ATR – Modo de reflectância total atenuada;

CDX – Clorexidina;

CMF – Capacidade de manuseio de fluidos;

CMH – Caldo Mueller-Hinton;

CN – Controle negativo;

CO₂ – Dióxido de carbono;

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

FTIR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier;

HaCaT – Queratinócitos humanos imortalizados;

IACS – Infecções associadas a cuidados da saúde;

IBPC – Índice de proliferação com bloqueio de citocinese;

IM – Índice de mutagenicidade;

KCl – Cloreto de potássio;

M – Filme do mesocarpo da melancia;

M-CXD – Filme do mesocarpo da melancia contendo clorexidina;

MEV – Microscopia eletrônica de varredura;

MN – Ensaio do micronúcleo;

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio;

PBS – *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato);

PVA – Permeabilidade ao vapor d'água;

ROS – *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigênio);

TTVA – Taxa de transmissão de vapor d'água;

TTVU – Taxa de transmissão de vapor de umidade;

UAF – Unidades arbitrárias de fluorescência;

UR – Umidade relativa.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fotomicrografia da linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados (células HaCaT)	30
Figura 2. Imagens digitais de (A) biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e (B) biopolímero M contendo CXD (M-CXD)	38
Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura da superfície e do corte transversal do (1A-C) biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e (2A-C) biopolímero M contendo CXD (M-CXD). Especificamente, A e B são da superfície (resolução de 50 e 20 μm , respectivamente) e C é do corte transversal (resolução de 20 μm)	39
Figura 4. Espectros infravermelhos do (-) biopolímero do mesocarpo da melancia (M), (-) CXD e (-) biopolímero M contendo CXD (M-CXD).....	41
Figura 5. Curvas TG/DTG do (A) biopolímero do mesocarpo da melancia sem CXD (M) e (B) biopolímero M contendo CXD (M-CXD).....	42
Figura 6. (Esquerda) Cinética de permeação de vapor d'água através do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e (B) biopolímero M contendo CXD (M-CXD); (Direita) Propriedades de manuseio de fluidos dos filmes M, M-CXD e Allevyn	43
Figura 7. Média e desvio padrão das medidas do ângulo de contato com a superfície do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD).....	44
Figura 8. Perfil de liberação de clorexidina (CXD) do biopolímero do mesocarpo de melancia contendo CXD (M-CXD) ao longo do tempo,	

mostrando a porcentagem de fármaco liberado em vários intervalos de tempo.... 46

Figura 9. Porcentagem de crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* em resposta a tratamentos com diferentes concentrações de eluatos do biopolímero do mesocarpo de melancia (M) contendo CXD (M-CXD)..... 49

Figura 10. Viabilidade celular (%) da linhagem HaCaT após 24 horas de tratamento com eluatos do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD)..... 50

Figura 11. Efeitos do tratamento com eluatos do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD) em modelo 3D in vitro de esferoides multicelulares de células HaCaT. (A) A viabilidade dos esferoides foi determinada pelo ensaio Alamar Blue após 24 h de tratamento. (B) Cinética de crescimento da área de esferoides de células HaCaT. As medições foram realizadas no tempo 0 e após 24 e 48 horas de tratamento com eluatos de M-CXD sem renovação do meio de cultivo. (C) Os esferoides foram examinados usando microscópio invertido (amplificação 200×), barra de escala = 100 µm..... 52

Figura 12. Efeito genotóxico do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD) em células HaCaT. (A) Imagens representativas do ensaio do cometa em células HaCaT tratadas com eluatos de filmes M e M-CXD por 24 horas. As imagens foram adquiridas utilizando microscopia de fluorescência com ampliação total de 400× (barra de escala = 20 µm). (B) O gráfico representa a intensidade da cauda (%), que está diretamente correlacionada com o DNA danificado..... 56

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Dados das curvas TG/DTG do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD).....	42
Tabela 2. Resultados dos ensaios mecânicos do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD).....	47
Tabela 3. Atividade antibacteriana do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD) pelo método de difusão em ágar.....	48
Tabela 4 Avaliação mutagênica do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD) nas cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102 de <i>Salmonella</i> Typhimurium, na presença e ausência de ativação metabólica (S9)	55
Tabela 5. Frequência de micronúcleos (MNs) e índice de proliferação com bloqueio de citocinese (IPBC) em células HaCaT após 24 horas de tratamento com eluatos do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD)	58

1. INTRODUÇÃO

A clorexidina (CXD), na forma de digluconato, acetato ou cloridrato, é a principal forma de antisséptico da classe das biguanidas. A CXD é um biguanídeo catiônico desenvolvido no Reino Unido na década de 1940, e todas as suas formas são solúveis em água (Abbood et al., 2023). É amplamente utilizado como um antisséptico e agente antimicrobiano de amplo espectro contra bactérias, fungos e certos protozoários para desinfecção em ambientes clínicos, abrangendo desinfecção de superfícies, pele e tecidos mucosos (Wei et al., 2019; Facciola et al., 2019; Deus; Ouanounou, 2022). Estudos também relataram as aplicações da CXD para banhos, curativos e impregnação de dispositivos médicos, como cateteres (Wei et al., 2019; Abbood et al., 2023). Além disso, a CXD tem ampla aplicação na odontologia, sendo comparada com outros agentes contra gengivite e utilizada no tratamento de doenças periodontais como enxaguante bucal e pasta de dentes, além de géis, vernizes e sprays. Sua eficácia pode ser atribuída aos seus efeitos bactericidas e bacteriostáticos, dependendo da concentração, e à sua substantividade na cavidade oral (Jones, 2000; Thangavelu et al., 2020; Brookes et al., 2020; Deus; Ouanounou, 2022; Abbood et al., 2023).

A carga negativa em certas superfícies biológicas, como o estrato córneo e na maioria das superfícies orais, incluindo membranas mucosas, dentes e glicoproteínas salivares, facilita a aderência eficaz das moléculas de CXD devido à sua natureza catiônica. Essa aderência permite a substantividade da CXD, caracterizada pela sua capacidade de permanecer ligada em sua forma ativa, atuando como um reservatório e prolongando seu efeito bactericida (Macias et al., 2013; Deus; Ouanounou, 2022).

Em relação ao potencial antibacteriano, devido às suas propriedades hidrofóbicas e lipofílicas, a carga positiva da CXD interage com as superfícies das

células bacterianas carregadas negativamente, que contêm grupos fosfato e sulfato (membranas celulares bacterianas). Ela penetra através da parede celular bacteriana por difusão passiva e compromete a barreira de permeação na membrana celular bacteriana. Conseqüentemente, o fluxo de moléculas de baixo peso molecular e componentes citoplasmáticos do microrganismo, incluindo íons potássio, leva à inibição de certas enzimas associadas à membrana citoplasmática. Nesse ponto, a CXD exibe atividade bacteriostática, que pode ser revertida após a remoção. No entanto, uma concentração sustentada ou elevada de CXD ao longo do tempo leva a danos celulares irreversíveis e ação bactericida. Durante a fase bactericida, ocorre a coagulação e precipitação citoplasmática por meio da formação de complexos com compostos fosforilados, como o trifosfato de adenosina e ácidos nucleicos (Wei et al., 2019; Deus; Ouanounou, 2022; Facciola et al., 2019). Esse processo atinge o efeito máximo em 20 segundos, seguido por um efeito residual que impede o crescimento microbiano. Sua eficácia é mantida mesmo em concentrações baixas (Deus; Ouanounou, 2022).

Embora o impacto substantivo da CXD tenha sido demonstrado principalmente na pele e na endodontia, o efeito residual é uma característica dos antissépticos. Alvarez et al., (2016) mostrou que a CXD pode inibir a recontaminação das membranas de estetoscópios, ajudando potencialmente na prevenção de infecções cruzadas. Hong et al. (2013) demonstrou a atividade residual desinfetante da CXD-álcool por até 24 horas em conectores sem agulha.

Dado que as infecções associadas a cuidados de saúde (IACS) representam uma preocupação significativa para a saúde pública global (Facciola et al., 2019), a importância do ambiente hospitalar foi recentemente reavaliada nos esforços de prevenção e controle de infecções (Peters et al., 2022), o que pode aumentar a morbidade, prolongar a permanência hospitalar e representar um grande ônus financeiro

para os sistemas de saúde (Bryant et al., 2022; Peters et al., 2022). Está bem documentado que os principais agentes etiológicos das infecções associadas a cuidados de saúde podem persistir por meses ou até anos em superfícies ambientais, servindo como reservatórios eficientes (Álvarez et al., 2016).

As IACS abrangem infecções que ocorrem em ambientes de internação ou ambulatoriais dentro de 48 horas após a hospitalização, 30 dias após receber cuidados de saúde ou até 90 dias após certos procedimentos cirúrgicos. As populações mais vulneráveis são pacientes imunocomprometidos, como aqueles em tratamento de transplante ou quimioterapia, neonatos e pacientes gravemente enfermos em unidades de queimados ou unidades de terapia intensiva (Liu; Dickter, 2020; Lemiech-Mirowska et al., 2021).

Os esforços para reduzir a propagação de microrganismos patogênicos em hospitais envolvem estratégias abrangentes, reconhecendo o papel das superfícies contaminadas e das mãos dos profissionais de saúde na transmissão (Facciola et al., 2019; Lemiech-Mirowska et al., 2021; Weber et al., 2023).

Além dos métodos convencionais de limpeza, as tecnologias atuais de superfícies antimicrobianas em ambientes de saúde adotam estratégias para prevenir ou reduzir a contaminação microbiana, como a incorporação de biocidas para liberação ou morte dependente de contato, abordagens antiaderentes ou uma combinação de ambas (Bryant et al., 2022).

Nanopartículas e compostos metálicos, como prata, cobre, ouro, zinco, titânio e alumínio, além de nanomateriais não metálicos, como grafeno, nanotubos de carbono, sílica e quitosana, têm demonstrado grande potencial em terapias antimicrobianas. Esses nanomateriais podem atuar de diferentes maneiras, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio, a liberação de íons com ação antimicrobiana ou a participação em

reações bioquímicas específicas. Além disso, superfícies com nanotopografias modificadas tornam-se fisicamente hostis às bactérias, promovendo sua destruição por meio de danos biomecânicos. Apesar de suas amplas possibilidades de aplicação na engenharia médica, ainda existem preocupações relevantes relacionadas à segurança desses materiais, principalmente no que diz respeito à toxicidade e aos possíveis efeitos de longo prazo, o que representa um desafio em ambientes de saúde (Reshma et al., 2017; Butler et al., 2023).

Diante do exposto, produzimos um filme de superfície com atividade antimicrobiana utilizando biopolímeros obtidos do mesocarpo da melancia contendo CXD na forma de digluconato (M-CXD). Os revestimentos obtidos podem ser aplicados em superfícies 2D e dispositivos médicos para hospitais e instalações de saúde. Os filmes foram produzidos sem plastificantes, são flexíveis, uniformes e fáceis de processar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir, caracterizar e avaliar filmes biopoliméricos com potencial antimicrobiano utilizando o mesocarpo da melancia (M) e digluconato de clorexidina (M-CXD), com potencial aplicação para revestimento de superfícies 2D e dispositivos médicos.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os filmes M e M-CXD com base em diferentes análises, incluindo espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura, perfil de estabilidade térmica, propriedades de barreira à água, capacidade de manuseio de fluidos, ângulo de contato, liberação de fármacos e propriedades mecânicas.
- Determinar a atividade antimicrobiana dos filmes M e M-CXD frente à bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* e às bactérias Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*;
- Avaliar a viabilidade celular das linhagens HaCaT, após o tratamento com diferentes concentrações dos eluatos dos filmes M e M-CXD em monocamadas de células e em modelos celulares tridimensionais;
- Avaliar a atividade genotóxica dos filmes M e M-CXD, por meio do teste do cometa;
- Avaliar a atividade mutagênica dos filmes M e M-CXD, em nível cromossômico e gênico, por meio do ensaio do micronúcleo (MN) com bloqueio da citocinese e ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella Typhimurium* (teste de Ames), respectivamente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1. Produção de filmes poliméricos derivados do mesocarpo de melancia contendo clorexidina (M-CXD)

Os filmes M-CXD foram preparados a partir do purê do mesocarpo (parte branca) da melancia (*Citrullus lanatus*, var. Crimson Sweet) através de um processo ecológico, sem plastificantes e solventes orgânicos, utilizando etapas hidrotérmicas e *casting* (Dias et al., 2020). Resumidamente, após lavagem e sanitização, o mesocarpo da melancia foi autoclavado a 121°C sob uma pressão de 1,2 kgf/cm² por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, a polpa resfriada foi processada usando um dispersor Ultra Turrax (IKA T18) por 10 minutos a 7.000 rpm. Após obter a massa seca usando uma balança de infravermelho, a polpa foi diluída em água MilliQ até alcançar uma concentração de 1% (m/v). A CXD (digluconato) (2% m/v) foi adicionada a uma proporção de 1 µL por grama de polpa úmida de mesocarpo de melancia contendo 1% de massa seca e misturada por 5 minutos a 400 rpm. Toda a mistura (30 g) foi então despejada em uma placa de Petri (Kasvi, 80x15 mm) e seca em uma capela de fluxo laminar à temperatura ambiente com circulação de ar até que os filmes se desprendessem. Filmes controle foram preparados seguindo o mesmo procedimento descrito para os filmes M-CXD, com a única diferença de que a CXD não foi incorporada. Esses filmes, nomeados filmes M, foram utilizados para comparações subsequentes.

3. 2. Caracterização dos filmes biopoliméricos

3.2.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos químicos dos filmes M-CXD foram identificados usando FTIR no modo de reflectância total atenuada (ATR) com um espectrômetro Hyperion 2000 (Bruker, Alemanha). Os espectros foram registrados de 4000 a 400 cm^{-1} com 32 varreduras a uma resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os filmes M-CXD foram analisados morfologicamente usando MEV (JEOL JSM-IT500HR, Musashino, Tóquio, Japão). Para esta análise, os filmes foram fraturados em nitrogênio líquido, e as condições experimentais foram ajustadas para 20 kV com modo de elétrons retroespalhados secundários. Os filmes foram revestidos com carbono para aumentar a densidade eletrônica do material.

3.2.3 Análise térmica

O Comportamento térmico dos filmes M-CXD foi registrado usando um analisador térmico SDT Q600 Simultaneous DSC-TGA (TA Instruments, New Castle, DE, EUA) em uma atmosfera de nitrogênio, com uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de ambiente até 600 $^{\circ}\text{C}$.

3.2.4 Propriedades de Barreira

Os parâmetros analisados foram o coeficiente de permeabilidade (α), a taxa de transmissão de vapor d'água (TTVA) e a permeabilidade ao vapor d'água (PVA). Para a

determinação da TTVA, frascos contendo 5 g de CaCl₂ anidro foram selados com amostras circulares dos filmes (diâmetro = 15 mm) e submersos em um reator contendo uma solução aquosa de NaCl a 30 ± 2 °C por 8 horas. A TTVA foi calculada de hora em hora usando a equação (1), onde α representa a massa de umidade permeada (g h⁻¹) e A é a área da amostra (m²).

$$TTVA = \frac{\alpha}{A} \quad (1)$$

A PVA foi calculada seguindo um método de copo gravimétrico modificado com base na norma ASTM E96M-16 (Dias et al., 2016), considerando a espessura do filme (e) e as condições de umidade relativa (UR, aproximadamente 75%) e pressão de vapor (P_v: 31,824 mmHg) (McHugh et al., 1993), conforme mostrado na equação (2):

$$PVA = \frac{100 \times TTVA \times e}{P_v \times UR} \quad (2)$$

A capacidade de manuseio de fluidos (CMF) foi determinada pela absorvência (ABS) e pela taxa de transmissão de vapor de umidade (TTVU), avaliadas usando copos Paddington modificados de acordo com a norma EN 13726-1. Os filmes foram colocados nos copos, e uma solução salina (20 mL) foi adicionada. Após 24 horas a 37 °C, os copos foram pesados para calcular a TTVU (equação 3) e a ABS (Equação 4), com a CMF calculada como a soma da TTVU e da ABS (Equação 5).

$$TTVU = \frac{(x-y)}{\text{tempo} \times \text{área do filme}} \quad (3)$$

onde “x” é o peso do copo Paddington com o filme e a solução salina (conjunto), e “y” é o peso do conjunto após permanecer invertido dentro da câmara climática por 24 horas.

$$ABS = \frac{(b-a)}{\text{tempo} \times \text{área do filme}} \quad (4)$$

onde “a” é o peso do copo Paddington com o filme, e “b” é o peso do conjunto após a remoção da solução salina.

$$CMF = TTVU + ABS \quad (5)$$

3.2.5 Medição do ângulo de contato aparente

A molhabilidade dos filmes M-CXD foi determinada utilizando um goniômetro (modelo 260 F4, Ramé-Hart, Succasunna, NJ, EUA). O experimento foi realizado em modo estático, empregando água destilada como líquido de referência. As medições foram processadas automaticamente pelo software DROPimage Advanced V2.7 e os resultados foram expressos como a média e desvio padrão de nove diferentes medições após a deposição da gotícula de água sobre a superfície dos filmes. O experimento foi realizado em triplicata.

3.2.6 Liberação de CXD

Os testes de liberação de CXD foram realizados utilizando filmes de M-CXD com dimensões de 4 × 4 cm (0,21 g). As amostras foram submetidas à agitação em um dissolutor Ethik modelo 299-1D, com 400 mL de PBS (pH 7,4) como meio receptor, mantido a 37 °C. Alíquotas de 1 mL foram coletadas em intervalos regulares ao longo de 2880 minutos e analisadas por espectrofotometria UV-Vis. Os experimentos foram

realizados em triplicata, e os dados obtidos foram avaliados utilizando os modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Peppas-Korsmeyer e Hixon-Crowell, conforme descrito por Bruschi (2015).

3.2.7 Avaliação das propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes M-CXD foram analisadas através de testes de tração uniaxial, realizados em um TAXT PLUS (Stable Micro Systems) equipado com uma célula de carga de 18 N. Os filmes biopoliméricos com dimensões aproximadas de 100 mm × 25 mm, foram previamente condicionadas a 25 °C e 50% de umidade relativa (UR) por 48 horas antes de serem submetidas a um alongamento com uma taxa de 0,1% min⁻¹. A espessura dos filmes, medida com um micrômetro digital (modelo IP 65, Mitutoyo Manufacturing, Japão) com precisão de 0,001 mm, foi utilizada para o cálculo da resistência à tração e do módulo de Young. O alongamento na ruptura também foi determinado.

3.3 Ensaio biológicos

3.3.1 Método de difusão em ágar

A atividade antimicrobiana dos filmes M-CXD foi avaliada contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853) por contato do filme sobre o inóculo bacteriano em ágar. Resumidamente, o inóculo com 1,0 x 10⁸ unidades formadoras de colônias/ mL (UFC/mL) de cada bactéria foi espalhado uniformemente sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton (AMH) usando um swab estéril. Em seguida, discos de 6 mm de diâmetro dos filmes poliméricos, previamente expostos à radiação ultravioleta

germicida (UV-C 254 nm) para garantir esterilidade, foram aplicados sobre o ágar com o auxílio de uma pinça. Uma amostra de cada filme foi colocada na superfície do AMH sem inóculo bacteriano para confirmar a ausência de contaminação microbiana. Para inibir o crescimento microbiano, discos de papel filtro estéreis impregnados com 2% de CXD foram usados como controle positivo, enquanto água deionizada estéril foi usada como controle negativo. Após o tratamento, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em uma estufa bacteriológica, e a presença ou ausência de um halo de inibição do crescimento microbiano foi verificada, medida em milímetros usando um paquímetro. Os testes foram realizados em triplicata.

3.3.2 Método de microdiluição em caldo

O teste de microdiluição foi realizado conforme estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI com modificações. Primeiramente, os poços de uma microplaca de 96 poços foram preenchidos com 80 µL de caldo Mueller-Hinton (CMH). A diluição seriada dos eluatos, preparados em CMH, foi realizada diretamente na microplaca, resultando em concentrações que variaram de 0,8% a 50% v/v. Os eluatos foram preparados usando filmes com uma área de superfície de 6 cm² incubados em 1 mL de CMH a 37°C com agitação por 24 horas. Em seguida, 20 µL de suspensões bacterianas ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL) foram distribuídos em cada poço. Os testes incluíram um controle positivo (CXD, 2%), controle de crescimento bacteriano/controlado negativo (sem tratamento) e controles de cor e esterilidade do meio e dos eluatos, onde o inóculo bacteriano não foi adicionado. Após incubar as microplacas a 37°C por 24 horas em uma estufa bacteriológica, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 620 nm. Os experimentos foram conduzidos em triplicata. A determinação da viabilidade bacteriana para cada microrganismo foi calculada pela média da absorbância dos poços contendo

diferentes concentrações dos eluatos subtraída do valor de absorbância obtido para cada concentração do eluato sem a adição do inóculo, fornecendo assim o valor real de absorbância das bactérias sem interferência das amostras testadas. O resultado obtido foi então convertido em uma porcentagem estimada de viabilidade bacteriana, usando o valor médio de absorbância dos poços de controle de crescimento (controle negativo) como 100% de viabilidade. O critério experimental foi a significância da resposta ao tratamento em relação ao controle de crescimento bacteriano.

3.3.3 *Linhagem celular e condições de cultivo*

A linhagem celular utilizada neste estudo foi de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT, PCS-200-011, Figura 1). As células HaCaT foram mantidas em monocamada em frascos de cultura (Corning) a 37°C em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) e 95% de ar sob umidade saturada, em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (meio DMEM - Gibco Waltham, Massachusetts, EUA) constituído de 4,5 g/L de glicose e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), suplementado com 1% de solução antibiótica-antimicótica (5 mg/mL de penicilina, 5 mg/mL de estreptomicina e 10 mg/mL de neomicina) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB - Gibco Waltham, Massachusetts, EUA).

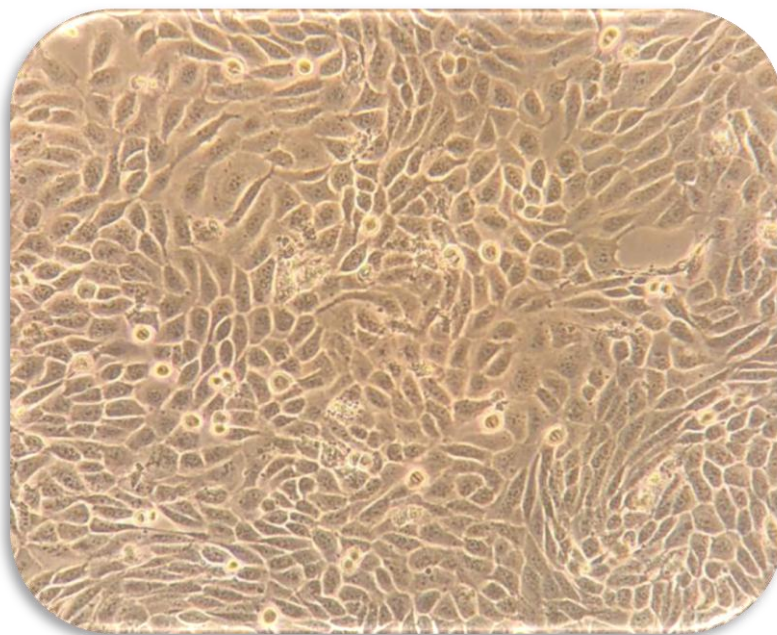


Figura 1. Fotomicrografia da linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados (células HaCaT). A imagem foi obtida em microscópio invertido em aumento de 20x. **Fonte:** Próprio autor.

3.3.4 Ensaios de citotoxicidade em modelo celular 2D

A viabilidade das células HaCaT foi avaliada usando o ensaio baseado na redução de resazurina, seguindo o método descrito por Page et al., (1993). A resazurina, um corante azul não fluorescente, é irreversivelmente reduzida à resorufina, de cor rosa altamente fluorescente, por enzimas desidrogenases apenas em células metabolicamente ativas (Rampersad, 2012).

Para a realização do ensaio, as células foram semeadas em microplacas de 96 poços em uma densidade inicial de $1,0 \times 10^4$ células/poço e incubadas por 24 horas sob condições padronizadas (5% de CO_2 a 37°C e 95% de umidade) para adesão celular. Diluições seriadas dos eluatos, variando de 6,25% a 100% v/v, foram preparadas diretamente nas microplacas (6 cm^2 de filmes/ 1 mL de meio DMEM/ 37°C / com agitação por 24 horas) (ISO 10993-12, 2007). Controles negativos (meio de cultura

completo) e positivos (50% de dimetilsulfóxido, DMSO) foram incluídos. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. Após 24 horas de tratamento, o meio de cultura foi removido e 50 µL de solução de resazurina a 0,01% (p/v) foi adicionado a cada poço, seguido por 4 horas de incubação. A intensidade da fluorescência foi medida usando um espectrofotômetro de fluorescência Synergy H1 (BioTek®) com filtros de excitação e emissão em comprimentos de onda de 560 nm e 590 nm, respectivamente. A intensidade da fluorescência foi registrada em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF), considerando-se as UAF das células não tratadas (controle negativo) como 100%. O critério experimental foi a significância da resposta ao tratamento em relação ao controle negativo.

3.3.5 Esferoides

Esferoides de células HaCaT foram cultivados em placas de 96 poços previamente revestidas com meio DMEM e 1,5% de agarose. Após a solidificação do meio, a formação dos esferoides foi iniciada pela adição de 200 µL de meio DMEM contendo 7×10^3 células HaCaT em cada poço. Estruturas esferoidais estáveis foram observadas após cinco dias de cultivo. Em seguida, os esferoides foram expostos aos eluatos dos filmes M e M-CXD em cinco diferentes concentrações de eluatos, variando de 3,1% a 50% v/v, por um período de 24 horas. Ao final do tratamento, a viabilidade celular dos esferoides foi determinada pela adição de 100 µL de solução de resazurina (0,1 mg/mL). Após 12 horas de incubação, a placa foi lida em um espectrofotômetro (560Ex/590Em). O critério experimental foi a significância da resposta ao tratamento em relação ao controle negativo (células não tratadas).

Para investigar possíveis alterações morfológicas após os tratamentos com eluatos dos filmes M-CXD, outros esferoides foram incubados em estufa com CO₂ e sua

integridade foi monitorada por meio de imagens adquiridas em microscópio óptico nos tempos 0, 24 e 48 horas. Esferoides sem tratamento foram utilizados como controle negativo. A metodologia de análise seguiu as recomendações de Friedrich et al. (2009) e Vinci et al. (2012), que envolvem a captura de imagens individuais de cada esferoide e a medição subsequente com o software ImageJ.

3.3.6 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado seguindo o protocolo descrito por Tice et al. (2000). As células HaCaT foram cultivadas em placas de 6 poços na concentração inicial de 1×10^5 células/poço e expostas aos controles experimentais com meio de cultura completo, correspondendo ao controle negativo e peróxido de hidrogênio (50 μM) como controle positivo, bem como concentrações dos eluatos dos filmes (6 cm^2 de filme/mL de meio DMEM, 37°C, com agitação por 72 horas): 3,1 a 12,5% v/v para o filme M-CXD e 12,5 a 50% v/v para o filme M.

Após 24 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos e lavadas duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS, *phosphate buffered saline*, pH ~ 7,4). O *pellet* celular foi então homogeneizado com 200 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%, Invitrogen®). Cada 100 μL dessa suspensão foi aplicado em uma lâmina pré-revestida com agarose de ponto de fusão normal (1,5%, Invitrogen® □). As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a 4°C por 10 minutos.

Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram incubadas em uma solução de lise recém-preparada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, pH 10) a 4°C por 18 horas, protegidas da luz. Subsequentemente, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em água

destilada gelada e imersas em um tampão de eletroforese alcalina (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 13) em um banho de gelo por 20 minutos para desnaturar o DNA.

A eletroforese foi conduzida nessa mesma solução a 4°C por 20 minutos, aplicando uma corrente elétrica de 25V e 300mA. As lâminas foram então transferidas para um tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos e fixadas em etanol absoluto por 5 minutos.

Para a análise, as lâminas foram coradas com GelRed™ (Biotium Inc., Fremont, CA, EUA) (GelRed/PBS; 1:10.000 µL v/v). Nucleoides foram visualizados usando um microscópio de fluorescência (Leica MDi8, Wetzlar, Alemanha), com filtro de excitação de 516-560 nm e filtro de barreira de emissão de 590 nm, na objetiva de 20×. 100 nucleoides aleatórios foram analisados para cada tratamento, e a fluorescência da cauda foi quantificada usando o software Comet Score versão 2.0.0.38 (TriTek, Sumerduck, VA). O critério experimental foi a significância da resposta ao tratamento em relação ao controle negativo.

3.3.7 Ensaio do micronúcleo (MN) com bloqueio da citocinese

O ensaio de MN foi realizado com base no protocolo proposto por Fenech (2007), com adaptações, utilizando células HaCaT após 24 horas de tratamento. As células foram cultivadas em placas de seis poços, com uma densidade inicial de 1×10^5 células por poço. Após um período de 24 horas para a adesão celular, os tratamentos foram aplicados. As concentrações dos eluatos testados variaram de 12,5% a 3,1% v/v para os filmes M-CXD, e de 50% a 12,5% v/v para os filmes M. Os controles experimentais consistiram em meio de cultura completo (controle negativo) e peróxido de hidrogênio (100 µM).

Ao final do período de tratamento, o meio contendo as amostras foi substituído por novo meio de cultura isento de tratamento, e 20 µL de citocalasina B (3,0 µg/mL) foram adicionados a cada poço para inibir a citocinese. As células permaneceram incubadas por mais um ciclo e meio de divisão celular.

Em seguida, as células foram submetidas à tripsinização e centrifugadas a 900 rpm por 5 minutos. O sedimento celular foi ressuspenso em 3 mL de solução hipotônica gelada de cloreto de potássio (KCl 0,075M, Sigma) e centrifugado novamente. O sedimento foi então ressuspenso duas vezes em 5 mL de solução fixadora de metanol e ácido acético (3:1). Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a suspensão celular foi gotejada sobre lâminas limpas, previamente mantidas em água destilada gelada.

Após a secagem das lâminas, as células foram coradas com Giemsa, lavadas com água destilada e deixadas secar em temperatura ambiente para posterior análise em microscópio óptico com objetiva de 40x. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Um total de 3000 células binucleadas viáveis foram examinadas por tratamento (1000 células por tratamento, por repetição). A identificação dos micronúcleos foi feita com base nos critérios de Fenech (2007). Além disso, foram contadas 500 células viáveis por repetição entre mononucleadas, binucleadas e multinucleadas (três ou mais núcleos) para o cálculo do índice de proliferação com bloqueio de citocinese (IPBC). Este índice, que avalia a toxicidade celular ou atrasos no ciclo celular, foi calculado conforme a equação descrita pela OECD (2016):

$$IPBC = \frac{[(\text{céls mononucleadas}) + 2(\text{céls binucleadas}) + 3(\text{céls multinucleadas})]}{\text{número total de céls viáveis}}$$

3.3.8 Ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella Typhimurium* (Teste de Ames)

O teste de Ames foi realizado conforme o método de pré-incubação descrito por Maron; Ames (1983). Foram utilizadas cepas mutantes TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. Typhimurium*, tanto na presença quanto na ausência da fração S9, que é usada para ativação metabólica. A fração microsomal, adquirida comercialmente em forma liofilizada da Molecular Toxicology, foi preparada a partir de fígado de ratos Sprague Dawley tratados previamente com Aroclor 1254 e enriquecida com cofatores. A verificação periódica dos genótipos das cepas bacterianas, fornecidas pelo laboratório do Dr. Bruce Ames (Universidade de Berkeley, Califórnia, EUA), foi realizada para garantir sua autenticidade. As cepas bacterianas foram cultivadas em caldo nutriente (Oxoid nº 2) por 14 horas a 37°C sob agitação até atingirem uma densidade de $1-2 \times 10^9$ UFC/mL.

Nos ensaios, foram misturados em tubos de ensaio 500 µL da mistura S9 (ou 500 µL de tampão fosfato), 100 µL da cultura bacteriana, e diferentes concentrações de eluatos de filmes biopoliméricos (variando de 12,5 a 100 µL/placa). A incubação dessa mistura ocorreu por 20 minutos antes de ser adicionada a 2 mL de ágar superficial (top agar) suplementado com histidina e biotina. Os eluatos foram preparados a partir de filmes M-CXD com área de superfície de 6 cm², incubados em 5 mL de DMSO a 37°C, com agitação por 72 horas. Esta concentração foi selecionada devido ao efeito bactericida da CXD. Eluatos de filmes sem CXD foram preparados de forma semelhante, mas utilizando de 1 mL de DMSO.

Após a incubação, a mistura dos tubos foi distribuída sobre placas contendo ágar mínimo glicolisado e incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias revertentes foram contadas manualmente com auxílio de um contador de colônias. Os controles positivos utilizados incluíram 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (para TA98 e TA97a), azida sódica (para

TA100), e mitomicina C (para TA102) em ensaios sem ativação metabólica. Para os ensaios com ativação metabólica, os agentes 2-antramine (para TA98, TA97a e TA100) e 2-aminofluoreno (para TA102) foram usados. DMSO (100 µL/placa) foi utilizado como controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Além da análise estatística dos dados, o índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, sendo definido como a razão entre o número médio de revertentes induzidos pela amostra-teste e o número médio de revertentes do controle negativo (DMSO). A amostra foi considerada mutagênica se houvesse uma relação dose-resposta e/ou se o IM fosse igual ou superior a dois em pelo menos uma das concentrações testadas (Mortelmans; Zeiger, 2000).

3.4. Análise estatística

Os dados obtidos dos ensaios biológicos, com exceção do teste de Ames foram analisados estatisticamente pelo software Graph Pad Prism 7.0 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) utilizando análise de variância One way ANOVA para determinar as significâncias estatísticas, seguida pelo teste de Tukey considerando $p < 0,05$. Os resultados do teste de Ames foram analisados utilizando o software estatístico Salanal (Agência de Proteção Ambiental dos EUA, Laboratório de Sistemas de Monitoramento, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Instituto de Pesquisa Triangle, RTP, Carolina do Norte, EUA), seguindo o modelo de Bernstein et al., (1982). A análise dos dados (revertentes/placa) foi feita por ANOVA, seguida de regressão linear.

4. RESULTADOS

Parte dos resultados obtidos neste estudo foram publicados no periódico *Waste and Biomass Valorization* (DOI: 10.1007/s12649-024-02765-0) (ANEXO).

4.1 Caracterização dos filmes

Macroscopicamente, a inclusão de CXD não induziu alterações notáveis nas características morfológicas dos filmes do mesocarpo de melancia (M). Esses filmes (M e M-CXD) apresentaram uma tonalidade acastanhada devido ao tratamento térmico, superfícies homogêneas e certa transparência (Figura 2).

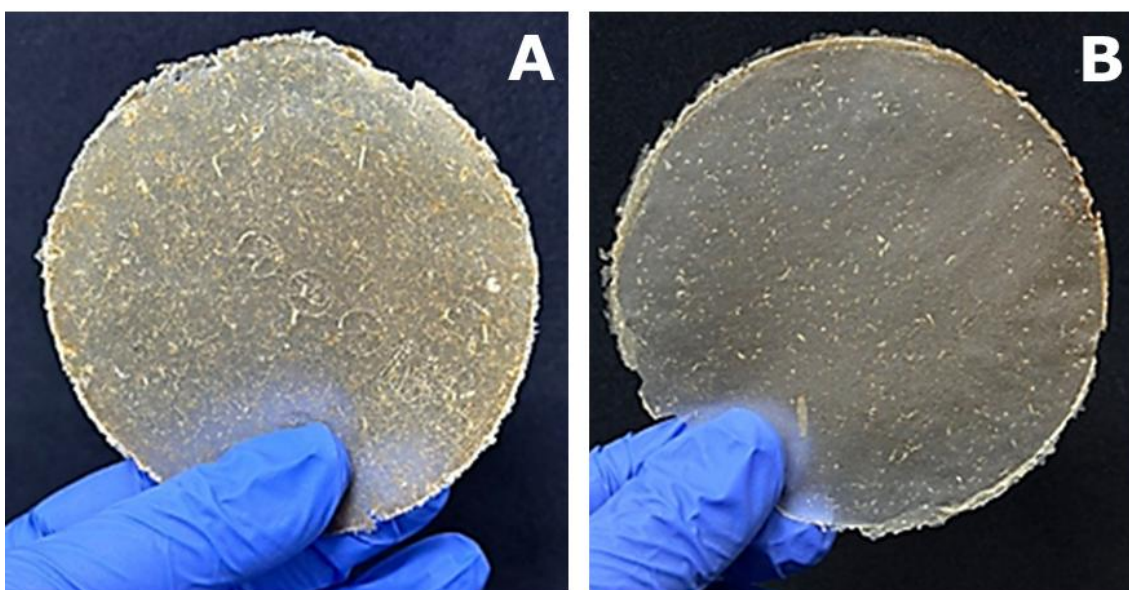


Figura 2. Imagens digitais de (A) biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e (B) biopolímero M contendo CXD (M-CXD)

A Figura 3 (1A-B) apresenta imagens obtidas por MEV da superfície do filme M, evidenciando rugosidade, ondulações e pequenas fibras dispersas. Já a imagem em

seção transversal obtida (Figura 3-1C) revela uma superfície lisa, sem a presença de um perfil multiplanar. Em contrapartida, a Figura 3 (3A-B), referente ao filme M-CXD, mostra que a incorporação de CXD expôs as fibras internas do filme, resultando em uma superfície não uniforme. A imagem em seção transversal (Figura 3 - 2C) evidencia um perfil multiplanar, embora a superfície permaneça lisa.

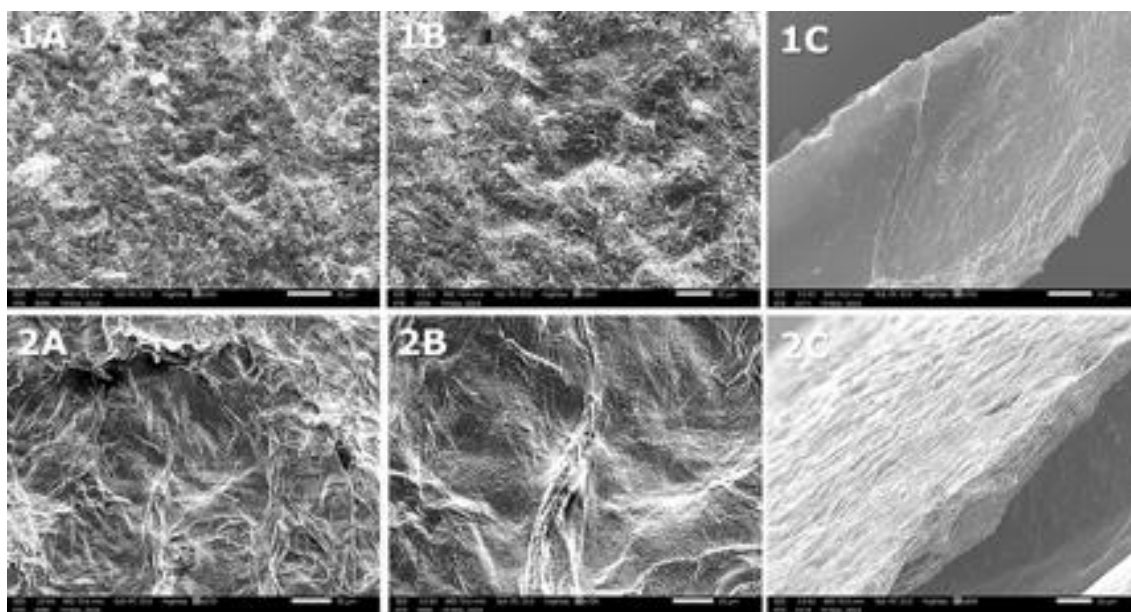


Figura 3 Microscopia eletrônica de varredura da superfície e do corte transversal do (1A-C) biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e (2A-C) biopolímero M contendo CXD (M-CXD). Especificamente, A e B são da superfície (resolução de 50 e 20 μm , respectivamente) e C é do corte transversal (resolução de 20 μm).

Os espectros de infravermelho do filme M (Figura 4) revelaram a presença de uma banda larga e intensa em torno de 3274 cm^{-1} , associada às vibrações de estiramento do grupo -OH, característica de compostos como celulose, pectina e lignina, principais carboidratos presentes na casca e no mesocarpo da melancia (Dias et al., 2020). No caso do CXD, as bandas amplas correspondentes aos grupos -OH e -NH aparecem em 3120 , 3182 e 3303 cm^{-1} , mantendo-se no espectro do filme M-CXD. Isso indica que o CXD

ocupou locais nos filmes M-CXD anteriormente preenchidos por açúcares e ácidos formados durante o processo hidrotérmico na produção do biopolímero.

A banda localizada em 2924 cm^{-1} foi atribuída às vibrações de estiramento -CH dos grupos metil CH_2 e CH_3 , enquanto a banda em 1740 cm^{-1} corresponde ao estiramento -C=O de ácidos carboxílicos esterificados. Além disso, vibrações de grupos carboxílicos livres (-COO-) foram identificadas em 1568 cm^{-1} , características da pectina. As bandas vibracionais entre 1300 e 900 cm^{-1} , por sua vez, são associadas às ligações do éter R-O-R e ao anel cíclico C-C da estrutura da pectina (Mamiru; Gonfa, 2023).

No espectro do CXD (Figura 4), as bandas em 1083 cm^{-1} são atribuídas aos grupos CN, enquanto a banda em 1531 cm^{-1} refere-se à curvatura N-H da amina secundária aromática (Priyadarshini et al., 2017). As bandas em 1485 e 1518 cm^{-1} estão relacionadas à deformação dos grupos CH_2 , enquanto as vibrações em 1082 cm^{-1} correspondem às ligações entre o cloro e o anel aromático. A banda em 819 cm^{-1} é atribuída aos anéis aromáticos para-disubstituídos (Santos et al., 2019). No espectro do filme M-CXD (Figura 4), é possível observar picos em 1527 e 1487 cm^{-1} , confirmando a presença marcante do CXD incorporado na matriz do filme.

Não há evidências de interações entre os componentes que resultem em alterações ou desaparecimento das bandas características, o que sugere que a interação é de natureza física. Assim, é provável que a CXD esteja intercalada nas fibras do filme biopolimérico sem formação de ligações químicas, preservando a integridade estrutural dos componentes originais.

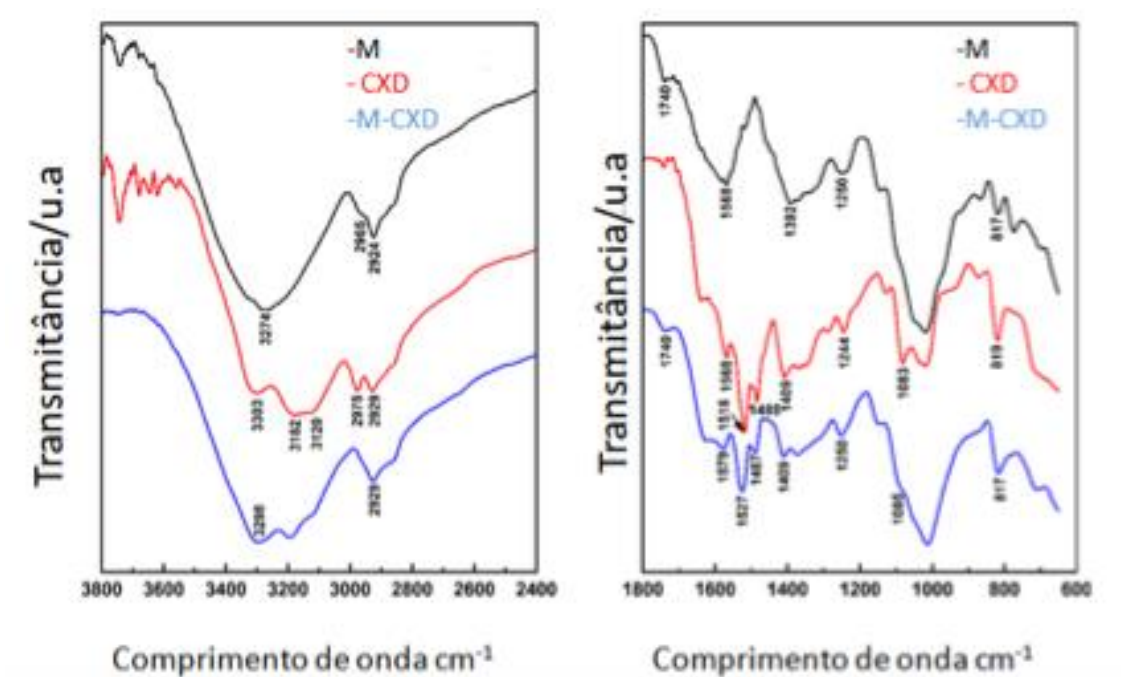


Figura 4. Espectros infravermelhos do (-) biopolímero do mesocarpo da melancia (M), (-) CXD e (-) biopolímero M contendo CXD (M-CXD)

As curvas TG/DTG dos biopolímeros M e M-CXD são apresentadas na Figura 5. O filme M exibe seis etapas consecutivas de perda de massa, conforme indicado pela curva DTG, cujas temperaturas e variações de massa estão descritas na Tabela 1. Os dois primeiros estágios, de 30°C a 161°C, correspondem à perda de umidade relativa/desidratação, resultando em uma redução de massa de 13,19 %. Já o terceiro e quarto estágios, entre 161°C e 268°C, totalizam uma perda de 21,07 % e são atribuídos à volatilização e decomposição de componentes derivados ou resistentes ao tratamento hidrotermal, como açúcares e ácidos, gerados durante a produção do bioplástico. Entre 268°C e 600°C, ocorre a decomposição térmica da fração lignocelulósica, restando um resíduo carbonoso de 31,2 %.

Por outro lado, as curvas TG/DTG do biopolímero M incorporado com CXD (filme M-CXD) indicam uma primeira etapa de perda de massa até 161°C, relacionada à perda de umidade/desidratação, com uma redução de 9,94 %. Observa-se um intervalo

relativamente estável até 200°C, sugerindo que a CXD se alojou nos componentes formados durante o tratamento hidrotermal, como confirmado pelos espectros FTIR apresentados na Figura 3. No entanto, o M-CXD começa a perder estabilidade térmica próximo a 200°C, com um segundo estágio de perda de massa de 5,24 % até 257°C, seguido pelos terceiro e quarto estágios, que resultam em uma perda total de 61,42 % até 600°C, restando um resíduo de 23,4 %.

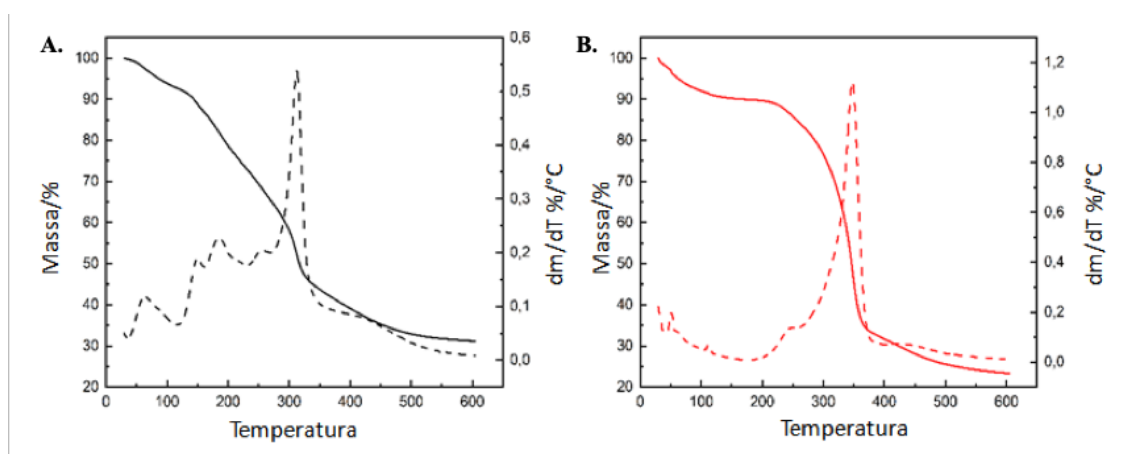


Figura 5. Curvas TG/DTG do (A) biopolímero do mesocarpo da melancia sem CXD (M) e (B) biopolímero M contendo CXD (M-CXD)

Tabela 1. Dados das curvas TG/DTG do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD)

Filme M						
$\Delta T/^{\circ}C$	30 - 117	117 - 161	161 - 228	228 - 268	268 - 384	384 - 600
$\Delta m/\%$	7,35	5,84	13,32	7,75	25,23	9,31
Filme M-CXD						
$\Delta T/^{\circ}C$	30 - 161		161 - 257		257 - 392	392 - 600
$\Delta m/\%$	9,94		5,24		52,55	8,87

A Figura 6A apresenta os coeficientes angulares da cinética de permeação de água nos filmes. O filme M exibe a menor permeabilidade ao vapor d'água, com $\alpha = 0,43$ g/h, indicando uma barreira mais eficiente do que o filme M-CXD, que possui $\alpha = 0,50$ g/h. Isso sugere que os componentes originados ou resistentes ao tratamento hidrotermal, como açúcares e ácidos, contribuem para uma barreira superior no filme M em comparação com aquele incorporado com CXD. A linearidade das curvas evidencia que o vapor d'água é adsorvido permanentemente, demonstrando que as moléculas de água adsorvidas em uma face do filme são desorvidas na face oposta.

Considerando a potencial aplicabilidade dos filmes M e M-CXD como suportes para curativos, avaliou-se sua capacidade de manuseio de fluidos, uma característica essencial na seleção de materiais para curativos, conforme destacado por Boateng et al. (2008). Os resultados estão ilustrados na Figura 6 B. Os valores obtidos dos filmes M e M-CXD foram comparados a produtos disponíveis no mercado, como o New Allewyn Non-Adhesive ($270 \text{ g/m}^2/24\text{h}$) (White; Hartwell; Brown, 2007). Embora os filmes apresentem uma taxa de transmissão de vapor d'água (MVTR) mais elevada, eles exibem uma absorção de vapor d'água (ABS) mais baixa.

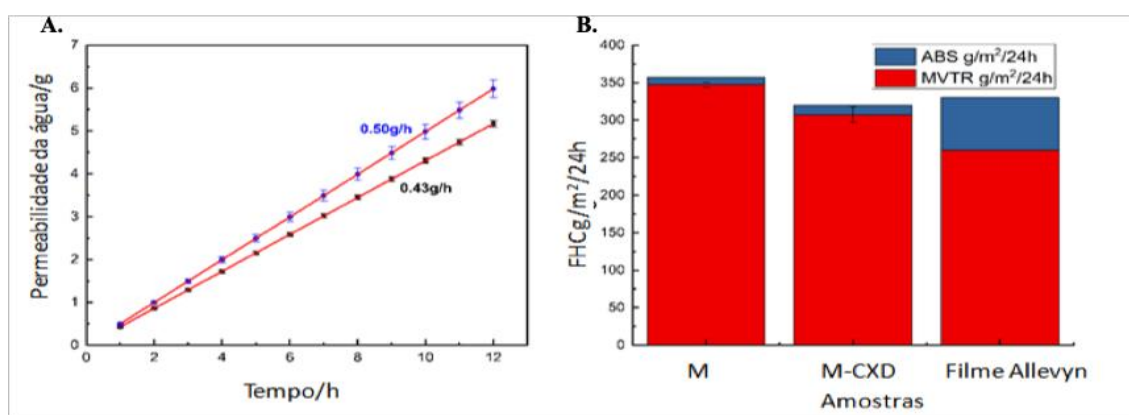


Figura 6. (A) Cinética de permeação de vapor d'água através do biopolímero do mesocarpo da melancia (M, $\alpha = 0,43$ g/h) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD,

$\alpha = 0,50$ g/h); (B) Propriedades de manuseio de fluidos dos filmes M, M-CXD e Allevyn.

Além das características de permeabilidade e manuseio de fluidos, as propriedades de molhabilidade dos filmes também desempenham um papel crucial na sua aplicabilidade. Os testes de ângulo de contato revelaram que o filme M apresentou um ângulo de contato maior em comparação ao filme M-CXD. A incorporação de CXD promoveu um maior contato da gota de água com a superfície do filme, aumentando a interação molecular com essa superfície (Figura 7). Esses resultados indicam que a redução do ângulo observada no filme M-CXD favorece a molhabilidade, o que, por sua vez, melhora a adesão à superfície. Essa combinação de propriedades faz do filme M-CXD uma opção promissora para revestimentos de superfícies, enquanto o filme M, com sua barreira superior ao vapor d'água, pode ser explorado para outras aplicações específicas.

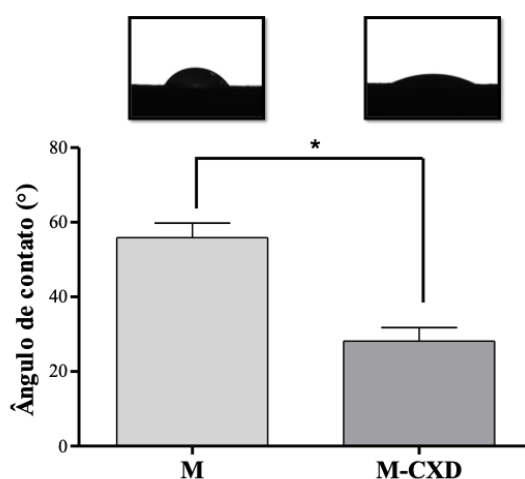


Figura 7. Média e desvio padrão das medidas do ângulo de contato com a superfície do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD)

O ensaio de liberação mostrou um perfil inicial rápido de liberação de CXD pelos filmes M-CXD, com aproximadamente 36% liberados em 30 minutos e atingindo 87,7% em 120 minutos, momento em que começou a se estabilizar. Um platô de liberação foi observado após 360 minutos, indicando um perfil sustentado que se manteve até o final do experimento (Figura 8).

A análise da cinética de liberação revelou que o modelo matemático de Peppas-Korsmeyer foi o que melhor se ajustou aos dados, com uma constante de taxa de liberação (K_{PK}) de 0,277 e um expoente de liberação de 0,53. Este modelo é amplamente utilizado para descrever a liberação de fármacos em sistemas poliméricos e hidrogéis (Bruschi, 2015). No caso de filmes planos, o expoente de liberação (n) pode ser empregado para identificar o mecanismo que controla a liberação do composto ativo. Valores de $0,5 < n < 1,0$ indicam um mecanismo de transporte anômalo, no qual as taxas de difusão do solvente através da membrana e de relaxamento do polímero são equivalentes (Al-Ani et al., 2021).

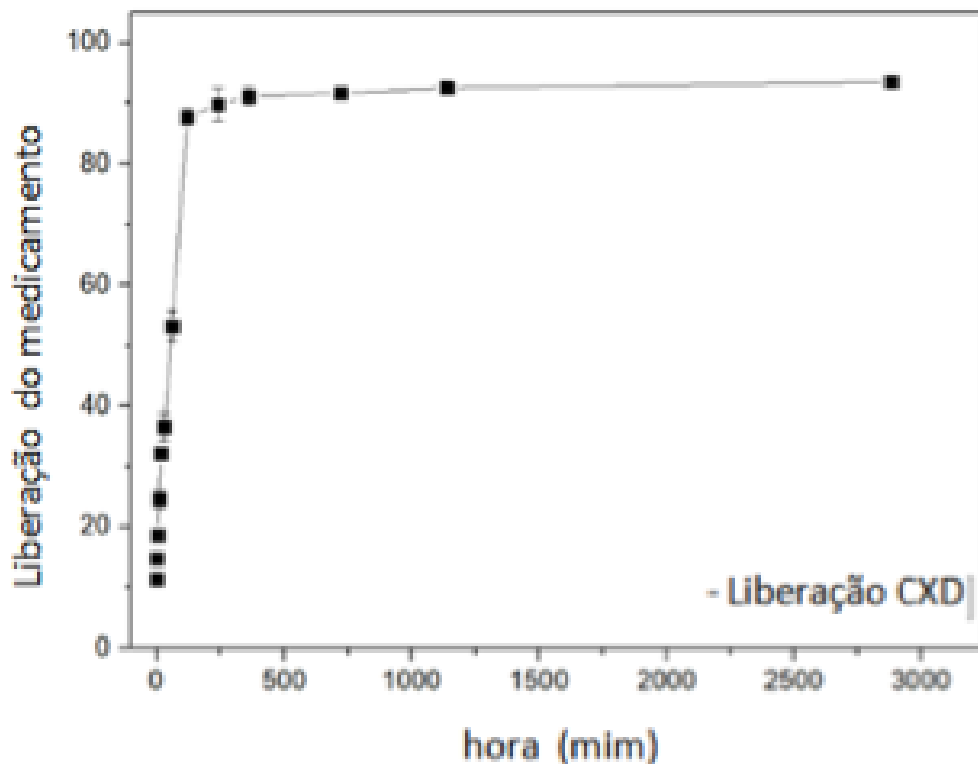


Figura 8. Perfil de liberação de clorexidina (CXD) do biopolímero do mesocarpo de melancia contendo CXD (M-CXD) ao longo do tempo, mostrando a porcentagem de fármaco liberado em vários intervalos de tempo.

O comportamento mecânico dos filmes M e M-CXD foi avaliado por meio de ensaios de tração, analisando-se a resistência à tração (σ_T , MPa), o módulo de Young (E, MPa) e o alongamento na ruptura (ϵ_R , %). Os ensaios consistiram na aplicação de uma força uniaxial sobre o corpo de prova, com extensão em velocidade constante até o rompimento. A resistência à tração (σ_T) corresponde à tensão máxima suportada pelo filme antes de ocorrer a deformação irreversível das cadeias poliméricas. O módulo de Young (E) representa a rigidez do material, sendo definido como a razão entre tensão e deformação na região elástica. Já o alongamento na ruptura (ϵ_R) reflete a capacidade do material de se deformar até o rompimento. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Os filmes apresentaram propriedades mecânicas distintas, refletindo diferenças estruturais e de interação molecular. O filme M exibiu menor resistência à tração e módulo de Young, mas maior alongamento na ruptura, o que caracteriza um material mais flexível e extensível. Isso indica que o filme M possui maior capacidade de deformação antes do rompimento, sugerindo uma menor densidade de ligações intermoleculares ou interações mais fracas entre as cadeias poliméricas. Por outro lado, o filme M-CXD demonstrou maior resistência à tração e módulo de Young, mas menor alongamento na ruptura, indicando maior rigidez e menor extensibilidade. Esses resultados sugerem que a incorporação de CXD promove um aumento na coesão estrutural, possivelmente devido à formação de ligações intermoleculares mais fortes, como ligações de hidrogênio, ou interações específicas entre a matriz biopolimérica e CXD. O módulo de Young mais elevado (E : $208,3 \pm 38,1$ MPa) reflete uma estrutura mais rígida, com as cadeias poliméricas apresentando menor mobilidade, o que corrobora a hipótese de uma rede polimérica mais densa e reforçada pela presença da CXD.

Tabela 2. Resultados dos ensaios mecânicos do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD)

Amostras	σT (MPa)	E (MPa)	εR (%)
M	$0,20 \pm 0,01$	$130,2 \pm 23,0$	$1,7 \pm 0,15$
M-CXD	$0,34 \pm 0,04$	$208,3 \pm 38,1$	$1,4 \pm 0,13$

σT MPa: resistência à tração; E MPa: módulo de Young; εR %: alongamento na ruptura

4.2 Ensaio biológicos

Os filmes M-CXD demonstraram atividade antibacteriana. Por meio do ensaio de difusão em ágar (Tabela 3), observou-se uma zona de inibição maior contra *S. aureus* em comparação com as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*. O diâmetro das zonas de inibição, que reflete a suscetibilidade das bactérias, foi de $22,0 \pm 1,0$ mm para *S. aureus*, $15,3 \pm 1,5$ mm para *P. aeruginosa* e $17,3 \pm 0,7$ mm para *E. coli*. Essa inibição microbiana indica que a CXD foi liberada da matriz biopolimérica derivada do mesocarpo da melancia e difundida radialmente no ágar, inibindo o crescimento bacteriano na superfície. Esses resultados foram corroborados pelo ensaio de microdiluição. A Figura 9 apresenta a porcentagem de crescimento bacteriano em diferentes concentrações de eluatos dos filmes. Em comparação ao controle, considerado com 100% de viabilidade bacteriana, os filmes M-CXD induziram uma redução estatisticamente significativa no crescimento das bactérias Gram-negativas até uma concentração de 1,5% v/v de eluato e em todas as concentrações testadas contra *S. aureus*. Em contrapartida, os filmes M (sem CXD) não afetaram o crescimento de nenhum dos organismos testados.

Tabela 3 Atividade antibacteriana do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD) pelo método de difusão em ágar

	Halo de Inibição (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
M-CXD	$22,0 \pm 1,0$	$15,3 \pm 1,5$	$17,3 \pm 0,7$
M	-	-	-
C+	$22,0 \pm 0,7$	$18,7 \pm 1,2$	$19,7 \pm 0,6$

C+ (controle positivo) 2% clorexidina (CXD) impregnada em discos de papel filtro estéreis

(-) ausência de halo de inibição.

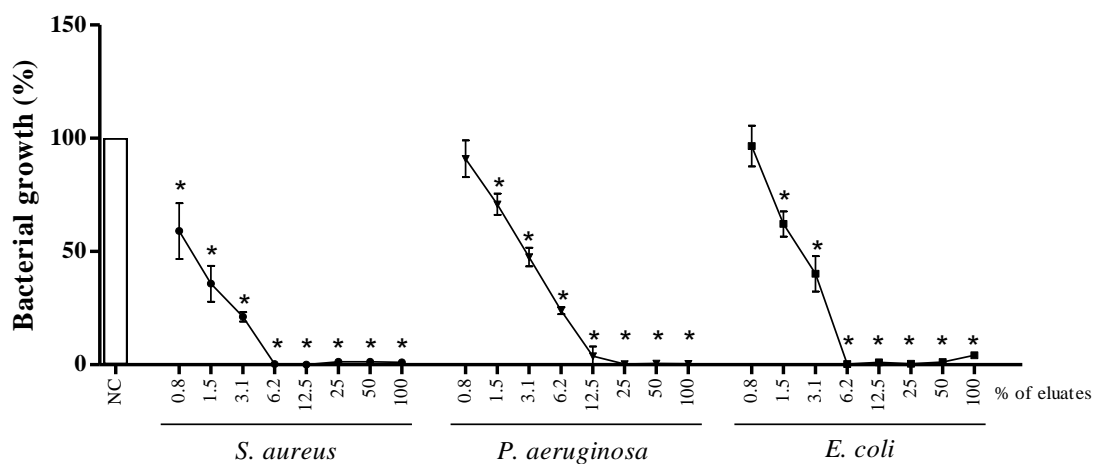


Figura 9. Porcentagem de crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* em resposta a tratamentos com diferentes concentrações de eluatos do biopolímero do mesocarpo de melancia (M) contendo CXD (M-CXD). CN: controle negativo (controle de crescimento bacteriano, 100% de viabilidade bacteriana). *estatisticamente diferente do controle de crescimento bacteriano ($p < 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey). Os eluatos foram preparados usando filmes com uma área de superfície de 6 cm² incubados em 1 mL de caldo Mueller-Hinton a 37°C com agitação por 24 horas.

A Figura 10 mostra a porcentagem de células viáveis da linhagem HaCaT após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de eluatos derivados dos filmes M e CXD. Os filmes sem o fármaco (M) não apresentaram efeitos citotóxicos, pois não reduziram de forma estatisticamente significativa a viabilidade celular em comparação ao controle negativo nas condições experimentais avaliadas. Por outro lado, os tratamentos com eluatos do filme M-CXD a partir de 6,2 % comprometeram significativamente a viabilidade das células HaCaT, de maneira dependente da dose, indicando efeitos citotóxicos.

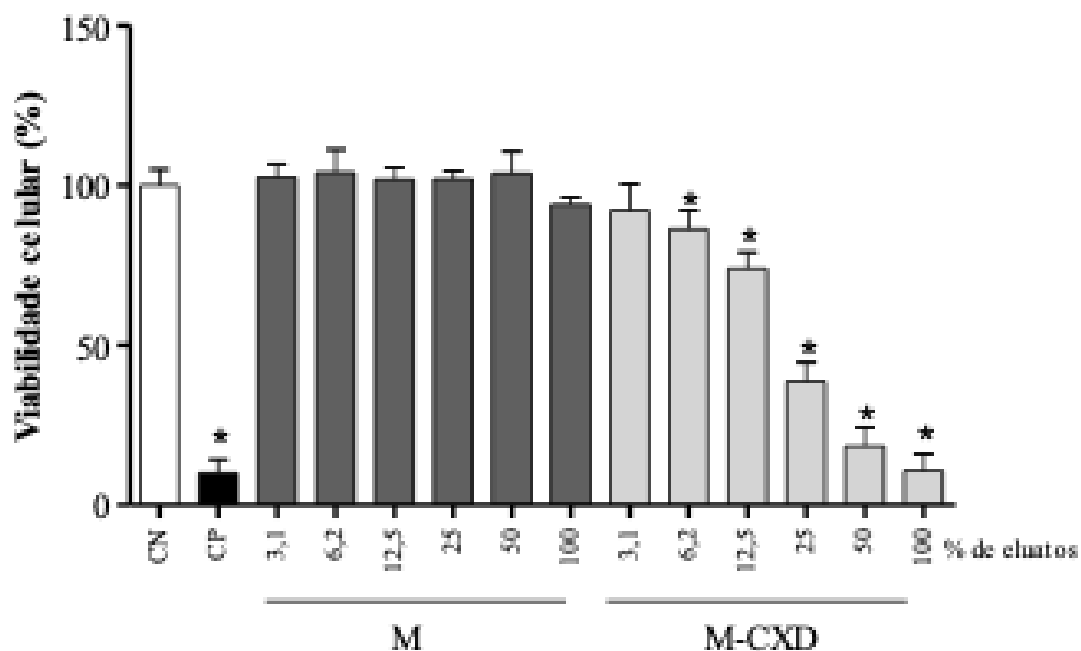


Figura 10. Viabilidade celular (%) da linhagem HaCaT após 24 horas de tratamento com eluatos do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD). CN: controle negativo (meio de cultura), 100% de viabilidade celular; CP: controle positivo (DMSO 50%). *estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$, ANOVA, seguido do teste de Tukey). Os eluatos foram preparados usando filmes com uma área de superfície de 6 cm² incubados em 1 mL de meio DMEM a 37°C com agitação por 24 horas.

Para complementar os ensaios convencionais de citotoxicidade em monocamada celular, estabelecemos esferoides multicelulares tridimensionais (3D) a partir de células HaCaT. Esferoides de pele têm se destacado como ferramentas essenciais em diversas áreas, como desenvolvimento e triagem de medicamentos, toxicologia, reconstituição cutânea e modelagem de doenças (Nie et al., 2020). Esses modelos proporcionam um ambiente mais próximo das condições *in vivo*. A cultura tridimensional (3D) é

amplamente reconhecida por reproduzir características bioquímicas e morfológicas específicas dos tecidos, além de estabelecer conexões celulares que refletem mais fielmente a fisiológica *in vivo* (Leong et al., 2017).

Os resultados deste estudo mostraram que, após 24 horas de tratamento com eluatos dos filmes M-CXD em concentrações de 12,5% a 50% v/v, a viabilidade dos esferoides de queratinócitos foi significativamente reduzida em comparação ao controle negativo (Figura 11A). Ao comparar os dados, observou-se que os esferoides apresentaram maior resistência em relação às células cultivadas em 2D. Essa diferença pode ser explicada pelas interações intercelulares, que, ao gerarem altas pressões intersticiais, formam uma barreira física, que dificulta a difusão do fármaco, resultando em uma maior resistência ao tratamento (Gong et al., 2015). Os filmes M não induziram alterações significativas na viabilidade dos esferoides (Figura 11A).

As Figuras 11B e 11C ilustram a área e as imagens do crescimento dos esferoides, respectivamente, avaliados após 0, 24 e 48 horas de tratamento com diferentes concentrações dos eluatos dos filmes M-CXD e do controle negativo. A análise morfológica revelou que no grupo controle, o crescimento dos esferoides foi acentuado ao longo do tempo, enquanto o tratamento com M-CXD inibiu significativamente o crescimento dos esferoides, após 24 e 48 horas de exposição comparado ao tempo inicial (tempo zero). Contudo, o tratamento não interrompeu as agregações celulares, ou seja, não causou alterações estruturais nos esferoides.

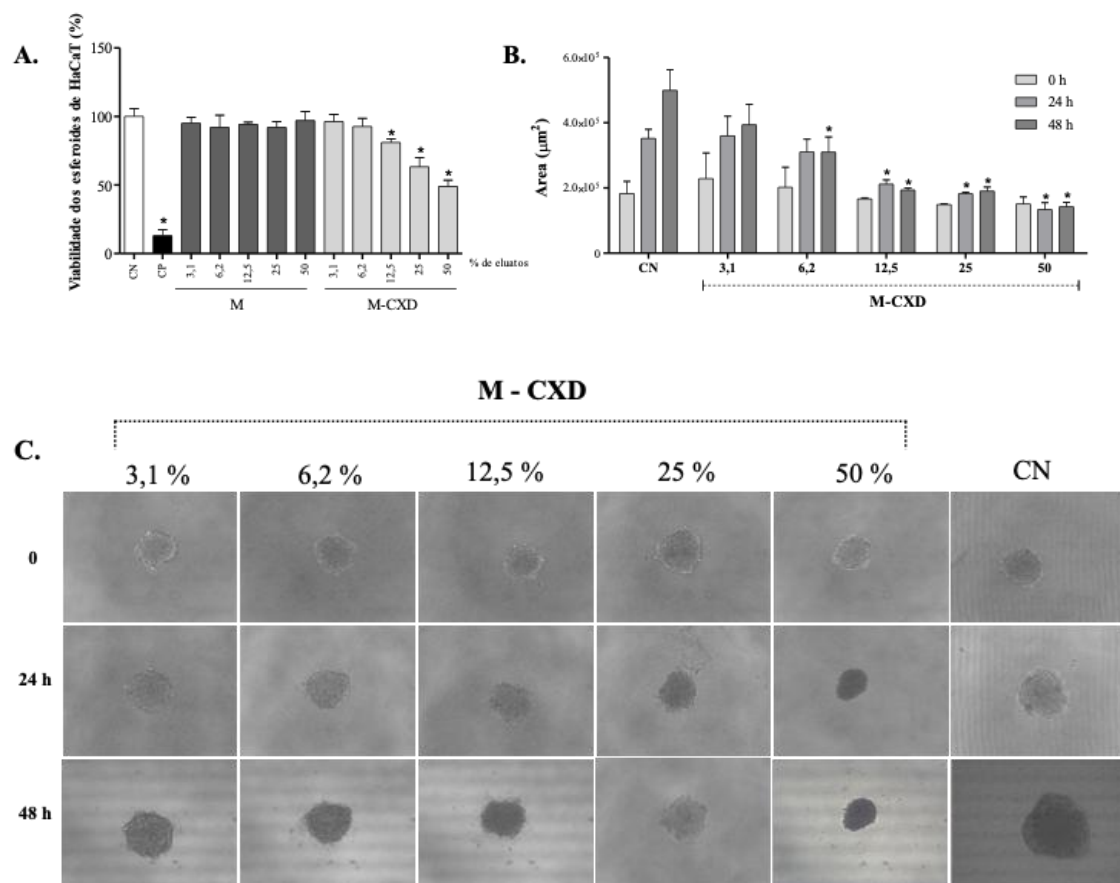


Figura 11. Efeitos do tratamento com eluatos do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD) em modelo 3D in vitro de esferoides multicelulares de células HaCaT. (A) A viabilidade dos esferoides foi determinada pelo ensaio Alamar Blue após 24 h de tratamento. CN: controle negativo (meio de cultura), 100% de viabilidade celular; CP: controle positivo (DMSO 50%). Os dados são apresentados como a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. *estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$, ANOVA, seguido do teste de Tukey). Os eluatos foram preparados usando filmes com uma área de superfície de 6 cm² incubados em 1 mL de meio DMEM a 37°C com agitação por 24 horas. (B) Cinética de crescimento da área de esferoides de células HaCaT. As medições foram realizadas no tempo 0 e após 24 e 48 horas de tratamento com eluatos de M-CXD sem renovação do meio de cultivo. *estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$, ANOVA, seguido do teste de Tukey). (C) Os esferoides foram

examinados usando microscópio invertido (amplificação 200×), barra de escala = 100 μm .

Quanto à mutagenicidade, conforme mostrado na Tabela 4, não foi observado aumento estatisticamente significativo no número médio de colônias revertentes em comparação com o controle negativo após o tratamento com eluatos dos filmes M e M-CXD, em nenhuma das concentrações ou cepas de *S. Typhimurium* analisadas, com ou sem ativação metabólica. Esses resultados indicam a ausência de atividade mutagênica em sistemas bacterianos. O IM permaneceu abaixo de 2 em todas as análises, demonstrando que o número de colônias revertentes induzido pelos tratamentos com os filmes não excedeu o dobro do observado no controle negativo. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas apenas nos controles positivos.

Além disso, a genotoxicidade dos filmes biopoliméricos em células HaCaT foi avaliada utilizando o ensaio cometa, uma técnica sensível para detectar quebras de cadeias de DNA, e o ensaio de MN, que avalia mutações cromossômicas. Como mostrado na Fig. 12, os nucleóides das células HaCaT nos grupos controle negativo e nas concentrações de eluatos do filme M apresentaram formas arredondadas, indicativas de DNA não danificado, corroborando os resultados obtidos no ensaio de MN. O filme M não induziu aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos em comparação com o controle negativo (Tabela 5).

Por outro lado, após 24 horas de tratamento, as células HaCaT expostas a 6,25% e 12,5% v/v de eluatos do filme M-CXD provocaram um aumento na extensão de danos ao DNA detectáveis pelo ensaio do Cometa (Figura 12). Além disso, essas concentrações também apresentaram um aumento estatisticamente significativo na frequência de MNs e reduziram significativamente o IPBC comparado ao controle

negativo (Tabela 5), confirmando o potencial genotóxico do filme M-CXD em células eucarióticas e seu perfil de citotoxicidade, respectivamente.

Tabela 4 Avaliação mutagênica do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD) nas cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella Typhimurium*, na presença e ausência de ativação metabólica (S9)

Tratamentos	Número de revertentes (Média ± Desvio Padrão)/ placa e IM							
	TA97a		TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
C-	96 ± 13	139 ± 11	28 ± 2	20 ± 4	113 ± 7	108 ± 21	218 ± 32	300 ± 37
C+	1439 ± 67 ^{*a}	1438 ± 102 ^d	812 ± 41 ^{*a}	907 ± 81 ^d	1322 ± 75 ^{*b}	1601 ± 139 ^d	1835 ± 124 ^{*c}	1360 ± 114 ^e
μL/ placa	M							
12,5	106 ± 15 (1,1)	151 ± 18 (1,1)	30 ± 3 (1,1)	23 ± 4 (1,1)	120 ± 8 (1,1)	110 ± 24 (1,0)	220 ± 28 (1,0)	316 ± 49 (1,0)
25	108 ± 8 (1,1)	150 ± 14 (1,1)	29 ± 3 (1,0)	23 ± 6 (1,1)	123 ± 11 (1,1)	114 ± 14 (1,1)	228 ± 19 (1,0)	327 ± 32 (1,1)
50	103 ± 7 (1,1)	147 ± 21 (1,1)	30 ± 6 (1,0)	22 ± 1 (1,1)	124 ± 6 (1,1)	108 ± 18 (1,0)	240 ± 30 (1,1)	278 ± 39 (0,9)
75	99 ± 12 (1,0)	154 ± 25 (1,1)	31 ± 1 (1,1)	20 ± 6 (1,0)	127 ± 3 (1,1)	99 ± 6 (0,9)	223 ± 47 (1,0)	268 ± 21 (0,9)
100	96 ± 6 (1,0)	151 ± 19 (1,1)	34 ± 6 (1,2)	21 ± 7 (1,0)	106 ± 14 (0,9)	105 ± 11 (1,0)	217 ± 24 (1,0)	276 ± 25 (0,9)
μL/ placa	M-CXD							
12,5	90 ± 6 (0,9)	162 ± 18 (1,2)	28 ± 4 (1,0)	24 ± 6 (1,2)	105 ± 11 (0,9)	98 ± 4 (0,9)	187 ± 27 (0,9)	270 ± 21 (0,9)
25	85 ± 4 (0,9)	147 ± 20 (1,1)	26 ± 3 (0,9)	21 ± 2 (1,0)	111 ± 12 (1,0)	99 ± 11 (0,9)	192 ± 14 (0,9)	261 ± 31 (0,9)
50	92 ± 3 (1,0)	150 ± 28 (1,1)	25 ± 4 (0,9)	21 ± 1 (1,0)	112 ± 27 (1,0)	90 ± 14 (0,8)	185 ± 22 (0,8)	232 ± 23 (0,8)
75	81 ± 11 (0,8)	127 ± 8 (0,9)	23 ± 1 (0,8)	22 ± 1 (1,1)	96 ± 8 (0,8)	89 ± 3 (0,8)	175 ± 18 (0,8)	221 ± 11 (0,7)
100	76 ± 8 (0,8)	100 ± 12 (0,7)	25 ± 2 (0,9)	19 ± 8 (0,9)	93 ± 4 (0,8)	86 ± 8 (0,8)	171 ± 10 (0,8)	184 ± 25 (0,6)

* p < 0,05 (ANOVA); C- = Controle Negativo: dimetilsulfóxido (DMSO – 100 μL/placa); C+ = Controle Positivo – ^a4-nitro-*o*-fenilenodiamina (10,0 μg/placa – TA98, TA97a); ^bazida de sódio (1,25 μg/placa – TA100); ^cmitomicina (0,5 μg/placa – TA102), na ausência de S9 e ^d2-antramina (1,25 μg/placa – TA97a, TA98, TA100); ^e2-aminofluoreno (10 μg/placa – TA102), na presença de S9. Os eluatos foram preparados utilizando filmes com uma área de superfície de 6 cm² incubados em 1 mL de DMSO a 37°C com agitação por 72 horas.

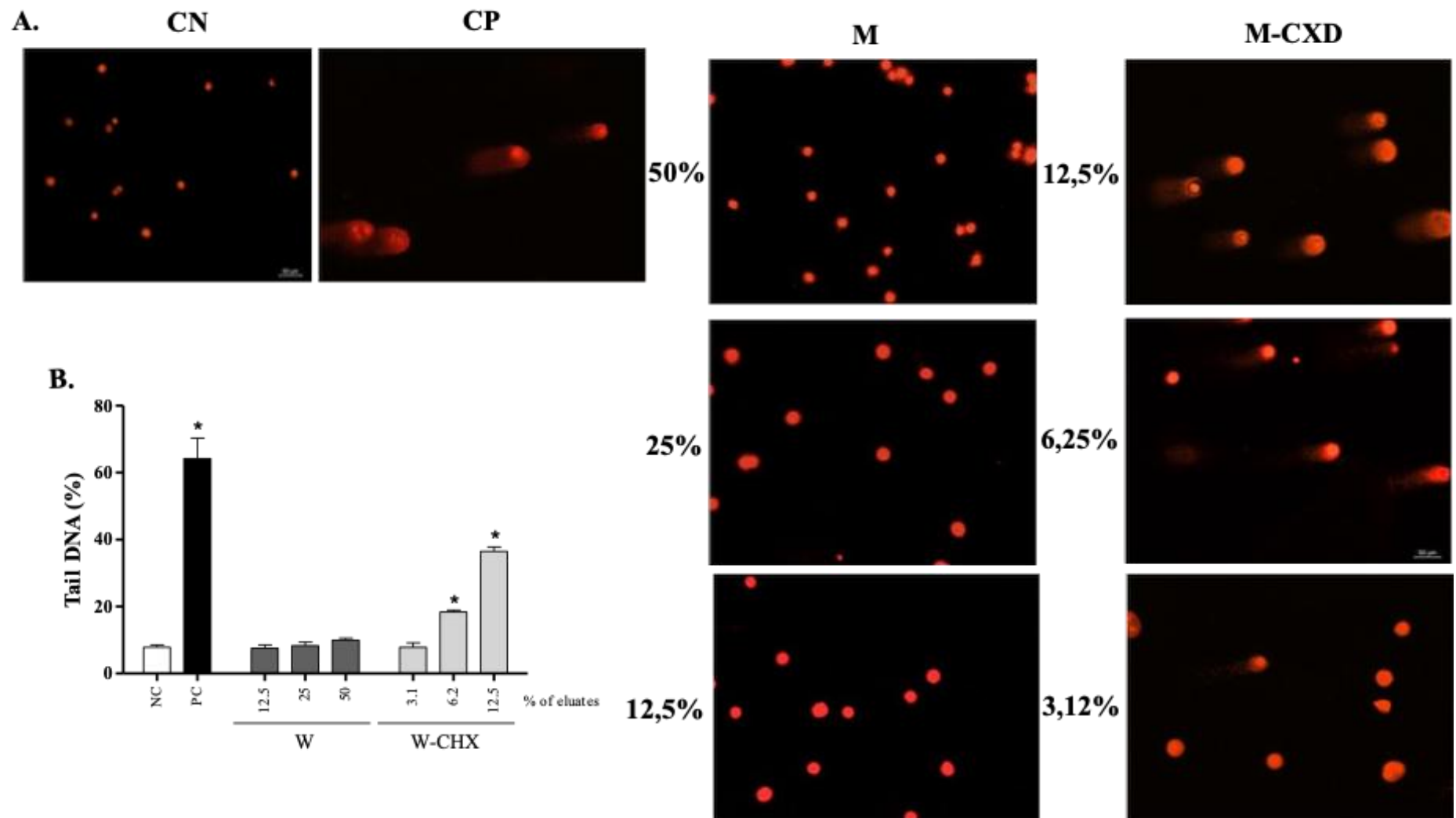


Figura 12. Efeito genotóxico do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD) em células HaCaT.

(A) Imagens representativas do ensaio do cometa em células HaCaT tratadas com eluatos de filmes M e M-CXD por 24 horas. As imagens foram adquiridas utilizando microscopia de fluorescência com ampliação total de 400× (barra de escala = 20 μm).

(B) O gráfico representa a intensidade da cauda (%), que está diretamente correlacionada com o DNA danificado. O controle negativo (CN) corresponde ao grupo não tratado (somente meio DMEM suplementado com SFB), e o controle positivo (CP) foi tratado com peróxido de hidrogênio (50 μM). Os eluatos foram preparados utilizando filmes com uma área de superfície de 6 cm² incubados em 1 mL de meio DMEM com SFB a 37°C com agitação por 72 horas. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em comparação com o controle por ANOVA seguido do teste de Tukey.

Tabela 5. Frequência de micronúcleos (MNs) e índice de proliferação com bloqueio de citocinese (IPBC) em células HaCaT após 24 horas de tratamento com eluatos do biopolímero do mesocarpo da melancia (M) e do biopolímero M contendo CXD (M-CXD)

Tratamentos	MNs^a	IPBC^b
Controle negativo	5,0 ± 1,4	1,90 ± 0,08
Controle positivo	36,5 ± 6,4*	1,63 ± 0,03*
Filme M		
12,5%	3,0 ± 1,8	1,85 ± 0,01
25%	3,5 ± 1,1	1,88 ± 0,05
50%	4,0 ± 1,2	1,85 ± 0,06
Filme M-CXD		
3,1%	8,0 ± 1,4	1,74 ± 0,03
6,2%	14,0 ± 4,2*	1,67 ± 0,01*
12,5%	24,0 ± 2,8*	1,59 ± 0,06*

Os valores são apresentados como média ± DP do número de micronúcleos (MNs) e índice de proliferação com bloqueio da citocinese (IPBC) em células HaCaT. CN: controle negativo (meio de cultura completo), CP: controle positivo (peróxido de hidrogênio, 100 µM). Os eluatos foram preparados utilizando filmes com uma área de superfície de 6 cm² incubados em 1 mL de meio DMEM com SFB a 37°C com agitação por 72 horas. ^aUm total de 3000 células binucleadas foram analisadas por grupo de tratamento (1000 células/tratamento/repetição). ^bUm total de 1500 células foram analisadas por grupo de tratamento (500 células/tratamento/repetição). *estatisticamente diferente do controle negativo (p<0,05, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

5. DISCUSSÃO

Atualmente, a substituição de materiais poliméricos à base de petróleo é uma necessidade urgente, dada sua natureza não renovável, baixa biodegradabilidade e as preocupações ambientais associadas. Os plásticos esgotam recursos naturais limitados e geram resíduos que ameaçam o meio ambiente e a saúde humana. Assim, o desenvolvimento de materiais renováveis, alinhados aos princípios de sustentabilidade e projetados de forma funcional e circular, tornou-se imperativo (Valencia et al., 2019; Eissenberger et al., 2023).

Resíduos de frutas e vegetais são fontes abundantes de polifenóis, antioxidantes naturais e fibras dietéticas (Al-Sayed; Ahmed, 2013). O reaproveitamento desses resíduos para a produção de filmes poliméricos ou revestimentos de superfície apresenta uma abordagem inovadora para aumentar o valor de subprodutos renováveis. Revestimentos poliméricos funcionais têm ampla aplicação biológica, abrangendo desde biomateriais e liberação de medicamentos até a separação de biomoléculas em escala industrial (Khlyustova et al., 2020).

Entre esses resíduos, a casca de melancia destaca-se devido ao seu perfil nutricional e conteúdo fitoquímico com efeitos terapêuticos benéficos. Embora frequentemente descartada, a casca pode ser utilizada em produtos como sobremesas, sorvetes e geleias (Nadeem et al., 2022). Sua composição mineral inclui ferro, fósforo, cálcio, sódio, cobre, zinco, magnésio e potássio, além de proteínas, gorduras, cinzas e fibras (Feizy; Jahani; Ahmadi, 2020). A casca também contém vitaminas como retinol (A), tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6) e ácido ascórbico (C) (GLADVIN et al., 2017).

Entre os compostos fenólicos, o ácido 4-hidroxibenzoico (958,3 µg/g) destaca-se como o composto mais abundante por peso seco, seguido pela vanilina (851,8 µg/g), enquanto o ácido cumárico foi detectado em quantidades menores (8,8 µg/g), conforme relatado por Al-Sayed; Ahmed (2013). Estudos destacam o potencial antioxidante da casca de melancia, atribuído à sua composição química (Al-Sayed; Ahmed, 2013; Feizy; Jahani; Ahmadi, 2020; Neglo et al., 2021).

No contexto estrutural, a pectina presente na casca de melancia atua como um polissacarídeo que conecta fibras de celulose e hemicelulose, conferindo rigidez às paredes celulares e facilitando a produção de filmes estáveis (Dias et al., 2020). A casca madura de melancia contém cerca de 20% de celulose, 23% de hemicelulose, 10% de lignina, 13% de pectina, 7 mg/g de sílica e 12% de outros minerais (Singh et al., 1975).

Neste estudo, a incorporação de CXD nos filmes poliméricos proporcionou maior estabilidade térmica, atribuída à interação entre a CXD e a matriz polimérica, que aumentou a resistência às variações de temperatura. Análises de FTIR indicam que o CXD é incorporado por interações físicas, sem alterações significativas nas bandas características. Esse mecanismo explica a rápida liberação da CXD nos filmes M-CXD, tornando-os candidatos promissores como revestimentos antimicrobianos de superfície.

Quanto aos seus efeitos biológicos, os filmes M-CXD demonstraram significativa atividade antibacteriana. As cepas bacterianas selecionadas neste estudo incluem bactérias comensais humanas Gram-positivas e Gram-negativas, que podem atuar como patógenos oportunistas sob certas condições, representando riscos à saúde. A eficácia antibacteriana da CXD deve-se à sua capacidade de desestabilizar membranas citoplasmáticas, sendo mais ativa contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas (Pittet et al., 2009; Patel et al., 2019). A busca por novos revestimentos e dispositivos biomédicos com funcionalidades aprimoradas tem

impulsionado avanços tecnológicos e científicos (Dziadek; Stodolak-Zych; Cholewa-Kowalska, 2017).

Por exemplo, Tarawneh et al. (2021) desenvolveram filmes de hidrogel à base de celulose e carboximetilcelulose sódica incorporando CXD, que inibiram o crescimento de *Streptococcus oralis* e *Candida albicans*, oferecendo uma abordagem promissora para o tratamento da periodontite. Da mesma forma, Oliveira et al. (2023) produziram filmes compostos por goma de angico branco e quitosana contendo CXD, que apresentaram potentes efeitos antimicrobianos para o tratamento de lesões orais graves. Em outra aplicação, Duckworth et al. (2020) desenvolveram filmes de alginato contendo partículas de hexametáfosfato de CXD, proporcionando proteção antimicrobiana sustentada contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*.

Embora os filmes M-CXD desenvolvidos neste estudo apresentem propriedades mecânicas satisfatórias e eficácia antimicrobiana, sua toxicidade limita sua aplicação em feridas sem infecção (Wasiak; Cleland, 2015; Ambrogi et al., 2017). Estudos mostram que a CXD é citotóxica para diferentes tipos celulares, incluindo fibroblastos, osteoblastos e linfócitos humanos, de forma dose e tempo dependente (Giannelli et al., 2008; Li et al., 2014; Ambrogi et al., 2017; Liu et al., 2018). Faria et al., (2010) relataram que concentrações mais baixas de CXD podem induzir apoptose, enquanto concentrações mais altas resultam em necrose. Esses efeitos citotóxicos estão associados à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que desempenham papel crucial em danos ao DNA e na sinalização celular (Giannelli et al., 2008; Faria et al., 2009; Li et al., 2014; Pires et al., 2016). Para mitigar esses efeitos, diversas formulações têm sido exploradas, incluindo curativos de quitosana/ácido hialurônico, filmes

poliméricos mucoadesivos e microesferas biodegradáveis (Rossi et al., 2007; Agarwal et al., 2012; Jiang; Zhang; Brey, 2013; Donnadio et al., 2016; Lim et al., 2020).

Outra consideração diz respeito à mutagenicidade da CXD. Quando avaliados pelo teste de Ames, os filmes M e M-CXD não induziram mutações gênicas detectáveis nas condições experimentais utilizadas. O teste de Ames, que avalia o potencial das substâncias para induzir mutações de deslocamento de quadro ou substituições de pares de bases, é rotineiramente realizado para prever a carcinogenicidade em roedores e humanos. Apesar da disponibilidade de outros testes para avaliar mutações ou danos genéticos em células microbianas e de mamíferos, o teste de Ames (ensaio de mutação reversa em *Salmonella*) é considerado o ensaio in vitro mais preditivo e é exigido pelas autoridades reguladoras em todo o mundo para testar produtos químicos de uso comercial (Escobar et al., 2013; Zeiger, 2019).

Neste estudo, as cepas de *Salmonella* exibiram uma sensibilidade aumentada aos tratamentos com eluatos dos filmes M-CXD preparados de acordo com a ISO 10993-12 (2021), levando à inibição completa do crescimento bacteriano (dados não mostrados). Conseqüentemente, foi necessário aumentar a diluição para reduzir a concentração residual de CXD no eluato testado. Devido à limitação do sistema de teste em avaliar substâncias com ação bactericida, combinamos o teste de Ames e os ensaios Cometa e de MN para avaliar a toxicologia genética dos filmes biopoliméricos.

Evidências sugerem que a CXD pode induzir efeitos genotóxicos em células de mamíferos, possivelmente relacionados à sua capacidade de gerar ROS (Grassi et al., 2007; Li et al., 2014; Khan, Hasan, 2016; Pires et al., 2016). Em nosso estudo, os ensaios Cometa e MN revelaram que os filmes M-CXD induzem danos significativos ao DNA das células HaCaT de forma dose-dependente. Resultados semelhantes foram relatados em estudos com outras linhagens celulares (Eren et al., 2002; Ribeiro et al.,

2004; Grassi et al., 2007). Além disso, o produto de degradação da CXD, 4-cloroanilina, também foi associado a efeitos genotóxicos (Lueken et al., 2004).

Embora a CXD não se acumule no organismo e seja minimamente absorvida pelos tecidos (Eren et al., 2002), os efeitos mutagênicos induzidos pelos filmes M-CXD representam um risco potencial à saúde, especialmente em exposições prolongadas ou repetidas.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo foi desenvolvido um filme antimicrobiano inovador, sustentável e eficaz, utilizando biopolímeros obtidos do mesocarpo da melancia por meio de um processo hidrotérmico. O filme M-CXD demonstrou atividade antimicrobiana eficaz contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Além disso, nossos resultados contribuem na avaliação da segurança genotoxicológica desses materiais, o que evidenciou potenciais efeitos mutagênicos e citotóxicos. Diante disso, este estudo reforça a necessidade de avaliações toxicológicas detalhadas durante o desenvolvimento de biomateriais e destacam os riscos associados ao uso de compostos com potencial genotóxico, mesmo em matrizes biopoliméricas. O uso dos filmes M-CXD como curativos, por exemplo, deve ser criteriosamente avaliado com base na relação risco-benefício. Ainda assim, as propriedades únicas dos filmes M-CXD destacam seu potencial para atender à crescente demanda por materiais biopoliméricos de alto desempenho, especialmente em aplicações externas ao corpo, onde o controle do crescimento microbiano é essencial.

6. REFERÊNCIAS

- ABBOOD, H.M., HIJAZI, K., GOULD, I.M.: Chlorhexidine Resistance or Cross-Resistance, That Is the Question. **Antibiotics**. v.12, n.798, p. 1-12. 2023. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050798>
- AGARWAL, A., NELSON, T.B., KIERSKI, P.R., SCHURR, M.J., MURPHY, C.J., CZUPRYNSKI, C.J., MCANULTY, J.F., ABBOTT, N.L.: Polymeric multilayers that localize the release of chlorhexidine from biologic wound dressings. **Biomaterials**. v.33, n.1, p.6783–6792. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.068>
- AL-ANI, E., HILL, D., DOUDIN, K.: Chlorhexidine mucoadhesive buccal tablets: The impact of formulation design on drug delivery and release kinetics using conventional and novel dissolution methods. **Pharmaceuticals**. v.14, n.493, 1-18. 2021. <https://doi.org/10.3390/ph14060493>
- AL-SAYED, H.M.A., AHMED, A.R.: Utilization of watermelon rinds and sharlyn melon peels as a natural source of dietary fiber and antioxidants in cake. **Annals Agric. Sci**. v.58, n.1, p.83–95. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2013.01.012>
- ÁLVAREZ, J.A., RUÍZ, S.R., MOSQUEDA, J.L., LEÓN, X., ARREGUÍN, V., MACÍAS, A.E., MACIAS, J.H.: Decontamination of stethoscope membranes with chlorhexidine: Should it be recommended? **Am. J. Infect. Control**. v.44, n.1, p. e205–e209. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.07.012>
- AMBROGI, V., PIETRELLA, D., NOCCHETTI, M., CASAGRANDE, S., MORETTI, V., DE MARCO, S., RICCI, M.: Montmorillonite–chitosan–chlorhexidine composite films with antibiofilm activity and improved cytotoxicity for wound dressing. **J. Colloid Interface Sci**. v.491, n.1, p. 265–272. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.12.058>

- American Society for Testing and Materials (ASTM)0. 2016. Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting (E96/E96M-16). In **Annual Book of American Standard Testing Methods**; American Society for Testing and Materials (ASTM): West Conshohocken, PA, USA, p. 719–725. 2016 <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D882-18>
- BERNSTEIN, I.H., LIN, T.-D., MCCLELLAN, P.: Cross- vs. within-racial judgments of attractiveness. **Perception & Psychophysics**. v.32, n.1, p.495–503. 1982. <https://doi.org/10.3758/BF03204202>
- BOATENG, J.S., MATTHEWS, K.H., STEVENS, H.N.E., ECCLESTON, G.M.: Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. **J. Pharmac. Sci.** v.97, n.1, p.2892–2923. 2008. <https://doi.org/10.1002/jps.21210>
- BROOKES, Z.L.S., BESCOS, R., BELFIELD, L.A., ALI, K., ROBERTS, A.: Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. **J. Dentist.** v.103, n.1, p.103497. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103497>
- BRUSCHI, M.L.: Mathematical models of drug release. In *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (pp. 63–86), **Elsevier**, (2015). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>
- BRYANT, J.A., RIORDAN, L., WATSON, R., NIKOI, N.D., TRZASKA, W., SLOPE, L., TIBBATTS, C., ALEXANDER, M.R., SCURR, D.J., MAY, R.C., DE COGAN, F.: Developing Novel Biointerfaces: Using Chlorhexidine Surface Attachment as a Method for Creating Anti-Fungal Surfaces. **Global Challenges**. v.6, n.1, p.2100138. 2022. <https://doi.org/10.1002/gch2.202100138>
- BUTLER, J., HANDY, R.D., UPTON, M., BESINIS, A.: Review of Antimicrobial Nanocoatings in Medicine and Dentistry: Mechanisms of Action, Biocompatibility

- Performance, Safety, and Benefits Compared to Antibiotics. **ACS Nano**. v.17, n.1, p.7064-7092 2023. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c12488>
- COLLINS, A., MØLLER, P., GAJSKI, G., VODENKOVÁ, S., ABDULWAHED, A., ANDERSON, D., BANKOGLU, E.E., BONASSI, S., BOUTET-ROBINET, E., BRUNBORG, G., CHAO, C., COOKE, M.S., COSTA, C., COSTA, S., DHAWAN, A. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. **Nat. Protoc.** v.18, n.1, p.929–989. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00754-y>
- DIAS, D.D.S., OTONI, C.G., DA SILVA, R.R., MENEGUIN, A.B., MATTOSO, L.H.C., BARUD, H.D.S., RIBEIRO, C.A.: Large scale manufacturing of puree-only edible films from onion bulb (*Allium cepa* L.): Probing production and structure–processing–property correlations. **Ind. Crops Prod.** v.145, n.1, p.111847. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111847>
- DONNADIO, A., AMBROGI, V., PIETRELLA, D., PICA, M., SORRENTINO, G., CASCIOLA, M.: Carboxymethylcellulose films containing chlorhexidine–zirconium phosphate nanoparticles: antibiofilm activity and cytotoxicity. **RSC Adv.** v.6, n.1, p.46249–46257. 2016. <https://doi.org/10.1039/C6RA04151E>
- DUCKWORTH, P.F., MADDOCKS, S.E., RAHATEKAR, S.S., BARBOUR, M.E.: Alginate films augmented with chlorhexidine hexametaphosphate particles provide sustained antimicrobial properties for application in wound care. *J Mater Sci: Mater Med.* 31, 33 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06370-0>
- DZIADEK, M., STODOLAK-ZYCH, E., CHOLEWA-KOWALSKA, K.: Biodegradable ceramic-polymer composites for biomedical applications: A review. *Mat. Sci. Engineer. C.* v.71, n.1, p.1175–1191. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.014>

- EISSENBERGER, K., BALLESTEROS, A., DE BISSCHOP, R., BUGNICOURT, E., CINELLI, P., DEFOIN, M., DEMEYER, E., FÜRTAUER, S., GIOIA, C., GÓMEZ, L., HORNBERGER, R., IßBRÜCKER et al.: Approaches in Sustainable, Biobased Multilayer Packaging Solutions. **Polym.** v.15, n.1, p.1184. 2023. <https://doi.org/10.3390/polym15051184>
- EREN, K., ÖZMERİÇ, N., ŞARDAŞ, S.: Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. **Clin. Oral Invest.** v.6, n.1, p.150–154. 2002. <https://doi.org/10.1007/s00784-002-0168-1>
- ESCOBAR, P.A., KEMPER, R.A., TARCA, J., NICOLETTE, J., KENYON, M., GLOWIENKE, S., SAWANT, S.G., CHRISTENSEN, J., JOHNSON, T.E., MCKNIGHT, C., WARD, G., GALLOWAY, S.M., CUSTER, L., GOCKE, E., O'DONOVAN, M.R., BRAUN, K., SNYDER, R.D., MAHADEVAN, B.: BACTERIAL mutagenicity screening in the pharmaceutical industry. **Mutat. Res.** v.752, n.1, p.99–118. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.12.002>
- FACCIOLÀ, A., PELLICANÒ, G.F., VISALLI, G., PAOLUCCI, I.A., RULLO, E.V., CECCARELLI, M., D'ALEO, F., DI PIETRO, A., SQUERI, R., NUNNARI, G., LA FAUCI, V.: The role of the hospital environment in the healthcare-associated infections: a general review of the literature. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.** v.23, n.1, p.1266–1278. 2019. https://doi.org/10.26355/eurrev_201902_17020
- FARIA, G., CELES, M.R.N., DE ROSSI, A., SILVA, L.A.B., SILVA, J.S., ROSSI, M.A.: Evaluation of Chlorhexidine Toxicity Injected in the Paw of Mice and Added to Cultured L929 Fibroblasts. **J. Endodontics.** v.33, n.1, p.715–722. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.12.023>

- FEIZY, J., JAHANI, M., AHMADI, S.: Antioxidant activity and mineral content of watermelon peel. **J. Food Bioprocess. Eng.** v.3, n.1, p.1-10. 2020. <https://doi.org/10.22059/jfabe.2020.75811>
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat Protoc.** 2, 1084–1104 (2007). <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- FRIEDRICH, J., SEIDEL, C., EBNER, R., KUNZ-SCHUGHART, L.A. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nat Protoc.** 4, 309–324 (2009). <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>
- GIANNELLI, M., CHELLINI, F., MARGHERI, M., TONELLI, P., TANI, A.: Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. **Toxicol. in Vitro.** v.22, n.1, p.308–317. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.09.012>
- GLADVIN, G., SUDHAACKR, G., SWATHI, V., SANTHISRI, K. V.: Mineral and vitamin compositions contents in watermelon peel (rind). **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.** v.5, n.1, p.129-133. 2017.
- GONG, X. et al. Generation of multicellular tumor spheroids with microwell-based
- GRASSI, T.F., CAMARGO, E.A., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, M.E.A., RIBEIRO, D.A.: DNA damage in multiple organs after exposure to chlorhexidine in Wistar rats. **Int. J. Hygiene Environm. Health.** v.210, n.1, p.163–167. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2006.09.001>
- HONG, H., MORROW, D.F., SANDORA, T.J., PRIEBE, G.P.: Disinfection of needleless connectors with chlorhexidine-alcohol provides long-lasting residual disinfectant activity. **Am. J. Infect. Control.** v.41, n.1, p.e77–e79. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.10.018>

- Institute of Clinical Standards and Laboratories St. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 28th ed. CLSI Supplement M100 (ISBN 1-56238-838-X Print]; ISBN 1-56238-839-8 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018. https://clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf
- ISO 10993-12:2021. 2021. Biological Evaluation of Medical Devices — Part 12: Sample Preparation and Reference Materials. Brussels, Belgium: International Organization for Standardization. <https://www.iso.org/standard/75769.html>
- JIANG, B., ZHANG, G., BREY, E.M.: Dual delivery of chlorhexidine and platelet-derived growth factor-BB for enhanced wound healing and infection control. **Acta Biomaterialia**. v9, n.1, p.4976–4984. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.10.005>
- JONES, C.G.: Chlorhexidine: is it still the gold standard? **Periodontol.** v.15, n.1, p.55–62. 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00105.x>
- KHAN, S., KHAN, A., HASAN, S.: Genotoxic assessment of chlorhexidine mouthwash on exfoliated buccal epithelial cells in chronic gingivitis patients. **J Indian Soc Periodontol.** v.20, n.1, p.584. 2016. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_9_17
- KHLYUSTOVA, A., CHENG, Y., YANG, R.: Vapor-deposited functional polymer thin films in biological applications. **J. Mater. Chem. B.** v.8, n.1, p.6588–6609. 2020. <https://doi.org/10.1039/D0TB00681E>
- LEMIECH-MIROWSKA, E., KIERSNOWSKA, Z., MICHAŁKIEWICZ, M., DEPTA, A., MARCZAK, M.: Nosocomial infections as one of the most important problems of healthcare system. **Ann. Agric. Environ. Med.** v.28, n.1, p.361–366. 2021. <https://doi.org/10.26444/aaem/122629>

- LI, Y., KUAN, Y., LEE, S., HUANG, F., CHANG, Y.: Cytotoxicity and genotoxicity of chlorhexidine on macrophages in vitro. **Environm. Toxicol.** v.29, n.1, p.452–458. 2014. <https://doi.org/10.1002/tox.21771>
- LIM, S.Y., DAFYDD, M., ONG, J., ORD-MCDERMOTT, L.A., BOARD-DAVIES, E., SANDS, K., WILLIAMS, D., SLOAN, A.J., HEARD, C.M.: Mucoadhesive thin films for the simultaneous delivery of microbicide and anti-inflammatory drugs in the treatment of periodontal diseases. **Int. J. Pharmac.** v.573, n.1, p.118860. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118860>
- LIU, J-Y; DICKTER, J.K.: Nosocomial Infections: A History of Hospital-Acquired Infections. **Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.** 30, 637-652 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.001>
- LIU, J.X., WERNER, J., KIRSCH, T., ZUCKERMAN, J.D., VIRK, M.S.: Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. **J. Bone Joint Infect.** v.3, n.1, p.165–172. 2018. <https://doi.org/10.7150/jbji.26355>
- LUEKEN, A., JUHL-STRAUSS, U., KRIEGER, G., WITTE, I.: Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H₂O₂) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. **Toxicol. Letters.** 147, 35–43 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.10.020>
- MACIAS, J.H., ARREGUIN, V., MUNOZ, J.M., ALVAREZ, J.A., MOSQUEDA, J.L., MACIAS, A.E.: Chlorhexidine is a better antiseptic than povidone iodine and sodium hypochlorite because of its substantive effect. **Am. J. Infect. Control.** v.41, n.1, p.634–637. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.10.002>

- MAMIRU, D., GONFA, G.: Extraction and characterization of pectin from watermelon rind using acetic acid. **Heliyon**. v.9, n.1, p.e13525. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13525>
- MARON, D.M., AMES, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutat. Res.** v.113, n.1, p.173–215. 1983. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- MCHUGH, T.H., AVENA-BUSTILLOS, R., KROCHTA, J.M.: Hydrophilic Edible Films: Modified Procedure for Water Vapor Permeability and Explanation of Thickness Effects. **J. Food Sci.** v.58, n.1, p.899–903. 1993. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb09387.x>
- MORTELMANS, K., ZEIGER, E.: The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutat. Res.** v. 455, p. 29–60. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6)
- NADEEM, M., NAVIDA, M., AMEER, K., IQBAL, A., MALIK, F., NADEEM, M.A., FATIMA, H., AHMED, A., DIN, A.: A comprehensive review on the watermelon phytochemical profile and their bioactive and therapeutic effects. **Korean J. Food Preserv.** v.29, n.1, p.546–576. 2022. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2022.29.4.546>
- NEGLO, D., TETTEY, C.O., ESSUMAN, E.K., KORTEI, N.K., BOAKYE, A.A., HUNKPE, G., AMARH, F., KWASHIE, P., DEVI, W.S.: Comparative antioxidant and antimicrobial activities of the peels, rind, pulp, and seeds of watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit. **Scient. African.** v.11, n.1, p.e00582. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00582>
- NIE, Y.; XU, X.; WANG, W.; MA, N.; LENDLEIN, A.: Spheroid formation of human keratinocyte: Balancing between cellsubstrate and cell-cell interaction. **In: Clinical Hemorheology and Microcirculation.** v. 76 (2020) 2, 329 -340. First published

online by IOS Press: 08.09.2020 DOI: 10.3233/CH-209217
<https://dx.doi.org/10.3233/CH-209217>

OLIVEIRA, R.W.G., DE OLIVEIRA, J.M., DA PAZ, F.B., MUNIZ, E.C., DE MOURA, E.M., COSTA, J.C.S., DO NASCIMENTO, M.O., CARVALHO, A.L.M., PINHEIRO, I.M., MENDES, A.N., FILGUEIRAS, L.A., DE SOUZA, P.R., DE MOURA, C.V.R.: Films composed of white angico gum and chitosan containing chlorhexidine as an antimicrobial agent. **Int. J. Biol. Macromol.** v.235, n.1, p.123905. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123905>

PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C.: A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. **International J. Oncol.** v.3, n.1, p.473–476. 1993. <https://doi.org/10.3892/ijo.3.3.473>

PATEL, A., PARIKH, P., DUNN, A.N., OTTER, J.A., THOTA, P., FRASER, T.G., DONSKEY, C.J., DESHPANDE, A.: Effectiveness of daily chlorhexidine bathing for reducing gram-negative infections: A meta-analysis. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** v.40, n.1, p.392–399. 2019. <https://doi.org/10.1017/ice.2019.20>

PETERS, A., SCHMID, M.N., PARNEIX, P., LEBOWITZ, D., DE KRAKER, M., SAUSER, J., ZINGG, W., PITTET, D.: Impact of environmental hygiene interventions on healthcare-associated infections and patient colonization: a systematic review. **Antimicrob. Resist. Infect. Control.** v.11, n.1, p.38. 2022. <https://doi.org/10.1186/s13756-022-01075-1>

PIRES, C.W., BOTTON, G., CADONÁ, F.C., MACHADO, A.K., AZZOLIN, V.F., DA CRUZ, I.B.M., SAGRILLO, M.R., PRAETZEL, J.R.: Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. **Int Endodontic J.** v.49, n.1, p.737–745. 2016. <https://doi.org/10.1111/iej.12502>

- PITTET, D., ALLEGRANZI, B., BOYCE, J.: World Health Organization World Alliance for Patient Safety First Global Patient Safety Challenge Core Group of Experts: The World Health Organization Guidelines on Hand Hygiene in Health Care and Their Consensus Recommendations. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** v.30, n.1, p.611–622. 2009. <https://doi.org/10.1086/600379>
- POPPOLO DEUS, F., OUANOUNOU, A.: Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. **Inter. Dental J.** v.72, n.1, p.269–277. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.identj.2022.01.005>
- PRIYADARSHINI, B., SELVAN, S., NARAYANAN, K., FAWZY, A.: Characterization of Chlorhexidine-Loaded Calcium-Hydroxide Microparticles as a Potential Dental Pulp-Capping Material. **Bioengineering.** v.4, n.1, p.59. 2017. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030059>
- RAMPERSAD, S. N.: Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. **Sensors** v.12, n.1, p.12347–12360. 2012. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- RESHMA, V.G., SYAMA, S., SRUTHI, S., RESHMA, S.C., REMYA, N.S., MOHANAN, P.V.: Engineered Nanoparticles with Antimicrobial Property. **Curr Drug Metab.** v.18, n.1, p.1040-1054. 2017. <https://doi.org/10.2174/1389200218666170925122201>
- RIBEIRO, D.A., BAZO, A.P., FRANCHI, C.A.S., MARQUES, M.E.A., SALVADORI, D.M.F.: Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. **J. Periodontal Res.** v.39, n.1, p.358-361. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00759.x>
- ROSSI, S., MARCIELLO, M., SANDRI, G., FERRARI, F., BONFERONI, M.C., PAPETTI, A., CAMELLA, C., DACARRO, C., GRISOLI, P.: Wound Dressings

- Based on Chitosans and Hyaluronic Acid for the Release of Chlorhexidine Diacetate in Skin Ulcer Therapy. **Pharmac. Dev. Technol.** v.12, n.1, p.415–422. 2007. <https://doi.org/10.1080/10837450701366903>
- SANTOS, M.V.B.D., FEITOSA, G.T., OSAJIMA, J.A., SANTOS, R.L.P., SILVA FILHO, E.C.D.: Desenvolvimento de biomaterial composto por hidroxiapatita e clorexidina para aplicação na cavidade oral. **Cerâmica.** v.65, n.1, p.130–138. 2019. <https://doi.org/10.1590/0366-69132019653732441>
- SINGH, R., KUMAR, J.C., NANDPURI, K.S.: A study on the influence of the structural chemical constituents of the skin of watermelon (*Citrullus lanatus* sch.) fruit on the incidence of its blossom-end-rot and cracking. **Indian J. Horticult.** v.32, n.1, p.98-101. 1975.
- TARAWNEH, O., HAMADNEH, I., HUWAITAT, R., AL-ASSI, A.R., EL MADANI, A.: Characterization of Chlorhexidine-Impregnated Cellulose-Based Hydrogel Films Intended for the Treatment of Periodontitis. **BioMed Res. Int.** v.1, n.1, p.1–7. 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9853977>
- THANGAVELU, A., KASPAR, S., KATHIRVELU, R., SRINIVASAN, B., SRINIVASAN, S., SUNDRAM, R.: Chlorhexidine: An elixir for periodontics. **J. Pharm. Bioall. Sci.** v.12, n.1, p.57. 2020. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_162_20
- TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C., SASAKI, Y.F.: Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.** v.35, n.1, p.206-221. 2000. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(2000\)35:3<206:aid-em8>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206:aid-em8>3.0.co;2-j)
- VALENCIA, L., NOMENA, E.M., MATHEW, A.P., VELIKOV, K.P.: Biobased Cellulose Nanofibril–Oil Composite Films for Active Edible Barriers. **ACS Appl.**

- Mater. Interfaces.** v.11, n.1, p.16040–16047. 2019.
<https://doi.org/10.1021/acsami.9b02649>
- VINCI, M., GOWAN, S., BOXALL, F., PATTERSON, L., ZIMMERMANN, M., COURT, W., LOMAS, C., MENDIOLA, M., HARDISSON, D., ECCLES, S.A. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC Biol.** 10, 29 (2012). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-29>
- WASIAK, J., CLELAND, H.: Burns: dressings. **BMJ Clin Evid.** v.1, n.1, p.1903. 2015.
https://researchmgt.monash.edu/ws/portalfiles/portal/316309579/316309476_oa.pdf
- WEBER, J., HENSSLER, L., ZEMAN, F., PFEIFER, C., ALT, V., NERLICH, M., HUBER, M., HERBST, T., KOLLER, M., SCHNEIDER-BRACHERT, W., KERSCHBAUM, M., HOLZMANN, T.: Nanosilver/DCOIT-containing surface coating effectively and constantly reduces microbial load in emergency room surfaces. **J. Hosp. Infect.** v.135, n.1, p.90–97. 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.01.024>
- WEI, L., LI, Y., LI, X., BIAN, L., WEN, Z., LI, M.: Chlorhexidine-impregnated dressing for the prophylaxis of central venous catheter-related complications: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infect Dis.** v.19, n.1, p.429. 2019.
<https://doi.org/10.1186/s12879-019-4029-9>
- WHITE, R., HARTWELL, S., BROWN, S.: Interim report on a study to assess the effectiveness and improved fluid uptake of new Allevyn. **Wounds UK.** v.3, n.1, p.121–127.
- ZEIGER, E.: The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. **Mutat. Res.** v.841, n.1, p.43–48. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.007>



Biopolymer from the Puree of Mesocarp of *Citrullus lanatus* (Watermelon) Containing Chlorhexidine Digluconate: Physical-Chemistry Characterization and Biological Aspects

José Alberto Paris Junior¹ · Leonardo Gorla Nogueira¹ · Igor Henrique Cerqueira¹ · Nicole Pichirilli Catirse¹ · Lucas Henrique Domingos da Silva¹ · Paula de Abreu Fernandes¹ · Vitória Maria Medalha Colturato¹ · Diógenes dos Santos Dias^{2,3} · Clóvis Augusto Ribeiro^{2,3} · Alessandra Cristina Dametto³ · Jhonatan Miguel Silva¹ · Hernane da Silva Barud¹ · Flávia Aparecida Resende¹

Received: 12 April 2024 / Accepted: 29 September 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2024

Abstract

Fruit and vegetable waste is a promising source to produce functional polymeric films, given the urgent need to replace petroleum-based polymeric materials due to their environmental impacts and limited sustainability. In the present study, we produced an antimicrobial surface film derived from watermelon mesocarp containing chlorhexidine in digluconate form (W-CHX) with applicability for coating 2D surfaces and medical devices. The films were obtained by hydrothermal steps and casting, and characterized by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, thermal stability profile, water barrier properties, fluid handling ability, and drug release, in addition to the assessment of antibacterial, cytotoxic, and mutagenic potential. Although the W-CHC films have demonstrated promising mechanical and antibacterial properties against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*, their cytotoxicity and genotoxicity in keratinocytes (HaCaT cells) as revealed by the Comet assay highlight the need for cautious use for topical applications. Therefore, the attributes exhibited by W-CHX films offer a pathway to address the escalating need for biopolymer-based materials with enhanced performance, particularly in extracorporeal applications necessitating microbial growth inhibition.

Graphical Abstract

Antimicrobial surface film: watermelon mesocarp-only biopolymers with chlorhexidine (CHX)



Keywords Watermelon mesocarp · Antimicrobial surface film · Biopolymer-based materials · Cytotoxic · Genotoxicity

Statement of Novelty

This study presents a novel approach in developing an antimicrobial surface film derived exclusively from watermelon mesocarp via a hydrothermal process, incorporating

Extended author information available on the last page of the article

chlorhexidine (W-CHX film). The innovative aspect lies in utilizing fruit and vegetable waste as a sustainable source for producing functional polymeric films, addressing the urgent need to replace petroleum-based materials. The characterization of the films through well-established techniques and standardized protocols, further contributes to the novelty of this work. Additionally, the assessment of antibacterial,