UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA CAROLINE COSTA XAVIER

DESENVOLVIMENTO DE FILME COM AÇÃO ANTIMICROBIANA À BASE DE QUITOSANA INCORPORADO COM EXTRATO SECO DE *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul (Angico)

Recife
2021

ANA CAROLINE COSTA XAVIER

DESENVOLVIMENTO DE FILME COM AÇÃO ANTIMICROBIANA À BASE DE QUITOSANA INCORPORADO COM EXTRATO SECO DE *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul (Angico)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Orientadora: Profª. Drª. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Recife

2021

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

X3d Xavier, Ana Caroline Costa

Desenvolvimento de filme com ação antimicrobiana à base de quitosana incorporado com extrato seco de *Anadenanthera colubrina var. cebil (*Griseb) Altschul (Angico) / Ana Caroline Costa Xavier. - 2021.

95 f.: il.

Orientadora: Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde (CCS). Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2021.

Inclui referências e anexo.

1. Produtos biológicos. 2. Plantas medicinais. 3. Taninos. 4. Anti-infecciosos. I. Amorim, Elba Lúcia Cavalcanti de (Orientadora). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2021-173)

ANA CAROLINE COSTA XAVIER

DESENVOLVIMENTO DE FILME COM AÇÃO ANTIMICROBIANA À BASE DE QUITOSANA INCORPORADO COM EXTRATO SECO DE *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul (Angico)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Aprovada em: 04 de junho de 2021

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Drª. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Presidente e orientadora)

_____

Profª. Drª. Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinadora interna)

_____

Profª. Drª. Analúcia Guedes Silveira Cabral (Examinadora externa)

AGRADECIMENTOS

Agradecer. Em ordem cronológica ou de importância? Como demonstrar tanta gratidão em tão poucas palavras?

Agradeço a Deus em primeiro lugar, sempre, em toda e qualquer situação. “Não cai uma folha sequer de uma árvore sem a Sua permissão”. E quão abençoada e cheia de aprendizados foi essa jornada que parece um final, mas que na verdade é apenas um começo.

Agradeço à minha família, que me apoiou em cada momento. Minha mãe, Zilda, com todo amor e acalento, meu pai, Emilton, com toda racionalidade e perseverança, minha irmã, Juliana, que se vestiu de irmã mais velha tantas vezes. E também à Jadinha, que me traz tanta alegria e leveza.

Aos meus amigos, tão queridos, que colaboraram direta ou indiretamente. Lelo, Bia, Cássia, Angela e família, esses que são os meus amores mais correspondidos que me sustentam, me inspiram e me enchem de propósito. Marília, Rebeca e Julianne por toda fé em mim depositada, por tanto amor e tanta verdade, por não medirem esforços para me manter sempre confiante. Lucas, que me socorreu tantas vezes e me fez acreditar que tudo daria certo ao seu tempo.

Aos amigos do LAPRONAT, Jenifer, Jorge, Christian, Wedna, Patrícia, Uyara e Marcelino; à professora Elba Lúcia, por ser esse ser humano de coração tão gigante e bondoso, pelos direcionamentos e pelo acolhimento. À Ianca, professora Danielle e professora Beate, pela ajuda e principalmente, assim como os demais, por demonstrarem a possibilidade de haver tanto amor no meio acadêmico. E agradeço também a Rilvan e Nerilin por toda paciência e otimismo, à professora Rosali e Widson e ao LTM pela parceria. E à Olívia, Rita e ao Instituto Pernambucano de Agronomia, por terem sido tão solícitos, preocupados e gentis.

Preciso ainda agradecer a quem veio antes desse projeto existir. Agradecer ao meu grande mestre, em memória, Arquimedes, que foi a primeira pessoa a me fazer enxergar a possibilidade de conquistar coisas grandes na vida, de ir longe, sem nunca perder a humildade. Ele que assim como Risonildo e Analúcia se tornaram meus modelos de profissionais e seres humanos e que sempre estiveram tão disponíveis e que me apoiam e me motivam tanto.

Até aqui nos ajudou o Senhor!

RESUMO

O uso tradicional das plantas com propósito medicinal está entrelaçado com questões históricas e culturais dos povos de cada localidade. No Brasil, soma-se a isto o componente da diversidade, considerando suas proporções continentais e seus biomas com características distintas, sendo a caatinga considerada um bioma exclusivo deste país. O aparato científico busca caminhar juntamente a esses conhecimentos tradicionais, aumentando a aplicabilidade destes recursos enquanto promove a segurança na sua utilização, motivo pelo qual chegam ao mercado medicamentos originados de plantas, sejam fitoterápicos, seus extratos ou até mesmo sintetizados com base em seus metabólitos. Dentro deste contexto, o presente estudo objetivou formular filme incorporado com extrato da espécie *Anadenanthera colubrina*, o angico, aplicado pelas comunidades inseridas na caatinga como antimicrobiano, cicatrizante e anti-inflamatório, associando-o à quitosana, biopolímero também de origem natural, advindo principalmente da carapaça de crustáceos, com características como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Isto com a finalidade de testar tal formulação em microrganismos e células participantes do processo de cicatrização. Para a obtenção de resultados os principais métodos utilizados foram: *casting* (formulação de filmes a partir de evaporação de solvente de solução filmogênica prévia); ensaios microbiológicos (concentração inibitória mínima e *Checkerboad*), para determinação de atividade individual e sinérgica com antimicrobiano de aplicação tópica, a gentamicina; ensaios de degradação (termogravimetria) e de caracterização (espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier) e ensaios de toxicidade (MTT), utilizando células participantes do processo de recuperação de feridas (macrófagos e fibroblastos). A formulação resultou em um produto de fácil manuseio, com aspecto transparente, interações físicas entes os seus componentes, estabilidade térmica considerável, alto grau de intumescimento e ação comprovada *in vitro*, sobre cepa padrão de *Staphylococcus aureus*, responsável por infecções de pele, partes moles, dispositivos e próteses médicas. Os testes de citotoxicidade revelaram proximidade entre dose eficaz e dose tóxica, entretanto em baixas concentrações observou-se o aumento do crescimento celular. Sendo assim, espera-se contribuir para a literatura não apenas identificando espécies vegetais promissoras para a geração de novos fitofármacos,

mas também levantar a possibilidade de aprimoramento de produtos à base de quitosana. Neste caso com foco em desenvolvimento de novas alternativas para curativos inteligentes que favoreçam a recuperação de pacientes portadores de feridas crônicas e afins.

Palavras-chave: produtos biológicos; plantas medicinais; taninos; anti-infecciosos.

ABSTRACT

The traditional use of plants for medicinal purposes is linked with historical and cultural issues of the peoples of each location. In Brazil, there is also the diversity component, considering its continental proportions and its biomes with distinct characteristics, among which the caatinga is considered an exclusive biome in this country. The scientific apparatus seeks to walk together with this traditional knowledge, increasing the applicability of these resources while promoting safety in their use, which is why medicines originating from plants, whether herbal, their extracts or even synthesized based on their metabolites, reach the market. Within this context, the present study aimed to formulate the incorporation of a film with an extract of the species Anadenanthera colubrina, the angico, applied by communities inserted in the caatinga as antimicrobial, healing and anti-inflammatory, associating it with chitosan, a natural biopolymer, coming mainly of the shell of crustaceans, with characteristics such as biocompatibility, biodegradability and low toxicity. This is in order to test such formulation on microorganisms and cells that participate in the healing process. To obtain results, the main methods used were: casting (formulation of films from solvent evaporation of a previous film-forming solution); microbiological tests (minimum inhibitory concentration and Checkerboad), to determine individual and synergistic activity with topically applied antimicrobial, gentamicin; degradation tests (thermogravimetry) and characterization (Fourier transform infrared spectroscopy) and toxicity tests (MTT), using cells participating in the wound recovery process (macrophages and fibroblasts). The formulation resulted in an easy-to-handle product, with a transparent appearance, physical interactions between its components, considerable thermal stability, high degree of swelling and proven in vitro action on the standard strain of Staphylococcus aureus, responsible for skin infections, soft parts, medical devices and prostheses. Cytotoxicity tests revealed proximity between effective dose and toxic dose, however at low concentrations there was an increase in cell growth. Thus, it is expected to contribute to the literature not only identifying promising plant species for the generation of new phytopharmaceuticals, but also raising the possibility of improving chitosan-based products. In this case, focusing on the development of new alternatives for smart dressings that favor the recovery of patients with chronic wounds and related aspects.

Key words: biological products; medicinal plants; tannins; anti-infective agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul (Angico), município de São Caetano.....26

Figura 2 - Estruturas químicas fundamentais dos metabólitos secundários: Terpenos.....28

Figura 3 - Estruturas químicas fundamentais dos metabólitos secundários: Saponinas.....29

Figura 4 - Estrutura química fundamental dos metabólitos secundários: Antraquinona.....30

Figura 5 - Estrutura química fundamental dos metabólitos secundários: Glicosídeos cardiotônicos (Digoxina).....31

Figura 6 - Estrutura química fundamental dos metabólitos secundários: Alcalóides indólicos (Bufotenina).....32

Figura 7 - Representação estrutural geral de taninos condensados e hidrolisáveis.....33

Figura 8 - Estrutura química fundamental dos metabólitos secundários: Flavonoides.....33

Figura 9 - Estrutura química da quitina e da quitosana.....45

Figura 10 - Esquema do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....53

Figura 11 - Esquema do ensaio de *checkerboard* (sinergismo).....54

Figura 12 - Extrato seco de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul.....57

Figura 13 - Soluções filmogênicas para técnica de *casting*.....59

Figura 14 - Método de *casting* com secagem de solvente em estufa.....62

Figura 15 - Características visuais de filme à base de quitosana incorporado com extrato seco de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul (Angico).....62

Figura 16 - FT-IR de quitosana em comparação com formulação.....63

Figura 17 - FT-IR de formulações de filme base e filme incorporado.....64

Figura 18 - Termogravimetria de materiais e formulações.....65

Figura 19 - Grau de intumescimento (%).....67

Figura 20 - Retro cultivo de *Staphylococcus aureus* para determinação de ação bactericida ou bacteriostática.....68

Figura 21 - Ensaio de Concentração inibitória mínima (*Staphylococcus aureus*).....69

Figura 22 - Ensaio de *Checkerboard* (determinação de sinergismo).....70

Figura 23 - Intumescimento de filme à base de quitosana incorporado com extrato seco de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul.....71

Figura 24 - Ensaio de diluição em caldo para determinação de efeito antimicrobiano de filme à base de quitosana.....71

Figura 25 - Ensaio de diluição em caldo para determinação de efeito antimicrobiano de filme à base de quitosana incorporado com extrato seco de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul.....72

Figura 26 - Ensaio de difusão em ágar com filme à base de quitosana incorporado com extrato seco de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul.....73

Figura 27 - Ensaio de MTT (Citotoxicidade).....74

Figura 28 - Ensaio de toxicidade (MTT) Fibroblastos L929.....75

Figura 29 - Ensaio de toxicidade (MTT) Macrófagos J774.A1.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulações testadas para obtenção do filme de quitosana ……..……..… 60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

AHCPR	*Agency for Health Care Policy and Research*
ATCC	*American Type Culture Collection*
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESBL	β-lactamases de espectro estendido
FATSS	Florestas e Arbustais Tropicais Sazonalmente Secos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPA	Instituto Pernambucano de Agronomia
KPC	*Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase
LAPRONAT	Laboratório de Produtos Naturais
LAM	Laboratório de Análises Microbiológicos
LTM	Laboratório de Tecnologia de Medicamentos
MEC	Matriz Extracelular
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
MP	Matéria-prima
MS	Ministério da Saúde
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
OMS	Organização Mundial da Saúde

OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PHA	Polihidroxialcanoato
PIC	Práticas Integrativas e Complementares
PLA	Polilactato
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
SUS	Sistema Único de Saúde
TGA	Termogravimetria
VRSA	*Staphylococcus aureus* resistentes à Vancomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REFERENCIAL TEÓRICO..... 20

2.1 PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL..... 20

2.2 A CAATINGA..... 22

2.3 A ESPÉCIE *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul..... 25

2.3.1 Aplicações biológicas..... 27

2.3.2 Metabólitos secundários presentes na espécie..... 28

2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA..... 34

2.4.1 Principais microrganismos envolvidos em infecções de feridas e suas características..... 37

2.5 TIPOS DE COBERTURA PARA CURATIVOS E ESTRATÉGIAS NOS TRATAMENTOS DE FERIDAS..... 41

2.6 BIOPOLÍMEROS COM APLICAÇÃO MEDICINAL..... 44

3 OBJETIVOS..... 48

3.1 OBJETIVO GERAL..... 48

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 48

4 METODOLOGIA..... 49

4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL..... 49

4.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE INTERESSE..... 49

4.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES..... 51

4.4 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS..... 52

4.5 CITOTOXICIDADE..... 55

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 57

5.1 OBTENÇÃO DE EXTRATO E DOSEAMENTO DE METABÓLITOS DE INTERESSE..... 57

5.2 FORMULAÇÕES DE FILMES À BASE DE QUITOSANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE *CASTING*..... 58

5.3 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS..... 67

5.4 CITOTOXICIDADE..... 73

6 CONCLUSÃO..... 77

REFERÊNCIAS..... 79

ANEXO A - CADASTRO SISGEN..... 95

1 INTRODUÇÃO

A medicina popular também referenciada como medicina tradicional ganhou espaço nas últimas décadas, quebrando-se um paradigma, visto que a chamada “medicina moderna” ou “Hipocrática”, altamente difundida nos países desenvolvidos era considerada a única opção válida e viável no atendimento às enfermidades, o que começa a apresentar certa mudança principalmente a partir da criação do “Programa da Medicina Tradicional” proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) na década de 1970, com o objetivo de levantar e incentivar políticas que promovessem uma visão mais ampla da saúde (CASTRO; FIGUEIREDO, 2019).

As plantas medicinais, inseridas na medicina popular, estão vinculadas a questões sociais e intimamente ligadas à cultura das comunidades que as utilizam, agregando assim, saberes que se difundem entre as gerações. Essas espécies se configuram como importantes ferramentas na promoção e recuperação da saúde, sobretudo quando nos remetemos às comunidades mais afastadas dos grandes centros urbanos, indivíduos que acabam tendo uma maior proximidade com as espécies vegetais nativas ou adaptadas e atribuem a estas espécies, importância medicinal, religiosa, alimentar e até comercial conforme levantado por Meneghelli et al (2018).

O Brasil se destaca pela sua vasta biodiversidade, sendo responsável por abrigar cerca de 20% das espécies conhecidas mundialmente. Soma-se a isto a grande quantidade de grupos étnicos compreendidos em seu território que acabam enriquecendo o componente etnofarmacológico ao integrar diferentes formas de utilização e aplicação das plantas com aplicação medicinal (SANTOS et al, 2018). A caatinga, cujo bioma é exclusivamente brasileiro possui diversas espécies consideradas endêmicas que estão incluídas neste quesito, onde estas são largamente utilizadas pelas comunidades em seu entorno, observando-se que as mesmas acabam por desenvolver uma relação simbiótica com o meio contribuindo inclusive para a sua preservação (NASCIMENTO et al, 2019).

Dentro deste contexto, as plantas medicinais e seus derivados podem ser aplicados à produção de medicamentos e alternativas inovadoras, sobretudo em áreas que demandam novas estratégias continuamente. Dentre estas áreas, propõe-

se destacar neste estudo as feridas de alta complexidade, relacionadas a comorbidades no âmbito hospitalar e fora dele, estando envolvidas em uma série de complicações que afetam a saúde em seu sentido mais amplo, assim como compromete as atividades sociais do paciente devido ao seu grande potencial incapacitante (GARCIA, 2016). Os pacientes variam entre pessoas diabéticas, pacientes restritos ao leito com desenvolvimento de úlceras por pressão, pacientes com feridas cirúrgicas infectadas ou não, vítimas de queimaduras, entre outros (PALAMIN, 2018).

A demanda por novas alternativas de tratamento para as feridas de alta complexidade esbarra ainda em outro problema cujo enfrentamento é de grande desafio para a saúde em geral: a multirresistência bacteriana, considerando a barreira que a integridade da pele proporciona evitando infecções por microrganismos oportu0nistas, havendo assim grande possibilidade de propagação microbiana no leito do ferimento, sendo os principais microrganismos envolvidos neste problema: *Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* e a presença destes agentes retardam o processo de cicatrização (PINTO, 2016).

Os taninos, polifenóis de origem vegetal de natureza adstringente, que garantem, nas espécies nas quais são observados defesa contra predadores, apresentam atividades antioxidante e antimicrobiana, além de possuírem a capacidade de combinarem-se com macromoléculas, como as proteínas formando complexos insolúveis (SIMÕES et al., 2017). Essas características trazem a possibilidade do uso de extratos ricos nesta classe de metabólitos secundários nos estudos relacionados com a cicatrização e antissepsia, visto que agem diminuindo a permeabilidade, ao passo que inibem o crescimento bacteriano (HIGINO, et al. 2015), o que é de grande importância no tratamento de feridas de qualquer natureza, devido à facilidade de infecção pela perda da integridade cutânea que se configura como barreira natural de defesa do organismo (MARCO, 2015).

Desta forma, o presente estudo propõe aplicar o extrato da espécie *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul (Angico), que é, segundo estudos etnobotânicos publicados nos últimos 10 anos, uma das 5 espécies endêmicas da caatinga brasileira com maior concentração tânica, em um filme à base de quitosana, avaliando seu potencial em uso conjunto a este biopolímero, em uma possível

alternativa de tratamento para feridas infectadas, pretendendo, ao mesmo tempo, que explore aplicações medicinais, promovendo destaque à flora da caatinga, valorizando seus povos e toda sua bagagem cultural e científica associada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL

O Brasil é constantemente referenciado como um país onde habita a diversidade. Característica que vai desde os seus ecossistemas, considerando que se trata de um país de dimensões continentais, até a sua própria população que abriga povos nativos e povos das mais variadas origens, onde através dos séculos contribuem com costumes, saberes e espécies vegetais e especiarias próprias, além do sincretismo religioso, que em conjunto alteram o modo de vida e a forma de interação com o ambiente que evolui e se modifica em meio à miscigenação. Dentro deste contexto, está também a utilização das plantas, seja com aplicação medicinal, nutricional ou até mesmo econômica, conforme indicado por Rodrigues et al (2020).

Segundo Gonçalves (2020) o próprio reconhecimento botânico e fitogeográfico no Brasil esteve por séculos dificultado tanto pela ampla abrangência territorial, quanto pela constante modificação do ambiente, fazendo com que apenas a partir da década de 1980 houvesse conteúdo suficiente para traçar uma linha evolutiva de suas espécies com integração de informações taxonômicas e ecológicas, apresentando inclusive posteriormente, um marco com a elaboração do Manual Técnico da Vegetação Brasileira pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no início da década de 1990. Destacando-se assim, a probabilidade, devido ao histórico relativamente recente, de haver espécies com características ainda não exploradas no território brasileiro dentro de seus 7 biomas reconhecidos: Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Pantanal e Pampa (SILVA, et al, 2017).

Medeiros et al (2015) levantam os fatores que influenciam na seleção de uma planta para fins medicinais, seja pela alta disponibilidade que essa tenha junto às comunidades tradicionais, seja pelas suas características organolépticas, sendo estas últimas relacionadas com metabólitos específicos, assim como os óleos essenciais geralmente têm sabor e odor adocicado, enquanto as espécies ricas em alcaloides se caracterizam por resultarem em extratos amargos. Dentro desta narrativa há a representação cultural, religiosa e medicinal das plantas, cuja utilização, por vezes, está associada a essas três características conjuntamente, destacando-se assim a sua importância para os povos que as cultivam e/ou as protegem, revelando uma

interação simbiótica que pode, inclusive, ser útil para a preservação dessas espécies (SILVA, SOARES, QUADROS, 2019).

Os avanços científicos, sobretudo no que diz respeito ao desenvolvimento tecnológico aplicado às Ciências Farmacêuticas abrange uma dualidade de interpretações, visto que de um lado possibilita a aplicação dos produtos naturais de forma segura, além da possibilidade de melhora de seus potenciais aplicados à saúde, entretanto, esbarra em questões associadas à apropriação cultural, considerando toda a bagagem tradicional associada a essas alternativas terapêuticas, principalmente quando se considera as religiões de matriz africana, cujas práticas, sofrem discriminação até os dias atuais (ARRUDA, et al, 2019). Sendo assim, é necessário partir do pressuposto de que os estudos etnofarmacológicos precisam de uma visão que promova a abrangência do componente sociocultural, de modo a compreender a importância que essas espécies possuem dentro das culturas que impactam, promovendo a valorização de seu conhecimento tradicional agregado enquanto comprovam suas atividades biológicas, conferindo assim, segurança e integração do saber popular ao meio acadêmico (SILVA, SOARES, QUADROS, 2019).

Observa-se o crescimento nas últimas décadas do interesse pela Fitoterapia, isto é, pela aplicação de produtos de origem vegetal à saúde. O Ministério da Saúde brasileiro (MS) reconhece a utilização de plantas medicinais e fitoterápicos dentro das chamadas Práticas Integrativas e Complementares (PIC), cuja política foi implementada desde 2006 com a finalidade justamente de abrir a possibilidade de aplicação de métodos alternativos e baseados em evidências dentro do Sistema Único de Saúde (SUS) (GONÇALVES, 2018). Entretanto, é necessário levantar a necessidade dos estudos que comprovem segurança e efeito desses recursos, de modo a investigar sua efetividade assim como sua toxicidade (JAMSHIDI-KIA et al, 2018). Esses estudos resultam em informações que podem inclusive auxiliar na descoberta de novos fármacos, levando em consideração que 25% dos medicamentos hoje disponíveis no mercado são derivados de plantas, sejam seus extratos, compostos isolados ou aqueles sintetizados a partir de seus constituintes (SANTOS et al, 2018).

De modo geral, a abertura às plantas medicinais e produtos naturais e fitoterápicos na Assistência à saúde no Brasil abriu portas para facilitação da adesão terapêutica, sobretudo daquelas comunidades afastadas dos grandes centros

urbanos, sejam comunidades ribeirinhas, extrativistas, quilombolas e indígenas, principalmente, considerando o fator econômico associado, visto que a ocorrência de desigualdades socioeconômicas ainda é uma realidade no Brasil, assim como possibilita que povos tradicionais se identifiquem com as terapias que estão realizando e sintam-se valorizados ao identificar que seus saberes transformam o empirismo em conhecimento científico que pode ser expandido ao cuidado de todos os indivíduos assistidos pelo sistema de saúde vigente (CASTRO; FIGUEIREDO, 2019).

2.2 A CAATINGA

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro que ocorre em toda a Região Nordeste do país, com exceção do estado do Maranhão, e também no norte do estado de Minas Gerais, com prevalência das chamadas Florestas e Arbustais Tropicais Sazonalmente Secos - FATSS, sendo a maior extensão de vegetação deste tipo no mundo. Geograficamente se caracteriza pelo solo seco decorrente dos longos períodos de estiagem, que confere condições adversas às suas espécies vegetais, que estão, na maior parte do tempo, desfolhadas, por este motivo o nome do bioma que se traduz do tupi, selva branca. As principais espécies endêmicas da região estão distribuídas em cerca de 950 gêneros, com predominância das plantas xerófitas, que de acordo com estudos da área botânica, se desenvolveram através de linhagens antigas que se adaptaram às condições ambientais, adquirindo características próprias, predominando os arbustos de pequeno a médio porte, porém com ocorrência também de plantas suculentas e arbustos de grande porte (FERNANDES; QUEIROZ, 2018).

Cerca de 23% das espécies da caatinga se configuram como endêmicas, sejam elas nativas ou adaptadas e estão distribuídas em três biotas principalmente, conforme indicado por Fernandes e Queiroz (2018):

> …(I) a Caatinga do Cristalino, associada a solos com fertilidade moderada ou elevada da Depressão Sertaneja; e (II) a Caatinga Arenosa, associada a solos arenosos profundos e de baixa fertilidade. Um terceiro grupo florístico é representado pela Caatinga Arbórea, que ocorre principalmente no norte de Minas Gerais e centro-sul da Bahia e também na borda oriental da Chapada Diamantina.

A flora da caatinga do cristalino, da qual faz parte a espécie utilizada neste estudo, o angico (*Anadenanthera colubrina*), além da umburana-de-cheiro (*Amburana cearensis*) e a aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), compreende a maior parte deste bioma, cerca de 70% de sua extensão, onde prevalecem, em sua maioria plantas não lenhosas, com destaque para a ocorrência de ervas. Porém, por se tratar de ambiente no qual o solo é próprio para o cultivo, é também a porção que mais sofreu com a interferência humana, destinando o solo para a agricultura de subsistência (FERNANDES; QUEIROZ, 2018).

Já na caatinga arenosa, destacam-se as plantas lenhosas de pequeno porte, como a espécie *Copaifera coriacea* (copaíba), enquanto que na caatinga arbórea, que se limita ao norte do estado de Minas Gerais e parte da Chapada Diamantina, na Bahia, devido a solos mais férteis se desenvolvem arbustos de portes maiores como *Cavanillesia umbellata* (barriguda-lisa; Malvaceae) e *Aralia warmingiana* (Araliaceae). Além disso, ainda encontram-se disseminadas pelo ambiente da caatinga espécies adaptadas ao solo rochoso, como suculentas e cactos, com destaque para a férteis se macambira-de-flecha (*Encholirium spectabile*; Bromeliaceae e o xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) e espécies aquáticas que são reconhecidas em rios e lagos temporários e se adaptaram para sobrevivência gerando espécies de bancos de sementes como as famílias Pontederiaceae, Nymphaeaceae, Hydrocharitaceae e Cabombaceae (FERNANDES; QUEIROZ, 2018).

Culturalmente, o cenário do semiárido brasileiro, onde se insere a Caatinga, serviu de pano de fundo para grandes obras literárias, como Vidas Secas, de Graciliano Ramos, Os sertões, de Euclides da Cunha e ainda nas várias obras de Ariano Suassuna, onde é possível identificar as várias dificuldades que o ambiente oferece àqueles que estão englobados neste contexto, ao mesmo tempo em que se destaca a riqueza cultural presente, colocando o sertanejo como protagonista de suas próprias lutas. Entretanto, ainda nos dias atuais, existe uma correlação social entre a Caatinga e a pobreza, a falta de recursos e a negligência com este bioma que na verdade é rico em biodiversidade e possui grande potencial para aplicações diversas, econômicas inclusive, apresentando grande importância para os povos inseridos em seu território (TABARELLI et al, 2018).

Como citado por Emilliano e Balliano (2019), as adversidades impostas pelo ambiente, na verdade, contribuem para a disseminação de espécies ricas em

metabólitos secundários que as auxiliam no processo de sobrevivência, o que as tornam importantes ferramentas para aplicação tecnológica, sobretudo para a saúde, o que envolve a produção empírica de remédios caseiros. O desenvolvimento técnico-científico dessas alternativas, a utilização de espécies com fins praguicidas com menos potencial agressivo à vida humana, na nutrição como alimentos funcionais ou como possíveis alternativas no combate à fome, como plantas forrageiras para uso agropecuário, na construção e na geração de energia, o que pode possibilitar a exploração consciente dessas espécies com o intuito de trazer desenvolvimento sustentável à esta região, conforme indicam Carneiro et al (2019).

As espécies com potencial medicinal, levantadas em estudos etnofarmacológicos dentro da denominada “Caatinga do cristalino”, destacam principalmente as famílias Fabaceae, Euphorbiaceae e Anacardiaceae, estas por sua maior disponibilidade ambiental, fator que é preponderante para sua seleção pelas populações que as utilizam (MEDEIROS et al, 2015), com destaque para a aplicação das espécies *Myracrodruon urundeuva* (aroeira), *Amburana cearensis* (umburana de cheiro.), *Triplaris gardneriana* (pajeú), *Anadenanthera colubrina* (angico), *Hymenaea courbaril* (jatobá), *Bauhinia cheilantha* (pata de vaca), *Erythrina velutina* (mulungu), *Mimosa tenuiflora* (Jurema) e Anacardium occidentale L (cajueiro), sendo boa parte destas utilizadas com finalidade antimicrobiana (PEREIRA JUNIOR et al, 2014; CORRÊA, 2018; SALESSE, 2018).

Conforme mencionado por Gomes et al (2008), a principal porção utilizada nos remédios caseiros produzidos, a partir das espécies vegetais de uso medicinal é a casca, já que na maior parte do tempo estes exemplares estão desfolhados, voltando a apresentar a folhagem característica nos períodos de maior incidência de chuva, seguidos de frutos, raízes, folhas e flores. Os autores destacam ainda a participação dos mercados e feiras livres que comercializam essas plantas medicinais e orientam sobre o seu uso de acordo com o conhecimento popular agregado, porém levantam a necessidade de promover a coleta responsável, de modo a promover uma extração sustentável.

Promover o destaque das espécies que compõem a Caatinga pode influenciar numa maior valorização deste bioma, já que como citado por Alves et al (2017), este se configura como sendo o bioma com menor taxa de proteção ambiental do Brasil, com menos de 2% de sua área sendo parte de unidades de conservação. Por este

motivo se observam estudos das mais variadas áreas, de modo a transpor barreiras impostas pelo preconceito e pelas próprias dificuldades ambientais enfrentadas pelas populações que vivem em seu entorno de modo a contribuir com a preservação e a sustentabilidade.

2.3 A ESPÉCIE *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul

O Angico (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul) faz parte da família Fabaceae, que é uma das mais encontradas na Caatinga (FERNANDES; QUEIROZ, 2018). A espécie ainda está entre as vinte com maior valor de importância relativa de toda a Região Nordeste, o que demonstra a sua importância para as comunidades que a utilizam (MAGALHÃES, 2020). Podem ser identificados estudos na literatura com as sinonímias *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan, *Piptadenia macrocarpa* Benth., *Acacia colubrina* (Vell.) Mart. e *Acacia cebil Griseb*. Se caracteriza pelo porte arbustivo a arbóreo podendo chegar a até 25 m de altura, de acordo com Nascimento, Bispo e Dantas (2018), que descrevem suas principais características botânicas, visualizadas na figura 1:

> Ramificação cimosa, dicotômica, com copa geralmente estreita e elíptica, com ramos lenticelados, pubescentes a glabrescentes e seu tronco apresenta projeções cônicas da periderme. As folhas são compostas, oblongas, alternas e paripinadas, com pinas de aproximadamente 15-20 (ou mais) pares de foliólulos opostos de 4-6 mm, com raque pubescente, ambas superfícies glabras, ápice agudo a obtuso e base assimétrica. As flores são de formato tubular curto, hermafroditas, com estames numerosos (polistêmone), estilete filiforme, que juntos lhes conferem aspecto de pincel e encontram-se reunidas em inflorescências do tipo glomérulo alvos, com cerca de 3 mm; anteras com glândulas sésseis e caducas. O fruto é do tipo folículo achatado, podendo ter de 17 a 21 cm de comprimento, plano, linear, reto ou ligeiramente arqueado, uniloculares e falsamente septados que, quando atingem a maturidade adquirem coloração marrom escuro. As sementes, de até 15 mm de comprimento, de 5 a 15 por fruto, são relativamente pequenas, sendo estas exalbuminosas e achatadas, com tegumento marrom escurecido.

Figura 1 - *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul (Angico), município de São Caetano-PE

Fonte: A autora (2021)

O gênero *Anadenanthera* pertence à subfamília Mimosoideae da família Fabaceae e é composto por apenas duas espécies, *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan da qual faz parte a variação *cebil* (Griseb) Altschul, cuja diferenciação se dá principalmente pela localização geográfica distinta, sendo a primeira mais identificada nas regiões centro-oeste, Sudeste e Sul, enquanto a segunda é endêmica da Região Nordeste (ARAÚJO, 2018). A espécie *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul é rica em metabólitos secundários, sendo sua casca a parte mais utilizada com fins medicinais, com alta concentração de alcalóides e taninos, sendo uma das dez espécies endêmicas da Caatinga com maior conteúdo tânico (ARAÚJO, 2008), composição esta que sofre alterações sazonais, estando em maior quantidade nos períodos de índices pluviométricos menores (AIRES, 2017). Além disso, destaca-se ainda a presença de flavonoides, saponinas, antraquinonas, terpenos e glicosídeos cardiotônicos, em menor concentração. Tal composição está relacionada com sua aplicação medicinal como antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante (SILVA; AGUIAR; FREITAS, 2020).

2.3.1 Aplicações biológicas

O angico, *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul, possui citação em diversos estudos etnofarmacológicos e como mencionado anteriormente, figura entre as principais espécies com alta importância relativa para os povos que estão geograficamente localizados no entorno de sua ocorrência (MAGALHÃES, 2020). A partir desses estudos, destaca-se, seu uso popular como alternativa natural de ação anti-inflamatória e antimicrobiana, principalmente (LIMA et al, 2020), além do uso para afecções estomacais diversas, no uso tópico para a recuperação de feridas, em tratamentos ginecológicos e alterações a nível respiratório (SALVADOR et al, 2017).

Estudos também trabalham na elucidação dessas atividades observadas empiricamente, onde espera-se que tais efeitos estejam ligados à composição fitoquímica da espécie, cuja disposição de metabólitos secundários, segundo a literatura, será abordada na seção 2.3.2. Lima et al (2020) identificaram em seu estudo, efeito o anti-inflamatório do angico, ao demonstrarem que a aplicação do extrato hidroalcóolico em edema induzido em ratos, foi capaz de reduzir a extensão do edema em comparação com o grupo controle, ao passo em que observaram efeito antifúngico contra cepas padrão de várias espécies de *Candida*.

A espécie também é referenciada como possível para uso em afecções odontológicas, principalmente aquelas onde se espera combater infecções e acelerar processos de cicatrização (GOMES et al, 2020). Santos (2020) indicou com seu estudo em ratos, que o uso do extrato de angico incorporado a uma pasta para aplicação odontológica, levou a resultados muito similares, quando utilizado, para o mesmo fim, pasta à base de antimicrobiano de conhecida utilização clínica, favorecendo a recuperação ao mesmo tempo em que protege o tecido lesado, o que também corrobora com os estudos que levantam essa espécie enquanto potencial antimicrobiana e cicatrizante.

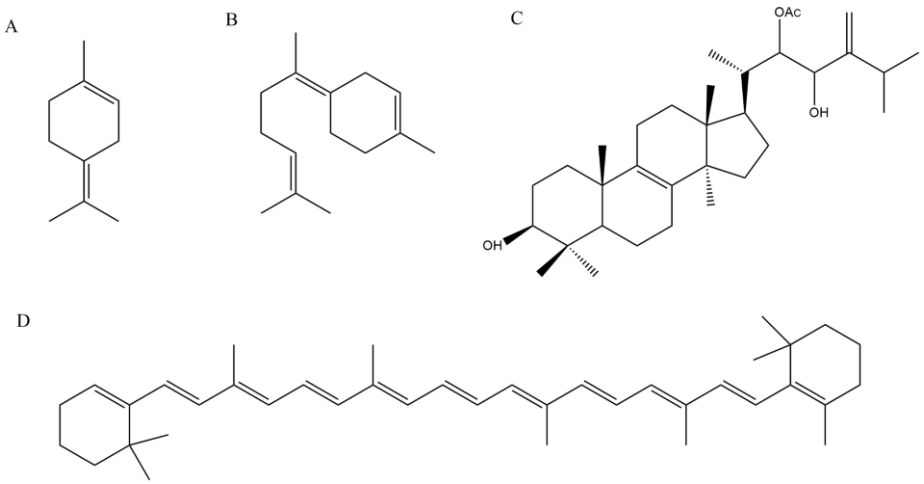
Entretanto, apesar de ser largamente utilizada, considerando o conhecimento popular, esta espécie também é mencionada como tóxica em estudos etnofarmacológicos, principalmente para mulheres durante a gestação, sendo reconhecida pela população como não indicada durante a gravidez devido relatos de ocorrência de abortos e por segurança também a ser evitada no puerpério (NUNES; SILVA, 2021). Sendo assim, mostra-se necessário identificar seu perfil de toxicidade,

considerando que estudos que utilizam como metodologia de investigação a *Artemia salina* encontraram resultados de toxicidade consideráveis (WEBER, 2011; SILVA; AGUIAR; FREITAS, 2020).

2.3.2 Metabólitos secundários presentes na espécie

Na espécie em estudo, *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul, os terpenóides estão entre as três principais moléculas encontradas em seus estudos fitoquímicos, juntamente com os compostos fenólicos e alcalóides, o que explica a sensação de ardência nos olhos quando manipulada fresca, visto que os primeiros mencionados são constituintes voláteis, cuja caracterização química consiste, de modo geral, em hidrocarbonetos que podem se organizar como monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C) ou triterpenos (30C), principalmente (figura 2) (FELIPE et al, 2017). Tais constituintes conferem proteção contra patógenos e predadores, auxiliam na germinação e reduzem o estresse oxidativo. Quando utilizados de forma medicinal possuem aplicações diversas, dentre elas a ação contra microrganismos, tanto bactérias quanto fungos (DE MENEZES FILHO, 2020).

Figura 2 - Estruturas químicas fundamentais dos metabólitos secundários: Terpenos



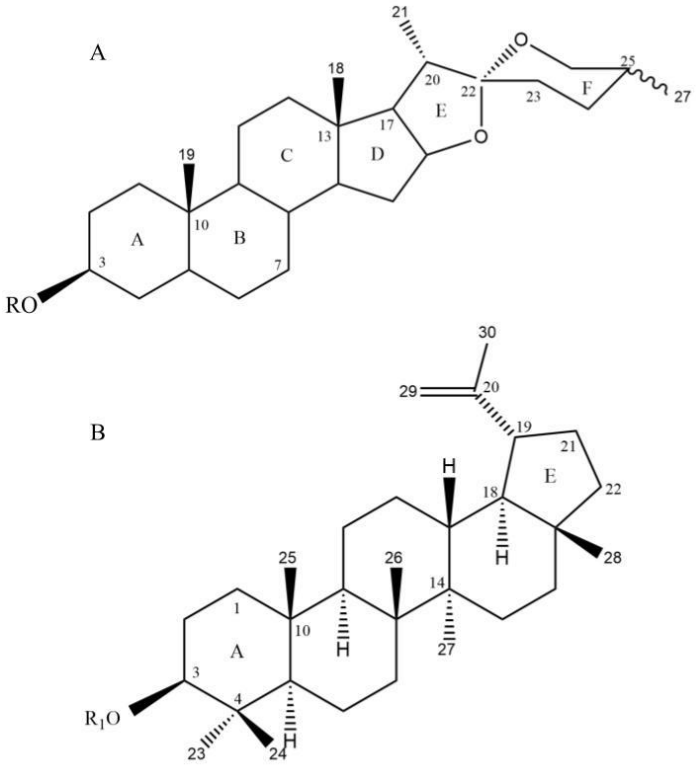
(A) Monoterpeno; (B) Sesquiterpeno; (C) Triterpeno; (D) Tetraterpeno. Fonte: MOREIRA (2013)

Encontradas na espécie em menor concentração, as saponinas, se caracterizam como compostos de caráter anfifílico, ou seja, parte lipofílica e parte

hidrofílica, propriedade que faz com que tenham ação detergente e emulsificante, liberando grande quantidade de espuma quando em solução aquosa. Além disso, podem apresentar alta atividade hemolítica, por interação com membranas e sua desorganização e de complexação com esteroides, podendo, devido a isto apresentarem atividade antifúngica. Como antibacterianos agem principalmente por mecanismo de extravasamento de conteúdo celular, conforme indicado por Lira et al (2020).

As saponinas podem ser classificadas como ácidas, básicas ou neutras, podendo ser ainda consideradas esteroides ou terpênicas a depender de seu núcleo fundamental. A aplicação das saponinas a nível medicinal ainda é bastante limitada, sendo mais utilizadas a nível cosmético como tensoativos naturais e produtos de higiene em geral, principalmente voltado para crianças, devido seu baixo potencial tóxico e alergênico. Sua estrutura geralmente compreende uma macromolécula glicosídica ou um triterpeno policíclico, como é possível identificar na figura 3 (SIMÕES et al, 2017).

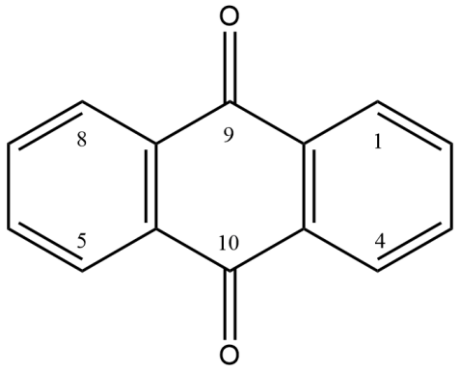
Figura 3 - Estruturas químicas fundamentais dos metabólitos secundários: Saponinas



(A)Espirostano: Núcleo básico as saponinas esteróides; (B) Lupeol: Núcleo básico das saponinas triterpênicas. Fonte: SIMÕES et al (2017)

As antraquinonas, por sua vez, são o grupo mais numeroso das quinonas, compostos orgânicos considerados produtos da oxidação de fenóis, mencionadas historicamente como fontes de corantes naturais e nas plantas que as produzem estão associadas a defesa de patógenos e com potencial alelopático, evitando que espécies vegetais competidoras germinem em seu entorno. Enquanto à finalidade medicinal são associadas a efeito antifúngico, bactericida e repelente (MOREIRA, 2006; SIMÕES et al, 2017). Tais atividades estão relacionadas à sua estrutura química quinoide de alta reatividade, possuindo a capacidade de interagir principalmente com sistemas redox, atuando como carreadoras de elétrons em processos metabólicos diversos, possuindo estrutura básica referente à O-glicosídeos ou C-glicosídeos, conforme indicado na figura 4 (SIMÕES et al, 2017).

Figura 4 - Estrutura química fundamental dos metabólitos secundários: Antraquinona

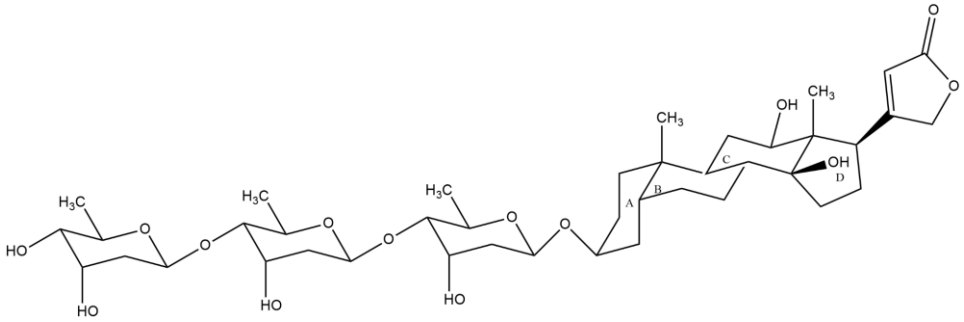


Fonte: SIMÕES et al (2017)

A disposição de glicosídeos cardiotônicos, esteróides com aplicação clínica na insuficiência cardíaca, pode incorporar esta espécie em estudos com esta finalidade, considerando que fármacos de uso comercial com efeito inotrópico, como a digoxina, são de origem vegetal. Entretanto, pesquisas com tais alternativas acabam desencorajadas, devido ao baixo índice terapêutico apresentado, necessitando-se de doses com muita proximidade entre efeito terapêutico e toxicidade (SIMÕES et al, 2017). Seu mecanismo de ação, nestes casos, está associado a uma inibição da bomba de Na^+/ K^+/ ATPase no músculo cardíaco, podendo alterar o ritmo cardíaco de forma desregulada, causando arritmias. Atividade relacionada à sua estrutura, que compõe uma porção glicosídica, que lhe confere solubilidade, um núcleo esteroidal conjunto a um anel lactônico de alta afinidade com a proteína receptora, como é

possível identificar na estrutura da digoxina, glicosídeo utilizado na prática clínica na insuficiência cardíaca (figura 5) (SIMÕES et al, 2017; MOTHEO, 2020).

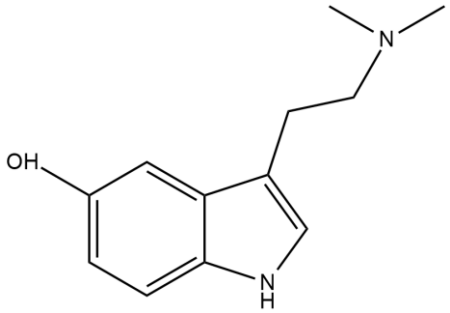
Figura 5 - Estrutura química fundamental dos metabólitos secundários: Glicosídeos cardiotônicos (Digoxina)



Fonte: SIMÕES et al (2017)

Os alcalóides, presentes na espécie, estão dispostos mais abundantemente em suas sementes, principalmente a bufotenina, alcaloide indólico também encontrado em espécies animais, como sapos pertencentes à família Bufonidae e que apresenta propriedades alucinógenas (SÁ, 2018), destacada na figura 6. Além disso, o alcaloide também está presente em estudos com possibilidade de uso como antinociceptivo, conforme citado por Mendes (2019) em doses baixas, sendo um composto com aplicação potencial na analgesia. Tais características, que interferem na modulação nervosa, ocorre devido ao fato de possuírem estrutura química bastante semelhante aos neurotransmissores endógenos, podendo, portanto, interferir no processo de neurotransmissão com efeito dose-dependente associado (SIMÕES et al, 2017). Além disso, esta classe de metabólitos secundários ainda possui atividade antimicrobiana, estando relacionada a interferência entre parede celular e DNA microbiano, podendo agir tanto de forma bacteriostática, quanto bactericida (LIRA et al, 2020).

Figura 6 - Estrutura química fundamental dos metabólitos secundários: Alcalóides indólico (Bufotenina)



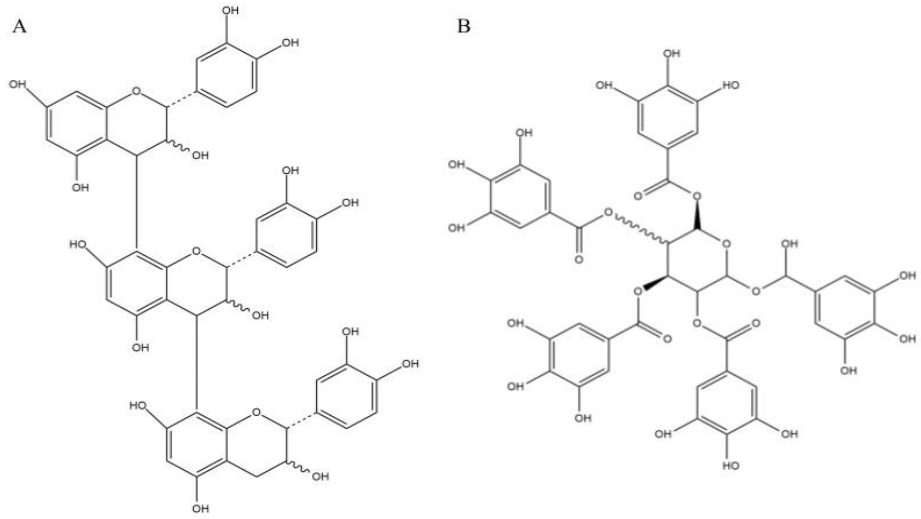
Fonte: SIMÕES et al (2017)

A maior concentração de metabólitos nas cascas do caule da espécie *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul, diz respeito à presença de taninos, úteis para a defesa das espécies nas quais sua ocorrência é identificada, reduzindo a sua degradação e impedindo a disseminação de organismos nocivos, tais como fungos, bactérias e parasitas de modo geral, além de afastar herbívoros, visto característica adstringente e sabor amargo. Tais metabólitos são polifenóis hidrossolúveis, agrupados em condensados e hidrolisáveis, sendo ambos encontrados na espécie (SIMÕES et al. 2017). Suas principais características podem ser visualizadas na figura 7 e são elencadas por Simões et al (2017):

> Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, em geral β-D-glicose, cujas hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzoico), formado na via do chiquimato. Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Essa classe de taninos também é denominada de proantocianidinas, devido ao fato de taninos condensados produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas.

A atividade biológica dos taninos se deve, principalmente, à capacidade de formar complexos com íons, moléculas e macromoléculas, tais como as proteínas, sendo úteis no processo de cicatrização, auxiliando a formação de uma barreira protetora e com potencial antimicrobiano. Oferecem ainda um efeito de sequestro de radicais livres, sendo potentes antioxidantes, sendo mencionados na literatura como possíveis alternativas para redução da cadeia de estresse oxidativo que serve de gatilho para várias desordens, que vão desde doenças cardiovasculares, inflamatórias, imunológicas, neurodegenerativas e até mesmo o câncer (SILVA; AGUIAR; FREITAS, 2020).

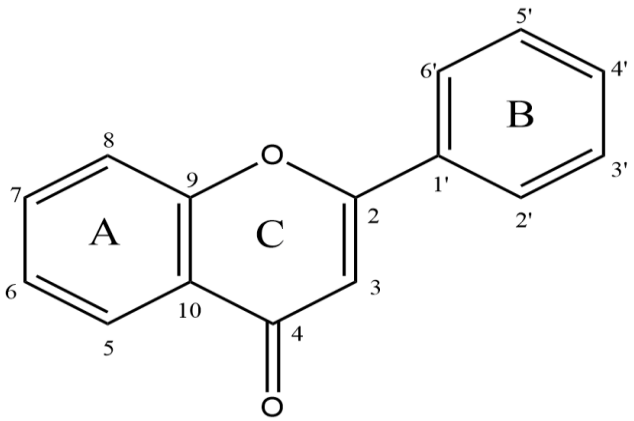
Figura 7: Representação estrutural geral de taninos condensados e hidrolisáveis



(A) Representação estrutural geral de taninos condensados. (B) Representação estrutural geral de taninos hidrolisáveis. Fonte: DIAS et al (2014)

Também estão representados na espécie, tanto em suas folhas quanto em seu caule, os flavonoides, que também são polifenóis e apresentam atividades tanto nas espécies onde ocorrem quanto aplicadas de modo medicinal, referente a proteção contra patógenos diversos, incluindo os fungos e as bactérias, além de vírus e insetos; fotoproteção e ação antioxidante, principalmente, atuando também como anti-inflamatórios, mediante modulação enzimática. São compostos tricíclicos com disposição de 15 átomos, cuja estrutura fundamental está representada na figura 8, e que podem também ser aliados no tratamento de feridas e lesões diversas, seja de forma tópica ou sistêmica (SIMÕES et al, 2017).

Figura 8: Estrutura química fundamental dos metabólitos secundários: Flavonoides



Fonte: SIMÕES et al (2017)

A utilização de produtos naturais e seus extratos, pode proporcionar mecanismos diferentes agindo de modo concomitante, sendo aliados no controle de enfermidades diversas. Os compostos fenólicos, particularmente, têm apresentado resultados promissores contra espécies bacterianas de alta patogenicidade, como é o caso do *Staphylococcus aureus*, responsável por infecções oportunistas, com colonização e formação de biofilme em próteses, lesões e procedimentos cirúrgicos, sendo uma das espécies mais associadas à infecção cruzada nos ambientes hospitalares e na assistência à saúde, de modo geral. Dentro deste contexto, os compostos fenólicos, podem impedir a formação de biofilmes, por redução da motilidade desse e outros microrganismos, por perda de densidade (devido inibição de mecanismo de sinalização através das acil-homoserina lactonas) e até mesmo através da quebra de peptideoglicanos (formadores das paredes bacterianas), levando à inviabilização do patógeno (MARTINS et al, 2020).

2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A ocorrência da multirresistência bacteriana está ligada a diversos fatores, podendo haver interferência ambiental ou mesmo por questões inerentes aos microrganismos, que possuem mecanismos de sobrevivência/adaptação. Freitas et al (2020) descrevem alguns dos mecanismos pelos quais os microrganismos exercem resistência aos antimicrobianos, podendo ocorrer a inativação por ação enzimática (a exemplo da produção de beta lactamase, que inviabilizam uma classe inteira de antimicrobianos, os beta lactâmicos); por modificação do sítio alvo (levando a um impedimento da ligação do antimicrobiano e assim o seu efeito, seja de forma individual ou por conjugação com outras cepas); por redução da permeabilidade (por redução da expressão de porinas ou sua substituição por canais de maior seletividade) e por disposição de bombas de efluxo (que removem o antimicrobiano impedindo sua ação).

A este fato está associado não apenas as estratégias de sobrevivência das cepas bacterianas, sendo também mencionado o agravante que diz respeito ao uso indiscriminado dos antimicrobianos, seja pela automedicação, sob falta de orientação profissional, seja por diagnóstico incorreto, sobretudo quando aplicados tais medicamentos em quadros virais ou a não utilização de meios confirmatórios acerca

do patógeno associado ao quadro de infecção, assim como sua sensibilidade**.** Sendo necessário um melhor direcionamento da terapia e promovendo o uso racional, com acompanhamento adequado, adesão ao esquema terapêutico e de-escalonamento de drogas ineficientes de forma guiada, colaborando para a recuperação do paciente, com o mínimo de agravamentos (HECKLER; HANN, 2020).

Ramos-Castañeda et al (2018) e Jernigan et al (2020) destacam alguns dos principais microrganismos resistentes, que aumentam a complexidade do cuidado aos pacientes infectados: (1) MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), cepas que na maioria das vezes respondem ao tratamento antimicrobiano, porém demandam períodos maiores para total remissão, ocasionando em aumento do tempo de internação do paciente, que acaba ficando exposto no ambiente hospitalar a coinfecção por outros patógenos, o que pode evoluir com piora significativa e abordagem por antibióticos múltiplos; (2) Microrganismos produtores de beta lactamase de espectro estendido (ESBL), enzima que degrada o anel beta-lactâmico (grupo farmacofórico dos antibióticos beta lactâmicos), que se configuram como a classe com a maior quantidade de antimicrobianos, o que pode desfavorecer a possibilidade de utilização de grande arsenal terapêutico; (3) KPC (*Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase), microrganismo associado principalmente a quadros de pneumonia nosocomial de difícil tratamento que produz enzima que inviabiliza o tratamento com os antibióticos carbapenêmicos, estes que costumam ser o último recurso para o tratamento de infecções graves por microrganismos gram negativos.

Os antimicrobianos são aplicados de acordo com o seu espectro de ação, que é influenciado tanto pela característica química da molécula, quanto pela característica do microrganismo propriamente dito, visto que as bactérias gram negativas se diferem das gram positivas, onde as primeiras possuem um revestimento que dificulta a interferência por alguns dos antibióticos aplicados na prática clínica, além do desenvolvimento de resistência que ocorre em algumas espécies com mais facilidade, como as citadas anteriormente (RAMOS-CASTAÑEDA et al, 2018).

Os principais antimicrobianos e seus mecanismos de ação estão descritos a seguir, segundo Guimarães, Momesso e Pupo (2010): (a) Beta lactâmicos, que interferem na síntese da parede bacteriana por meio de interferência na enzima transpeptidase (responsável por formar as paredes de peptideoglicano das paredes

celulares), seus principais representantes são as penicilinas e as cefalosporinas. São úteis tanto quanto gram positivos quanto gram negativos, sendo a principal estratégia de resistência, a produção de enzimas nucleofílicas pelos microrganismos que degradam seu grupo farmacofórico, o anel beta lactâmico; (b) os Aminoglicosídeos, representados pela estreptomicina, classe da qual também faz parte a gentamicina, se ligam aos ribossomos e impedem sua movimentação ao longo do mRNA, impedindo a síntese proteica, agindo como bactericida. São mais indicados para o tratamento de infecções por patógenos gram negativos, mas em geral, possuem amplo espectro podendo estender a ação também aos gram positivos. O principal mecanismo de resistência também se dá devido à produção de enzimas degradantes pelos microrganismos; (c) os Macrolídeos, representados pela eritromicina, atuam por inibição da síntese proteica por ligação ao RNA ribossomal, sendo a resistência adquirida mais comumente por modificações no alvo e efluxo, tais características gerais também apresentadas pelas (d) Lincosamidas, representadas pela clindamicina. Sendo os primeiros ativos principalmente contra patógenos causadores de infecções respiratórias; (e) as Tetraciclinas também possuem amplo espectro de ação e mecanismo de resistência semelhante aos aminoglicosídeos. enquanto que os (f) Glicopeptídeos, como a vancomicina e teicoplanina figuram entre os antimicrobianos mais utilizados para cepas de gram positivos multirresistentes, agindo na inibição da biossíntese da parede bacteriana e com desenvolvimento de resistência mais lento do que nas demais classes.

Dentro deste contexto, entretanto, Gonçalves-Belo (2017) destaca que devido à dificuldade na sintetização de novos antibióticos e na crescente ocorrência de multirresistência pelos microrganismos, é possível investir em estratégias, como alternativas adjuvantes. Utilizando mecanismos que auxiliem seja no impedimento na degradação, seja no aumento da potência de ação do medicamento, o tornando mais eficaz contra esses microrganismos. Porém, é necessário em conjunto a isto proporcionar uma melhora de foco em educação em saúde, assim como implementar medidas regulatórias, de modo a prover um maior controle do uso inadvertido desses medicamentos (SAMPAIO; SANCHO; LAGO, 2018).

Sob esta perspectiva, os compostos de origem natural, conforme mencionado por Amorim et al (2020), podem ser utilizados como estratégia de reversão do quadro de resistência, visto que podem modular os eventos ocorrentes, mediante regulação

e/ou alteração do metabolismo bacteriano e/ou desestabilização das membranas celulares, de modo a facilitar a ação do antimicrobiano, podendo, portanto, agir como adjuvantes aos antibióticos. Desta forma, estudos que utilizam técnicas para identificar sinergismo, têm ganhado espaço, considerando-se a importância de identificar alternativas para correção deste problema, visto que a exposição a cepas resistentes aumenta a probabilidade de morbimortalidade dos pacientes, além de aumentar o tempo de internação e os custos hospitalares.

2.4.1 Principais microrganismos envolvidos em infecções de feridas e suas características

Conforme descrito por Suarato; Bertorelli e Athanassiou (2018), a pele se configura como sendo a primeira barreira protetora do nosso organismo, conferindo defesa contra vários interferentes externos, além de possuir terminações nervosas especializadas para a percepção da dor, sendo mecanismo de defesa contra a ocorrência de lesões de modo geral. As feridas são rupturas, descontinuidades em quaisquer tecidos biológicos, não apenas na pele, gerando injúria e ativando processos inflamatórios e imunológicos para que o reparo ocorra e a barreira volte a se tornar efetiva.

Conhecer as etapas que ocorrem até essa recuperação é imprescindível para que se possa trabalhar em alternativas terapêuticas com essa finalidade. Suarato; Bertorelli e Athanassiou (2018) descrevem cada uma dessas etapas:

> O processo de cura pode ser dividido nos seguintes estágios sobrepostos: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação. A homeostase é a resposta imediata do corpo a uma lesão, a fim de interromper a perda de sangue no local da ferida, por meio de redes de fibrina como barreiras temporárias. A inflamação (de 24 h a 4-6 dias) é mediada por neutrófilos e macrófagos, que varrem o leito da ferida de partículas estranhas e fragmentos de tecido. Citocinas e enzimas são liberadas para estimular fibroblastos e miofibroblastos, enquanto o exsudato da ferida fornece a umidade essencial para a recuperação. Na fase de proliferação ocorre a epitelização e o tecido de granulação neoformado começa a preencher a área da ferida, produzindo nova matriz extracelular (MEC). Finalmente, durante a fase de remodelação, a reticulação à base de colágeno é responsável pela formação de uma rede tridimensional compacta, aumentando a resistência à tração do novo tecido.

Um dos maiores desafios, entretanto, quando se trata de feridas, independente do seu grau de complexidade, é a ocorrência de contaminações, principalmente pelos chamados microrganismos oportunistas, considerando que a lesão da barreira

cutânea pode favorecer que a própria microbiota, isto é, os microrganismos que fazem parte naturalmente do tecido no entorno do ferimento, tenham acesso ao leito da ferida, além de retardar o processo de recuperação e possibilitar infecções mais graves quando há acesso à corrente sanguínea (KIRKETERP-MØLLER; STEWART; BJARNSHOLT, 2020).

Essas infecções podem atingir outros órgãos, além do risco de necrose tecidual, trazendo um potencial incapacitante, sobretudo nas feridas crônicas, como ocorre em pacientes diabéticos ou portadores de úlceras por pressão, principalmente, onde esses pacientes acabam necessitando de procedimentos invasivos constantes e em uso de curativos que no longo prazo acabam lesionando o tecido a cada nova intervenção (KIRKETERP-MØLLER; STEWART; BJARNSHOLT, 2020).

Dentre os principais patógenos associados às infecções de feridas com alta prevalência, associados à extensa morbimortalidade estão *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, o primeiro por fazer parte da microbiota da pele, se caracterizando como oportunista e o segundo por sua disposição ambiental, sendo este último o principal responsável pelas infecções que levam a quadro de sepse dentro do ambiente hospitalar, estando associada inclusive com o desenvolvimento de pneumonia nosocomial pela contaminação cruzada em tecidos do próprio paciente, bem como através das mãos dos profissionais da saúde, visto que a higiene das mãos ineficiente continua sendo, nos tempos atuais, um dos principais fatores de risco para infecções graves na assistência à saúde (HOTTERBEEKX et al, 2017).

O *Staphylococcus aureus*, microrganismo presente em infecções de pele e tecidos moles, endocardites, infecções de próteses e dispositivos com grande atividade de formação de biofilmes, faz parte da microbiota humana, principalmente colonizando pele e mucosas, sobretudo na área nasal. Se comporta como oportunista, motivo pelo qual está envolvido na infecção também de feridas, gerando infecções que têm potencial para impactar na morbimortalidade, sobretudo nos ambientes hospitalares (PINTO, 2016). É um organismo esférico não formador de esporos e não móvel que se divide em mais de um plano formando cachos irregulares em forma de uva. É facultativamente anaeróbio, catalase positivo, oxidase-negativo e pode crescer em NaCl a 10% (FOSTER; GEOGHEGAN, 2015).

A alta virulência associada às cepas de *Staphylococcus aureus* está diretamente relacionada à sua capacidade de adesão, multiplicação e disseminação

nos tecidos, além de realizar síntese de toxinas e enzimas, moléculas de alto potencial patogênico. Junto a isto destaca-se a incidência de espécies resistentes, os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), que foram bastante disseminados no ambientes hospitalares, a partir da década de 1970, logo após o início da utilização da meticilina como estratégia terapêutica, limitando o tratamento desta variação aos antibióticos glicopeptídeos, como a vancomicina e a teicoplanina, dos quais já possuem cepas também resistentes, os *Staphylococcus aureus* resistentes à Vancomicina (VRSA), estas que foram encontradas pela primeira vez no Brasil nos anos 2000 e relatadas pela primeira vez no mundo em 1997, a partir de semeio de cepas de ferida cirúrgica (SANTOS et al, 2007).

O desenvolvimento de resistência dos *Staphylococcus aureus* está associado a mutações genéticas por meio de aquisição de genes de resistência da mesma espécie ou até mesmo de outras espécies, através de plasmídeos e transposons, o que na maior parte das vezes leva a uma inativação de diversas drogas, sendo também associado à grande ocorrência de enzimas que degradam as moléculas dos antibióticos. Este comportamento acaba gerando um grande desafio para o controle destas cepas, já que de modo geral, o uso dos antimicrobianos da classe dos betas lactâmicos são úteis no tratamento deste patógeno, porém acabam por auxiliar no aumento da ocorrência dos MRSA e VRSA, estreitando as possibilidades terapêuticas (SANTOS et al, 2007).

Outras três espécies de bactérias classificadas como cocos gram positivos também possuem alta incidência sobre a ocorrência de infecções associadas a lesões cutâneas, os *Enterococcus faecalis* e os *Staphylococcus epidermidis.* A primeira é associada principalmente a casos de infecção cruzada ou contaminação durante o processo de assistência, visto serem parte da microbiota digestiva humana. São organismos aeróbios, facultativos e também apresentam cepas resistentes à vancomicina, por problemática associada ao uso indiscriminado dos beta lactâmicos, assim como ocorre com os MRSA (BEGANOVIC, 2018). O *Staphylococcus epidermidis*, por sua vez, se caracteriza como uma bactéria de tipo coagulase negativa, que coloniza a pele normalmente e pode ter um papel de defesa, inibindo a disseminação de outros microrganismos, além de promover uma redução no processo inflamatório da pele (NAKATSUJI, 2018).

Dentre os microrganismos gram negativos envolvidos nas infecções em feridas, destacam-se *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis.* A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é uma das maiores causas de morbimortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Se caracteriza como bacilo não fermentador, de caráter ubíquo, o que potencializa a problemática associada, visto que por ser encontrada facilmente no solo, na água e nos seres vivos em geral, aumenta a possibilidade de contaminações que levem a infecções, inclusive infecções graves, com potencial para desenvolvimento de bacteremia e septicemia (PANG et al, 2019).

Quando encontrados casos de resistência à *Pseudomonas aeruginosa,* estas englobam antibióticos das mais variadas classes, possuindo resistência intrínseca com permeabilidade da membrana externa restrita, sistemas de efluxo que bombeiam antibióticos para fora da célula e produção de enzimas inativadoras de antibióticos (PANG et al, 2019). O mesmo ocorre com a espécie *Proteus mirabilis*, que também possui caráter ubíquo, sendo um contaminante importante na assistência à saúde, estando principalmente relacionados à infecções por formação de biofilme em dispositivos, como cateteres e sondas, aumentando a vulnerabilidade do paciente quando internado em unidades de saúde, favorecendo a contaminação cruzada, o que coloca em risco outros pacientes, considerando ainda a maior gravidade em pacientes imunocomprometidos (AMBRUSTER, MOBLEY & PEARSON).

A *Escherichia coli*, por sua vez, possui forma de bastonete, com ou sem flagelos, comportando-se como aeróbia facultativa. Está presente na microbiota do trato gastrointestinal humano, estando relacionada principalmente a contaminações ambientais, onde pode ser utilizada como parâmetro para identificar contaminação fecal na água, assim como nas contaminações associadas ao cuidado. As cepas afetam principalmente o trato urinário, além do próprio trato gastrintestinal. Sendo assim, quando identificadas em feridas, na maioria das vezes, são associadas à transmissão durante a manipulação (JANG et al, 2017).

O fato de estar presente no trato gastrintestinal faz com que essas bactérias tenham contato com vários antimicrobianos ao longo da vida de um indivíduo, o que favorece a resistência a múltiplas drogas, incorrendo em grandes riscos ao paciente, sobretudo do desenvolvimento de septicemia (JANG et al, 2017). Tais características também se aplicam à *Klebsiella pneumoniae* que está entre os três principais agentes

causadores de morte neonatal, e é também, uma das espécies com maior potencial de resistência, estimando-se que há grande possibilidade de haver cepas, inclusive, resistentes a todos os antibióticos disponíveis (WYRES, LAM & HOLT, 2020).

2.5 TIPOS DE COBERTURA PARA CURATIVOS E ESTRATÉGIAS NOS TRATAMENTOS DE FERIDAS

As estratégias de tratamento atualmente identificadas, seja a nível ambulatorial, domiciliar ou hospitalar, levam em consideração os processos fisiológicos associados ao reparo de feridas, de modo a contribuir com a recuperação e influenciar positivamente em cada uma das etapas envolvidas na cicatrização. Os curativos são desenvolvidos com intuito de aplicação tópica/local e abrangem diversas formas farmacêuticas, como pomadas, géis, filmes e coberturas, que podem ter ativos incorporados que aceleram o processo ao passo que impedem o desenvolvimento bacteriano, mantém a umidade regulada, assim como promove controle térmico, reduz a disposição de interferentes e corpos estranhos e remove tecido necrótico. Essa remoção, entretanto, pode necessitar de intervenção cirúrgica, considerando que a necrose tecidual pode alavancar cascatas que ativam mais necrose e, portanto, impede o desenvolvimento do tecido saudável (BLANES, 2004).

Dentro deste contexto existe a dificuldade sobre esses métodos, que podem apresentar alto custo ou serem pouco eficientes, visto que aqueles que se configuram como boa barreira para manter o leito da ferida livre de infecções, pode apresentar difícil remoção e acabam por lesionar a ferida a cada troca, fazendo com que o paciente incorra em novas injúrias e no impedimento do desenvolvimento do tecido ainda fragilizado (PARK et al, 2020)

Segundo Park et al (2020) o ideal seria a aplicação de curativos que tenham adesão com a produção do exsudato ao passo que reduz a exsudação excessiva e se desprende do tecido sem necessidade de força mecânica, tecnologias desenvolvidas por pesquisadores, porém com pouca aplicação prática devido ao alto custo agregado, no que se pode classificar como curativos inteligentes.

Para minimizar as lesões a cada troca de curativos existem orientações a serem seguidas, preconizadas pela *Agency for Health Care Policy and Research* (AHCPR), cujo principal intuito é manter o leito da ferida livre de contaminações com

a minimização de danos ao tecido em formação, utilizando irrigação com soluções neutras, mantendo-se a monitorização de possíveis focos de necrose tecidual, para avaliação de necessidade de desbridamento, isto é, a remoção do tecido desvitalizado ou necrótico, assim como possíveis corpos estranhos que prejudiquem a recuperação, conforme citado por Blanes (2004), que complementa:

> Existem diversos métodos de desbridamento, cujas indicações, contra indicações, vantagens e desvantagens devem ser conhecidas para ser tomada a decisão mais adequada às necessidades do paciente. Destaca-se o desbridamento autolítico (processo que utiliza os próprios leucócitos e enzimas para a degradação do tecido necrótico, é seletivo, confortável, porém lento, e para que ele ocorra é necessário a manutenção do meio úmido); desbridamento enzimático ou químico (envolve a utilização de enzimas proteolíticas que estimulam a degradação do tecido desvitalizado, é seletivo e pouco agressivo; é necessário a manutenção do meio úmido); desbridamento mecânico (consiste na remoção dos tecidos desvitalizados com o uso da força física como na fricção com gazes ou esponja, ou remoção de gazes secas, porém previamente aderidas na lesão) e desbridamento cirúrgico / instrumental (realizado com tesoura ou lâmina de bisturi, dependendo da lesão e condições do paciente pode ser feita a beira do leito, ambulatório ou centro cirúrgico; é considerado o método mais eficaz por remover extensas áreas em curto tempo, pode ter complicações como dor ou sangramento).

Outra estratégia que vem ganhando força e que tem apresentado boa aplicabilidade é a engenharia de tecidos, com produção de pele sintética ou a utilização de estruturas biocompatíveis para auxílio na recuperação e proteção do leito da ferida favorecendo a recuperação dos pacientes que sofrem com feridas crônicas ou com queimaduras, como é o caso da utilização da pele de tilápia, metodologia desenvolvida no Brasil (LIMA JÚNIOR, 2017), além da aplicação de produtos biodegradáveis com possibilidade de redução de exsudato, promoção de barreira protetora e atividade antimicrobiana associada, como é o caso da aplicação de biopolímeros, como a quitosana, que possibilitam a incorporação de ativos, sejam naturais, sejam sintéticos, que possam auxiliar na recuperação com o mínimo de prejuízo ao tecido em desenvolvimento. (SUARATO; BERTORELLI; ATHANASSIOU, 2018).

Os biopolímeros quando aplicados a coberturas para feridas, seja em forma de gel ou filme, se assemelham aos curativos de tipo hidrocoloide e hidrogel. As coberturas de tipo hidrocoloide consistem em curativos que em seu interior possuem filme de carboximetilcelulose sódica, pectina e gelatina (mais frequente) e por fora cobertura com espuma, geralmente à base de poliuretano. Esses materiais agem promovendo a angiogênese e o desbridamento autolítico, além de acelerar o processo

de granulação tecidual, enquanto mantém o leito da ferida livre de contaminações, curativos deste tipo são ideais para feridas exsudativas, porém a depender do nível de exsudação, podem necessitar de um número grande de trocas, retardando a total recuperação da lesão (SILVA et al, 2017).

Já os curativos com hidrogel utilizam gel transparente que também possui, em sua maioria, carboximetilcelulose sódica em sua composição em conjunto com água e propilenoglicol, sendo mais úteis quando aplicadas a feridas superficiais, com o mínimo possível de exsudação, também promovendo a hidratação e o processo de desbridamento autolítico, mantendo a ferida com aspecto saudável e favorecendo a angiogênese no local, o que promove a distribuição de nutrientes e células para favorecer a cicatrização. Associados às coberturas ainda são utilizados o alginato de cálcio (ação hemostática e de controle de exsudação), carvão ativado e prata (atraem e inviabilizam bactérias), papaína (enzima proteolítica de origem vegetal com função de debridante e acelerador de reparo tecidual). Sendo assim, identifica-se a possibilidade de aplicação de polímeros de biopolímeros com esta finalidade, seja como hemostáticos, seja com adição de compostos ativos que influenciam nas várias etapas relacionadas à cicatrização (SILVA et al, 2017).

Quanto à população e demanda de estratégias de tratamento para feridas, independentemente de seu nível de complexidade, pode-se citar os pacientes vítimas de queimaduras, pacientes diabéticos, que sofrem com a amputação de membros devido feridas em concomitância com esta comorbidade. Soma-se a isto o aumento da população idosa no Brasil, o que também incorre no aumento de pacientes restritos ao leito que podem desenvolver as chamadas úlceras por pressão (OLIVEIRA et al, 2019). Destaca-se ainda os pacientes vítimas de acidentes, onde ocorre a prevalência de feridas infectadas. A má evolução de feridas cirúrgicas devido às contaminações no ambiente hospitalar e o impacto econômico que esses tratamentos trazem às unidades de saúde, onde pode-se otimizar os custos com terapias mais eficientes, contribuindo ao mesmo tempo para uma melhor recuperação aos pacientes, impactando também no âmbito social (ARAÚJO, 2019).

2.6 BIOPOLÍMEROS COM APLICAÇÃO MEDICINAL

O termo polímero foi introduzido no século XIX para designar moléculas orgânicas com os mesmos elementos químicos, mas que diferiam em suas propriedades. Tais compostos possuem unidades de repetição denominados monômeros que se ligam entre si na maior parte das vezes através de ligações covalentes. De modo geral, podem ser classificados entre sintéticos e naturais. Estes últimos, também referenciados como “biopolímeros” ganharam destaque nas últimas décadas devido principalmente à sua biodegradabilidade, visto que a produção, sobretudo, de embalagens sustentáveis se tornou uma necessidade emergente, considerando os riscos ao ambiente causados pelo acúmulo de resíduos advindos de polímeros sintéticos, como os plásticos, expondo a necessidade de investimento e desenvolvimento de alternativas com menores impactos à natureza (FARIAS, 2016).

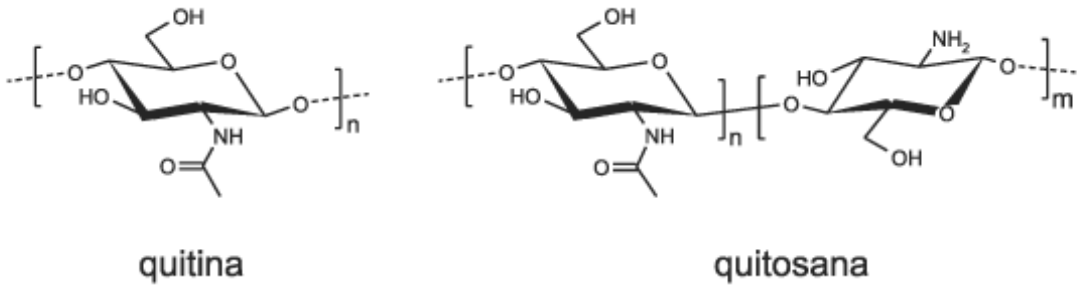
A aplicação diversa dos polímeros e biopolímeros se dá devido serem facilmente moldados, sendo possível obter géis, fibras e filmes, com resistência e elasticidade, podendo ser otimizados em contato com outras estruturas químicas, através de processos diversos. Bastos (2007), menciona os principais biopolímeros e suas possíveis aplicações, assim como traça as perspectivas desse mercado que se mostra promissor. Destacando-se a utilização dos polímeros do amido, composto por grupos repetidos de glicose, com ampla disponibilidade e aplicados principalmente na produção de bioplásticos, devendo haver pelo menos 60% de amido em sua composição para se tornarem biodegradáveis, de modo a promover a substituição de embalagens nos mais variados setores.

A utilização dos biopolímeros também possui como ponto positivo a possibilidade de reutilização de resíduos, sendo portanto, também por este motivo, uma alternativa sustentável, considerando que a sua maioria é adquirida de matéria-prima vegetal, como o polilactato (PLA) e o polihidroxialcanoato (PHA), de origem animal, como a gelatina (bovina, suína e pescados) e a quitosana (crustáceos) e de microrganismos, como a goma xantana e a kefirana, estando associados, na maior parte das vezes à fontes renováveis (GUILHERME et al, 2019). Tal característica proporciona uma alta disponibilidade desses produtos que acabam sendo utilizados na área da saúde, na tecnologia de alimentos, agricultura e embalagens, principalmente (BORSCHIVER; ALMEIDA; ROITMAN, 2008).

As características dos biopolímeros naturais os tornaram atrativos para aplicação na pesquisa em saúde, principalmente devido sua versatilidade e características básicas que envolvem biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa reatividade e possibilidade de interações físicas e químicas com diversos compostos ativos, podendo, inclusive, gerar efeitos sinérgicos, sendo portanto materiais oportunos para utilização com aplicação medicinal, principalmente na recuperação de feridas, considerando que podem fazer parte de formulações com este fim, além de serem úteis na pesquisa sobre liberação controlada de fármacos, de modo geral (LIU; JI; ZHU, 2021).

A quitosana (figura 9), segundo biopolímero mais abundante no mundo, é obtida através da desacetilação da quitina, polissacarídeo presente em crustáceos, e é formada por unidades repetidas de 2-amino-2-desoxi-d-glicopiranose e 2-acetamido-2-desoxi-d-glicopiranose e possui grupos funcionais receptivos, como amina primária (NH), grupo hidroxila primário e secundário (OH) em seu monômero, o que facilita a sua modificação química para aprimoramentos sem que haja perda de suas propriedades gerais. Isso a torna um produto de alta versatilidade e aplicabilidade, possuindo ainda a vantagem de sua obtenção estar associada a processos sustentáveis, visto que pode ser obtida de resíduos de crustáceos, possibilitando seu reprocessamento (NEGM et al, 2020).

Figura 9: Estrutura química da quitina e da quitosana



Fonte: SILVA; SANTOS; FERREIRA (2006)

Estudos revelam que a quitosana pode também oferecer atividade anti-inflamatória e antimicrobiana, atividades possivelmente explicadas pela ocorrência de interações eletrostáticas entre o polímero, com seus grupos positivamente carregados (–NH3+), e as moléculas com resíduos de carga negativa, sendo possível, no caso

das infecções, ocorrer interferência na parede bacteriana. Tais atividades são potencializadas através de alterações quimicamente estruturais, além de necessitarem de ambiente favorável, considerando temperatura e pH. A aplicabilidade deste biopolímero ao desenvolvimento de formas farmacêuticas, entretanto, é possível mesmo sem essas alterações, em conjunto, principalmente, com agentes plastificantes, gerando materiais flexíveis e de fácil manipulação, que fornecem estrutura ideal para a incorporação de componentes ativos, sua proteção e liberação (SAHARIAH; MASSON, 2017).

Além disso, filmes à base de quitosana possuem alta capacidade adsortiva devido interações de hidrogênio possibilitadas pelos grupamentos amino presentes ao longo de toda a sua estrutura, o que propicia ação hemostática (SLOBODOVA; GORSHKOVA; NOVOSELOV, 2020). Além de interagir a nível celular com baixa ativação imunitária e baixos níveis de toxicidade, com estímulo à migração de macrófagos, fibroblastos e colágeno, favorecendo a regeneração de tecidos biológicos, fazendo com que seja um biomaterial com aplicação favorável em feridas, queimaduras, lesões em geral e no controle de hemorragias em incisões cirúrgicas, agindo como hemostáticos eficientes (SANTOS, 2019). Tais propriedades são destacadas por Silva, Santos e Ferreira (2006):

> A propriedade imunomoduladora da quitosana é devida à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente o macrófago e explica não somente seu papel na aceleração da cicatrização de lesões, mas também a biodegradabilidade deste polímero no organismo. Os macrófagos, ativados pelos oligômeros de quitina e quitosana de baixa massa molecular, liberam interleucina-1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Liberam, também, N-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana a monômeros de N-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias à biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos. Promovem a migração de neutrófilos, facilitando a resolução da resposta inflamatória. As atividades bactericidas e bacteriostáticas sugerem que estes polímeros podem prevenir infecções, se aplicados diretamente no local da lesão. A quitosana é excelente umectante e adere melhor que ácido hialurônico, além de ser economicamente mais viável.

Diante do exposto, pode-se inferir que a quitosana se configura como um material de aplicabilidade promissora no tratamento de feridas, pois segundo De Queiroz e Tomaz (2021), ainda se somam ao já mencionado, o fato de que filmes à base de quitosana possibilitam a troca de gases e nutrientes, essenciais ao desenvolvimento do tecido em formação, além de ser possível, aprimorando suas

propriedades, reduzir o número de intervenções e trocas de curativos, mantendo o paciente mais confortável durante a sua evolução e trazendo menos ocorrência de lesões ao longo do tratamento. A versatilidade na incorporação também é uma vantagem, mantendo este biopolímero como ferramenta de liberação controlada de fármacos (DE QUEIROZ; TOMAZ, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Formular filme à base de quitosana incorporado com extrato seco da espécie *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul para avaliação de atividade antimicrobiana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar cascas da espécie *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul em época sazonal de modo a proporcionar o máximo de conteúdo tânico;
- Extrair e quantificar o conteúdo de taninos e flavonoides da espécie coletada;
- Formular filme de quitosana através de soluções filmogênicas utilizando método de *casting*;
- Incorporar extrato seco obtido da espécie em estudo ao filme formulado;
- Realizar caracterização do filme à base de quitosana incorporado com extrato da espécie em estudo através de ensaios de intumescimento, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e termogravimetria;
- Realizar teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato com os três patógenos mais prevalentes, associados com quadro de morbimortalidade, na infecção de feridas;
- Realizar teste de *Checkerboard* para identificação de sinergismo entre extrato e principal antibiótico de uso tópico, a gentamicina;
- Determinar potencial antimicrobiano da formulação através de método de diluição em caldo.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As amostras de cascas da espécie *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul, conhecida popularmente como Angico, foram coletadas nos meses de setembro e outubro de 2019, devido a ser identificado como período com baixo registro de chuvas e com temperaturas mais altas, variando de 28 a 32ºC, de modo a proporcionar o maior conteúdo possível de taninos, considerando impacto sazonal da espécie. As coletas foram realizadas na zona rural do município de São Caetano (23° 37’ 21” S e 46º 32’ 56” W), localizado a 134 km do Recife, inserido na mesorregião Agreste e na Microrregião Vale do Ipojuca do Estado de Pernambuco, apresentando clima de tipo Tropical Chuvoso, com verão seco, com estação chuvosa entre os meses de janeiro e agosto, com término em setembro (BRASIL, 2005). A exsicata foi registrada sob nº 93849 no Herbário Dárdano de Andrade Lima, no Instituto Pernambucano de Agronomia (IPA). A Pesquisa também foi registrada junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN), sob o código A364335, conforme consta no Anexo I.

4.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE INTERESSE

A extração seguiu metodologia desenvolvida pelo Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT) da Universidade Federal de Pernambuco. O material coletado (4 kg das cascas da espécie *Anadenanthera colubrina*) foi exposto a um moinho de facas, para trituração em partes menores, de modo a aumentar a superfície de contato do material com o solvente a ser utilizado para extração, com posterior padronização de tamanho de partículas, com o auxílio de tamises em granulometria de 20 mesh (1,2 mm). Para a extração, foi utilizado como solvente etanol 80% com maceração adaptada, ao abrigo da luz, de modo a possibilitar a extração de metabólitos sem que haja oxidação, evitando perdas, considerando a característica química dos metabólitos que podem incorrer em degradação em contato com a luz (SIMÕES et al, 2017). O solvente foi substituído por seis vezes, de modo a extrair o máximo possível

de metabólitos e as soluções foram concentradas até a obtenção de um extrato seco, expondo-se a evaporador rotativo sob temperatura de 40ºC e a proporção droga-solvente foi de 1:1 m/V.

Para determinação do conteúdo fenólico total foi utilizada a metodologia descrita por Amorim et al (2008) a partir da utilização do reagente Folin-Ciocalteu, reagente que possui em sua composição uma mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato que, em presença de carbonato de sódio, promove coloração característica azulada e possibilita a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda a 760nm, para determinação de fenóis e polifenóis de modo geral. Devido ao potencial antioxidante, a reação da solução preparada com o extrato (utilizada concentração de 1 mg/mL) deve ocorrer ao abrigo da luz e em temperatura ambiente por 30 minutos, quando é possível realizar a leitura e determinar a concentração através da preparação de uma curva de calibração a partir de concentrações conhecidas de ácido tânico (0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0µg/mL). O teor de fenóis totais então pode ser expresso como miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de amostra (mg TAE/g).

Já para a quantificação de taninos, procede-se, conforme descrito por Amorim et al (2008) a partir da complexação com a caseína PA, de obtenção comercial, proteína presente no leite fresco. Esta técnica determina de forma indireta o conteúdo de taninos presentes, devido à capacidade desses metabólitos em se complexar com estruturas tais como as proteínas. Desta forma, quantificou-se também pelo método Folin-Ciocalteu, calculando-se o teor de taninos, através da diferença entre o conteúdo de fenóis totais e fenóis residuais, a partir de curva de calibração com ácido tânico, conforme descrito anteriormente.

Foi também avaliada a concentração de flavonoides, a partir da metodologia descrita por Peixoto Sobrinho et al (2008), onde é possível identificar a formação de um complexo contendo flavonoides em conjunto com íons de alumínio. Esta reação promoveu uma coloração amarelada, característica possível de leitura em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 420 nm. Para tanto, estabeleceu-se curva de calibração do padrão rutina nas concentrações 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0 µg/mL, sendo o teor de flavonoides expresso em miligramas equivalentes de rutina por grama de extrato (mg ER/g).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco, utilizando reagentes de grau analítico. As análises estatísticas ocorreram com utilização do *software Statistica*, registrando as médias e desvios padrões.

4.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

A formulação dos filmes à base de quitosana foram incorporados com o extrato bruto de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul se deu através do método de *casting* conforme relatado por Fráguas et al (2015), que consiste em obtenção de solução filmogênica, realizada a partir de variações de concentrações de ácido lático (5%, 3% e 1%) como agente solubilizante, Glicerina (15%, 20% e 25%) como agente plastificante e quitosana com grau de desacetilação 80% como biopolímero para composição da matriz do filme. A solução passou por processo de agitação por 24h, para então ocorrer a incorporação do extrato, diluído em DMSO 1% para facilitar sua solubilização. Após 24h sob agitação ao abrigo da luz, a solução com o extrato incorporado foi disposta em placas de Petri de 90 mm e expostas a secagem em estufa a 40 ºC por mais 24 h.

O grau de desacetilação da quitosana utilizada, gentilmente cedida pelo Laboratório de Tecnologia Química Farmacêutica da Universidade Federal de Pernambuco, foi comprovada através de método proposto por Fráguas et al (2015), a partir de titulação potenciométrica e foram realizadas leituras em FT-IR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier) de modo a identificar os grupos funcionais característicos, tanto do polímero quanto do extrato, bem como indicar o perfil de interação entre eles, se a incorporação resultou em alterações químicas importantes quando realizada a formulação.

Para determinação e identificação de perfil de degradação utilizou-se método de termogravimetria com emprego de termobalança Shimadzu®, modelo DTG 60H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min-1, utilizando-se amostra de 400µg do extrato seco, da quitosana e das formulações, onde é possível compreender a cinética de degradação do material utilizando-se faixas de temperatura de 100ºC a 600ºC e inferir se a inclusão de componentes interfere modificações no padrão de degradação do produto final. As análises de termogravimetria e FT-IR foram

realizadas em parceria com o Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM), da Universidade Federal de Pernambuco.

A espessura dos filmes foi determinada com o auxílio de um micrômetro digital, realizando-se a leitura em 5 posições aleatórias (BISPO; MANSUR; MANSUR, 2009). Também foram efetuadas leituras em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 600 nm, para determinação de transparência, conforme citado por Silva et al (2015). Foi identificada a massa final dos filmes, escolhendo-se para os testes aquela formulação que resultou em filme com melhores condições, tanto considerando o manuseio, quanto em relação aos resultados, identificados na tabela 1.

Os filmes também foram testados quanto à sua capacidade de intumescimento, a partir de método proposto por Bispo, Mansur & Mansur (2009), com adaptação que consiste na observação do percentual de aumento de massa do filme em tempos programados (0,5h, 1h, 3h, 5h, 8h, 12h e 24h) em 10 mL de água destilada em temperatura ambiente, utilizando-se soluções tampão padrão, para manutenção de pH neutro e pH levemente ácido, realizando-se a pesagem do filme após filtração e aplicando-se a equação GI = (Mi – Ms/Ms) x 100, onde GI corresponde ao grau de intumescimento (em %), Mi diz respeito à massa inicial do filme e Ms à Massa do filme após exposto à solução. Tais testes também foram realizados em triplicata.

4.4 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

As análises de foco microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Análises Microbiológicas (LAM) da Universidade Federal de Pernambuco, onde foram selecionadas para o estudo as três espécies bacterianas mais prevalentes nas infecções de feridas e com maiores impactos no desenvolvimento de morbimortalidade nas unidades de saúde, representadas por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (BARBOSA, et al, 2016).

Os testes partiram do método de microdiluição seriada em placas de 96 poços utilizando caldo Müeller-Hinton de modo a determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato seco de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul frente aos microrganismos, obtidos de cepas padrão do tipo ATCC. A incubação foi, para todos os testes, de 24 horas em estufa com temperatura de 37ºC, mantendo assim um ambiente favorável ao crescimento bacteriano. A observação de

crescimento ou de inibição ocorreu com a utilização do revelador resazurina 0,01%, indicador de viabilidade, cuja coloração rosa indica crescimento bacteriano ativo e, portanto, a não eficiência do composto em determinada concentração frente à cepa em teste. Tal reação ocorre devido a conversão da Resazurina (coloração azul) em Resorufina (coloração rosa) devido atividade mitocondrial (ALONSO et al, 2017).

A organização dos poços na placa foi realizada, de acordo com o descrito na figura 10, onde nas posições de A1, B1, C1 a A10, B10, C10 foram semeados 100 µL de suspensão bacteriana referentes a uma concentração de 1,5 x 10^7 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL em 100 µL de caldo Müeller-Hinton em conjunto com 100µL do extrato em diluição seriada partindo da concentração inicial de 1000 µg/mL. Nas posições de E1, F1 e G1 até E10, F10,G10, procedido da mesma forma, porém com o antimicrobiano gentamicina iniciando da concentração de 16 µg/mL estabelecendo-se sua diluição seriada a partir desta concentração, preconizada pelo CLSI. Nas colunas 11 e 12 foram dispostos um controle positivo (sem ativo contra as bactérias, onde se espera observar o crescimento bacteriano) e um controle de esterilidade do extrato sem inóculo bacteriano, respectivamente. E por fim, na linha H foi disposto um controle negativo, sem semeio bacteriano, de modo a indicar a esterilidade do meio em uso e evitar resultados falsos positivos.

Figura 10: Esquema do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

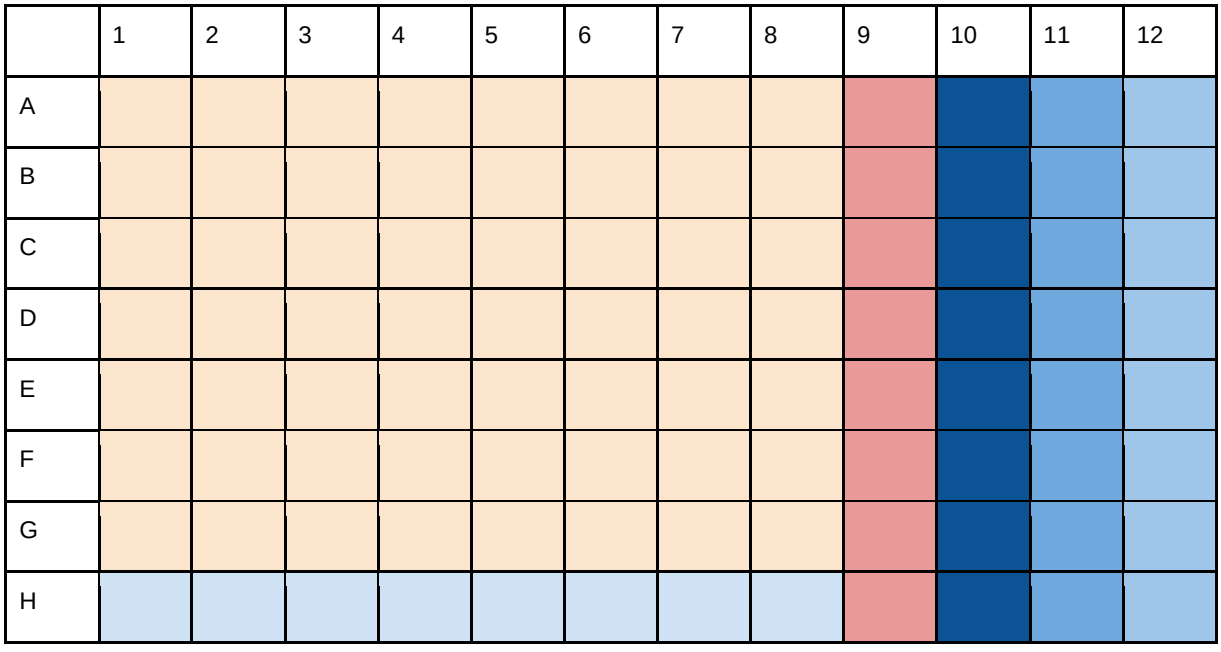
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Fonte: A autora (2021)

Para detecção de possível sinergismo da espécie vegetal abordada neste estudo com a gentamicina. O método de *Checkerboard*, seguiu conforme indicado por Silva et al (2020), utilizando uma combinação do ensaio de CIM tanto do extrato quanto do antibiótico. A determinação de sinergismo se dá através de cálculo da concentração inibitória fracionária (FIC), sendo considerados sinérgicos as combinações com um índice FIC ≤0,5, antagonistas FIC ≥4,0 e entre 4,0 e 1,0 indica indiferença e entre 1,0 e 0,5 interação aditiva.

O método de *Checkerboard* seguiu como indicado por Pansara et al (2019) com adaptações, com placa disposta conforme descrito na figura 11, onde foram realizadas as diluições seriadas do composto 1 (extrato) no sentido vertical (de A1/G1 a A8/G8) e do composto 2 (gentamicina) no sentido horizontal (de G1/A1 a G8/A8), promovendo assim uma combinação dos dois compostos ativos de modo a identificar se há atividade sinérgica. Nas colunas 9 e 10 foram realizados controle positivo e negativo, respectivamente. Já nas colunas 11 e 12 foram repetidas as concentrações do CIM de ambos os compostos participantes do teste como contraprova do ensaio anterior. O semeio ocorreu em caldo Müeller-Hinton, com semeio de suspensão bacteriana com concentração de 1,5 x 10^7 UFC/mL em estufa a 37ºC por 24 h. A revelação também foi realizada por exposição dos poços à resazurina 0,01%.

Figura 11: Esquema de ensaio de *checkerboard* (sinergismo)



Fonte: A autora (2021)

Os testes de atividade bacteriana também foram repetidos com os filmes incorporados, através de disposição do filme obtido em caldo Müeller-Hinton, realizando-se uma adaptação, utilizando tubos de ensaio com volume de 10 mL do meio de cultura com fragmentos do filme medindo 35x10 mm aderidos à parede do tubo. Desta forma, possibilitando identificar se houve liberação de compostos ativos no meio suficientes para gerar efeito inibitório. Todas as etapas foram realizadas em triplicata, com adaptação do filme para proporcionar concentração ideal para promoção da atividade antimicrobiana. Para verificação de comportamento da atividade microbiológica, caso identificada, foi realizado retro cultivo dos poços de modo a indicar se o extrato da espécie em estudo se comporta como bactericida (sem observação de crescimento bacteriano em retro cultivo) ou bacteriostático (com retorno do crescimento bacteriano quando expostas as cepas às condições ideais de crescimento).

4.5 CITOTOXICIDADE

Os ensaios referentes às análises de citotoxicidade foram realizados em conjunto com o Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz-Pernambuco. A toxicidade do extrato da espécie *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul, o Angico, foi avaliada em fibroblasto L929 e macrófago J774.A1 mantidos em cultura, pelo método do MTT, conforme citado por Bahuguna et al (2017). As células L929 e J774.A1 foram semeadas em microplacas de 96 poços na concentração de 1 x 10^5 células/mL em meio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*), respectivamente suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em atmosfera úmida a 5% de CO_2 por 24 h. Em seguida, foram tratadas com concentrações crescentes do extrato (7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125 e 250µg/mL).

Após 24 h de tratamento nas condições ambientais citadas acima, as células com e sem tratamento (controle) foram lavadas duas vezes com tampão HBSS e incubadas com DMEM ou RPMI contendo 0,5 mg/mL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) por 3h na ausência de luz. Para solubilizar os cristais de formazan formados, foram adicionados 100 µL da solução de isopropanol acidificado (HCl 0.04 N + isopropanol absoluto) e

quantificada a absorbância pelo GloMax® Multi Detection System (Promega Corporation, USA). A concentração do composto capaz de inibir em 50% a viabilidade das células (CC 50) foi estimada por regressão linear, utilizando o programa IBM SPSS Statics 25. Todos os testes foram realizados em triplicata e as análises estatísticas feitas com o Graphpad Prism 7.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DE EXTRATO E DOSEAMENTO DE METABÓLITOS DE INTERESSE

Após procedida a extração através de maceração adaptada, utilizando etanol 80% como solvente, o extrato bruto foi filtrado à vácuo e passou por processo de secagem com o auxílio de um evaporador rotativo, sob temperatura controlada de 40ºC. Foram utilizados 2 quilogramas de material vegetal, oriundo das cascas, que passou por trituração e padronização de partículas em tamises em granulometria de 20 mesh (1,2 mm). Obteve-se após secagem um conteúdo total de 27g de um pó de coloração marrom escura, característico da pigmentação da espécie em estudo, demonstrando, portanto, um rendimento de 1,3% (figura 12).

Figura 12: Extrato seco de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul

Fonte: A autora (2021)

O doseamento dos metabólitos secundários de interesse, taninos e flavonoides, que estão associados a usos populares no tratamento de feridas, assim como no processo inflamatório e antioxidante de modo geral (CABRAL, 2014), identificou concentrações de 316,15 ± 4,83 mg EAT/g de fenóis totais, sendo 184,33 ± 5,51 mg EAT/g referentes à concentração de taninos. Já os flavonoides representaram 23,89 ± 2,57 mg ER/g, valores que corroboram com o demonstrado

por Castro (2011), Cabral (2014) e Aires (2017), verificando-se valores levemente superiores, o que pode ser explicado pelo período de estiagem, já que como indicado por Monteiro et al (2006) e Corrêa (2018), a produção de metabólitos pode se tornar proporcional ao aumento das condições adversas impostas pelo ambiente, de modo a conferir propósito defensor e de sobrevivência, de modo geral.

Destaca-se ainda, com os resultados obtidos, o potencial da espécie para fins antimicrobiano e cicatrizante (suas aplicações na medicina popular), considerando a sua concentração de taninos, o que reforça o mencionado por estudos anteriores na área de produtos naturais relacionados às espécies da caatinga com foco em produção de taninos e suas aplicações, como Paes et al (2013) e Anselmo et al (2020). Inclusive a espécie possui um alto valor de uso para as comunidades que a utilizam, estando entre as dez espécies com maior conteúdo tânico dentre as endêmicas na região que compreende a Caatinga, possibilitando seu uso inclusive para outros fins, como o curtimento de couro, útil para fins comerciais, mas também ligado ao fator cultural, no auxílio da produção artesanal, componente de bastante influência em toda a região nordeste (ARAÚJO, 2008).

5.2 FORMULAÇÕES DE FILMES À BASE DE QUITOSANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE *CASTING*

Para composição dos filmes de quitosana incorporados com extrato bruto da espécie *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul, utilizou-se a técnica de *casting,* que consiste em produção de solução filmogênica, com posterior secagem de solvente. Para tanto, foi utilizada uma combinação de solvente, agente plastificante, biopolímero e extrato. O solvente empregado nas soluções filmogênicas foi o ácido lático a 1% p/V, escolhido devido a sua alta viscosidade, biodegradabilidade e baixa volatilidade, conferindo menor ocorrência de perdas, durante o processo de agitação, considerando o tempo necessário para a completa dissolução de todos os componentes da formulação, em torno de 48h no total.

Foram realizadas variações das concentrações de ácido lático, considerando sua aplicação conforme mencionado na literatura em uma faixa de 1 a 5% e também do agente plastificante, a glicerina com faixa entre 15% e 25%, e do biopolímero, a quitosana, com concentração entre 5 mg/mL e 20 mg/mL pretendendo obter um filme

de fácil manuseio e visualmente estável, além disso ainda foram considerados volume de solução filmogênica em cada placa de 30 a 45 mL.

Figura 13: Soluções filmogênicas para técnica de *casting*

Fonte: A autora (2021)

A partir das modificações, foi possível identificar melhora na estabilidade visual do filme, assim como na sua manipulação após secagem, elegendo-se formulação que compreende quitosana 10 mg/mL dissolvida em ácido lático 1%, este último atuando como solvente, visto que a característica catiônica da quitosana dificulta sua solubilização em água, além de haver a possibilidade de formação de géis quando em ausência de um agente plastificante. As formulações testadas estão descritas na tabela 1, que indica que o fator volume foi preponderante para formar filmes de melhor manuseio, assim como a proporção considerando agente plastificante e polímero na obtenção na forma de filme e não em forma gelatinosa.

Tabela 1 - Formulações testadas para obtenção do filme de quitosana

TESTE	SOL. ÁC. LÁTICO (v/v)	QUITOSANA (m/v)	GLICERINA (m/m)	VOLUME (mL/Placa)	CARACTERÍSTICAS
1	1%	5 mg/mL	15%	30	Filme com aspecto homogêneo, sem formação/depósito de grânulos, porém de difícil remoção da placa, causando quebras no manuseio.
2	1%	10 mg/mL	20%	40	Filme maleável, de fácil remoção, com aspecto plastificado, com pouca ou nenhuma adesividade observada, observação de acúmulo de grânulos no centro da placa.
3	1%	20 mg/mL	25%	45	Filme maleável, de fácil remoção, porém com alta formação de grânulos e nenhuma adesividade observada.
4	1%	5 mg/mL	15%	45	Filme maleável, de fácil remoção, porém com alta formação de grânulos e nenhuma adesividade observada.
5	1%	10 mg/mL	20%	30	Filme com aspecto homogêneo, sem formação/depósito de grânulos, porém de difícil remoção da placa, causando quebras no manuseio.
6	1%	20 mg/mL	25%	40	Filme maleável, de fácil remoção, com aspecto plastificado, com pouca ou nenhuma adesividade observada, observação de acúmulo de grânulos no centro da placa.
7	1%	5 mg/mL	15%	40	Filme maleável, de fácil remoção, com aspecto plastificado, com pouca ou nenhuma adesividade observada, observação de acúmulo de grânulos no centro da placa.
8	1%	10 mg/mL	20%	45	Filme maleável, de fácil remoção, porém com alta formação de grânulos e nenhuma adesividade observada.
9	1%	20 mg/mL	25%	30	Filme com aspecto homogêneo, sem formação/depósito de grânulos, porém de difícil remoção da placa, causando quebras no manuseio.
10	1%	10 mg/mL	25%	38	Filme maleável, com aparente adesividade, pouca ou nenhuma apresentação de grumos, de fácil remoção da placa e manuseio para seguimento dos testes necessários.
11	3%	5 mg/mL	15%	30	Filme de aspecto homogêneo, porém apresentando-se quebradiço.
12	3%	10 mg/mL	20%	40	Filme de aspecto homogêneo, porém consistência entre filme e gelatinoso, dificultando a remoção da placa por igual.
13	3%	20 mg/mL	25%	45	Filmes com aspecto gelatinoso e apresentação de grumos.
14	3%	5 mg/mL	15%	45	Filmes com aspecto gelatinoso e apresentação de grumos.
15	3%	10 mg/mL	20%	30	Filme com aspecto homogêneo, sem formação/depósito de grânulos, porém de

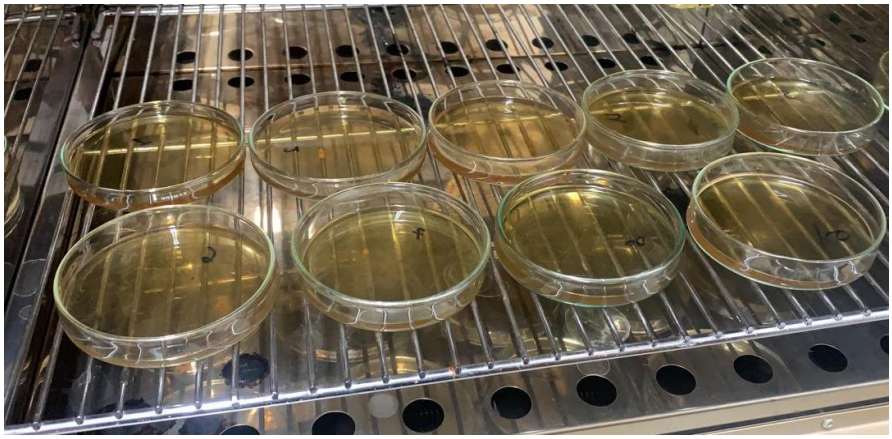
					difícil remoção da placa, causando quebras no manuseio.
16	3%	20 mg/mL	25%	40	Filme de aspecto homogêneo, porém consistência entre filme e gelatinoso, dificultando a remoção da placa por igual.
17	3%	5 mg/mL	15%	40	Filme de aspecto homogêneo, porém consistência entre filme e gelatinoso, dificultando a remoção da placa por igual.
18	3%	10 mg/mL	20%	45	Filme de aspecto homogêneo, porém consistência entre filme e gelatinoso, dificultando a remoção da placa por igual.
19	3%	20 mg/mL	25%	30	Filme com aspecto homogêneo, sem formação/depósito de grânulos, porém de difícil remoção da placa, causando quebras no manuseio.
20	3%	10 mg/mL	25%	38	Filme de aspecto homogêneo, porém consistência entre filme e gelatinoso, dificultando a remoção da placa por igual.
21	5%	5 mg/mL	15%	30	Filme com aspecto homogêneo, porém com consistência gelatinosa, inviabilizando seu manuseio.
22	5%	10 mg/mL	20%	40	Filme com aspecto homogêneo, porém com consistência gelatinosa, inviabilizando seu manuseio.
23	5%	20 mg/mL	25%	45	Filme com aspecto gelatinoso e apresentação de grumos.
24	5%	5 mg/mL	15%	45	Filme com aspecto gelatinoso e apresentação de grumos.
25	5%	10 mg/mL	20%	30	Filme com aspecto homogêneo, porém com consistência gelatinosa, inviabilizando seu manuseio.
26	5%	20 mg/mL	25%	40	Filme com aspecto homogêneo, porém com consistência gelatinosa, inviabilizando seu manuseio.
27	5%	5 mg/Ml	15%	40	Filme com aspecto homogêneo, porém com consistência gelatinosa, inviabilizando seu manuseio.
28	5%	10 mg/mL	20%	45	Filme com aspecto gelatinoso e apresentação de grumos.
29	5%	20 mg/Ml	25%	30	Filme com aspecto homogêneo, porém com consistência gelatinosa, inviabilizando seu manuseio.
30	5%	10 mg/Ml	25%	38	Filme com aspecto homogêneo, porém com consistência gelatinosa, inviabilizando seu manuseio.

Fonte: A autora (2021)

No caso deste estudo, foi optado pelo uso da glicerina em concentração de 25% e volume final de 38 mL distribuídos em placas de Petri de 90 mm para secagem, o que conferiu ao filme aspecto firme, de fácil manuseio e potencial adesividade. Sendo a formulação de escolha, a de número 10 descrita na tabela 1. As demais formulações não foram consideradas para os testes posteriores, pois resultaram em filmes quebradiços, de difícil manuseio e pouca ou nenhuma plasticidade e

adesividade, dificultando até mesmo a realização das análises básicas. Tendo sido formuladas inicialmente para identificar se as alterações trariam algum benefício em detrimento da formulação de escolha, o que não ocorreu.

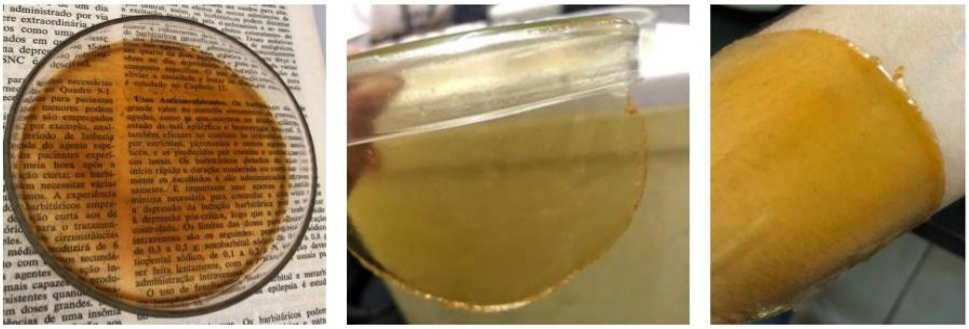
Figura 14: Método de *casting* com secagem de solvente em estufa



Fonte: A autora (2021)

As soluções filmogênicas foram agitadas em agitador magnético por 24 h até a não visualização de partículas suspensas ou sobrenadantes, em seguida incorporado extrato bruto em concentração de 4 mg/mL e 2 mg/mL. A primeira concentração foi realizada para manter concentração maior em filme a ser recortado para os ensaios microbiológicos, de modo a não incorrer em resultado falso negativo quando empregado às culturas bacterianas. Ao realizar a incorporação do extrato, nova agitação foi procedida por mais 24 h, seguida de secagem em estufa a 40ºC por igual período até observação de formação de filme, com peso médio de 0,88 g ± 0,3, espessura de 0,078 mm ± 0,04 e transparência de 88% ± 1,2 (figura 15).

Figura 15 - Características visuais de filme à base de quitosana incorporado com extrato seco de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul (Angico)

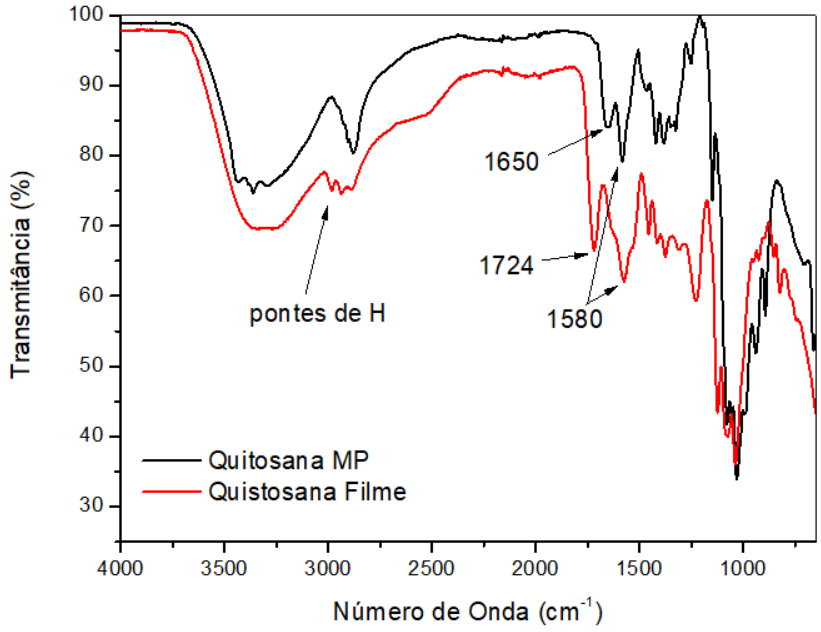


Fonte: A autora (2021)

Para auxiliar na caracterização do material e identificar seus principais parâmetros químicos e possíveis alterações sofridas no processo de formulação do produto final, utilizou-se técnica de espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), devido não interferir na amostra, promovendo resultado de forma rápida e não destrutiva (SOUZA et al, 2018). A técnica consiste na detecção por infravermelho da vibração característica de grupos funcionais conhecidos, sendo a intensidade relacionada a informações quantitativas e as frequências de ocorrência desses grupos a critérios qualitativos sobre a amostra (CARVALHO, 2013).

Ao observar o espectro de FT-IR (figura 16), realizado a partir de espectrofotômetro Perkin Elmer 400, foi possível identificar bandas características de grupos funcionais presentes na quitosana, enquanto material, o que confirma o abordado por Bispo, Mansur & Mansur (2009) e Tanganini (2019), identificando grupamentos amina em 1650, C=C em 1580 e C=O em 1724, onde observa-se a formação de pontes de hidrogênio quando avaliado o espectro da formulação em comparação com a quitosana em pó, relacionada possivelmente à quebra de cadeias devido a presença de água residual no produto finalizado.

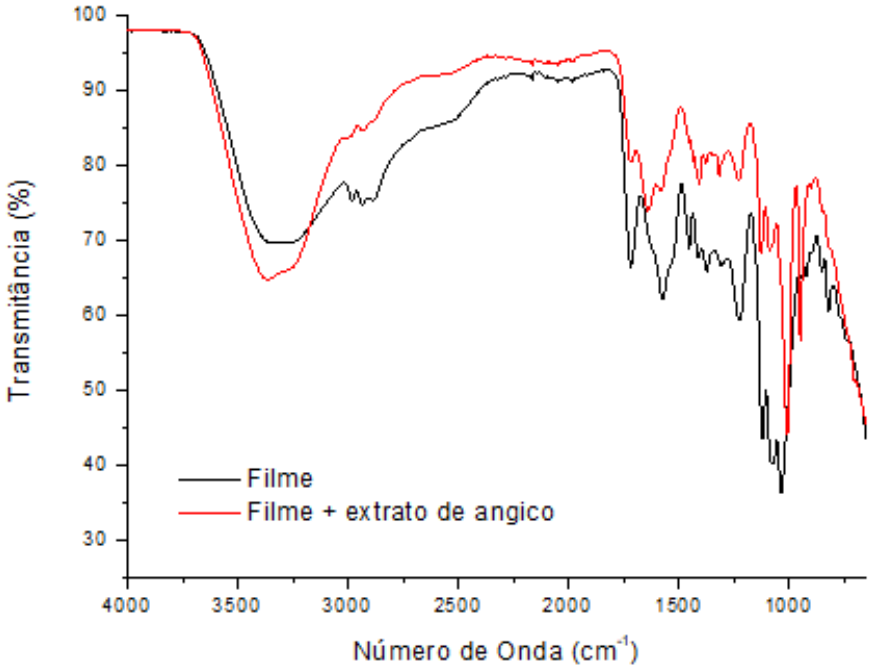
Figura 16: FT-IR de Quitosana em comparação com formulação



Fonte: A autora (2021)

Quanto à incorporação do extrato, realizada com concentração de 2 mg/mL, infere-se que a interação foi do tipo física, isto é, não promoveu alterações químicas na estrutura do biopolímero, considerando a manutenção de seu perfil após a obtenção do filme (figura 17). O espectro referente ao extrato bruto da espécie em estudo, o angico, por sua vez, não foi possível de ser visualizado quando incorporado ao filme, o que pode estar associado ao fato de a concentração final não ser detectável pelo aparelho utilizado, porém a sua presença se confirma pela manutenção do efeito antimicrobiano a ser discutido na seção seguinte.

Figura 17: FT-IR de formulações de filme base e filme com o extrato incorporado

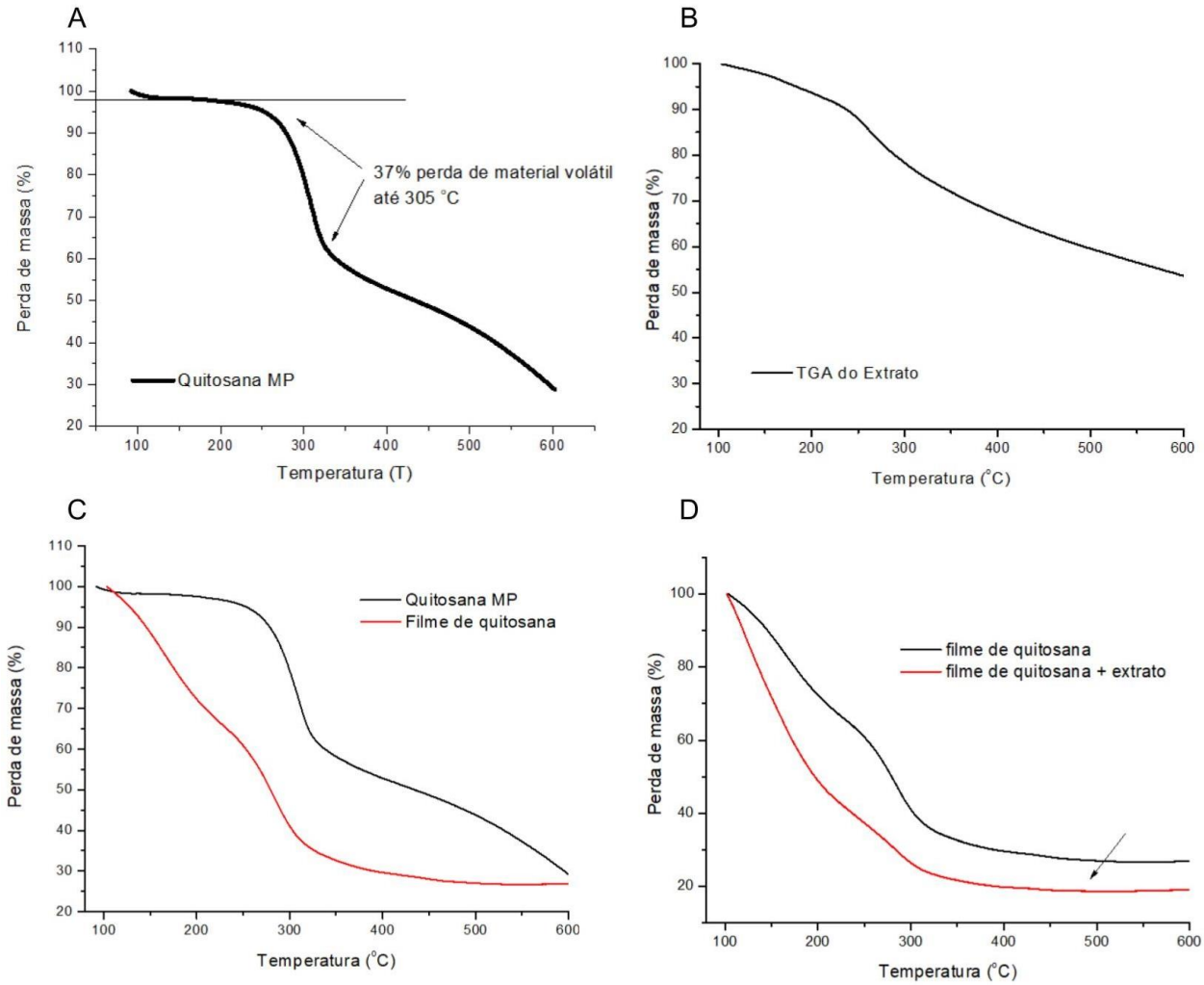


Fonte: A autora (2021)

Para caracterização térmica foi utilizada técnica de termogravimetria, com emprego de termobalança Shimadzu®, modelo DTG 60H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min-1. Foram utilizadas amostras com massa em torno de 400µg em cadinho de alumina e realizadas aferições do extrato seco da espécie em estudo, do filme de quitosana não incorporado, do filme de quitosana com o extrato incorporado e da quitosana em pó, os dados termoanalíticos foram analisados por meio do *software* TA-60WS® (Thermal Analysis) versão 2.20 da Shimadzu®.

A partir das análises das curvas de termogravimetria (figura 18) foi possível identificar a perda de massa contínua no filme de quitosana, referente a 63%, entre 100ºC e 300ºC. Entretanto quando avaliado o filme incorporado com o extrato seco de angico, identifica-se uma perda de 72% entre 100ºC e 400ºC, também de forma contínua, o que indica que o produto precisa ser mantido em um controle de temperatura dentro destes parâmetros para evitar degradações e, portanto, perdas em sua qualidade e ação. Estes resultados corroboram com o estudo realizado por Brianezi (2016).

Figura 18: Termogravimetria de materiais e formulações



(A)TGA da quitosana matéria-prima, (B) TGA do extrato seco de angico, (C) Comparação de TGA da quitosana matéria-prima e do filme de quitosana. (D) Comparação de TGA de filme de quitosana e filme incorporado com extrato seco de angico. Fonte: A autora (2021).

O aumento na degradação pós incorporação pode estar associado a uma maior concentração de componentes voláteis na composição final do filme, considerando o uso de extrato bruto da espécie em estudo. Além disso, conta-se com a participação ainda, da degradação de grupos funcionais que tem início através da “quebra de ligações glicosídicas, seguida da decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do polímero” conforme citado por Fráguas et al (2015).

As curvas de degradação, de modo geral, apresentaram para visualização, evento único de degradação, visto que, ocorrem dois eventos principais, sendo o primeiro evento referente à perda de água, o que não foi reportado devido registro de temperatura inicial em 100ºC. A partir disso iniciou-se a perda devido à despolimerização e decomposição da estrutura do polímero em conjunto com a degradação de grupos funcionais presentes nos metabólitos secundários ocorrentes no extrato incorporado (PEREIRA et al, 2021).

O extrato bruto seco da espécie em estudo foi testado com possibilidade de incorporação em concentrações de até 4 mg/mL, considerando solução filmogênica de 100 mL (Solução mãe para disposição posterior em placas de Petri). Acima dessa concentração necessitaria de concentrações superiores de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização inicial, o que poderia comprometer a viabilidade das células bacterianas, podendo gerar resultados falsos positivos para inibição. Sendo assim, o presente estudo optou por utilizar a menor concentração possível deste agente solubilizante, não superando 10%, evitando assim, erros de interpretação de resultados (FARIAS et al, 2018).

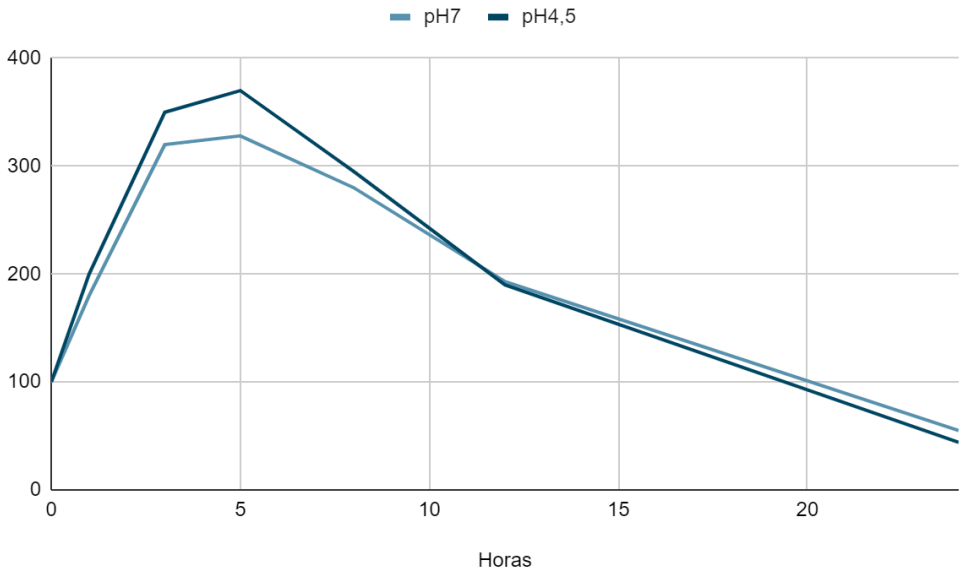
Um dos grandes desafios na formulação de estratégias voltadas ao tratamento de feridas é o controle do exsudato, que faz parte do processo inflamatório e auxilia na distribuição de proteínas e células na recuperação da lesão. Entretanto, considerando que feridas crônicas, de grandes proporções e de difícil reparo, caso contenham alta taxa de exsudação podem incorrer em favorecimento de contaminações e infecções por microrganismos oportunistas devido à umidificação excessiva do curativo (GENEVRO, 2017). Por este motivo foi investigado o perfil de intumescimento dos filmes produzidos, de modo a identificar seu comportamento caso utilizados em recuperação de feridas com este perfil.

Como indicado na figura 19, observou-se um aumento de massa por intumescimento de quase 4 vezes o peso inicial do filme nas 3 primeiras horas, com

uma capacidade maior em pH ácido (4,5). Tal resultado se deve ao caráter químico da quitosana, que possui vários grupos amina que, em meio ácido, se dispõem em sua forma protonada, fazendo com que aumente a solvatação na molécula e as ligações com os grupamentos hidrofílicos ocorram, principalmente as do tipo ponte de hidrogênio e íon-dipolo com a água (GABRIEL, 2017).

Após a terceira hora, observa-se em ambas as soluções, uma estabilização no material no que tange à esta característica, chegando ao máximo de intumescimento, seguindo logo em seguida do declínio da massa do filme que passa a se solubilizar quase completamente. Em contato com a água, o filme transforma-se em um gel filme de fácil remoção, o que pode o caracterizar como um candidato promissor ao tratamento de feridas, considerando a possibilidade de fácil aplicação, quando em forma de filme, com posterior controle de exsudação excessiva e fácil remoção com potencial baixo para o desenvolvimento de novas lesões por intervenção no tecido neoformado.

Figura 19: Grau de intumescimento (%)



Fonte: A autora (2021)

5.3 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

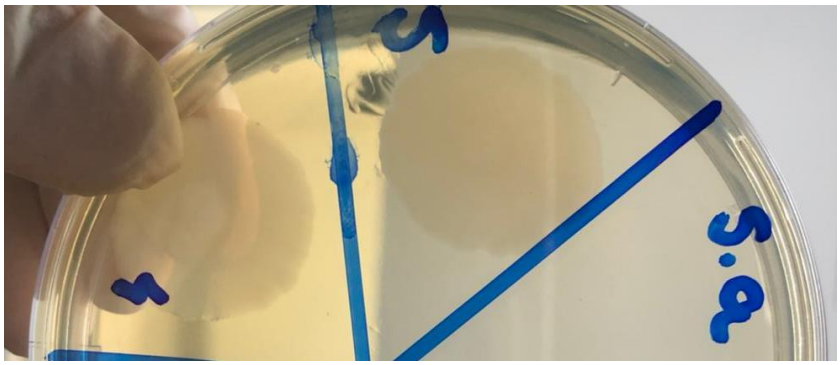
Para determinação de atividade antimicrobiana do extrato da espécie em estudo, foram realizados testes em duas etapas, sendo a primeira referente à identificação da Concentração Inibitória Mínima, ou seja, da menor concentração

capaz de inibir o crescimento bacteriano. A segunda etapa diz respeito a experimento em “tabuleiro de xadrez” (*Checkerboard*), para investigação se a espécie pode oferecer atividade sinérgica, antagonista ou aditiva ao efeito de antimicrobiano já utilizado na prática clínica em afecções cutâneas, a gentamicina, um aminoglicosídeo de amplo espectro de ação, presente em formas farmacêuticas semi sólidas.

O ensaio de CIM utilizou 3 cepas ATCC dos três principais patógenos associados às infecções de feridas: *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, microrganismos que estão também associados ao desenvolvimento de infecções graves, sobretudo no ambiente hospitalar, levando a quadros de pneumonia nosocomial, meningites, endocardite e septicemia (SIMÕES, 2016).

Os resultados obtidos corroboram com os estudos publicados por Araújo et al (2014), Araújo et al (2017) e Pereira et al (2018), onde foi identificada ação bacteriostática sobre cepas padrão de *Staphylococcus aureus,* principal patógeno associado às desordens de foco cutâneo com característica oportunista, sobretudo a pacientes imunocomprometidos (O’GARA, 2017). Para a determinação de atividade bactericida ou bacteriostática foi realizado o retro cultivo do conteúdo dos poços onde foi identificado a inibição em ágar Müeller-Hinton a 37ºC e observado após 24h e 48h, onde houve novamente crescimento das cepas, indicando, portanto, caráter bacteriostático, conforme indicado na figura 20.

Figura 20: Retro cultivo de *Staphylococcus aureus* para determinação de ação bactericida ou bacteriostática

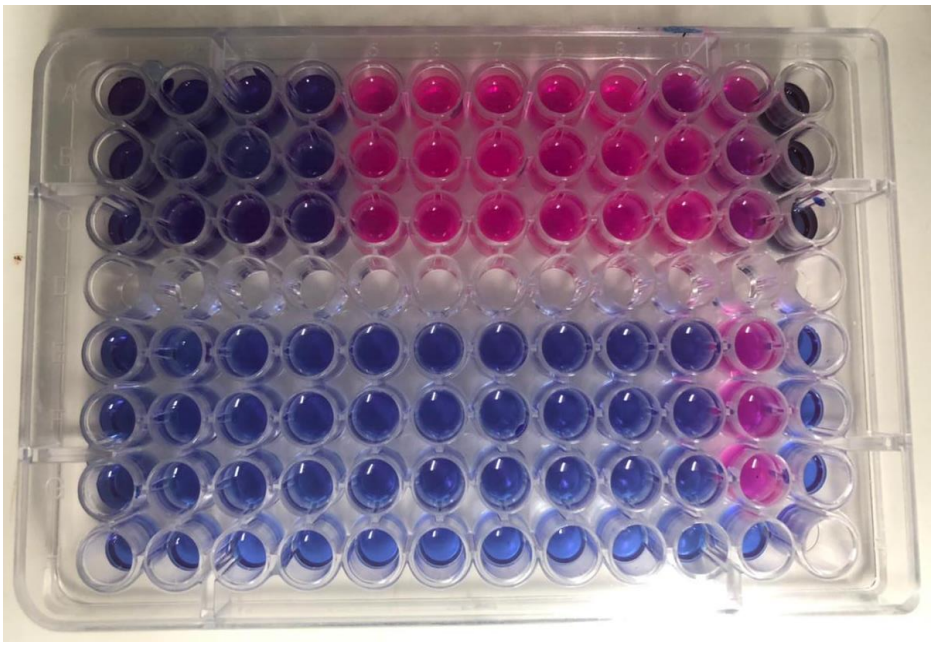


Fonte: A autora (2021)

O extrato apresentou CIM sobre a cepa padrão da espécie *Staphylococcus aureus,* correspondente a 125µg/mL, resultados também observados por Palmeira et

al (2010), Colacite (2015) e Silva (2020), que indentificaram em concentrações maiores, atividade também contra cepas resistentes a multidrogas. Para as demais espécies não foi observada atividade inibitória, entretanto, as mesmas seguiram para segunda etapa para identificação de possível sinergismo com o antimicrobiano gentamicina, o qual também foi realizado ensaio de CIM partindo da concentração preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 16µg/mL.

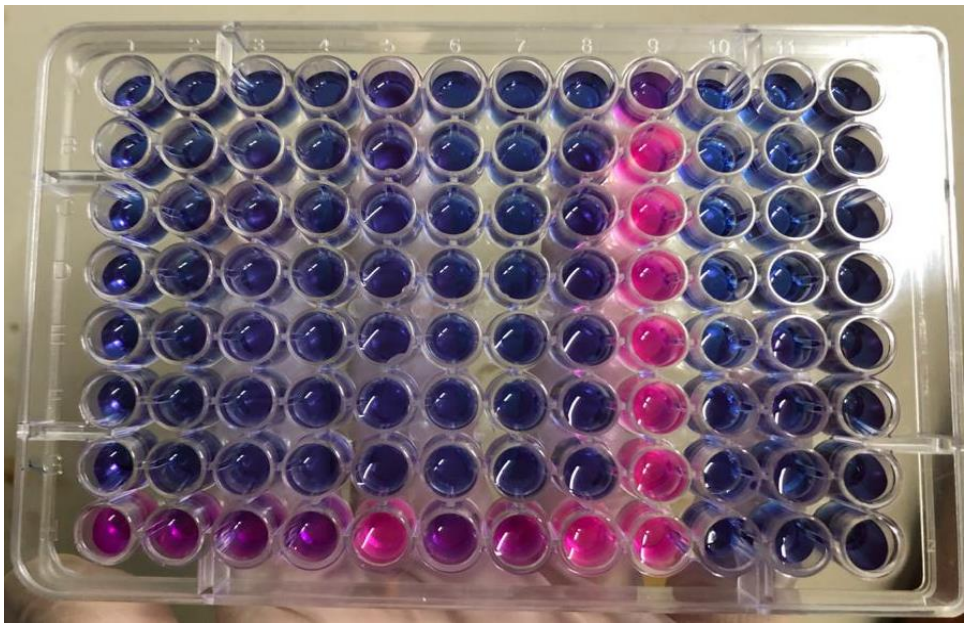
Figura 21: Ensaio de Concentração inibitória mínima (*Staphylococcus aureus*)



Fonte: A autora (2021)

Ao realizar o teste de sinergismo, ensaio de tabuleiro de xadrez, ou *Checkerboard assay,* caso identificada ação sinérgica ou aditiva, os filmes poderiam ser formulados com combinação dos agentes de modo a fornecer uma ação melhorada sobre estes microrganismos que oferecem prejuízos diversos no que se refere a atenção em saúde, considerando o grande desafio associado à resistência bacteriana. Entretanto, o resultado infere que o extrato não se comporta de forma sinérgica com o antimicrobiano em teste sobre nenhuma das cepas utilizadas, sendo, portanto, considerado, nesta aplicação em específico, de efeito indiferente, conforme indica a figura 22. Não excluindo a possibilidade de haver, com o uso do extrato em questão, possibilidade de sinergismo com outros antimicrobianos e até mesmo com outros extratos vegetais, conforme indicado por Amorim et al (2020).

Figura 22: Ensaio de *Checkerboard* (determinação de sinergismo)

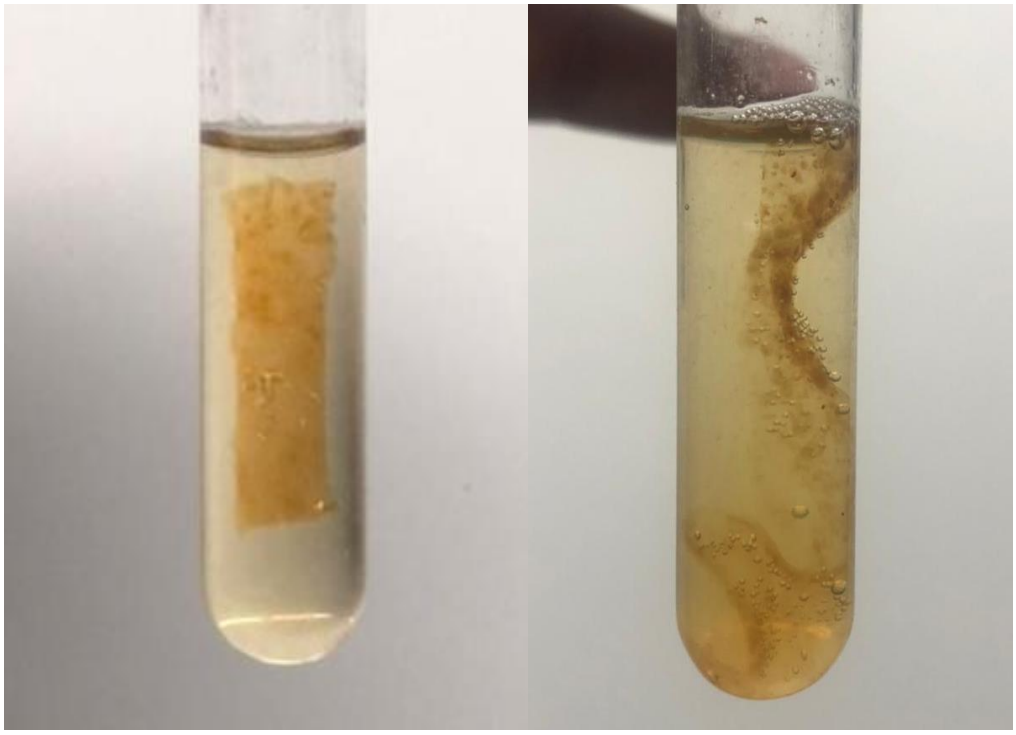


Fonte: A autora (2021)

Deste modo, a formulação dos filmes ocorreu com incorporação do extrato bruto e com teste microbiológico posterior adaptado, para identificação de liberação de conteúdo ativo sobre as cepas de *Staphylococcus aureus,* considerando que não houve resultado inibitório frente às demais espécies testadas, utilizando como meio de cultura o caldo Müeller-Hinton em tubos de ensaio com volume correspondente a 10 mL, fixando-se recortes de 35x10 mm dos filmes à parede do tubo, e posteriormente realizando o semeio e incubação bacteriana referente à 0,5 na escala de McFarland.

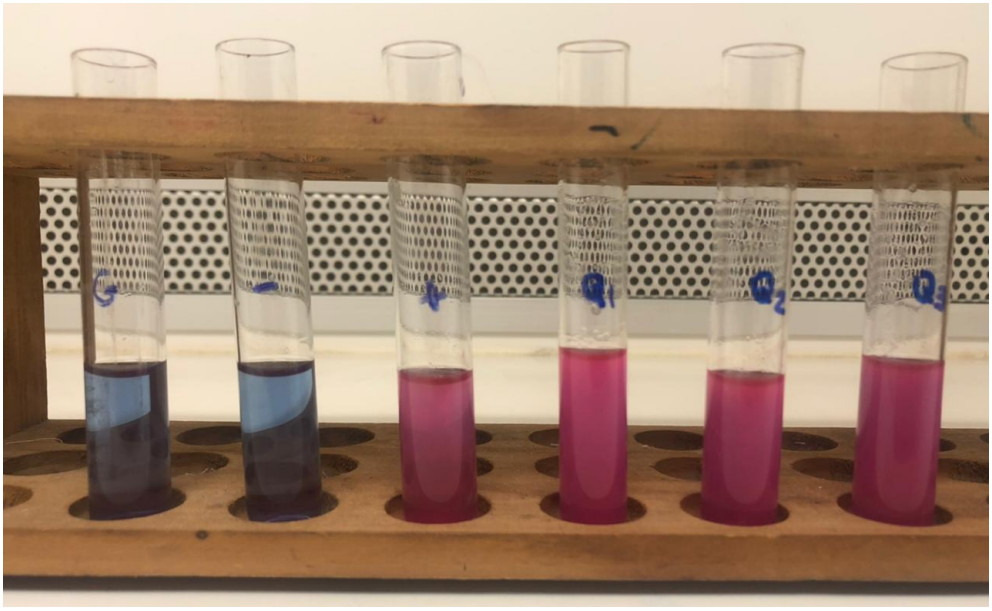
O teste ocorreu com filmes incorporados e não incorporados e os resultados podem ser visualizado nas figuras 23, 24 e 25 onde é possível identificar o intumescimento do filme quando em solução (figura 23), identificar também que os filmes sem extrato incorporado não apresentam atividade inibitória (figura 24), indicado pela coloração rosa da conversão da resazurina em resorufina pela atividade mitocondrial bacteriana, enquanto que os filmes com incorporação do extrato da espécie em estudo apresentaram atividade antimicrobiana satisfatória (figura 25).

Figura 23: Intumescimento de filme à base de quitosana incorporado com extrato seco de *Anadenanthera colubrina*



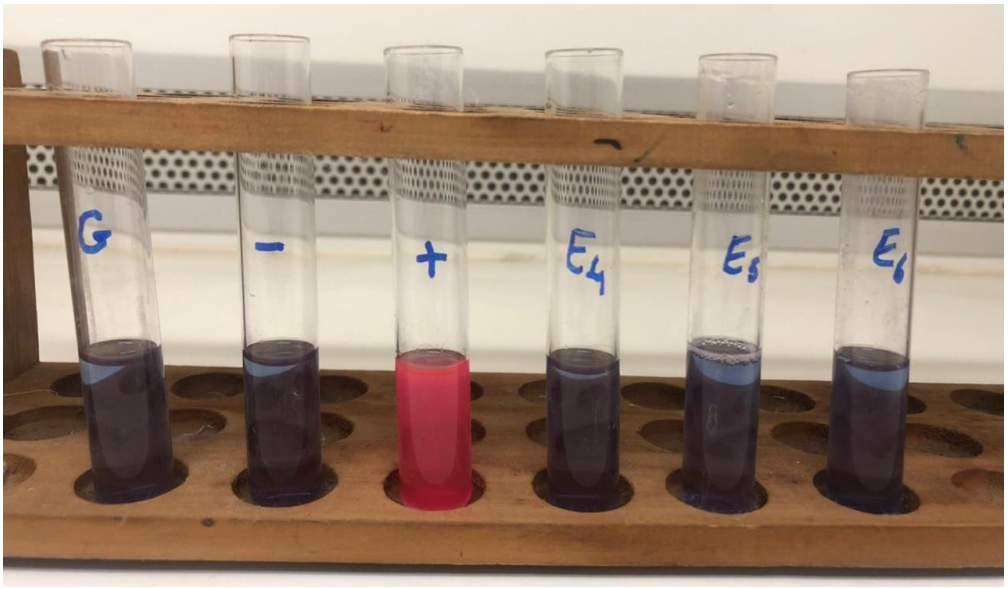
Fonte: A autora (2021)

Figura 24: Ensaio de diluição em caldo para determinação de efeito antimicrobiano de filme à base de quitosana



Fonte: A autora (2021)

Figura 25: Ensaio de diluição em caldo para determinação de efeito antimicrobiano de filme à base de quitosana incorporado com extrato seco de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul (Angico)



Fonte: A autora (2021)

De modo a contribuir com a confirmação do resultado, foi realizado em conjunto, um ensaio de atividade em difusão em ágar (figura 26), utilizando em triplicata em meio ágar Müeller-Hinton, um comparativo na produção de halos de inibição do filme de quitosana e do filme de quitosana incorporado com o extrato bruto seco de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul, frente à cepa padrão de *Staphylococcus aureus.* O teste resultou em halos de 17 mm ± 2, o que corrobora com o estudo realizado por Palmeira et al (2010) com leve melhora, o pode ter contribuição da quitosana em sua formulação, visto que o biopolímero tem pode interferir no crescimento bacteriano por mecanismo de imobilização e fixação, conforme indicado por Azevedo et al (2007), o que faz desse biopolímero um promissor candidato à formulação de curativos, *patches*, adesivos e recobrimento de próteses para garantir profilaxia a infecções, além de sua característica hemostática.

Figura 26 - Ensaio de difusão em ágar com filme à base de quitosana incorporado com extrato seco de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul

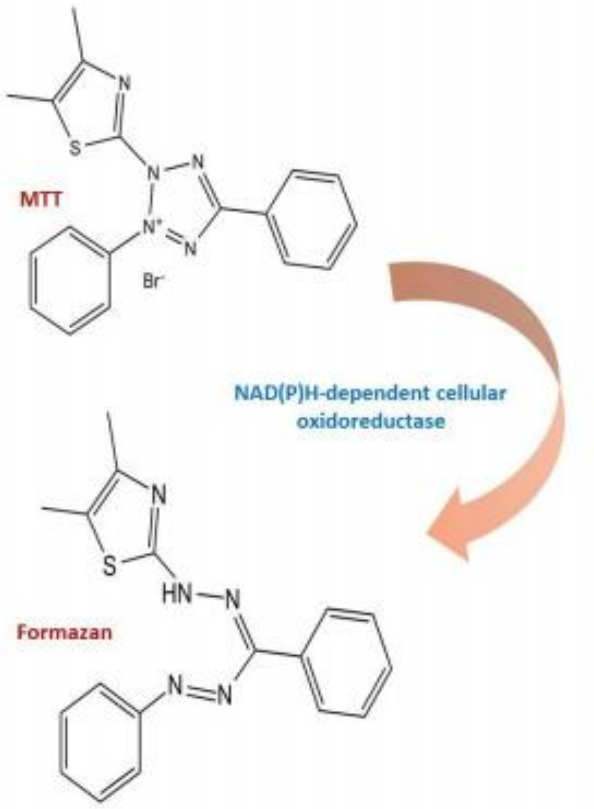
Fonte: A autora (2021)

5.4 CITOTOXICIDADE

O teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), foi escolhido para identificação de potencial de toxicidade da espécie abordada, método que possibilita indicar a segurança no uso de alternativas aplicadas à saúde, seja de origem vegetal ou sintética. O princípio do método se baseia na redução do reagente azul de tetrazólio em trifenil formazan de coloração rosa (figura 27), reação procedida pela atividade mitocondrial, ou seja, indicando a viabilidade celular (BAHUGUNA et al, 2017). Teste realizado em placas de 96 poços com duas linhagens de células: fibroblasto L929 e macrófago J774.A1.

A escolha das linhagens celulares se deve ao fato de estarem associadas diretamente ao processo de recuperação de lesões, de modo geral, nas feridas, inclusive. Sendo os macrófagos indispensáveis ao longo de toda a fase inflamatória, fase primordial para a definição da evolução do paciente, visto que sua interrupção ou prolongamento pode ativar mecanismos de geração de feridas crônicas ou promover cicatrização retardada com reparo impróprio (SILVA et al, 2019). Já os fibroblastos participam ativamente do processo de cicatrização, sendo responsáveis pela produção e degradação do colágeno, que por sua vez favorece a sustentação do tecido durante todo o processo até a completa recuperação (TAZIMA et al, 2008).

Figura 27: Ensaio de MTT (Citotoxicidade)



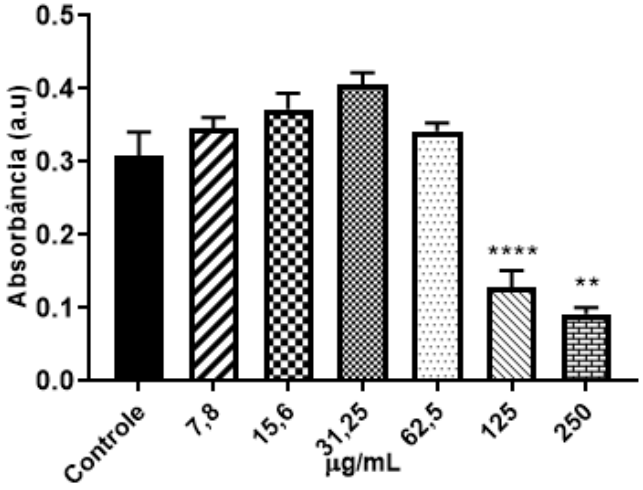
Fonte: BAHUGUNA et al (2017)

Estudos prévios sobre toxicidade da espécie utilizando outros métodos indicaram parâmetros ainda sem maiores elucidações, onde através de técnica de toxicidade sobre *Artemia salina*, Weber (2011) e Silva; Aguiar & Freitas (2020) identificaram alta toxicidade ao crustáceo, o que fez com que a espécie fosse vista como inviável para aplicação à saúde. Enquanto Pereira (2012) e Silva (2020), não identificam toxicidade mesmo em concentrações maiores, a partir de técnica que visualiza reação hemolítica por parte do composto teste, o que demonstra a necessidade de ensaios de toxicidade com maior abrangência para garantir a completa segurança no uso da espécie.

Os resultados do ensaio de MTT realizado estão dispostos nas figuras 28 e 29, onde foram identificadas as concentrações necessárias para causar morte de 50% da população de células utilizadas (concentração de 1 x 10^5 células/mL), sendo observado para as linhagens de Macrófagos J774.A1 uma DL_{50} correspondente a 141,42 µg/mL ± 0,2 e para as linhagens de Fibroblastos L929, 175,84 µg/mL ± 4,8. Concentrações significativamente baixas em comparação com estudos realizados a

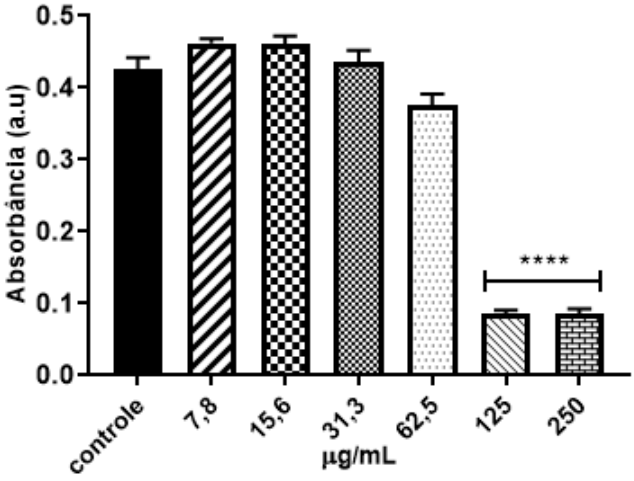
partir da técnica da *Artemia salina*, que consiste em expor este tipo de crustáceo de alta sensibilidade a concentrações crescentes de compostos em testes, avaliando sua viabilidade. Resultados semelhantes foram obtidos por Lima (2018), que demonstrou a não toxicidade abaixo de 250 µg/mL através do mesmo método sobre células humanas normais e tumorais, resultados ainda menores foram demonstrados por Ribeiro (2020) ao utilizarem polissacarídeos advindos da mesma espécie sobre linhagens L929, onde não houve citotoxicidade considerável.

Figura 28: Ensaio de toxicidade (MTT) Fibroblastos L929



Fonte: A autora (2021)

Figura 29: Ensaio de toxicidade (MTT) Macrófagos J774.A1



Fonte: A autora (2021)

Observa-se um ligeiro crescimento celular, em ambas as linhagens, em relação ao grupo controle quando utilizadas concentrações menores do extrato, a partir de 7,8µg/mL. Tal atividade pode estar relacionada com a resposta mitocondrial das células ao serem expostas ao stress, assim como ser referente à ocorrência de ativação e recrutamento celular, já que segundo Moretão et al (2003), componentes extraídos do Angico, espécie em estudo, demonstraram capacidade de ativação, sobretudo de macrófagos, podendo ser útil no processo de fagocitose, com aumento de atividade de acordo com a dose utilizada. Informações que contribuem com o estudo realizado por Moreira (2017), que tanto em linhagens celulares, quanto em ensaio *in vivo* indicou ativação celular e também modulação de marcadores inflamatórios como óxido nítrico e interleucinas utilizando extrato da mesma espécie.

6 CONCLUSÃO

A aplicação de biopolímeros em conjunto com ativos, sejam eles naturais ou sintéticos, constitui em uma promissora alternativa para o tratamento de diversas desordens, sobretudo quando nos remetemos ao tratamento de lesões cutâneas, sejam elas de quaisquer níveis de complexidade, levando em consideração a morbimortalidade associada à esta questão, assim como o comprometimento social dos pacientes que sofrem com estas injúrias, além do componente econômico, visto que o sistema de saúde brasileiro como um todo, demanda a maximização da eficiência na aplicação de recursos. Sendo assim, investindo em alternativas eficientes e de baixo custo, pode-se contribuir para alcançar este objetivo.

A quitosana, sendo um biopolímero de aquisição a partir de fontes renováveis pode se configurar, portanto como uma excelente alternativa, visto que a partir dos resultados observados, foi possível formular um filme de fácil manipulação, com alta capacidade de intumescimento, o que confere uma boa aplicabilidade para controle da exsudação a depender do nível identificado. Em conjunto com o extrato da espécie em estudo, o angico, possui aplicação bastante específica, sendo útil no tratamento de feridas infectadas por *Staphylococcus aureus*, patógeno mais comum nessas desordens, devido fazer parte da microbiota da pele e agir como microrganismo oportunista.

O produto formulado, cuja melhor apresentação testada compreende a utilização de quitosana em concentração de 10 mg/mL, responsável por manter a matriz do filme, ácido lático a 1% (agente solubilizante, que facilita a dissolução da quitosana no meio), glicerina 25% e solução filmogênica resultante com volume por placa de Petri 90 mm de 38 mL. Fazendo parte da formulação o conteúdo ativo, representado pelo extrato bruto da espécie *Anadenanthera colubrina* (angico) em concentração de 2 mg/mL.

Dentre as vantagens do produto formulado, pode-se destacar a comprovada liberação do ativo em teste em meio de cultura líquido, o que leva a crer que a formulação tem potencial enquanto forma farmacêutica, mantendo a atividade, além de existir a possibilidade de incorporação de outros componentes ativos, apresentando, portanto, uma vasta versatilidade, o que poderia maximizar a eficiência

contra outros patógenos, inclusive aqueles com alto potencial de geração de biofilme e com desenvolvimento de resistência.

Isto visualizado através de ensaios microbiológicos em que foi possível identificar a ocorrência de liberação do extrato da forma farmacêutica, visto que a atividade visualizada durante o teste de CIM foi evidenciada também com o uso do filme com a utilização de técnica de difusão em ágar.

Em relação à toxicidade do extrato, pôde-se identificar proximidade entre a concentração de efetividade antimicrobiana frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, e a concentração de potencial citotoxicidade. Entretanto, a literatura aborda a possibilidade de ocorrer ativação de resposta celular em baixas concentrações, o que fica também evidenciado pelo ensaio de MTT realizado, sendo possível inferir que pode ocorrer o favorecimento do processo de cicatrização via modulação celular.

Testes complementares podem ser sugeridos dentro deste contexto, de modo a aumentar as perspectivas do produto formulado, onde este pode ser aprimorado tanto física quanto quimicamente. Seja por adição de novos ativos, seja por aplicação de outras técnicas e estruturas, como nanopartículas e compostos sintéticos diversos. Sugere-se ainda realização de testes de maior especificidade para determinação de ativação celular, como o método e *Scratch*, que consiste em adicionar cortes em meio de cultivo celular, de modo a observar a migração das células para esta região, assim como teste para avaliação dos mecanismos de liberação do ativo da forma farmacêutica, através de ensaio de célula de Franz.

Assim espera-se prosseguir com o aprimoramento da formulação, além de identificar de forma controlada suas características de estabilidade, tanto a curto, quanto a longo prazo, para então poder indicar o filme formulado para testes *in vivo* com segurança, com a principal intenção de fornecer alternativas viáveis economicamente que apresentem eficiência e aplicação sustentável. Que auxilie na recuperação de pacientes com feridas, independentemente de sua complexidade. Considerando que a estas desordens, somam-se a outras comorbidades, comprometem a vida social do paciente e afetam os custos hospitalares, que podem, sempre que alternativas com esta intenção se estabelecem, remanejar e otimizar a distribuição de seus recursos para outros problemas de igual ou maior necessidade.

REFERÊNCIAS

AIRES, Paulo Sérgio Reginaldo. **Estudo de Sazonalidade da espécie Anadenanthera colubrina: obtenção de impressões de digitais por UV/Vis, CCD-AE e CLAE-DAD para aplicação no controle de qualidade da droga vegetal.** 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

CARVALHO, Lais Morandini. **Análise da saliva de pacientes com ardência bucal por espectroscopia de Fourier Transform Infrared (FT-IR)**. 2013. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de São Paulo.

ALONSO, Beatriz et al. Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of Staphylococcus aureus biofilm. **Journal of microbiological methods**, v. 139, p. 135-137, 2017.

ALVES, Allyson Rocha et al. Conteúdo de nutrientes na biomassa e eficiência nutricional em espécies da Caatinga. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 2, p. 377-390, 2017.

ALVES, Anna Carolina Rodrigues Santos. **Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de filmes biopoliméricos de derivados de quitosana**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, 2019.

AMORIM, Elba Lúcia Cavalcanti de et al. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems And Communities**. [s.l.], v. 2, n. 1, p. 88-94, 2008.

AMORIM, Elba Lúcia Cavalcanti de et al. **Potencial de extratos vegetais na reversão de resistência em** *Staphylococcus aureus.* In: DA SILVA, Francisco Henrique et al. Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes. São José dos Pinhais: Latin American Publicações, 2020.

ANSELMO, Maria da Glória Vieira et al. Ocorrência de Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan (angico) no semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Revista**

Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade, v. 7, n. 17, p. 1215-1229, 2020.

ARAÚJO, Daniel Rodrigo Cavalcante et al. Comparative analysis of anti-Staphylococcus aureus action of leaves and fruits of Anadenanthera colubrina var. cebil (Griseb.) Altschul. Afr. J. **Microbiol. Res**, v. 8, n. 28, p. 2690-6, 2014.

ARAÚJO, Daniel Rodrigo Cavalcante et al. Effects of Rainfall on the Antimicrobial Activity and Secondary Metabolites Contents of Leaves and Fruits of Anadenanthera colubrina from Caatinga Area. **Pharmacognosy Journal**, v. 9, n. 4, 2017.

ARAÚJO, Daniel Rodrigo Cavalcante. **Purificação bioguiada e caracterização química de compostos ativos de folhas Anadenanthera colubrina var. Cebil.(Griseb.) Altschul**. 2018. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco.

ARAÚJO, Edilane Rodrigues Dantas et al. Avaliação do potencial antimicrobiano de extrato hidroalcoólico e aquoso da espécie Anadenanthera Colubrina frente à bactérias gram negativa e gram positiva. **Biote Amazonie**, v. 5, n. 3, p. 66-71, 2015.

ARAÚJO, Meiriele Tavares et al. Análise de custo da prevenção e do tratamento de lesão por pressão: revisão sistemática. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 89, n. 27, 2019.

ARAÚJO, Thiago Antônio de Souza et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology. [s.l.]**, v. 120, n. 1, p.72-80. 2008.

ARAÚJO, Thiago Antônio de Souza. **Taninos e flavonóides em plantas medicinais da caatinga**: um estudo de etnobotânica quantitativa. 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

ARMBRUSTER, Chelsie E.; MOBLEY, Harry LT; PEARSON, Melanie M. Pathogenesis of Proteus mirabilis infection. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.

ARRUDA, Deliane Andrade et al. Uso de plantas medicinais na Umbanda e

Candomblé em associação cultural no município de Puxinanã, Paraíba. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 14, n. 5, p. 692-696, 2019.

ARRUDA, Natália Martins; MAIA, Alexandre Gori; ALVES, Luciana Correia. Desigualdade no acesso à saúde entre as áreas urbanas e rurais do Brasil: uma decomposição de fatores entre 1998 a 2008. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, p. e00213816, 2018.

AZEVEDO, Valéria Vital et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista eletrônica de Materiais e processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BAHUGUNA, Ashutosh et al. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 115-118, 2017.

BARBOSA DOS SANTOS, Wanderley et al. Microbiota infectante de feridas cirúrgicas: análise da produção científica nacional e internacional. **Rev. SOBECC**, 2016.

BASTOS, Valéria Delgado. Biopolímeros e Polímeros de matérias-primas renováveis alternativos aos petroquímicos. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro. V. 14, N. 28, P. 201-234, Dez. 2007.

BEGANOVIC, Maya et al. A review of combination antimicrobial therapy for Enterococcus faecalis bloodstream infections and infective endocarditis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. 2, p. 303-309, 2018.

BISPO, Viviane M.; MANSUR, Alexandra AP; MANSUR, Herman S. Caracterização por espectroscopia de infravermelho de filmes de quitosana com diferentes quantidades de agente reticulante. **Anais do Congresso Brasileiro de Biopolímeros**. Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2009.

BLANES, Leila. **Tratamento de feridas. Cirurgia vascular:** guia ilustrado. São Paulo, 2004. Disponível em: ttps://artedecuidar.webnode.com.br/_files/200000015-0ad7c0b337/Tratamento%20de%20Feridas.pdf. Acesso em 02 de maio de 2020.

BORSCHIVER, Suzana; ALMEIDA, Luiz FM; ROITMAN, Tamar. Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros. **Polímeros**, v. 18, n. 3, p. 256-261, 2008.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Diagnóstico do Município de São Caitano**. 2005. Disponível em: https://rigeo.cprm.gov.br/jspui/bitstream/doc/16576/1/Rel_S%C3%A3o%20Caitano.pdf. Acesso em 10/03//2020

BRIANEZI, Samira Faleiros Silva et al. **Preparação e caracterização de membranas de quitosana e mPEG-PCL para recobrimento de feridas e liberação controlada de gentamicina**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alfenas.

CABRAL, Daniela Lyra de Vasconcelos. **Potencial antimicrobiano de plantas da caatinga utilizadas na medicina tradicional como anti inflamatórias.** 2014. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco.

CARNEIRO, Josenildo Laurentino et al. **Cactáceas da caatinga:** estratégias de agregação de valor como meio de conservação da sua biodiversidade. Terra-Mudanças Climáticas e Biodiversidade. Ituiutaba: Barlavento, p. 346-358, 2019.

CASTRO, Marta Rocha; FIGUEIREDO, Fábio Fonseca. Saberes tradicionais, biodiversidade, práticas integrativas e complementares: o uso de plantas medicinais no SUS. **Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 15, n. 31, p. 56-70, 2019.

CASTRO, Valerium Thijan Nobre. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de Anadenanthera Colubrina (Vell.) Brenan e incorporação em gel dermatológico**. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

COLACITE, Jean. Triagem fitoquímica, análise antimicrobiana e citotóxica e dos extratos das plantas: Schinus terebinthifolia, Maytenus ilicifolia Reissek, Tabebuia avellanedae, Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 3,

p. 509-516, 2015.

CORRÊA, Allan Jonathan Chernichiarro. **Contribuição do conhecimento popular para a descoberta de novos antimicrobianos**. 2018. Tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco.

DE MENEZES FILHO, Antonio Carlos Pereira. Cochlospermum regium: conservação e tividade química e biológica. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 8, n. 3, p. 234-245, 2020.

DE QUEIROZ, Bárbara Brito; TOMAZ, Alecsandra Ferreira. Eficácia do curativo de quitosana na cicatrização: Uma revisão integrativa. **Revista Eletrônica de Ciências**, v. 21, n. 34, 2021.

DIAS, Heloisa P. et al. Identification of Polyphenols: Sequence for Teaching High School Chemistry. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 2, p. 467-477, 2014.

EMILIANO, Sannyele Alcantara; BALLIANO, Tatiane Luciano. Prospecção de Artigos e Patentes sobre Plantas Medicinais Presentes na Caatinga Brasileira. **Cadernos de Prospecção**, v. 12, n. 3, p. 615, 2019.

FAKHOURI, Farayde Matta, et al. Filmes e coberturas comestíveis composta à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, 2007.

FARIAS, Cayque de Souza, et al. Potencial Antimicrobiano Do Dimetilssufóxido (DMSO) Frente a diversas cepas bacterianas. A**nais do Terceiro Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde**, Campina Grande, 2018.

FARIAS, Silvana Silveira de et al. Biopolímeros: uma alternativa para promoção do desenvolvimento sustentável. **Revista Geonorte**, v. 7, n. 26, p. 61-77, 2016.

FELIPE, Lorena O. et al. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FERNANDES, Moabe Ferreira; QUEIROZ, Luciano Paganucci de. Vegetação e flora

da Caatinga. **Ciência e cultura**, v. 70, n. 4, p. 51-56, 2018.

FOSTER, Timothy J.; GEOGHEGAN, Joan A. Staphylococcus aureus. **Molecular Medical Microbiology**, p. 655-674, 2015.

FRÁGUAS, Rodrigo Martins et al. Preparo e caracterização de filmes comestíveis de quitosana. **Polímeros**, v. 25, n. SPE, p. 48-53, 2015.

FREITAS, Catarina Fernandes de Freitas et al. **Mecanismos moleculares de resistência bacteriana aos antimicrobianos**. In: DA SILVA, Francisco Henrique et al. Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes. São José dos Pinhais: Latin American Publicações, 2020.

GABRIEL, Juliana dos Santos. **Bionanocompósitos de derivados de quitosana/montmorilonita/nanopartículas de prata preparadas via fotoquímica**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GARCIA, Anelise Bassedas. **Perfil dos usuários com úlceras de membros inferiores atendidos no ambulatório de feridas do município Canoas**, RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. 2016.

GENEVRO, Giovana Maria et al. **Desenvolvimento de materiais micro estruturados a partir de biopolímeros para obtenção de curativos de alto desempenho**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas.

GIULIETTI, Ana Maria et al. **Biodiversidade da Caatinga:** áreas e ações prioritárias para a conservação. In: Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. Universidade Federal da Paraíba, 2004.

GOMES, Erbs Cintra et al. Plantas da caatinga de uso terapêutico: levantamento etnobotânico. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 5, n. 2, 2008.

GOMES, Mayra Sousa et al. Uso de plantas medicinais na odontologia: uma revisão integrativa. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 18, n. 2, p. 118-126, 2020.

GONZÁLEZ-BELLO, Concepción. Antibiotic adjuvants–A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 18, p. 4221-4228, 2017.

GONÇALVES, Rodrigo Noll et al. Plantas medicinais: relacionando conhecimento popular e científico na atenção primária à saúde. **Visão Acadêmica**, v. 18, n. 4, 2018.

GONÇALVES, Thamyres Sabrina. A história paleoambiental da vegetação brasileira e seus apontamentos sobre a fitogeografia atual do Brasil. **Humboldt-Revista de Geografia Física e Meio Ambiente**, v. 1, n. 1, 2020.

GUILHERME, Luciana Rebelo et al. Nanobiopolímeros aplicados em produtos para a saúde. In: PAULA, Joelma Abadia Marciano de; AMARAL, Vanessa Cristiane de Santana. **Ciências da Saúde: Saberes e práticas interdisciplinares**. Anápolis: Editora UEG, 2019.

HECKLER, Adriane Maris; HAHN, Siomara Regina. Implementação de um protocolo de monitorização terapêutica de vancomicina em adultos. **Journal of Epidemiology and Infection Control**, v. 10, n. 3, 2020.

HIGINO, S. S. S. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de taninos isolados da jurema vermelha (Mimosa arenosa (Willd Poir) sobre Staphylococcus aureus de origem bovina. **Revista Agropecuária técnica**. João Pessoa, v. 36, n. 1, p. 115-120. 2015

HOTTERBEEKX, An et al. In vivo and In vitro Interactions between Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus spp. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 106, 2017.

JAMSHIDI-KIA, Fatemeh; LORIGOOINI, Zahra; AMINI-KHOEI, Hossein. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of herbmed pharmacology**, v. 7, n. 1, 2018.

JANG, Jeonghwan et al. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications a review. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 3, p. 570-581, 2017.

JERNIGAN, John A. et al. Multidrug-resistant bacterial infections in US hospitalized patients, 2012–2017. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 14, p. 1309-1319, 2020.

KIRKETERP-MØLLER, Klaus; STEWART, Philip S.; BJARNSHOLT, Thomas. The zone model: A conceptual model for understanding the microenvironment of chronic wound infection. **Wound Repair and Regeneration**, v. 28, n. 5, p. 593-599, 2020.

LIMA, Amélia Ruth Nascimento et al. Atividade antimicrobiana e anti-inflamatória da Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 1, p. e121911770-e121911770, 2020.

LIMA JÚNIOR, Edmar Maciel. Tecnologias inovadoras: uso da pele da tilápia do Nilo no tratamento de queimaduras e feridas. **Rev Bras Queimaduras**, v. 16, n. 1, p. 1-2, 2017.

LIMA, Rennaly de Freitas et al. **Anadenanthera colubrina (VELL.) Brenan:** Perfil químico e atividade anticandida, antibiofilme, antitumoral e citotóxica. 2018. Tese de doutorado. Universidade Estadual da Paraíba.

LIRA, Mylena Felix de et al. **Metabólitos secundários de plantas:** Atividade antimicrobiana e relato de estrutura - atividade. In: DA SILVA, Francisco Henrique et al. Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes. São José dos Pinhais: Latin American Publicações, 2020.

LIU, Shan; JI, Xing-Xiang; ZHU, Jie-Fang. Recent Progress in the Synthesis and Biomedical Properties of Natural Biopolymer Composites. **Current Medicinal Chemistry**, 2021.

MAGALHÃES, Karla do Nascimento. **Plantas medicinais da caatinga do Nordeste brasileiro:** etno farmacopeia do Professor Francisco José De Abreu Matos.

Fortaleza: Imprensa Universitária, 2020.

MARCO, R. **Caracterização epidemiológica das infecções primárias de corrente sanguínea por Staphylococcus aureus coagulase negativa em unidades de terapia intensiva neonatal.** 2015.21f. Dissertação (Mestrado em Pediatria e saúde da criança) – Programa de Pós Graduação em Pediatria e saúde da criança. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. 2015.

MARTINS, Marília Manta et al. **Compostos fenólicos na inibição do biofilme bacteriano.** In: DA SILVA, Francisco Henrique et al. Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes. São José dos Pinhais: Latin American Publicações, 2020.

MEDEIROS, Aldo Cunha; DANTAS-FILHO, Antônio Medeiros. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of surgical and clinical research**, v. 7, n. 2, p. 87-102, 2016.

MEDEIROS, Patrícia Muniz; PINTO, Bárbara Luzia Santos; DO NASCIMENTO, Viviany Teixeira. Can organoleptic properties explain the differential use of medicinal plants? Evidence from Northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v.159, p. 43-48, 2015.

MENDES, Vanessa Aparecida. **Caracterização bioquímica e farmacológica de compostos analgésicos presentes na secreção das glândulas parotóides dos sapos Rhinella Icterica e Rhinella marina**. 2019. Tese de doutorado. Instituto Butantan.

MENEGUELLI, Alexandre Zandonadi et al. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos na saúde pública brasileira. **Revista Enfermagem e Saúde Coletiva**, v. 1, n. 1, 2018.

MONTEIRO, Júlio M. et al. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in Myracrodruon urundeuva (Engl.) Fr. All. and Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 338-

344, 2006.

MOREIRA, Madson Matheus Barbosa et al. **Diterpenos com atividade antitumoral frente células leucêmicas**: uma revisão. Universidade Federal da Paraíba. 2014.

MOREIRA, Mirella dos Reis de Araújo. **Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos de Terminalia argentea Mart. & Succ e Anadenanthera colubrina var. colubrina (Benth.) Brenan**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MOREIRA, Rafael YO et al. Antraquinonas e naftoquinonas do caule de um espécime de reflorestamento de Tectona grandi (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 392-396, 2006.

MORETÃO, Mariana Piemonte et al. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of Anadenanthera colubrina (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, v. 89, n. 2-3, p. 175-185, 2003.

MOTHEO, Stéphanie Ferguson. **Utilização de zebrafish para validação de programa computacional aplicado à análise cardíaca após administração de medicamentos cardiotônicos**. 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos.

NAKATSUJI, Teruaki et al. A commensal strain of Staphylococcus epidermidis protects against skin neoplasia. **Science Advances**, v. 4, n. 2, p. eaao4502, 2018.

NASCIMENTO, Ailza Maria Lima; RAMOS, Elba Maria Nogueira Ferraz; DA SILVA, José Severino Bento. Conhecimento e uso das plantas da caatinga por agricultores locais moradores de uma comunidade rural do município de Pesqueira estado de Pernambuco. **Revista de Ciência, Tecnologia e Humanidades do IFPE**, v. 10, n. 1, 2019.

NASCIMENTO, JPB; BISPO, J. de S.; DANTAS, B. F. A**ngico Anadenanthera colubrina var. cebil (Vell.) Brenan**. Embrapa Semiárido-Nota Técnica/Nota

Científica, 2018. Disponível em: https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1131693/1/Angico-Anadenanthera-colubrin-2018.pdf. Acesso em 20 de fevereiro de 2020.

NEGM, Nabel A. et al. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 681-702, 2020.

NUNES, Andreia Magnólia Marques; SILVA, Valdeline Atanazio. O Uso de plantas abortivas no nordeste brasileiro: Uma revisão. **Ethnoscientia: Revista Brasileira de Etnobiologia e Etnoecologia**, v. 6, n. 2, p. 100-112, 2021.

O'GARA, James P. Into the storm: Chasing the opportunistic pathogen Staphylococcus aureus from skin colonisation to life-threatening infections. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 10, p. 3823-3833, 2017.

OLIVEIRA, Marina Ferreira de et al. Feridas em membros inferiores em diabéticos e não diabéticos: estudo de sobrevida. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 40, 2019.

PAES, Juarez Benigno et al. Taninos condensados da casca de angico-vermelho (Anadenanthera colubrina var. cebil) extraídos com soluções de hidróxido e sulfito de sódio. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 3, p. 22-27, 2013.

PALAMIN, Thalita Fernanda Nishihara. F**eridas crônicas, saber popular e práticas integrativas:** revisão sistemática. Repositório UNESP, 2018.

PALMEIRA, Josman Dantas et al. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcóolico de angico sobre cepas de Staphylococcus aureus. **RBAC**, v. 42, n. 1, p. 33-7, 2010.

PANG, Zheng et al. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 1, p. 177-192, 2019.

PANSARA, Chintan et al. Formulation optimization of chitosan-stabilized silver nanoparticles using in vitro antimicrobial assay. **Journal of pharmaceutical**

sciences, v. 108, n. 2, p. 1007-1016, 2019.

PARK, Tae Hoon et al. Development and characterization of a superabsorbing hydrogel film containing Ulmus davidiana var. Japonica root bark and pullulan for skin wound healing. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 7, p. 791-802, 2020.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de Bauhinia cheilantha (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. [s.l.], v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

PEREIRA, Aline de Paula Caetano. **Avaliação das atividades antioxidante e antiinflamatória de Commiphora leptophloeos, Myracrodruon urundeuva e Anadenanthera colubrina**. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

PEREIRA, Andréia Vieira et al. Effects of associations of tannins from Anacardium occidentale and Anadenanthera colubrina with cephalosporin against bovine Staphylococcus aureus isolates. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018.

PEREIRA JÚNIOR, Lécio Resende et al. Caatinga species as an alternative to the development of new phytochemicals. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p. 509-520, 2014.

PEREIRA, Ronaldo Coelho et al. Caracterização de filmes de quitosana produzidos a partir da incorporação de extrato de anacardium microcarpum ducke. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 51376-51394, 2021.

PINTO, Gisela Patrícia Neto Magalhães. **Biofilmes e feridas crónicas**. 2016. 84f Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2016.

RAMOS-CASTAÑEDA, Jorge A. et al. Mortality due to KPC carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae infections: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 76, n. 5, p. 438-448, 2018.

RIBEIRO, Fábio de Oliveira Silva et al. Structural characterization, antifungal and cytotoxic profiles of quaternized heteropolysaccharide from Anadenanthera colubrina. International **Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 279-290, 2020.

RODRIGUES, Tayronne et al. A valorização das plantas medicinais como alternativa à saúde: um estudo etnobotânico. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 1, p. 411-428, 2020.

SÁ, Ingrity Suelen Costa et al. **Caracterização química e estudo da atividade biológica de substâncias obtidas da casca e do látex da espécie Brosimum parinarioides (Moraceae)**. 2018. Tese de doutorado, Universidade Federal do Amazonas.

SAHARIAH, Priyanka; MASSON, Mar. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure–activity relationship. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 11, p. 3846-3868, 2017.

SALESSE, Daniele et al. Etnobotânica e Etnofarmacologia das espécies de Amaryllidaceae, Anacardiaceae, Annonaceae e Apiaceae. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 22, n. 3, 2018.

SALVADOR, Islaine de Souza et al. **Estudos toxicológicos não-clínicos do infuso e extratos secos nebulizados das drogas vegetais Myracrodruon urundeuva Allemão (aroeira), Poincianella pyramidalis Tul.(catingueira) e Anadenanthera colubrina var. cebil (angico)**. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação tecnológica de medicamentos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

SAMPAIO, Pamella da Silva; SANCHO, Leyla Gomes; LAGO, Regina Ferro do. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 26, n. 1, p. 15-22, 2018.

SANTOS, Ana Larisse Nunes dos et al. **Desenvolvimento de filmes de Quitosana/PVA/Norbixina com potencial aplicação em regeneração de tecidos**.

Dissertação de mestrado, Instituto Federal do Piauí, 2019.

SANTOS, André Luis dos et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, Carina Silva et al. What matters when prioritizing a medicinal plant? A study of local criteria for their differential use. **Acta Botanica Brasilica**, n. AHEAD, p. 0-0, 2018.

SANTOS, Carlus Alberto Oliveira dos. **Avaliação da polpa dentária de ratos após pulpotomia e selamento pulpar com uma pasta à base de Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan E. com a pasta antibiótica CTZ. 2020**. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2020.

SILVA, Ana Catarina de Oliveira, et al. As principais coberturas utilizadas pelo enfermeiro. **Revista Uningá**, v. 53, n. 2, 2017.

SILVA, Danielle M. et al. Plant extracts display synergism with different classes of antibiotics. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 2, 2019.

SILVA, Echile Lorrany Gonçalves dos Santos; AGUIAR, Hérica Thaís Vieira; FREITAS, Ronilson Ferreira. Estudo Fitoquímico, atividade antioxidante e tóxica da casca de Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan. **Biodiversidade**, v. 19, n. 2, 2020.

SILVA, Elys Karine Carvalho da. **Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica e antioxidante de extratos metanólico e aquoso de galhos da Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan**. 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SILVA, Franciéle de Matos et al. Uso de Fototerapia para cicatrização de feridas de pés diabéticos. **Revista Eletrônica do Programa de Mestrado em Direitos Humanos, Cidadania e Violência/Ciência Política do Centro Universitário Unieuro**, Brasília, 2019.

SILVA, Gustavo Bayma et al. **Comunicado técnico:** Diagnóstico dos serviços ambientais florestais nos biomas brasileiros de 2001 a 2011. BRASIL: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Gustavo-Bayma/publication/322833142_Diagnostico_dos_servicos_ambientais_florestais_nos_biomas_brasileiros_de_2001_a_2011/links/5a71eb51aca2720bc0d99a11/Diagnostico-dos-servicos-ambientais-florestais-nos-biomas-brasileiros-de-2001-a-2011.pdf. Acesso em 08 de março de 2020.

SILVA, Hélio SR; DOS SANTOS, Kátia SCR; FERREIRA, Elizabeth I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SILVA, Lucas Barbosa; SOARES, Luzinátia Ramos; QUADROS, Fátima Alice Aguiar. Promoção da saúde indígena frente ao uso de plantas medicinais, desempenhando resgate e preservação do patrimônio cultural imaterial. **Anais do Semex**, n. 12, 2019.

SILVA, M. G. et al. Caracterização de filmes à base de quitosana. In: **XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Campinas, Anais**. 2015. p. 1710-1715.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.

SIMÕES, Cristina Maria Senra Barroso. **Infecções hospitalares bacterianas no século XXI**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa.

SLOBODOVA, Dara; GORSHKOVA, Raisa; NOVOSELOV, Nickolay. **Perspective of biopolymer matrices application as hemostatics**. InterConf, 2020.

SOUZA, Priscilla Bastos et al. Uma abordagem sobre a determinação de atividade antioxidante e fenóis totais por FT-IR e quimiometria em alimentos. Revista Jovens Pesquisadores, v. 8, n. 1, p. 17-25, 2018.

SUARATO, Giulia; BERTORELLI, Rosalia; ATHANASSIOU, Athanassia. Borrowing

from Nature: biopolymers and biocomposites as smart wound care materials. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 6, p. 137, 2018.

TABARELLI, Marcelo et al. Caatinga: legado, trajetória e desafios rumo à sustentabilidade. **Ciência e Cultura**, v. 70, n. 4, p. 25-29, 2018.

TANGANINI, Isabella Carvalho. **Extração de quitosana a partir de resíduo de camarão e seu efeito sobre leveduras do bioetanol**. 2019. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos.

TAZIMA, Maria de Fátima, G. S. et al. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina (Ribeirao Preto Online)**, v. 41, n. 3, p. 259-264, 2008.

WEBER, Carlos R. et al. Anadenanthera colubrina: um estudo do potencial terapêutico. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 235-244, 2011.

WYRES, Kelly L.; LAM, Margaret MC; HOLT, Kathryn E. Population genomics of Klebsiella pneumoniae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 344-359, 2020.

ANEXO A - CADASTRO SISGEN

Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A364335

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	**A364335**
Usuário:	**Ana Caroline Costa Xavier**
CPF/CNPJ:	**100.411.904-67**
Objeto do Acesso:	**Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso:	**Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Anadenanthera colubrina

Título da Atividade:	**DESENVOLVIMENTO DE FILME COM AÇÃO ANTIMICROBIANA À BASE DE QUITOSANA INCORPORADO COM EXTRATO SECO DE ANADENANTHERA COLUBRINA VAR. CEBIL (GRISEB) ALTSCHUL (ANGICO)**

Equipe

Ana Caroline Costa Xavier	**INDEPENDENTE**

Parceiras Nacionais

24.134.488/0001-08 / Universidade Federal de Pernambuco

Data do Cadastro:	**07/07/2021 20:06:20**
Situação do Cadastro:	**Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **20:06** de **07/07/2021**.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO - SISGEN