

AValiação DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH• DE BLENdas DE QUITOSANA COM *Aloe vera* OBTIDAS POR CO-PRECIPItaÇÃO

Pâmella R. L. C. Gonçalves¹; Cícero W. B. Bezerra²; Leandro L. Silva³; Francisco F. S. Cruz⁴

¹*Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Bionorte, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805 São Luis – MA, Brasil*

²*Departamento de Química, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805 São Luís – MA, Brasil*

³*Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro-RJ, 27930-560 Macaé, Brazil*

⁴*Doutorado em Química Associativo UFMA-IFMA, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805 São Luís – MA, Brasil*

Palavras-Chave: biopolímeros, materiais sustentáveis, síntese verde.

Introdução

A quitosana (QT), um biopolímero versátil, biocompatível e com atividade antimicrobiana intrínseca, tem despertado grande interesse como material para aplicações biomédicas (1). Suas propriedades únicas motivaram sua utilização na síntese de blendas com outros biopolímeros, a exemplo do ácido hialurônico (AH), visando a obtenção de funcionalidades específicas (1-5). Particularmente, ainda que combinações como QT/AH ofereçam vantagens na cicatrização de feridas e na engenharia de tecidos, a obtenção de blendas que possam sinergicamente ampliar as propriedades benéficas da quitosana continua a ser necessária (6-12).

Aloe vera, planta suculenta reconhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e antimicrobianas, tem merecida significativa atenção na pesquisa biomédica. Blendas de quitosana e *Aloe vera* (QT/AV) vêm demonstrando aplicações promissoras em curativos devido à sua bioatividade combinada (13-19). No entanto, os métodos convencionais de síntese frequentemente carecem de controle sobre a distribuição dos componentes na mistura, o que pode afetar sua eficácia. Este estudo aborda essa limitação ao empregar o método de co-precipitação para fabricar blendas QT/AV com uma composição mais controlada e investigar suas propriedades, incluindo características estruturais, térmicas, de intumescimento e atividade antioxidante.

O método DPPH• é amplamente utilizado na caracterização da atividade antioxidante devido à sua facilidade de operação, sensibilidade, precisão e rapidez, além de ser econômico. Este método permite a avaliação da capacidade antioxidante tanto de substâncias puras quanto de blendas (20).

Por meio da variação sistemática das proporções de mistura e da caracterização das interações entre biopolímeros, almejou-se otimizar as propriedades funcionais das blendas QT/AV para aprimorar suas aplicações na cicatrização de feridas.

Material e Métodos

A quitosana foi obtida a partir da desacetilação da quitina extraída do exoesqueleto do camarão branco (*Litopenaeus schmitti*), seguindo a metodologia descrita por Zelencova *et al.*, com algumas modificações (21). O exsudato de *Aloe vera* foi obtido a partir do tratamento das folhas maduras da espécie *Aloe vera* Burm.f., onde a mucilagem foi congelada e liofilizada à -60 °C por 48h, seguida de secagem a 40°C por 2h.

As blendas quitosana/*Aloe vera* (QT/AV) foram preparadas nas proporções (%p/p) 75:25, 50:50 e 25:75 por co-precipitação alcalina utilizando o $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{conc}}$. Durante o processo de preparação, observou-se a formação de um precipitado branco, que foi separado por centrifugação e lavado com água destilada até atingir pH neutro. O material foi então seco em estufa a 40°C por 12 horas e armazenado em dessecador. Todos os reagentes químicos utilizados neste estudo foram de grau analítico.

A caracterização das amostras foi realizada conforme descrito a seguir.

Os espectros de infravermelho foram registrados por um espectrômetro FT-IR (Shimadzu model IR Prestige-21, Kyoto, Japão) à temperatura ambiente, na faixa entre 4.000 e 400 cm^{-1} .

As análises de TG e DTA foram realizadas em analisador termogravimétrico Perkin Elmer modelo TGA 4000 em suporte de platina sob aquecimento controlado em atmosfera de ar sintético. Foi utilizada uma razão de aquecimento de 20 °C·min⁻¹ e fluxo de gás de 20 mL·min⁻¹.

A absorção de água das misturas e dos seus precursores foram avaliadas de acordo com o método utilizado por Adekogbe & Ghanem (2005) com adaptações (22). A razão de intumescimento (G) foi obtida de acordo com a Equação 1.

$$G = \frac{w_t - w_0}{w_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde G é a razão de intumescimento (g H₂O/g de amostra), w_0 é o peso da amostra seca e w_t é o peso da amostra úmida, após determinado tempo de imersão, t.

A avaliação da capacidade antioxidante foi realizada pelo método colorimétrico DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (23). As amostras foram colocadas em solução de ácido acético 0,5 molL⁻¹ na proporção de 30 mg mL⁻¹ e posteriormente diluídas em água. Alíquotas de 200 μL foram misturadas com 200 μL de DPPH (0,3 mM em etanol), resultando em concentrações finais de 0,94, 1,87, 3,75 e 7,50 mg mL⁻¹. A mistura foi vigorosamente agitada e, após um período de incubação de 30 min protegido da luz, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi transferido para uma microplaca de 96 poços para medição espectrofotométrica de absorção (SpectraMax® i3, Molecular Devices), em 517 nm, como um indicador de DPPH restante. A atividade antioxidante (AA) foi expressa em relação ao controle, onde 100% de DPPH restante, de acordo com a Equação 2.

$$\text{AA (\%)} = \frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100 \quad (2)$$

Resultados e Discussão

FT-IR

A Figura 1 mostra os espectros de infravermelho por transformada de Fourier da quitosana, Aloe vera e suas respectivas blendas.

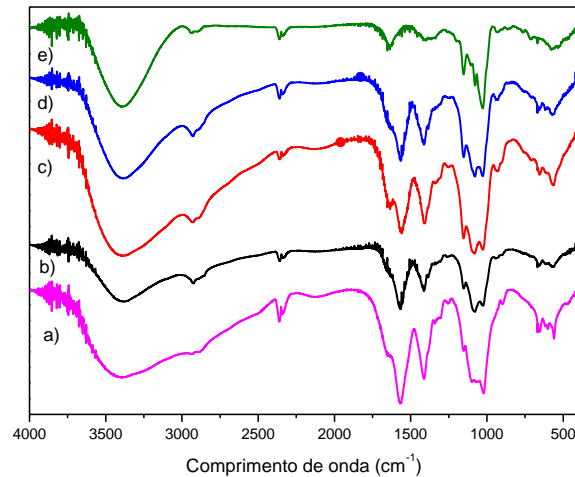


Figura 1: Espectros de FT-IR de a) quitosana, b) blenda QT/AV-75:25, c) blenda QT/AV-50:50, d) blenda QT/AV-25:75 e e) *Aloe vera* (AV).

O espectro vibracional do *Aloe vera* liofilizado (Figura 1e) apresentou uma faixa de 3690-3000 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{OH})$ e $\nu(\text{NH})$ característico dos aminoácidos; picos em 2945 e 2897 cm^{-1} devido ao alongamento simétrico e assimétrico de CH presente no grupo $-\text{CH}_2$, bem como grupos alifáticos $-\text{CH}$ presentes nos compostos. O pico em 1628 cm^{-1} foi atribuído à banda amida I, indicando a presença de grupos carbonila, $\nu(\text{C}=\text{O})$. Uma banda larga centrada em torno de 1408 cm^{-1} foi atribuída à presença de componentes carboxílicos (27). Um pico em 1139 cm^{-1} foi atribuído às vibrações de estiramento da ligação $\text{C} = \text{S}$, e um pico em 856 cm^{-1} foi atribuído às vibrações CH no anel piranose (27,28).

Nas blendas QT/AV (Figura 1b-d), foram observadas as características vibracionais predominantes da quitosana. Porém, conforme observado por Zarandona et al. (13) e Jithendra et al. (28), os espectros revelaram elementos distintos em comparação com a quitosana pura, sugerindo interações com componentes do *Aloe vera* através de leves deslocamentos e alterações na forma de certas bandas. Conforme representado na Figura 1, as misturas exibem picos mais nítidos em $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{COO}^-)$ e $\sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C}=\text{S})$ devido à presença dos componentes AV (13,28).

Os espectros de FTIR de quitosana, *Aloe vera* e suas misturas apresentam notável semelhança, isto representa um desafio na caracterização definitiva das interações utilizando apenas o FTIR. Embora existam variações espectrais sutis entre as blendas e seus biopolímeros individuais, essas diferenças fornecem informações limitadas sobre as interações específicas entre os componentes, o que representa um desafio na caracterização definitiva das interações utilizando apenas o FTIR.

TG/DTG

As curvas termogravimétricas (TG) e termogravimétricas derivadas (DTG) para todas as amostras são apresentadas na Figura 2.

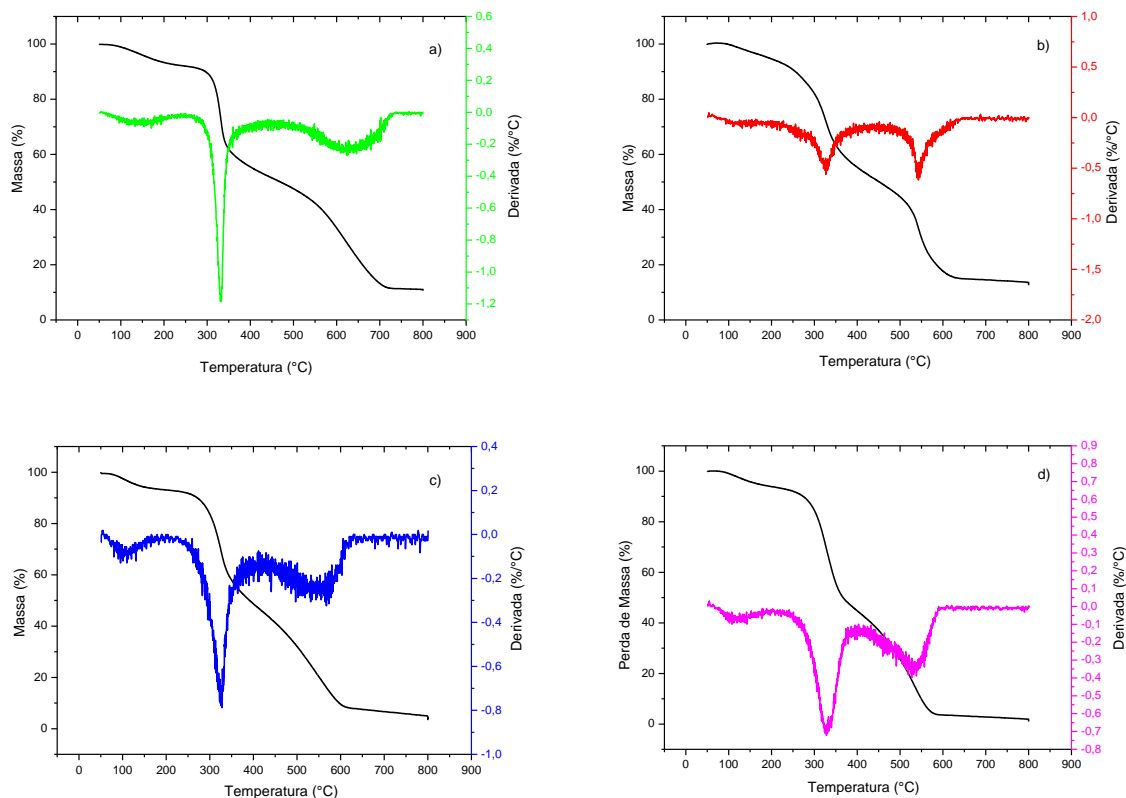


Figura 2 - Curvas termogravimétricas e termogravimétricas derivadas (TG/DTG) para a) quitosana (QT) e suas blends com exsudato de Aloe vera (b) QT/AV-75:25; c) QT/AV-50:50; d) QT/AV-25:75) sob atmosfera de ar sintético.

O comportamento da decomposição térmica revela a existência de três eventos de perda de massa na faixa de temperatura investigada. Interessante notar que a quantidade de matéria residual diminuiu significativamente com o aumento da quantidade de exsudato de Aloe vera incorporado na síntese. Isto sugere que o Aloe vera pode facilitar os processos de decomposição térmica, resultando em menor quantidade de material residual. Especificamente, a variação do resíduo obtido foi de 17,3% para QT, 15,2% para QT/AV-75:25, 7,4% para QT/AV-50:50 e 4,4% para QT/AV-25:75. Estas variações sugerem modificações na estrutura da quitosana.

As blends apresentaram o perfil de decomposição térmica semelhante ao observado na quitosana e em acordo com os resultados da literatura (13,28). Notavelmente, a inclusão de *Aloe vera* pareceu promover a desidratação do composto, como evidenciado por uma diminuição no pico máximo de temperatura (T_{Max}). Adicionalmente, foi observada uma perda gradual de massa durante o segundo e terceiro eventos, indicando modificações na estrutura da quitosana. Esta descoberta é relevante, sugerindo potenciais alterações na composição e propriedades das misturas quando o *Aloe vera* está presente.

Intumescimento

A Figura 3 apresenta a análise de intumescimento da quitosana pura e suas blends com *Aloe vera* em diferentes proporções (QT/AV-75:25; 50:50; e 25:75). Devido à sua alta solubilidade em água em vários níveis de pH, o exsudato de *Aloe vera* não apresentou resultados de intumescimento.

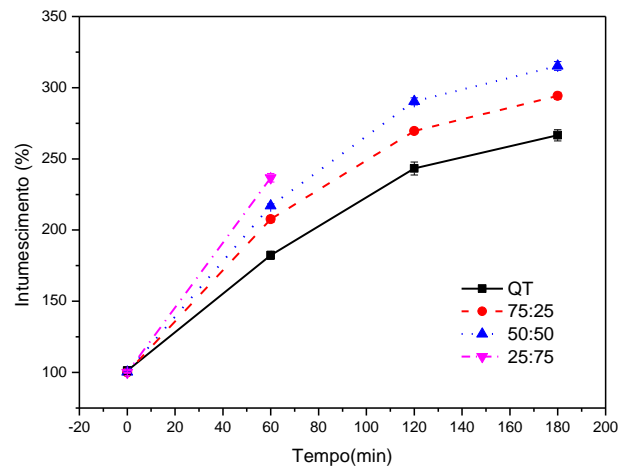


Figura 3: Porcentagem de intumescimento médio da amostra de quitosana (QT) e blends QT:AV nas proporções 75:25; 50:50; 25:75 sem. Média \pm DP (n = 4).

Um aumento gradual na taxa de inchaço é observado para todas as amostras ao longo do tempo. Este aumento é dependente do teor de *Aloe vera* presente na mistura, corroborando a hidrofiliicidade intrínseca deste biomaterial (28). Após 60 min de imersão no solvente, as blends apresentaram taxas de intumescimento maiores que a quitosana pura. A mistura QT/AV-25:75, com maior teor de *Aloe vera*, chegou a se desintegrar após esse período. Estes resultados demonstram que a incorporação de *Aloe vera* na quitosana modifica significativamente o comportamento de inchamento do material. As blends apresentaram maior capacidade de absorção de água, o que pode ser atribuído à presença de grupos hidrofílicos do exsudato de *Aloe vera* (29). A desintegração da mistura QT/AV-25:75 pode ser atribuída à sua alta hidrofiliicidade, resultando em inchaço excessivo e ruptura da estrutura do material.

Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante in vitro da quitosana, *Aloe vera* e suas blends nas proporções 75:25, 50:50 e 25:75 foi avaliada em diferentes concentrações (0,94, 1,87, 3,75 e 7,50 mg mL⁻¹) utilizando o método DPPH• a 150 μ M, conforme mostrado na Figura 4.

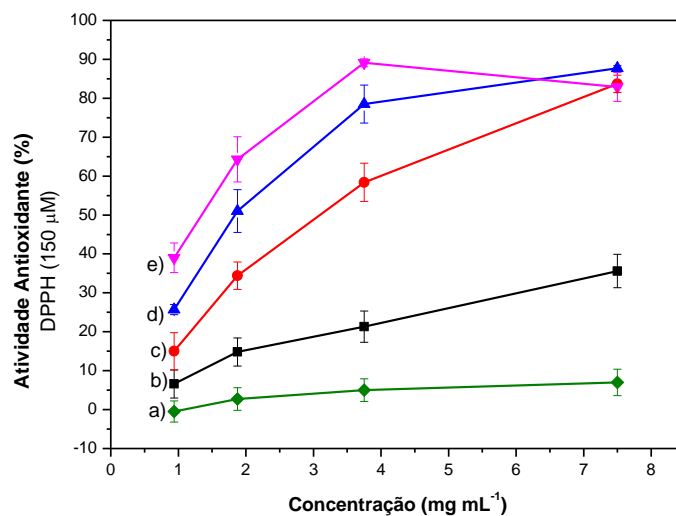


Figura 4: Atividade antioxidante em função da concentração de a) AV, b) QT, c) QT/AV-75:25, d) QT/AV-50:50, e) QT/AV-25:75.

Na Figura 4, observa-se que a atividade antioxidante de radicais aumentou com o aumento da concentração em todas as amostras analisadas, exceto para a amostra 25:75 que apresentou um valor menor na concentração (7,5 mg mL⁻¹). Todas as demais amostras apresentaram um aumento da atividade antioxidante dentro da faixa de concentração avaliada, sendo esta propriedade maior para as blendas do que para os compostos puros. Em relação às blendas, observa-se que o aumento na proporção de *Aloe vera* resultou em aumento na atividade sequestradora de radicais livres. A quitosana e o *Aloe vera* são reconhecidos pelas suas múltiplas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (30-32). A atividade antioxidante da quitosana é atribuída ao grupo amino -NH₂ livre residual, que tem a capacidade de capturar e neutralizar radicais livres através da doação de elétrons, reduzindo assim o estresse oxidativo (33). Os radicais livres são moléculas altamente reativas que podem danificar as células e consequentemente contribuir para o desenvolvimento de inúmeras doenças. Da mesma forma, o exsudato de *Aloe vera* atua como um eliminador de radicais livres, aumentando as defesas antioxidantes endógenas. De acordo com Yahya et al. (34), O gel de *Aloe vera* possui 13 tipos de compostos químicos fenólicos e flavonóides, que estão diretamente relacionados à atividade antioxidante. A adição de *Aloe vera* à quitosana potencializou o ensaio antioxidante DPPH das amostras, indicando que as blendas possivelmente contêm espécies doadoras de elétrons capazes de reagir com radicais livres e convertê-los em produtos mais estáveis. As formulações de gel de quitosana e *Aloe vera* tendem a induzir a atividade de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase. Essas enzimas participam do processo de neutralização das espécies reativas ao oxigênio, mantendo o equilíbrio químico da reação dentro da célula, reduzindo assim o estresse oxidativo (35).

Conclusões

Este estudo investigou as propriedades estruturais, térmicas, de absorção de água e antioxidantes da quitosana e Aloe vera, bem como de suas misturas (blendas) preparadas utilizando uma nova rota de síntese: co-precipitação. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier confirmou a formação de novos compostos nas blendas, identificando bandas características de ambos os materiais. A análise termogravimétrica revelou um comportamento térmico típico das amostras, com uma redução nas temperaturas de decomposição térmica das blendas em relação à quitosana pura, indicando uma modificação nas propriedades térmicas após a incorporação de Aloe vera. A capacidade de absorção de água foi favorável para todas as amostras, sendo que a blenda QT/AV-25:75 apresentou melhor desempenho após 1 h de contato com água. Observou-se atividade antioxidante tanto nos precursores quanto nas blendas, com destaque para QT/AV-25:75, exibindo a maior atividade. Os resultados combinados deste estudo indicam que a blenda de quitosana e Aloe vera na proporção QT/AV-25:75 apresenta-se como um material promissor para aplicações biomédicas. Sua biocompatibilidade, capacidade de absorção de água e atividade antioxidante o tornam um potencial candidato ao desenvolvimento de curativos para tratamento de lesões cutâneas. Além disso, a produção de blendas a partir de resíduos (casca de camarão) contribui significativamente para a redução da poluição ambiental, promovendo a sustentabilidade ecológica no desenvolvimento de materiais biomédicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPEMA e à Comissão Europeia (MSCA-IF-101026616) pelo apoio financeiro e a Pâmella R. L. C. Gonçalves agradece à CAPES pela bolsa concedida.

Referências

1. Iqbal, Y.; Ahmed, I.; Irfan, M. F.; Chatha, S. A. S.; Zubair, M.; Ullah A. Recent advances in chitosan-based materials; The synthesis, modifications and biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, 321, 121318, 2023.
2. Zhang, R.; Chang, S. J.; Jing, Y.; Wang, L.Y.; Chen, C-J.; Liu, J-T. Application of chitosan with different molecular weights in cartilage tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, 314, 120890, 2023.
3. Jayakumar, A.; Menona, D.; Manzoor, K.; Nair, S. V.; Tamura, H. Biomedical applications of chitin and chitosan-based nanomaterials—A short review. **Carbohydrate Polymers**, 82, 227–232, 2010.
4. Ressler, A.; Ohlsbom, R.; Žužić, A.; Gebraad, A.; Frankberg, E. J.; Pakarinen, T-K. *et al.* Chitosan/collagen/Mg, Se, Sr, Zn-substituted calcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering applications: A growth factor free approach. **European Polymer Journal**. 194, 112129, 2023.
5. Jagdale, S.; Agarwal, B.; Dixit, A.; Gaware, S. Chitosan as excellent bio-macromolecule with myriad of anti-activities in biomedical applications – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**. 257,128697, 2024.
6. Phunpee, S.; Ruktanonchai, U. R.; Chirachanchai S. Tailoring a UCST-LCST-pH multiresponsive window through a single polymer complex of chitosan–hyaluronic acid. **Biomacromolecules**. 23, 5361-5372, 2022.
7. Valachová, K.; Šoltés, L. Versatile use of chitosan and hyaluronan in medicine. **Molecules**, 26, 1195, 2021.

8. Peter, M.; Ganesh, N.; Selvamurugan, N.; Nair, S. V.; Furuike, T.; Tamura, H. *et al.* Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 414–420, 2010.
9. Lawrie, G.; Keen, I.; Drew, B.; Chandler-Temple, A.; Rintoul, L.; Fredericks, P. *et al.* Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*. 8(8), 2533–2541, 2007.
10. Ducret, M.; Montebault, A.; Josse, J.; Padeloup, M.; Celle, A.; Benchrih, R. *et al.* Design and characterization of a chitosan-enriched fibrin hydrogel for human dental pulp regeneration. *Dental Materials*. 35(4), 523-533, 2019.
11. Qureshi, M. A. R.; Arshad, N.; Rasool, A.; Islam, A.; Rizwan, M.; Haseeb, M.; *et al.* Chitosan and Carrageenan-Based Biocompatible Hydrogel Platforms for Cosmeceutical, Drug Delivery, and Biomedical Applications. *Starch–Stärke*. 2200052, 2022.
12. Martău, G. A.; Mihai, M.; Vodnar, D. C. The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector-Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability. *Polymers*. 11(11), 1837, 2019.
13. Zarandona, I.; Minh, N. C.; Trung, T. S.; Caba, K.; Guerrero, P. Evaluation of bioactive release kinetics from crosslinked chitosan films with *Aloe vera*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 182, 1331-1338, 2021.
14. Yoshida, C. M. P.; Pacheco, M. S.; Moraes, M. A.; Lopes, P. S.; Severino, P.; Souto, E. B.; *et al.* Effect of Chitosan and *Aloe vera* Extract Concentrations on the Physicochemical Properties of Chitosan Biofilms. *Polymers*. 13(8), 1187, 2021.
15. Añibarro-Ortega, M.; Pinela, J.; Barros, L.; Ćirić, A.; Silva, S. P. Coelho, E. *et al.* Compositional Features and Bioactive Properties of *Aloe vera* Leaf (Fillet, Mucilage, and Rind) and Flower. *Antioxidants*. 8(10), 444, 2019.
16. Oliveira Filho, J. G.; Lira, M. M.; Sousa, T. L.; Campos, S. B.; Lemes, A. C.; Egea, M. B. Plant-based mucilage with healing and anti-inflammatory actions for topical application: A review. *Food Hydrocolloids for Health*. 1, 1000122021, 2021.
17. Ranjbar, R. Yousefi, A. Effects of *Aloe vera* and Chitosan Nanoparticle Thin-Film Membranes on Wound Healing in Full Thickness Infected Wounds with Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Bulletin of Emergency and Trauma*. 6(1), 8-15, 2018.
18. Chabala, L. F. G.; Cuartas, C. E. E.; López, M. E. L. Release Behavior and Antibacterial Activity of Chitosan/Alginate Blends with *Aloe vera* and Silver Nanoparticles. *Marine Drugs*. 15(10), 328, 2017.
19. Kudłacik-Kramarczyk, S.; Głąb, M.; Drabczyk, A.; Kordyka, A.; Godzierz, M.; Wróbel, P. S. *et al.* Physicochemical Characteristics of Chitosan-Based Hydrogels Containing Albumin Particles and *Aloe vera* Juice as Transdermal Systems Functionalized in the Viewpoint of Potential Biomedical Applications. *Materials*. 14(19), 5832, 2021.
20. Oliveira, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 17(1), 36-44, 2015.
21. Zelencova, L.; Erdogan, S.; Baran, T.; Kaya, M. chitin extraction and chitosan production from Chilopoda (Scolopendracinulata) with identification of physicochemical properties. *Polymers Science Series A*. 57(4), 437–444, 2015.
22. Adekogbe, I.; Ghanem, A. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials*. 26(35), 7241-7250, 2005.

23. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M-E.; Berset, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**. 28(1),25-30, 1995.
24. Sionkowska, A.; Wisniewski, M.; Skopinska, J.; Kennedy, C. J.; Wess, T. J. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**. 25, 795-801, 2004.
25. Santos, C. C, Mouta, R; Junior, M. C. C.; Santana, S. A. A.; Silva, H. A. D. S; Bezerra, C. W. B. Chitosan-edible oil-based materials as upgraded adsorbents for textile dyes. **Carbohydrate. Polymers**. 180, 182-191, 2018.
26. Queiroz, F. M.; Melo, K. R.; Sabry, D. A.; Sasaki, G. L.; Rocha, H. Á. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation?. **Marine Drugs**. 13,141-158, 2014.
27. Fardsadegh, B.; Jafarizadeh-Malmiri, H. *Aloe vera* leaf extract mediated green synthesis of selenium nanoparticles and assessment of their In vitro antimicrobial activity against spoilage fungi and pathogenic bacteria strains. **Green Processes and Synthesis**. 8, 399–407, 2019.
28. Jithendra, P.; Rajam, A. M.; Kalaivani, T.; Mandal, A. B.; Rose, C. Preparation and Characterization of *Aloe Vera* Blended Collagen-Chitosan Composite Scaffold for Tissue Engineering Applications. **Acs Applied Materials & Interfaces**. 5(15),7291-7298, 2013.
29. Martínez-Camacho, A. P.; Cortez-Rocha, M. O.; Ezquerro-Brauer, J. M.; Graciano-Verdugo, A. Z.; Rodriguez-Félix, F.; Castillo-Ortega, M. M.; Yépiz-Gómez, M. S.; Plascencia-Jatomea, M.; Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, 82(2), 305-315, 2010.
30. Yaghoubi, M.; Ayaseh, A.; Alirezalu, K.; Nemati, Z.; Pateiro, M.; Lorenzo, J. M. Efeito do revestimento de quitosana incorporado com óleo essencial de *Artemisia fragrans* na carne fresca de frango durante armazenamento refrigerado. **Polímeros**. 13(5), 716, 2021.
31. Yong, H.; Wang, X.; Zhang, X.; Liu, Y.; Qin, Y.; Liu, J. Effects of anthocyanin-rich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film. **Food Hydrocolloid**. 94, 93-104, 2019.
32. Rodrigues, L. L. O.; Oliveira, A. C. L.; Tabrez, S.; Shakil, S.; Khan, M. I.; Asghar, M. N.; *et al.* Mutagenic, antioxidant and wound healing properties of *Aloe vera*. **J Ethnopharmacology**. 227, 191-197, 2018.
33. Yen, M-T.; Yang, J-H.; Mau, J-L. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**. 74(4), 840-844, 2008.
34. Yahya, R.; Al-Rajhi, A. M. H.; Alzaid, S. Z.; Abboud, M. A. A.; Almuhayawi, M. S.; Jaouni, S. K. A. *et al.* Molecular Docking and Efficacy of *Aloe vera* Gel Based on Chitosan Nanoparticles against *Helicobacter pylori* and Its Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities. **Polymers**. 14(15), 2994, 2022.
35. Felicia, W. X. L.; Kobun, R. Aqilah, N. M. N, Mantihal S, Huda N. Chitosan/*aloe vera* gel coatings infused with orange peel essential oils for fruits preservation. **Current Research in Food Science**. 8, 100680, 2024.