

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

DIOGO DO NASCIMENTO GOMES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES
DE ALGINATO INCORPORADOS COM EXTRATOS DE
ANADENANTHERA COLUBRINA (VELL.) BRENAN VISANDO O
DESENVOLVIMENTO DE SUBSTITUTO TEMPORÁRIO
DE PELE**

Recife

2016

DIOGO DO NASCIMENTO GOMES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES
DE ALGINATO INCORPORADOS COM EXTRATOS DE
ANADENANTHERA COLUBRINA (VELL.) BRENAN VISANDO O
DESENVOLVIMENTO DE SUBSTITUTO TEMPORÁRIO
DE PELE**

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Biomédica, da
Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Engenharia
Biomédica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Yara
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Thiago
Antônio de Sousa Araújo

Recife

2016

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

G633d Gomes, Diogo do Nascimento.
Desenvolvimento e caracterização de filmes de Alginato incorporados com extratos de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan visando o desenvolvimento de substituto temporário de pele / Diogo do Nascimento Gomes. - 2016.
105 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yara.
Coorientador: Prof. Dr. Thiago Antônio de Sousa Araújo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, 2016.
Inclui Referências e Apêndice.

1. Engenharia Biomédica. 2. Alginato. 3. Angico. 4. Substituto de pele. 5. Filmes poliméricos. I. Yara, Ricardo. (Orientador). II. Araújo, Thiago Antônio de Sousa. III. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.)

BCTG/2016-297

DIOGO DO NASCIMENTO GOMES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES
DE ALGINATO INCORPORADOS COM EXTRATOS DE
ANADENANTHERA COLUBRINA (VELL.) BRENAN VISANDO O
DESENVOLVIMENTO DE SUBSTITUTO TEMPORÁRIO
DE PELE**

Essa dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora em 29 de julho de 2016.

Orientador: _____
Prof. Dr. Ricardo Yara, Doutor pela Universidade de São Paulo –
São Paulo, Brasil.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Yara, UFPE
Doutor pela Universidade de São Paulo – São Paulo, Brasil.

Prof. Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues, UFPE
Doutor pela Universidade de São Paulo – São Paulo, Brasil.

Prof^a. Dr. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim, UFPE
Doutora pela Université Pierre et Marie Curie – Paris, França

Coordenador do PPGEb: _____
Prof. Dr. Edval José Pinheiro Santos

Recife, Julho de 2016

A minha mãe **Maria de Fátima**, a minha esposa **Elaine**,
Por todo amor, incentivo, dedico.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe **Maria de Fátima**, por toda garra em momentos difíceis, dela herdei toda perseverança.

A minha esposa **Elaine Patricia**, por cada palavra de amor, carinho e incentivo.

Aos meus orientadores prof. Dr. **Ricardo Yara** pela oportunidade e por ter seguido nessa jornada comigo até o fim, mesmo com todas as dificuldades e a Prof. Dr. **Thiago Araújo**, por ter lembrado e confiado a mim para o desenvolvimento desse trabalho. As professoras Dr.^a **Claudia S. de. A. Lima**, pelo apoio e por toda orientação nesse mestrado, Dr.^a **Adriana Fontes** e Dr.^a **Beate Saegesser**, por me aceitarem em seu laboratório e por todo aprendizado concedido.

A **Rafael Padilha** que foi mais que um companheiro em horas de experimentos, foi também um amigo nos momentos de alegria e de frustração.

A **Carlos** um dos meus primeiros contatos nessa empreitada, a **Natália**, e a **Yago** por todos os ensinamentos, por todo o carinho, cuidado e companheirismo. A **Regina** por liberar seu marido e a quem eu passo minha aprendizagem.

Aos meus colegas do grupo do Laboratório de Biofísica-Química, grupo de pesquisa NANOBIO/BIONAT, em especial, **Isabela, Renan, Rafael, Paulo Euzebio, Bruna, Bruno, Flavia, Aline Lima e Antônio** por todos os momentos de alegria e descontração essenciais nessa caminhada.

Aos meus tios **Conceição e Adeildo**, por toda ajuda em diversos âmbitos quando necessário.

À Prof. Dr.^a **Késia Xisto** e todos do laboratório de Microbiologia Aplicada do UFPEDA.

A coordenação do programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica por todo apoio.

Obrigado a todos!

RESUMO

A pele funciona como uma barreira contra agentes físicos e patógenos, sem ela, diversos tipos de doenças causadas por agentes patógenos podem levar o indivíduo ao óbito. Substitutos temporários de pele auxiliam na regeneração cutânea, prevenindo a perda de líquidos e eletrólitos e o aparecimento de infecções. Alginatos são biomateriais biocompatíveis que podem ser utilizados para a confecção de substitutos temporários de pele. Adicionalmente, extratos e tinturas da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan são amplamente utilizados na medicina tradicional, por apresentarem ações antimicrobianas e cicatrizantes, podem ser úteis na produção tais substitutos. Assim, este trabalho teve por objetivo produzir filmes baseados em alginato com ou sem adição de cloreto de cálcio, além da incorporação de extratos de *A. colubrina*. Foi avaliada a liberação de extratos de *A. colubrina* incorporados aos filmes em meio aquoso, além de ensaios físicos para verificar transparência, espessura, teores de umidade de todos os filmes de alginato e aqueles com incorporação de extratos. Adicionalmente foi verificada a distribuição do extrato no filme. Os filmes foram caracterizados por espectroscopia na região do Ultravioleta/Visível (UV/VIS) e do Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Adicionalmente foi avaliada a ação antimicrobiana qualitativa dos filmes incorporados com extratos etanólicos (50% e 80%) com ou sem a presença do Ca^{++} , frente a linhagens multirresistentes *Staphylococcus aureus*. Os filmes sem incorporação de extratos apresentaram-se finos e mais transparentes (0,16 mm; 12,63) quando comparados com Cálcio (0,3 mm; não transparentes). Os filmes contendo extratos vegetais apresentaram diferenças apenas na transparência, de acordo com o extrato utilizado: 50% (0,61 mm; 3,04), a 80% (0,62 mm; 1,18) ou com CaCl_2 e extrato (a 50% 0,62 mm e 2,17 a 80 % 0,75 mm; 2,03). As análises por UV/VIS evidenciaram homogeneidade na incorporação dos extratos nos filmes quando observados a 282 nm. Observou-se uma pronunciada atividade bactericida destes filmes frente ao *S. aureus*, inclusive para as linhagens multirresistentes. O filme de Alginato com incorporação do extrato de *A. colubrina* 50% (FA50) apresentou maior inibição para *S. aureus* UFPEDA 700 (73.10^{-3} UFC), já o filme de Alginato reticulado com cálcio e com incorporação do extrato de *A. colubrina* 80% (FACa80) apresentou maior inibição do crescimento das cepas UFPEDA 711 (6.10^{-1}) e 731 (261.10^{-1}). Nos ensaios realizados (físico-químicos, espectroscópicos e microbiológicos) ficou evidenciada a diferença da liberação controlada dos extratos de *A. colubrina* (Vell.) Brenan em filmes com Ca^{++} .

Palavras-chave: Alginato. Angico. Substituto de Pele. Filmes Poliméricos.

ABSTRACT

The skin acts as a barrier against physical and pathological agents. without it, all kinds of diseases caused by pathogens can cause the individual to death. Skin temporary replacements help in skin regeneration, preventing the loss of fluids and electrolytes and the onset of infections. Alginate is biocompatible biomaterials, which can be used for making skin substitutes. Additionally extracts and tinctures of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan are widely used in traditional medicine, because they have antimicrobial and healing actions that can be useful in skin substitutive. This study aimed to produce films based on alginate with or without calcium chloride addition besides we tested an incorporation of extracts *A. colubrina* (Vell.) Brenan. Release of *A. colubrina* (Vell.) Brenan extracts, which was incorporated into the films, was performed in aqueous solution. Physical tests were performed to verify transparency, thickness, moisture content of all these films and alginate embedding extracts. Additionally it was verified the distribution of the extract into the film. In addition, the films were characterized by spectroscopy in the UV region / Visible (UV / VIS) and infrared Fourier transform (FT-IR). Additionally it was evaluated the qualitative antimicrobial action of the films incorporated with extracts (extracted with 50% and 80% ethanol) and with Ca^{++} against *Staphylococcus aureus*, but also for multiresistant strains of this bacterium. The film without addition of extracts present is thinner and more transparent (0.16 mm; 12,63) than those crosslinked with calcium (0.3 mm; not transparent). The films containing plant extracts showed differences only in transparency in accordance with the extract used: 50% (0.61 mm; 3.04), 80% (0,62mm; 1.18) or CaCl_2 and extract (the 50% 0.62 mm 0.75 mm 2.17 to 80%; 2.03). Analysis of UV / VIS showed homogeneous incorporation of the extracts in the movies when observed at 282 nm. There was a pronounced bactericidal activity of these films opposite to *S. aureus*, including multidrug-resistant strains. Alginate film with incorporation of *A. colubrina* extract 50% (FA50) showed greater inhibition for the strain *S. aureus* UFPEDA 700 (73.10^{-3} UFC), since the alginate film crosslinked with calcium and incorporation of *A. colubrina* extract 80% (FACa80) showed greater inhibition of growth of the strains UFPEDA 711 (6.10^{-1}) and UFPEDA 731 (261.10^{-1}). In tests (physico-chemical, spectroscopic and microbiological) was evident the difference of controlled release of *A. colubrina* extracts in films with Ca^{++} .

Keywords: Alginate. Angico. Skin Substitutes. Polymeric Films.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da pele.	18
Figura 2. Regra dos nove de Wallace em adultos, adaptação para criança e bebê.	21
Figura 3 (A) União dos meros para a formação do polímero, (B) Estrutura química do etileno seguida da estrutura química do polietileno.	26
Figura 4. Estrutura química do alginato de sódio.	27
Figura 5. Organização em blocos do ácido algínico.	27
Figura 6. Interação iônica entre alginato e cátions bivalentes.	30
Figura 7. Esquema simplificado das rotas biossintéticas para produção de compostos Fenólicos, isoprenóides e alcalóides.	37
Figura 8. Compostos fenólicos: ácidos gálicos (1), 3,4-dimetoxifenil- β -D-glucopiranosídeo (2) e ácido tânico (3).	38
Figura 9. Esquema representativo do método de difusão em meio líquido.	47
Figura 10. Esquema representativo das metodologias de diluição e semeio em rede.	48
Figura 11. Filme de alginato (A) FA, filme de alginato com extrato de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan a 50% (B) FA50, filme de alginato incorporado com <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan a 80% (C) FA80, filme de alginato reticulados com cálcio, (D) FACa, Filme de alginato reticulados com cálcio e incorporação do extrato de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan a 50%, (E) FACa50 Filme de alginato reticulados com cálcio e incorporação do extrato de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan a 80%. (F) FACa80.	50
Figura 12 Espectro de absorção eletrônica na região do UV-Vis do ácido tânico e extrato de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan 50% (A)	54
Figura 13. Comparação entre os máximos de absorbância dos extratos 50% e 80% (B).	55
Figura 14. Espectro de absorção eletrônica na região do UV-VIS do filme de alginato.	56
Figura 15. Espectro de absorção eletrônica na região do UV-VIS do filme de alginato reticulados com cálcio.	56
Figura 16. Espectro de absorção eletrônica na região do UV-VIS do glicerol.	57
Figura 17 Curvas de ácido tânico e extratos (50 e 80%)	59
Figura 18. Espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier dos extratos de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan 50% (A) e 80% (B).	60
Figura 19 (A) Espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier do glicerol (B) Estrutura química do glicerol.	61
Figura 20 (A) Espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier do alginato de sódio (pó). (B) Estrutura química do alginato de sódio.	62
Figura 21 Espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier dos filmes de alginato com e sem incorporação dos extratos de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan 50%, 80% (A). (B) Estrutura química do ácido tânico.	63
Figura 22 Espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier dos filmes de alginato com cálcio com e sem incorporação dos extratos de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan 50% e 80%.	64

Figura 23. Espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier do filme de alginato e filme de alginato com reticulação de cálcio. .	65
Figura 24. Representação gráfica da liberação do extrato de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan dos filmes de alginato durante 24 h: A) Filme sem cálcio com extrato a 50% B) Filme sem cálcio com extrato a 80%	67
Figura 24. Representação gráfica da liberação do extrato de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan dos filmes de alginato durante 24 h: A) Filme com cálcio com extrato a 50% B) Filme com cálcio com extrato a 80%	68
Figura 26. Resultado do teste de discos, utilizando-se os filmes poliméricos em placas semeadas com <i>S. aureus</i> . Filmes de Alginato com incorporação do extrato de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan 50% (A), Filmes de Alginato com incorporação do extrato <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan 80% (B), Filmes de alginato com Cálcio e incorporação do <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan 50% (C), Filmes de alginato com Cálcio com incorporação do <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan 80% (D)	72
Figura 27. Resultados dos semeio em rede no teste de atividade antimicrobiana dos filmes com cálcio, incorporados com extrato de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan 80% frente a <i>S. aureus</i> UFPEDA 731.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidades por área da matéria prima empregada para síntese dos filmes.....	42
Tabela 2 Teor de umidade, em percentagem, para os filmes baseados em alginato com ou sem incorporação dos extratos, com ou sem reticulação do cálcio. Os resultados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão.	51
Tabela 3 Médias das espessuras dos filmes de alginato com e sem adição de cálcio com e sem incorporação dos extratos de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan.	52
Tabela 4 Relação entre a absorbância e transparência nos filmes poliméricos de alginato com e sem adição de cálcio, com e sem incorporação dos extratos de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan.....	53
Tabela 5 Atribuição das bandas de absorção vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier.....	65
Tabela 6. Distribuição obtida na região do UV-VIS dos filmes de alginato com incorporação <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan 50% e 80%.....	70
Tabela 7. Contagem das unidades formadoras de colônia do semeio por esgotamento para os isolados clínicos <i>S. aureus</i> multirresistentes.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ASTM	American Society for Testing and Materials
ANOVA	Técnica estatística para avaliar análises de variâncias
DRX	Difração de Raios – X
DDS	Drug Delivery System
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FT-IR	Espectroscopia de absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier
FDA	Food end Drug Adiministration
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LEB	Laboratório de Engenharia Biomédica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MH	Mueller Hinton
PBS	Tampão Salino Fosfato
RI	Razão de Intumescimentos
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta – Visível
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mL
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPEDA	Coleção de Culturas de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE SÍMBOLOS / SIGLAS

%	percentagem
°C	grau celsius
mg	miligrama
cm ²	centímetro ao quadrado
mm	milímetro
g	grama
mL	mililitro
μL	microlitro
nm	nanômetro
h	horas
cm ⁻¹	número de onda
g/ cm ²	grama por centímetros quadrados
μm	micrometro

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 A Pele	18
2.2 Queimaduras e agentes agravantes	20
2.2.1 Principais bactérias presentes em queimaduras	23
2.3 Biomateriais	25
2.3.1 Polímeros	25
2.3.2 Alginato	27
2.4 Substitutos cutâneos baseados em polímeros	30
2.5 Filmes poliméricos de alginato como substitutos temporário de pele	33
2.6 <i>Anadenanthera colubrina</i>	34
2.7 Metabólitos Secundários	36
2.7.1 Compostos Fenólicos	37
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Produção do extrato de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	41
4.2 Filmes de alginato	41
4.3 Determinação das propriedades morfológicas	43
4.3.1 Espessura	43
4.3.2 Transparência	43
4.3.3 Teor de umidade	44
4.4 Análises Espectroscópicas	44
4.4.1 Espectrofotometria de Absorção Eletrônica na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	44
4.4.2 Espectroscopia de Absorção Vibracional na região Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	45
4.5 Ensaios de liberação de extratos de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan dos filmes poliméricos	45
4.6 Atividade antimicrobiana	46
4.7 Análise estatística	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Desenvolvimento dos filmes poliméricos	49
5.2 Determinações das propriedades morfológicas	50
5.2.1 Teor de umidade	50
5.2.1 Espessura	52

5.2.2 Transparência	53
5.3 Análises Espectroscópicas	54
5.3.1 Caracterização das matérias primas e dos filmes por espectrometria de absorção no ultravioleta e do visível (UV-Vis).....	54
5.3.2 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	59
5.4 Caracterização dos filmes poliméricos em relação a interação com os extratos de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan	66
5.4.1 Ensaios de interação com a água	66
5.4.1.1 Ensaio Liberação dos extratos de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan incorporados nos filmes poliméricos.	66
5.4.1.2 Verificação da distribuição dos extratos de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan nos filmes poliméricos por espectroscopia UV-Vis.	70
5.5 Avaliações da atividade antimicrobiana	71
6. CONCLUSÕES	75
7. PERSPECTIVAS	76
8. REFERÊNCIAS	77

APENDICE A – TRABALHO APRESENTADO NO 13º CONGRESSO DA SOCIEDADE LATINO AMERICANA DE BIOMATERIAIS, ORGÃOS ARTIFICIAIS E ENGENHARIA DE TECIDOS – SLABO.....	92
---	----

1. INTRODUÇÃO

A pele é o primeiro sistema de defesa do ser humano, funcionando como uma barreira contra agentes físicos e patógenos (CRUZ e CORDOVIL, 2012). Sua função é abrigar as estruturas do interior do organismo evitando agressões do ambiente externo, incluindo as várias formas de poluição, temperatura, umidade e radiação, controlando o fluxo de substâncias para o interior ou exterior do corpo, manutenção de fatores homeostáticos como a temperatura, bem como intercedendo sensações, tais como, calor, frio, toque, dor e vibração (QUEIROZ et al., 2014). Por isso a pele deve ser reconhecida como o órgão periférico de defesa do sistema imunológico, sem essa barreira natural, agentes patógenos proliferam-se causando diversos tipos de doenças infecciosas secundárias que podem levar o indivíduo ao óbito (MOTTA et al., 2011).

Entre as injúrias que podem causar lesões a esta barreira estão as queimaduras. Estas são lesões causadas, por fatores térmicos, químicos, elétricos ou queimaduras por exposição excessiva ao sol. Esses elementos possuem ações destrutivas para os constituintes do tecido de revestimento, de abrangência total ou parcial, podendo atingir camadas mais profundas como tecido subcutâneo, ou ainda outros tecidos como músculos, tendões e ossos, provocando agravamentos posteriores como a perda de um membro ou até levar o indivíduo ao óbito. Em casos de perda dessa proteção, se faz necessário uma intervenção com o intuito de promover a viabilidade celular dos tecidos não afetados e a regeneração dos constituintes da barreira cutânea (OLIVEIRA et al., 2012).

Atualmente vários tipos de curativos e substitutos temporários de pele são desenvolvidos com base em uma gama diversa de materiais com o intuito de melhorar as condições de tratamento de pacientes agredidos com queimaduras. A classificação destes substitutos temporários varia de acordo com sua origem e sua função, os quais podem ter origem biológica, sintética ou ainda biosintética. (ORÉFICE et al., 2012)

Os substitutos temporários da pele podem ser desenvolvidos com polímeros de origem biológica, possuindo grande utilidade na medicina. Estes

biopolímeros são projetados para evitar a toxicidade (OSMAN et al., 2007), auxiliando no processo de regeneração cicatricial da pele (TAN et al., 2012).

Dentre os polímeros com potencial uso como substituto cutâneo, podemos destacar o alginato. Este é um componente da parede celular das algas, composto de subunidades L-guluronato e D-manuronato dispostas aleatoriamente. Quando dissolvida em água quente e seguidamente arrefecida, o alginato toma uma consistência gelatinosa, cuja propriedade tem sido usada em diversos seguimentos alimentícios e farmacêuticos (RHIM 2004; BLAINE 1946; ABBAH et al., 2012).

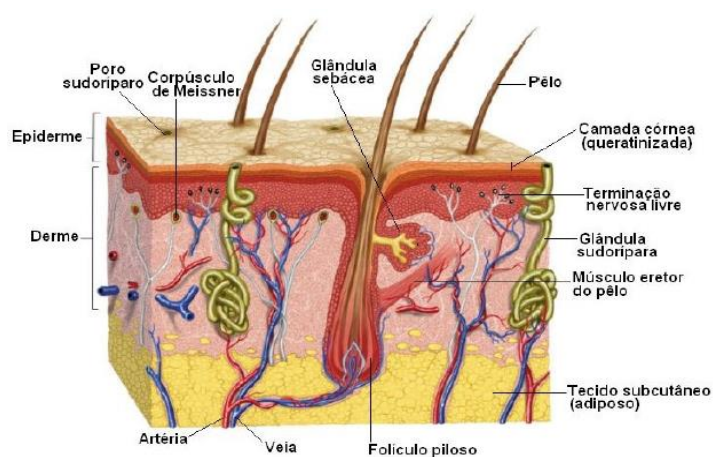
Uma das características ideais para um substituto temporário de pele é ter ação antimicrobiana, com o intuito de se evitar possíveis infecções. Para tanto, comumente tem se incorporado à sua composição agentes que confirmam tal característica, como é o caso dos antibióticos (MORAES et al., 2016), entre os antimicrobianos é crescente o interesse por fitoterápicos, medicamentos de origem vegetal que comprovadamente apresentam eficácias ao combate de patógenos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Pele

A pele é nosso primeiro sistema de defesa contra agentes danosos ao nosso corpo. Definido como maior órgão do corpo humano, apresenta características heterogêneas diferentes de acordo com o local do corpo onde está localizada atingindo 16% do peso corpóreo. Entre as funções desse revestimento destacam-se a conservação homeostática, controle hemodinâmico, percepção sensorial, proteção contra agentes biológicos, físicos e químicos. Formada pela epiderme e a derme, a camada subjacente, chamada de subcutânea, a hipoderme não faz parte da pele, mas serve de união a órgãos e outros tecidos. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013; SOUTO et al., 2016) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática da pele.



Fonte: Camargo, 2006.

A pele apresenta diversas características proporcionadas pelas suas camadas e seus anexos. A camada mais superficial a epiderme, barreira queratinizada que protege o organismo de atritos, desidratação e infecções de micro-organismos. Terminações nervosas sensoriais recebem informações externas ao corpo constantemente, levando ao sistema nervoso central (SNC). A epiderme, através da melanina, pigmento produzido e depositado na camada epitelial, apresenta proteção contra radiação ultravioleta (UV), síntese de vitamina D₃, além de células do sistema imunitário atuantes contra ações de

micro-organismos. Além dessas estruturas a pele possui estruturas anexas: os pelos, unhas e glândulas. A epiderme ao ser observada ao microscópio, como a camada mais próxima da derme à superfície observam-se cinco camadas:

- **Camada basal:** Constituída por células prismáticas na base da membrana basal, limite entre a derme e a epiderme. É uma camada rica em células tronco, responsável, juntamente com a camada espinhosa, pela manutenção constante da epiderme (SOUTO et al., 2016).
- **Camada espinhosa:** Apresenta células cuboides ligeiramente achatadas, com feixes de queratina em sua matriz citoplasmática que se unem entre as células vizinhas através dos desmossomos. São essas estruturas que juntas promovem maior coesão entre as células aumentando a resistência ao atrito (REHDER et al., 2004; SOUTO et al., 2006).
- **Camada granulosa:** Camada com células achatadas dispostas entre 3 a 5 fileiras. A matriz citoplasmática dessas células é rica em grânulos de querato-hialina. Essa deposição proteica contribui para tornar a pele impermeável a água, impedindo a desidratação corpórea. (REHDER et al., 2004; SOUTO et al., 2006).
- **Camada lucida:** camada constituída por células achatadas sem núcleo e organelas citoplasmáticas. O interior citoplasmático rico em filamentos de queratina.
- **Camada córnea:** Repleto de células achatadas cujo citoplasma é constituído por queratina e outros seis polipeptídios. A composição dos filamentos de queratina é modificada com a diferenciação celular dos queratinócitos. É nessa camada que os filamentos de queratina se aglutinam com os grânulos de querato-hialina. (REHDER et al., 2004; SOUTO et al., 2006). Na pele mais fina é frequente a ausência das camadas granulosa e lucida.

A derme apresenta espessura variável, sendo, por exemplo, mais espessa nos pés. Esse tecido conjuntivo é formado por duas camadas:

- **Camada papilar** é mais delgada, constituída por tecido conjuntivo frouxo. Constituídas de fibrilas de colágenos inseridas na camada basal penetrando profundamente a derme com função de adesão entre a derme e a epiderme. Os vasos sanguíneos presentes são responsáveis pela nutrição e oxigenação da epiderme (DE CARVALHO et al., 2011).

- **Camada reticular** apresenta-se mais espessa, formada por tecido conjuntivo denso. Também constituída de fibras elásticas que contribuem pela elasticidade da pele, além dos vasos sanguíneos e linfáticos e células nervosas é nessa camada que é encontrada estruturas derivadas da epiderme: folículos pilosos e as glândulas sebáceas e sudoríparas (DE CARVALHO et al., 2011).

2.2 Queimaduras e agentes agravantes

A queimadura é um dos traumas mais danoso que pode atingir o homem, e considerada uma das causas frequentes de mortalidade e de graves sequelas. Segundo o portal Brasil (2013) com pesquisa realizada e publicada na última década, no Brasil, este tipo de trauma contribui como um dos fatores relacionados aos acidentes domésticos que acarretam em morte em crianças de 0 até 9 anos de idade. Os dados do DATASUS (2016), apurados de maio de 2015 a maio de 2016, demonstram a ocorrência de cerca de 26.200 casos de queimaduras e corrosões, tratados pelo SUS (sistema único de saúde), não sendo contabilizados os pacientes que não procuraram atendimento hospitalar. O custo nacional, para esse mesmo período com estas internações, foi de aproximadamente R\$: 58.900.000,00.

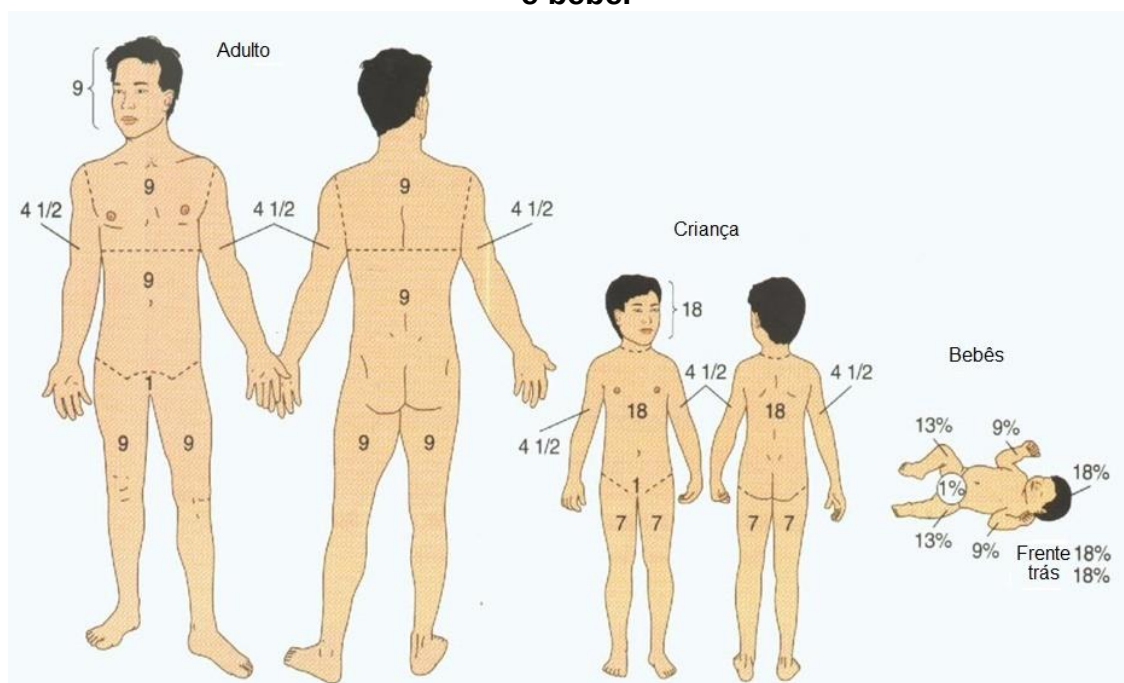
Segundo Linde et al. (2013), o tempo necessário para a cura da queimadura é um dos principais fatores que determina o desenvolvimento de complicações. Para colaborar com esses dados, de acordo com a maior parte da literatura pesquisada, um dos fatores relacionados à mortalidade é a infecção secundária decorrente do tempo e dos cuidados necessários para a cura (CARVALHO et al., 2013; CHAVES et al., 2013).

Para se determinar o tempo real de cura faz-se necessário observar a profundidade total da queimadura que só pode ser determinada após sua evolução. Uma infecção ou uma instabilidade hemodinâmica pode aprofundar a lesão, em decorrência disso o processo de reposição volêmica produz vários radicais livres que levam a danos adicionais aos tecidos, isto permite que uma lesão de espessura parcial superficial evolua para espessura total depois de 72 h da lesão.

De acordo com o levantamento de Pereira (2012) foram encontradas várias causas que podem atrasar ou impedir a cicatrização, como por exemplo: suporte ineficaz nutricional, déficit na oxigenação tecidual, infecção, necrose, ambiente seco, tamanho da ferida, idade do paciente e imunossupressão. Para evitar um efeito em cadeia que leve ao óbito ou o agravamento do quadro clínico, se faz necessária frequente observação e o controle desses fatores.

As queimaduras podem ser classificadas quanto a extensão da área corpórea afetada em que áreas do corpo somam percentuais (figura 2), e com relação à profundidade da lesão, para a última, podemos classificar de acordo com graus de 1 a 3 de acordo com a estrutura tecidual atingida. (quadro 1).

Figura 2. Regra dos nove de Wallace em adultos, adaptação para criança e bebê.



Fonte: Ministério da Saúde 2012.

O cálculo da extensão do agravante da lesão varia de acordo com a idade. Para a classificação da extensão normalmente utiliza-se a conhecida regra dos nove, criada por Wallace e Pulaski, a chamada superfície corporal queimada (SCQ). Para superfícies do corpo com menor extensão ou que as lesões atinjam locais isolados do corpo, utiliza-se para o cálculo da área queimada o tamanho da palma da mão (incluindo os dedos) do paciente, o que equivale a 1% da SCQ (Figura 2).

Quadro 1 - Classificação da queimadura quanto à profundidade

Grau de Queimadura	Característica
1º grau	Geralmente associadas à exposição excessiva ao sol, não comprometem o comportamento hemodinâmico.
2º grau	Variam entre superficiais ou profundas conforme as lesões na camada dérmica apresentam flictenas.
3º grau	Geralmente ocorre destruição da pele por completo (epiderme e derme) atingindo o folículo piloso.

As lesões causadas por queimaduras causam calor excessivo danificando os tecidos e acarretando em morte celular. Essas lesões quando afetam a pele são classificadas quanto à profundidade do primeiro a terceiro grau. Porém há casos em que a queimadura afeta tecidos inferiores como músculos, tendões, articulações, ossos, cavidades, apresentam gravidades ainda mais severas e são denominadas como queimaduras de 4º grau. Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), o controle de infecção vem mostrando ser uma medida que contribui para a redução significativa da morbidade de pacientes com queimaduras com ampla extensão, devido a estimulação de processos inflamatórios sistêmicos, nas lesões externas, são encontradas moléculas na pele como, fibronectina, fibrinogênio e colágeno que ficam expostas na superfície da lesão. Diversas espécies bacterianas possuem receptores específicos para tais moléculas, o que facilita as infecções por bactérias. Portanto, a frequente avaliação microbiológica da ferida é necessária em pacientes queimados internados para que se mantenha um acompanhamento adequado para o controle de infecção (HENRIQUE et al., 2013. MILLAN et al., 2012. MACEDO e SANTOS 2006).

O tipo mais comum de complicação infecciosa no queimado é a infecção da corrente sanguínea que pode ser causada por instrumentos que auxiliam no tratamento do paciente (MACEDO e SANTOS 2006). As principais bactérias causadoras de infecção são: *Staphylococcus* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas* sp, *Klebsiella*. (HENRIQUE et al., 2013. MILLAN et al., 2012; MACEDO e SANTOS 2006, LIMA et al., 2014)

As feridas usualmente são colonizadas nas primeiras 48 h por bactérias Gram-positivas pós-queimadura, o que pode ser reduzido com a terapia tópica

de agentes antimicrobianos. Eventualmente (após uma média de 5 a 7 dias), estas feridas são posteriormente colonizadas por outros micro-organismos, incluindo bactérias gram-negativas, leveduras e derivados da flora gastrointestinal e da flora do trato respiratório superior ou até mesmo do ambiente hospitalar que são transferidas pela manipulação dos profissionais de saúde (ZANETTI et al., 2007.; OLIVEIRA et al., 2009).

2.2.1 Principais bactérias presentes em queimaduras

As queimaduras promovem morte celular, queda no oxigênio tecidual e proteínas degradadas, fatores que auxiliam no crescimento de micro-organismos patógenos e oportunistas, a proliferação excessiva desses micro-organismos na pele lesionada pode provocar uma contaminação pela corrente sanguínea essa disseminação infecciosa pela corrente sanguínea e chamada de bacteremia. No período de 24 horas é possível que uma única bactéria se transforme em uma colônia num total de 10 bilhões de células (LIMA et al., 2014).

O risco de pacientes acometidos por queimaduras se agrava pela perda de defesas naturais, como a pele, e o ambiente hospitalar. Além disso, a resposta fisiológica ao estresse no paciente acometido por queimaduras é semelhante às condições fisiológicas de um paciente crítico ou com trauma severo, diferenciando-se pela sua severidade e duração. A resposta hipermetabólica após grandes queimaduras é caracterizada por resposta hiperdinâmica com aumento da temperatura corporal, aumento do consumo de glicose e oxigênio, aumento da formação de CO₂, glicogenólise, lipólise e proteólise. (LIMA et al., 2011).

Mesmo com o desenvolvimento amplo de pesquisas e modernização para o tratamento de pacientes queimados, as infecções ainda se caracterizam como um fator a ser superada, devida sua representatividade como uma das causas de óbito deste tipo de paciente (OLIVEIRA e SERRA, 2011).

Diversos estudos demonstram que o *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, são os principais patógenos encontrados tanto em amostras de sangue de pacientes queimados que apresentam evidências de

infecções por bactérias, como também na própria superfície da ferida da ocasionada por queimadura (MACEDO e SANTOS, 2006; SILVA et al., 2009; RENPEL et al., 2011).

A espécie de bactéria *Staphylococcus aureus* pertence à família *Micrococaceae* e morfologicamente são classificadas como cocos Gram-positivos agrupados em formato de cachos de uva; quanto ao metabolismo podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos; as suas colônias possuem pigmentos que variam de branco a amarelo sendo catalase positiva. Essa espécie apresenta capacidade de desenvolver doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outras (SANTOS et al., 2007).

Segundo Gelatti et al. (2009), entre os micro-organismos causadores de infecções destaca-se o *S. aureus*, os quais frequentemente podem apresentar linhagens resistentes à meticilina (MRSA). Este é o termo atualmente utilizado como referência ao *S. aureus* com resistência intrínseca a Meticilina, Flucloxacilina e Oxacilina. Infecções causadas pelos MRSA estavam anteriormente limitadas ao ambiente hospitalar, do inglês Healthcare-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, ou HA-MRSA. Atualmente infecções associadas a *S. aureus* resistentes à meticilina adquiridos ou associados à comunidade (CA-MRSA) também estão sendo detectados. As linhagens MRSA possuem um elemento genético móvel (transposon) denominado cassete cromossômico estafilocócico mec (SCCmec). As cepas HA-MRSA possuem os SCCmec dos tipos I, II e III. Por outro lado, os isolados CA-MRSA carrega preferencialmente o SCCmec do tipo IV e eventualmente o do tipo V.

Mohammed e Nigatu (2015) constatam que estas cepas têm provocado o aumento de surtos de infecções afetando tanto o ambiente hospitalar quanto ambientes de grandes aglomerados de pessoas. A falta de diagnóstico e posterior isolamento de pacientes infectados por essas cepas aumentam a possibilidade de infecção por outros pacientes dentro do ambiente hospitalar.

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) alerta sobre a capacidade de *S. aureus* resistente a oxacilina (também denominada ORSA),

causar grandes e dispendiosas infecções epidêmicas, de difícil tratamento e controle.

A utilização de extratos de origem vegetal surge como uma fonte alternativa para o combate de agentes patógenos inclusive cepas multirresistentes. (ANDRADE et al., 2014)

2.3 Biomateriais

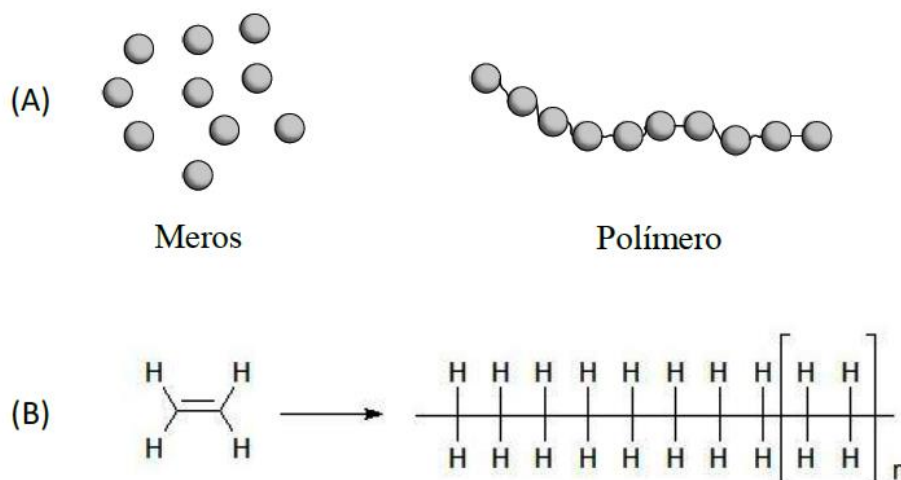
Biomaterial é qualquer material de origem biológica ou sintética utilizados para auxiliar no tratamento de agentes danosos a saúde. Tais materiais são constituintes de partes de implantes médicos, dispositivos extracorpóreos e descartáveis que são utilizados em medicina, odontologia e medicina veterinária, em todos os aspectos relacionados ao cuidado com a saúde (RECOUVREUX, 2008). Os biomateriais estão relacionados a dispositivos médicos, sobretudo em implantes internos ou externos de forma permanente ou temporária.

Um biomaterial deve apresentar a capacidade de resposta adequada a uma situação específica, além de ser aceito pelos tecidos próximos e pelas demais partes do corpo, ou seja, o material deve ser biocompatível, não devendo produzir irritação, inflamações o que pode levar a rejeição (SHIRANE et al., 2010). Dentre os biomateriais, os polímeros se destacam pela sua versatilidade e custo de fabricação.

2.3.1 Polímeros

Tem como definição pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), substâncias químicas compostas de moléculas, caracterizadas pela repetição sucessiva de uma ou mais espécie de átomos ou grupamento de átomos, que formam unidades constitucionais ligados entre si em quantidades suficientes para fornecer um conjunto de propriedades que não variam notavelmente com a adição ou remoção de uma ou de algumas (poucas) das unidades constitucionais, podendo ser obtidos de forma sintética ou natural (Figura 3) (PAOLI, 2008).

Figura 3 (A) União dos meros para a formação do polímero, (B) Estrutura química do etileno seguida da estrutura química do polietileno.



Fonte: ONOFRE, 2014.

Entre as diversas aplicações dos polímeros para aplicação como biomateriais poliméricos pode-se citar biopróteses de válvulas cardíacas confeccionadas a partir de colágeno, as resinas acrílicas para reparo do crânio e restauração dentárias, os dispositivos de liberação controlada de fármacos como aqueles produzidos a partir de policaprolactona para liberação de anticoncepcionais e hidrogéis para substitutos de pele (ORÉFICE et al., 2012).

Os polímeros podem ser de origem sintética ou natural apresentando vasta versatilidade em usos e aplicações, dentre as quais, destaca-se sua utilização no setor farmacêutico, alimentício e industrial. Seu uso na forma de biomateriais vem de longa data auxiliando o tratamento e reabilitação em pacientes acometidos por danos internos e externos ao corpo (VILLANOVA et al., 2010; BLAINE, 1946).

Atualmente os polímeros como alginato têm sido bastante empregados para a utilização como sistema de liberação de fármacos. Por definição, Sistema de Liberação de Fármaco (SLF) ou Drug Delivery System (DDS) é um sistema desenvolvido para prologar o tempo de liberação de substâncias. Em geral o encapsulamento de substâncias ou fármacos realizados por polímeros como alginato auxilia na liberação do fármaco no organismo, mantêm sua concentração plasmática além de controlar a localização temporal e espacial das moléculas *in vivo*, por meio da aplicação de princípios biológicos e

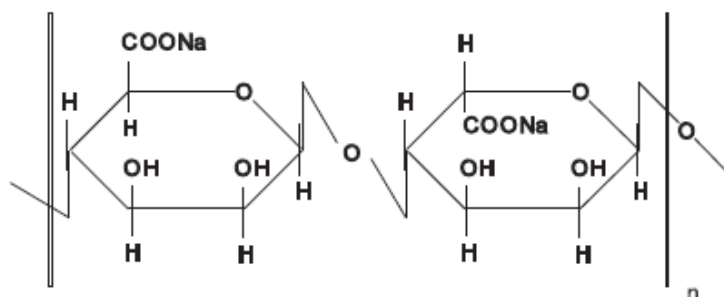
químicos. Dessa forma, alterações cíclicas na concentração são eliminadas e a disponibilidade biológica do agente encapsulado é aumentada (REHM, 2013). A utilização desses agentes encapsulantes para liberação controlada de fármacos auxilia na supressão de reações adversas e diminuição de aplicações do fármaco (Al-MUSA et al., 1999).

Dentre os polímeros naturais com potencial uso para SLF e como substituto cutâneo destacamos o alginato pelas suas propriedades físicas e químicas descritas a seguir.

2.3.2 Alginato

O Alginato tem papel estrutural na parede celular de espécies de algas e bactérias (MCHUGH 1987; GARCIA-CRUZ et al., 2008). Formado por ácidos carboxílicos compostos de subunidades monoméricas de β -D-ácido manurônico (M) e α -L ácido gulurônico (G) interligados por ligações 1,4-glicosídicas. Pode estar associado a sais como sódio (Figura 4), cálcio ou potássio (GARCIA-CRUZ et al., 2008; WANG et al., 2010).

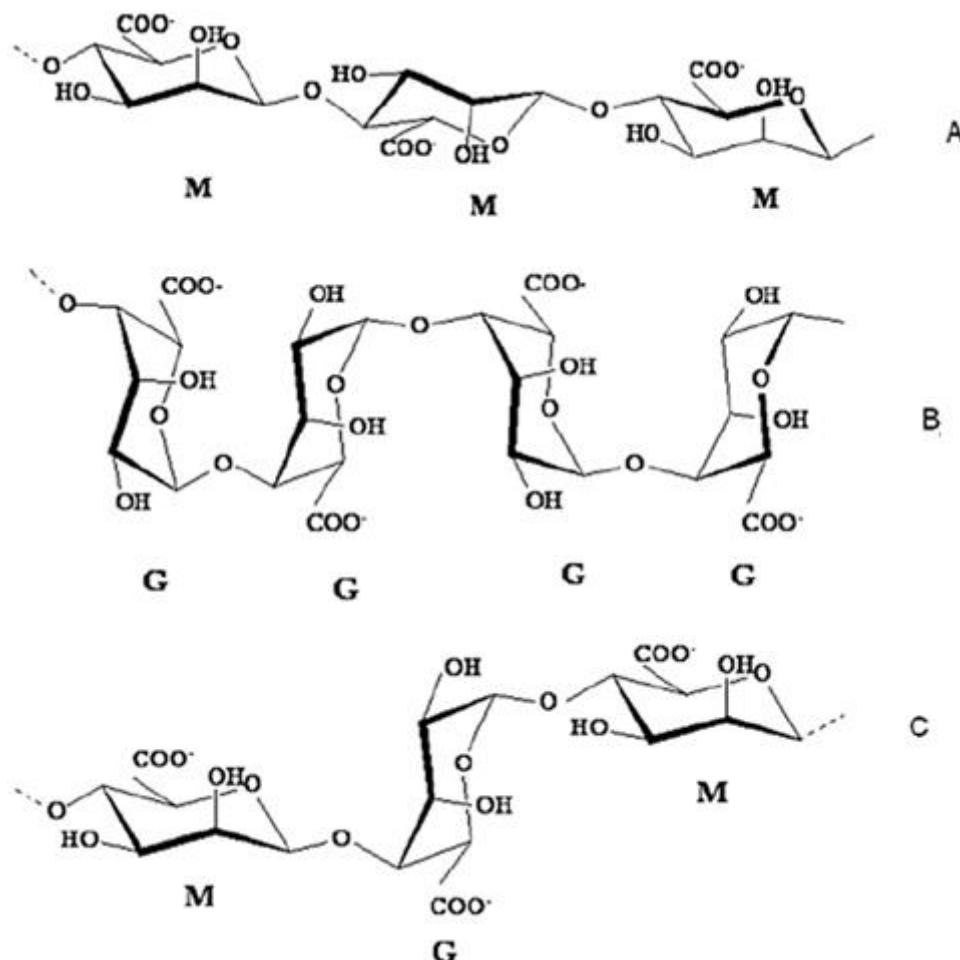
Figura 4. Estrutura química do alginato de sódio.



Fonte: Souza et al.(2008).

A organização da cadeia polimérica pode ser encontrada de três formas, a primeira constituída por regiões contendo apenas manuronato (A), a segunda região contendo apenas guluronato (B) e a terceira contendo manuronato intercalados ao guluronato (C), (figura 5) a razão entre o conteúdo dos blocos desse polímero determinara a flexibilidade da cadeia, alginato com maior porcentagem de guluronato formam géis mais rígidos e quebradiços já os géis com maior porcentagem de manuronato são mais viscoelásticos (COTTRELL et al., 1980).

Figura 5. Organização em blocos do ácido algínico.



Fonte: Garcia-Cruz et al. (2010)

Esse polímero é industrialmente extraído de algas pardas pertencentes à divisão *Phaeophyta*, grupo de algas marinhas com mais de 30.000 toneladas métricas produzidas anualmente (DRAGET et al., 2005). Esse polímero pode compor até 40% do peso seco destas algas (GARCIA-CRUZ et al., 2008). A exploração comercial de alginato de bactérias gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas* e *Azotobacter* não possui a mesma dimensão que a de algas, porem há um crescente interesse da indústria farmacêutica para extração de alginato bacteriano (BOYD e CHAKRABARTY, 1995).

Suas propriedades materiais, versatilidade e biocompatibilidade, boa biodegradação e baixa toxicidade (NICHOLAS et al., 2016), levou à utilização do alginato para aplicações médicas, incluindo curativos, entrega da droga sistemas e mais recentemente no tecido encapsulamento para a terapia regenerativa (TONNESEN e KARLSEN, 2002; QIN, 2008; LIM et al., 2010).

Alginato de grau farmacêutico tem preços mais elevados que alginato comercial, pois exige um maior grau de homogeneidade da razão G-M. Em relação a este aspecto mesmo com sua ampla utilização em aplicações biomédicas como material de imobilização, o alginato de algas sofre de problemas com estabilidade mecânica pela ampla distribuição de tamanho de poro e inchaço osmótico durante condições fisiológicas. Além de estar sujeito a heterogeneidade nas relações de resíduos G a M, (DRAGET et al., 2005; MØRCH et al., 2007; ANDERSEN et al., 2012).

Esta dificuldade tecnológica da indústria pode ser superada utilizando-se alginato produzidos por bactérias do gênero *Azotobacter* que são mais uniformes, além de apresentarem a vantagem de este micro-organismo não ser patogênicas e possuem enzimas que podem modificar a razão G/M de (REHM, 2010).

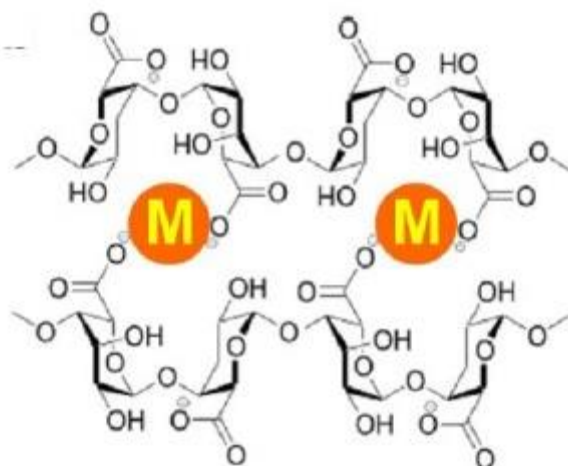
O alginato vem sendo utilizado em aplicações inovadoras na área médica e farmacêutica. Em função de suas características é utilizado como espessante, estabilizante de emulsões e de espuma, agente de encapsulação, agente de gelificação, agente de formação de filmes poliméricos e de fibras sintéticas, entre tantas outras possibilidades.

Não obstante o alginato de sódio possui a característica única de sofrer processo de reticulação na presença de cátions bivalentes, como o Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} , ou Sr^{2+} . Usualmente o íon Ca^{2+} é utilizado na forma de CaCl_2 como agente de reticulante do alginato de sódio em meio aquoso (figura 6), (SUN e TAN, 2013; NICHOLAS et al., 2016). Este fenômeno ocorre devido a sequências de G-G da cadeia de polímero que promove a reticulação com cations bivalentes (em inglês este modelo é denominado de egg-box). Este processo é utilizado para o encapsulamento de substâncias, (SMIDSROD, GLOVER, e WHITTINGTON, 1973; SMIDSROD e SKJAK, 1990) em alginato de cálcio insolúvel.

Reações de reticulação são, em geral, utilizadas para formar redes poliméricas com maior resistência o que auxilia no aprisionamento de substancias entre essas redes. Ademais, dependendo do grau de reticulação, o alginato reduz significativamente o seu inchaço na presença do solvente, geralmente resultando numa redução da permeabilidade de diferentes solutos. Como consequência, a liberação de substancias incorporadas em matrizes de

alginate será adiada, permitindo que estes sistemas sejam utilizados na liberação controlada de drogas (ABBAH et al., 2012).

Figura 6. Interação iônica entre alginato e cátions bivalentes.



Fonte: Sun e Tan, 2013.

O desenvolvimento de agentes encapsulantes para carregamento de ativos tem aumentado nas últimas décadas, pois estes apresentam tanto a capacidade de entregar fármacos de baixo peso molecular, bem como grandes biomacromoléculas, como proteínas e genes, de forma localizada ou orientada (TAN et al., 2012). Alginato tem sido amplamente adotado como um agente para imobilizar ou encapsular fármacos, moléculas bioativas, proteínas e células, por sua característica de biocompatibilidade e capacidade de serem biodegradáveis pela natureza. Muitos tipos veículos à base de alginato estão sob investigação, tais como hidrogéis, partículas coloidais, e os complexos polieletrólitos. Pesquisadores também têm estudado a combinação de hidrogéis à base de alginato, matrizes porosas para confecção de scaffolds para crescimento celular, microesferas para liberação controlada de fármacos, associação com nanotubos e substitutos temporários de pele (ABBAH et al., 2012; TAN et al., 2012; RHIM, 2004).

2.4 Substitutos cutâneos baseados em polímeros

Atualmente o esforço no desenvolvimento do tratamento de feridas de queimaduras está direcionada para melhorar a taxa de sobrevivência e melhoria ao longo prazo dos doentes acometidos por queimaduras. Para isso faz-se necessário à restauração oportuna das funções básicas da pele, como proteção mecânica e contra agentes patógenos, neste sentido, os substitutos de pele são necessários nos pacientes que sofrem desse tipo de injúria grave (HALIM et al., 2010; ALRUBAIY e AL-RUBAIY, 2009).

O foco no tratamento de feridas está voltado para reduzir os riscos causados por complicações ambientais e auxiliar na regeneração do tecido lesionado (CHANDIKA et al., 2015) sendo que vários trabalhos descrevem o uso de plantas para o tratamento eficaz de feridas (FORREST, 1982).

Tradicionalmente o uso de algodão, gazes, ataduras, usados como materiais no auxílio de tratamento de feridas, posteriormente foram adicionados substâncias com o intuito de prevenir e controlar infecções microbianas, como iodo, prata, biguanida, hexametileno (CHANDIKA et al., 2015), atualmente outros tipos compostos são inseridos ao tratamento de feridas.

Quanto a outros materiais existem diversos tipos que auxiliam no tratamento de injúrias à de tecidos, estes podem ser baseados em polímeros naturais como gelatina (NINAN et al., 2014; DUAN et al., JIN et al., 2013; DUBSKÝ et al., 2012), colágeno (WANG et al., 2013; GUO et al., 2011; JUDITH et al., SOLLER et al., 2012; WONG et al., 2010), fibrina (LOSI et al., 2013), quitosana (KIM et al., 2008; MUZZARELLI et al., 2009), peptídeos (SCHNEIDER et al., 2008), alginato (RHIM, 2009), como em polímeros sintéticos como Poli L- Ácido láctico (MOHITI et al., 2014), PGLA (SUN et al., 2014), poli etileno glicol – poli DL-lactídio (YANG et al., 2011). Ou ainda a associação entre polímeros naturais e sintéticos. No geral esses materiais são utilizados por apresentarem características desejáveis como substituto de pele devido sua: biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa imunogenicidade, acelerar a proliferação celular, apresentar função antibacteriana (MANSOURZADEH et al., 2015).

A aplicação dos substitutos de pele requer considerações prévias importantes para o adequado tratamento da lesão. Fatores como profundidade da queimadura, probabilidade de infecção da ferida, local da queimadura, probabilidade de contratura, custo relativo. Os substitutos devem fornecer uma

solução para cobrir a ferida, reduzir ou remover fatores inibidores de cicatrização de feridas, redução da resposta inflamatória (HALIM et al., 2010; ALRUBAIY e AL-RUBAIY 2009).

Segundo Halim et al. (2010), o substituto cutâneo considerado ideal deve possuir propriedades comparáveis às da pele humana além das seguintes características:

- Resistência à infecção
- Prevenção contra perda de água
- Capaz de suportar as forças de cisalhamento
- Custo efetivo
- Matéria prima amplamente disponível
- Longa vida útil e facilidade de armazenagem
- Ausência de antigenicidade
- Espessura Flexível
- Durabilidade
- Boa conformidade em superfícies irregulares
- Fácil aplicação

Segundo Nicholas (2016), apesar de cada substituto ser único em suas características é desejável que o substituto de pele ideal apresente cinco características prescindíveis, como:

- Barreira Semipermeável

A destruição da pele permite a entrada de patógenos, que resulta em infecções severas, esse ataque de patógenos em condições agudas como em pacientes queimados dificulta ainda mais o processo de cura do paciente. A esse fato se faz necessário a presença dessa barreira, que apresente ação para combater agentes patógenos.

- Aderência celular

O substituto deve além de permitir a aderência celular, dar condições ambientais para viabilidade, proliferação e diferenciação celular. As funções celulares e suas migrações sofrem influências pela morfologia, espessura, porosidade e conexões entre os poros de um substituto temporário de pele. O polímero utilizado para confecção do substituto temporário afeta diretamente as propriedades celulares.

- Não toxicidade, ação anti-inflamatória e não imunogenicidade

O processo inflamatório pode causar rejeição do substituto introduzido, que causa rápida eliminação das células e rápida degradação do dispositivo aumentando o risco de entrada de patógenos. Um substituto ideal previne rejeição, como em casos de resposta imunológicas. Outra preocupação diz respeito aos enxertos de pele sintéticos em que o risco de rejeição depende da toxicidade e do efeito imune nas células causadas pelos compostos utilizados na confecção dos enxertos.

- Durabilidade, maleabilidade e biodegradabilidade.

Outra característica ideal é a durabilidade do material mantendo sua característica sob estresse por cisalhamento, apresente maleabilidade suficiente para cobrir as áreas afetadas como joelhos e quadris. Deve ser biodegradável ao ponto que a derme já tenha sido reconstruída, para isso sua degradação não deve ser tão rápida.

- Baixo custo

O tratamento utilizando substituto de pele salva vidas, porém seu custo nos Estados Unidos chega a cem mil dólares por pessoa. O que traz a tona à importância de criar substitutos de baixo custo e com mesma eficácia no uso.

2.5 Filmes poliméricos de alginato como substitutos temporário de pele

Os filmes produzidos como polímeros naturais surgem como uma alternativa para o uso como substituto temporário de pele. Por apresentar

características desejáveis de um substituto temporário. Existem atualmente diversos tipos de pesquisa que visam à produção de filmes baseados em polímeros naturais, e a incorporação de extratos de plantas, com uma potencial ação antimicrobiana e cicatrizante. O alginato surge como uma alternativa para o uso como substituto temporário de pele, pela sua característica de aprisionar substâncias quando associados a íons bivalentes. Por apresentar características importantes o uso de alginato com o intuito de utilização como substituto temporário vem sendo amplamente estudado.

Existem diversos fatores benéficos na utilização de polímeros naturais como utilização de substituto temporário de pele entre eles incluem: redução da população densidade de bactérias na superfície da ferida; redução da perda de água por evaporação e a perda de calor de uma ferida aberta; prevenção de nova contaminação da ferida, e prevenção de danos físicos ao tecido (EVANS et al., 1987).

A capacidade dos filmes de alginato manter uma matriz com menor hidrofilicidade na presença de agentes reticulantes como cátions bivalentes, agir como agente de aprisionamento de substâncias como fármacos, auxilia na liberação controladas de substâncias com efeito terapêutico (OSTBERG et al., 1994).

A utilização de extratos de planta para usos terapêuticos associados aos filmes poliméricos acrescenta características de combate a agentes patógenos.

A. colubrina (Vell.) Brenan, surge como um mecanismo potencializador ao combate de patógenos (BARRETO et al., 2015), associados a infecções causadas pela perda da cutis, além de sua ampla utilização popular para combates de feridas e injúrias a pele (PESSOA et al., 2012).

2.6 *Anadenanthera colubrina*

Anadenanthera colubrina, é uma espécie da família Fabaceae de ampla distribuição na América do Sul incluindo Argentina, Venezuela e Bolívia (Weber et al., 2011). Sua origem no território brasileiro é considerada nativa, sua distribuição geográfica pelo território brasileiro acontece na região Sudeste (Minas Gerais), Centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e Nordeste (Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio

Grande do Norte, Sergipe). São diversos os nomes vernáculos que variam de acordo com a região do território brasileiro, entre eles o mais popular é o angico (LORENZI, 1992).

A espécie é caracterizada como planta decídua, heliófila, pioneira, suportando sombreamento leve enquanto jovem. Caducifólias durante a estação seca regional (ARAÚJO, 1990) com variação do tamanho entre 20 a 30 m de altura quando adultas (CORREIA, 1975). Tronco cilíndrico corpo lenhoso. Tronco ligeiramente torto e mais ou menos cilíndrico. Ramificação dicotômica, tortuosa e irregular. Copa em forma de umbela, bastante ramificada, galhos espalhados e grossos. Casca com espessura de até 20 mm. A casca externa é lisa, branca-acinzentada a cinza-escura, áspera e provida de fendas finas longitudinais. A casca interna é levemente avermelhada. Folhas compostas bipínadas, paripinadas; raque da folha com 15 a 20 cm de comprimento, com 15 a 35 pares de pinas multifoliolados; folíolo linear, assimétrico na base, obtuso, com costa média centralizada, margem ciliada e com um tufo de pelos. Pecíolo com 3 a 5 cm de comprimento. As folhas apresentam glândulas: uma glândula cônica séssil próxima ao pulvínulo (na base do pecíolo) e 1 a 4 glândulas verde-avermelhadas nos últimos pares de folíolos. Período de floração acontece durante a estação seca entre novembro a janeiro, suas flores apresentam-se brancas amareladas, pequenas, reunidas em inflorescências terminais, em panículas de glomérulos com até 40 cm de comprimento. O fruto: folículo deiscente por meio de uma fenda única, coriáceo, com as margens constrictas, marrom-escuro, estreito, com 11 a 30 cm de comprimento e 10 a 15 mm de largura, com uma ligeira constrição entre as lojas seminais, estipe de 10 a 20 mm de comprimento, com cinco a 15 sementes. Semente: escura, brilhante, orbicular, achatada, com ala estreita e sem pleurograma, com até 15 mm de comprimento. (CARVALHO 2002, LORENZI e MATOS 1992).

O uso popular de diversas partes da planta está relacionado ao combate de inflamações, gripe, dor nas costas, inflamação uterina, doenças venéreas. Tratamento da tosse, tosse crônica, bronquite, tratamento de feridas geral sua ação está relacionada à presença de metabolitos secundários como compostos fenólicos, triterpenos e quinonas.

Andrade et al. (2013) desenvolveram ensaios com extratos de casca de *A. colubrina* (Vell.) Brenan, constatando a atividade antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus* multiressistentes. Sua atividade está relacionada a compostos: como flavonoides, triterpenoides e compostos fenólicos.

A incorporação do extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan adiciona ao substituto proposto características de combate a infecções bacterianas, combate a inflamações e auxílio no combate de feridas cutâneas.

2.7 Metabólitos Secundários

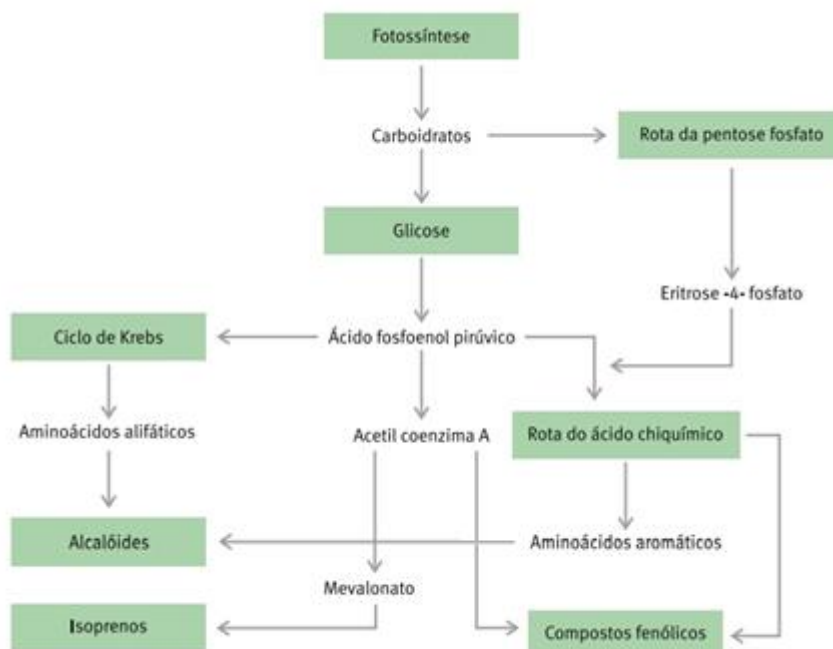
As plantas desenvolveram importantes substâncias responsáveis pela adaptabilidade aos seus ambientes e a predadores. Essas substâncias normalmente são produzidas pelo metabolismo secundário. Os metabólitos secundários são micromoléculas que geralmente apresentam baixo peso molecular e estruturas complexas e atividades biológicas que diferem das moléculas do metabolismo primário. Suas concentrações nos organismos que as produzem são relativamente baixas e encontradas em determinados grupos vegetais. São estes metabólitos, por exemplo, que atuam como agente primário de defesa dos vegetais e agente de interações entre o organismo vegetal conhecido como alelopatia, mecanismo de competição entre plantas, provavelmente por fornecimento de recursos como água, luz e nutrientes. Sob o ponto vista tecnológico, os metabólitos apresentam um potencial gigantesco para diversas áreas como medicamentos, cosméticos e agroquímicos.

A produção de metabólitos secundários por espécies vegetais é resultado de influência de três fatores principais: hereditariedade, ontogenia (estágio de desenvolvimento) e ambiente (ROBBERS et al., 1996).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e ácido mevalônico, alguns exemplos são: flavonoides, taninos e ligninas. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto) tem como representantes os óleos essenciais, saponinas, carotenoides e a maioria dos fitoreguladores. Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de

aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina), nicotina, cafeína e vincristina são alguns exemplos de alcaloides.

Figura 7. Esquema simplificado das rotas biossintéticas para produção de compostos Fenólicos, isoprenóides e alcalóides



Fonte: Adaptado de Dechen, (1999).

Esses metabolitos são consumidos pelos seres humanos por meio da ingestão de alimentos de origem vegetal como legumes, frutas e vegetais. Esses fitoquímicos geram proteção contra várias doenças como câncer e problemas cardíacos.

Os metabolitos secundários são classificados de acordo com suas rotas Biosintética (DECHEN 1999).

2.7.1 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos apresentam em sua estrutura anéis aromáticos e hidroxilas, podem ser encontrados como monômeros ou polímeros e apresentam-se como potente ação antioxidante. Além do mais, esses compostos podem estar encontrados na forma livre ou complexados a açúcares e proteínas. Dentre estes compostos fenólicos destacam-se os

taninos, tocoferóis, e os ácidos fenólicos, todos compostos naturais (ANGELO e JORGE, 2006; ABE et al., 2007; SOARES, 2002).

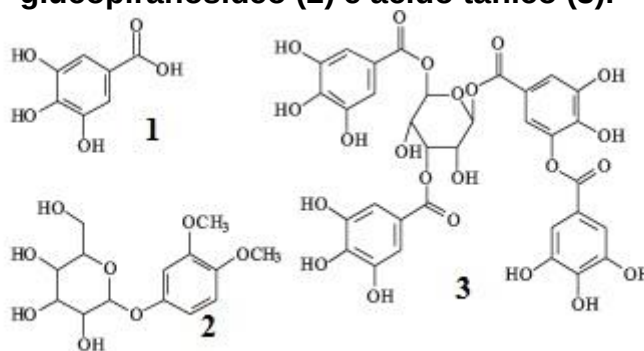
Taninos são classificados segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Em geral taninos condensados estão presentes em plantas lenhosas, já os taninos hidrolisáveis ocorrem em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas.

Taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico (ANGELO e JORGE, 2006; MANETTI et al., 2009). Já os taninos condensados, chamados de proantocianidinas, são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), produtos do metabolismo do fenilpropanol.

Plantas que apresentam grande quantidade de taninos são empregadas na medicina tradicional como remédio para o tratamento de diversas patologias fisiológicas tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e sistema excretor urinário e processos inflamatórios.

Dentre suas atividades biológicas podem-se citar: ação bactericida e fungicida, antiviral (DAGLIA 2011; HWANG et al., 2015), inibição enzimática como glucositransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (HATTORI et al., 1990 e OOSHIMA et al., 1993) e ação antitumoral (ROTINBERG et al., 2000).

Figura 8. Compostos fenólicos: ácidos gálicos (1), 3,4-dimetoxifenil- β -D-glucopiranosídeo (2) e ácido tânico (3).



Fonte: Manetti et al. (2009).

Siqueira et al. (2012) realizaram análises que determinaram a presença de taninos e flavonoides na casca de *A. colubrina*, esses compostos estão associados a cicatrização de feridas e atividade anti-inflamatória. Este mesmo trabalho evidenciou grandes teores de taninos nessa espécie.

As análises fitoquímicas em *A. colubrina* indicaram a presença de componentes fenólicos (Lorenzi e Matos 1992).

Estudos de Araújo et al. (2015) demonstram a presença de três compostos fenólicos como compostos majoritários na casca de *A. colubrina* (Vell) Breman, a Epigallocatequina galato, hiperina e o galato compostos que estão associados a ações antioxidantes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver filmes poliméricos baseados em Alginato com incorporação de extrato de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, para serem utilizados como um potencial substituto temporário de pele.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar extratos com diferentes teores hidro alcoólicos de cascas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan.
- Produzir filmes baseados em alginato com ou sem reticulação iônica e com e sem extratos de cascas de *A. colubrina* (Vell.) Brenan.
- Determinar propriedades dos filmes de acordo com suas características físicas (espessura, umidade e transparência), distribuição de incorporação de extrato (quando houver) e por espectroscopia UV-Vis e Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR);
- Avaliar a capacidade de liberação de extratos dos filmes produzidos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana filmes produzidos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção do extrato de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

Foram coletadas as cascas do *A. colubrina* (Vell.) Brenan no município de Altinho (8°29'32"S × 36°03' 03"W), Pernambuco, a área de amostragem específica fica localizada na comunidade do Carão (08°35' 16,1"S × 36°05 ' 36,1" W), comunidade rural localizada 16 km do centro do município. Esta comunidade está localizada na região de caatinga (ARAÚJO et al., 2007; BRASIL, 2011). Foram coletadas amostras de mais de três indivíduos com o intuito de minimizar possíveis efeitos idiossincráticos, especialmente genéticos. Depois da coleta, as amostras foram submetidas à secagem em estufa a 42°C com circulação forçada de ar. Após a secagem as amostras foram cortadas com auxílio de tesoura de poda e posteriormente trituradas em moinhos de facas no laboratório de produtos naturais da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, obtendo-se como resultado o pó da casca. Com a pesagem da amostra, 200 gramas dessa foram extraídas em uma solução etanol-água (8:2) e, em etanol-água (5:5), em três extrações sucessivas. E ao final de cada extração o extrato fluido foi submetido à destilação a vácuo em evaporador rotativo até no máximo 45°C e disposto em dissecador até peso constante. A produção foi realizada no laboratório de biofísica química (LBQ) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Por fim foram obtidos dois tipos de extratos da casca de *A. colubrina* (Vell.) Brenan, 80% alcoólico e 50% alcoólico.

4.2 Filmes de alginato

As quantidades utilizadas para a preparação dos filmes de alginato (FA) estão descritas na tabela 1. Para a preparação foram dissolvidos em 30 mL de água destilada. Essa mistura foi aquecida e mantida sob agitação até total dissolução o que pode variar entre 60 a 90 minutos, em seguida foi adicionado glicerol e despejada em placa de Petri com 9 cm de diâmetro e uma área de 63,5 cm², e levados a uma estufa de secagem por 24 horas.

Tabela 1. Quantidades por área da matéria prima empregada para síntese dos filmes

	Concentração por g/cm ²	Marca	Tratamento
Alginato	0,007	Dinâmica	FA; FA50; FA80; FACa; FACa50; FACa80
Glicerol	0,018	Nuclear	FA; FA50; FA80; FACa; FACa50; FACa80
CaCl ₂	0,006	Vetec	FACa; FACa50; FACa80
Na ₂ PO ₄	0,566	Vetec	FACa; FACa50; FACa80
Extrato de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan (50 ou 80%)	0,001		FA50; FA80; FACa50; FACa80

FA, filme de alginato; FA50, filme de alginato com *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50%; FA80: filme de alginato com *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80%; FACa50, filme de alginato reticulados com cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50%; FACa80, filme de alginato reticulados com cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80%.

As quantidades para a síntese dos filmes com extratos 50% (FA50) e 80% (FA80) estão descritas na tabela 1 e seguiram o mesmo protocolo de dissolução do alginato descrito para o filme (FA), sendo que após o acréscimo do glicerol foram adicionados os extratos (50% ou 80%) diluídos em 10 mL de água, e vertidos na placa de Petri e levados a estufa.

Os filmes com extratos 50% (FA50) e 80% (FA80), seguiram o mesmo protocolo de dissolução do alginato descrito para o filme (FA), sendo que após o acréscimo do glicerol foram adicionados os extratos (50% ou 80% de acordo com a tabela 1) diluídos em 10 mL de água, e vertidos na placa de Petri e levados a estufa.

A tabela 1 indica as quantidades utilizadas para a produção dos filmes de alginato reticulados com cálcio (FACa), o alginato foi dissolvido em água tipo I e sem seguida acrescido do agente de escoamento Na₂PO₄.2H₂O, posteriormente foi adicionada solução cloreto de cálcio e glicerol (nesta ordem) a solução foi mantida sob agitação e vertida placa de Petri e levadas a estufa.

Em relação aos filmes reticulados com cálcio e incorporados com extratos de *A. colubrina* (Vell). Brenan 50% (FACa50) e 80% (FACa80) seguiram a mesma metodologia do filme reticulado com cálcio (FACa) sendo que após a adição do glicerol, foram adicionados os extratos (50% ou 80%) diluídos em 10 mL de água tipo I e vertidas em placa de Petri levados a estufa.

4. 3 Determinação das propriedades morfológicas

4.3.1 Espessura

A espessura dos filmes foi obtida com auxílio de um micrômetro 6" (Zaas precision), de precisão 0,01 mm. Foram realizadas medidas de cada tratamento, em duplicata, tomando-se medida de 5 pontos diferentes de cada amostra, totalizando 10 medidas para cada tratamento. Os resultados foram expressos através da média das medidas de cada tratamento.

4.3.2 Transparência

Para determinação os graus de transparência dos filmes poliméricos produzidos foram mensurados as absorbâncias dos filmes a 600 nm (utilizando-se o espectrofotômetro de absorção UV-Visível modelo UV 1800 UV ESPECTROFOTOMETRO (SHIMADZU – Japão), operado pelo Software UV Probe) e suas respectivas espessuras, tendo sua magnitude calculada através da descrita por Fang et al. (2002), utilizando a equação 1. Um valor baixo de T representa menor transparência do filme. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os valores negativos de transparência foram considerados não transparentes.

$$T = \frac{-\log A_{600}}{x}$$

Equação 1

Onde:

T = Transparência

A₆₀₀ = absorvância em 600 nm

x = espessura dos filmes em mm

4.3.3 Teor de umidade

O teor de umidade dos filmes foi avaliado através da medida de perda de peso. Para isso, amostras de cada filme, em triplicata, foram pesadas em balança analítica (Shimadzu AUY 220) e em seguida aquecidas em estufa de secagem (Nova Técnica NT513) a 105 ± 1 °C em tempos pré-estabelecidos de 1 hora. As amostras foram acondicionadas em um dessecador até atingirem a temperatura ambiente, em seguida elas foram novamente pesadas, esse procedimento foi repetido até que as amostras mantivessem o seu peso constante. A umidade contida nas amostras foi relacionada à perda de peso, de acordo com a equação 2 (MOURA et al., 2014).

$$U\% = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100$$

Equação 2

Em que:

U% = porcentagem de umidade

M_i = Massa inicial

M_f = Massa final

4.4 Análises Espectroscópicas

4.4.1 Espectrofotometria de Absorção Eletrônica na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

As medidas de absorção na região do UV-Vis, dos filmes, foram realizadas através de análises de varredura na região de 200 a 600 nm. As análises foram feitas no Laboratório de Biofísica-Química do Departamento de Biofísica da UFPE, utilizando-se o espectrofotômetro de absorção UV-Visível modelo UV 1800 UV espectrofotômetro (SHIMADZU – Japão), operado pelo Software UV Probe, que permite o armazenamento de dados.

Nesse trabalho as análises espectroscópicas na região do UV-vis foram utilizadas para caracterizar os extratos de *A. colubrina*, nos seus dois teores hidro alcoólicos (50 e 80%). Adicionalmente, foram realizados ensaios para determinação de curvas de calibração utilizando ácido tânico e extratos a 50 e 80%. Também foram mensuradas as absorbâncias dos filmes com incorporação dos extratos produzidos para verificar a distribuição dos mesmos nos produzidos para tanto foram utilizadas 10 amostras para cada filme produzido.

4.4.2 Espectroscopia de Absorção Vibracional na região Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Foram realizadas análises de FT-IR na faixa de número de onda de 4000 a 650 cm^{-1} , para os filmes de alginato, para os filmes de alginato incorporados com extratos de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50% e 80%, para os filmes de alginato com cálcio incorporado com extratos de *A. colubrina* 50% e 80%, filme de alginato, estrutura do alginato de sódio (pó) e para o glicerol, dos extratos (pó) de *A. colubrina* 50% e 80% com o intuito de observar de observar possíveis interações entre os componentes utilizados para a síntese dos filmes. As análises foram realizadas no Laboratório de Biofísica-Química do Departamento de Biofísica da UFPE. O equipamento utilizado foi o Spectrum 4000 FT-IR/FT-NIR Spectrometer.

4.5 Ensaios de liberação de extratos de *A. colubrina* (Vell.) Brenan dos filmes poliméricos

Para a avaliação preliminar da liberação do extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan através dos filmes de alginato, discos de filme com 3 mm de diâmetro foram adicionados a 10 mL de água tipo I. Os filmes permaneceram em água por 24 horas, em sistema estático.

Durante esse período foram retiradas seis alíquotas de 2 mL em seis intervalos e colocada em uma cubeta de 4 mL, em seguida foi mensurada a absorção em 282 nm (região correspondente a compostos fenólicos) em espectrofotômetro UV-Vis modelo UV 1800 UV (SHIMADZU – Japão). As análises foram feitas em triplicata e como controle foram utilizados filmes sem a incorporação de extratos (FA e FACa).

4.6 Atividade antimicrobiana

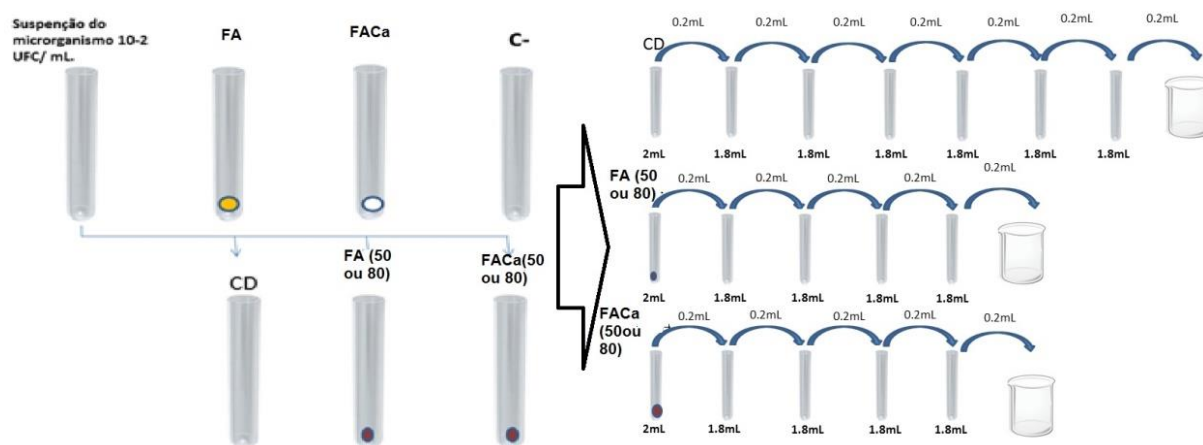
Inicialmente foram realizados ensaios de atividade antimicrobiana utilizando o método de difusão em disco proposto por Bauer et al. (1966) modificado. Para isso, foram cortados discos de 6 mm de diâmetro de cada filme a ser testado. Os discos foram colocados sobre a superfície do meio semeado com as suspensões da coleção de micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE: *Staphylococcus aureus* isolado de ponta de cateter (UFPEDA 700), *Staphylococcus aureus* isolados de ferida operatória (UFPEDA 711, 725 e 731) padronizadas de acordo com a turvação que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL (unidade formadora de colônia/ mililitro), para bactérias, em placas de Petri. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após o período de incubação foi realizada a leitura dos resultados, pela medição do diâmetro do halo de inibição formado em volta do disco. Os testes foram realizados em triplicata.

Foi realizada também antimicrobiana empregando o método de difusão em meio líquido (figura 9), utilizando micro-organismos. Foram utilizadas culturas de *Staphylococcus aureus* isolado de ponta de cateter (UFPEDA 700), *Staphylococcus aureus* isolados de ferida operatória (UFPEDA 711 e 731), representantes, importância clínica em queimaduras e feridas de pele.

A partir de isolados clínicos com 24 h de cultivo, foram padronizadas as suspensões microbianas em solução fisiológica a 10^8 UFC/mL. Para a realização dos testes, 10 µL da suspensão dos micro-organismos foram adicionados a tubos contendo 2 mL de meios de cultura Mueller-Hinton (MH) líquido. A cada tubo foi adicionado um disco de 6 mm de diâmetro do filme polimérico contendo o extrato de angico (50% e 80%), em triplicata. Além disso, foram realizados os controles com tubos contendo o meio de cultura líquido e 10 µL da suspensão dos micro-organismos. O controle negativo,

continha apenas o meio de cultura e o disco do filme sem incorporação do extrato.

Figura 9. Esquema representativo do método de difusão em meio líquido.



Legenda:

FA: Branco, filme de alginato.

FACa: branco, filme de alginato reticulados com cálcio

C D: Controle direto, tubos com meio de cultura e micro-organismo.

C -: Controle negativo: tubos de ensaio apenas com o meio de cultura.

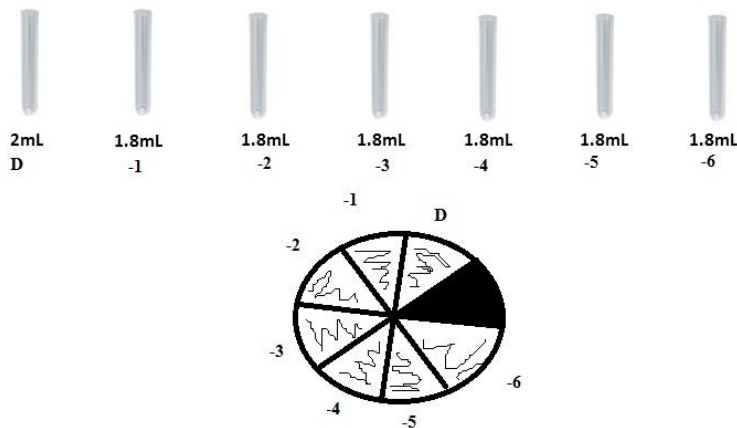
FA (50 ou 80): tubos contendo meio e filmes de alginato com adição do extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan (50% e 80 respectivamente).

FACa (50 ou 80): tubos contendo meio e filmes de alginato reticulados com cálcio com incorporação do extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan (50% e 80 respectivamente).

Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, foram realizadas comparações da turbidez dos tubos testes e controle. A partir do padrão de turvação, foram então realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} dos tubos que continham o filme polimérico incorporado com o extrato de *A. colubrina* e diluições de 10^{-1} a 10^{-6} para o controle direto, estas diluições são necessárias para que se consiga realizar a contagem das Unidades Formadoras de Colônia. Alíquotas de 1 µL de cada diluição foram semeadas por esgotamento, em meios de cultura contidos em placas de Petri (figura 10). Estas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, para a posterior contagem das

UFC. Toda a avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada no Departamento de Antibiótico da UFPE.

Figura 10. Esquema representativo das metodologias de diluição e semeio em rede.



Todos os tubos de ensaio com diluições seriadas das amostras continham 1,8 mL, foi retirado com o auxílio de alça calibrada descartável de um microlitro e semeada nas placas com meio de cultura, o experimento foi realizado em triplicata. As alças foram aplicadas de modo a serem semeadas em rede até esgotamento, para verificar a posteriormente formação ou não de colônias nas diluições seriadas.

4.7 Análise estatística

Os resultados dos ensaios foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para comparação de médias, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico Excel da Microsoft.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

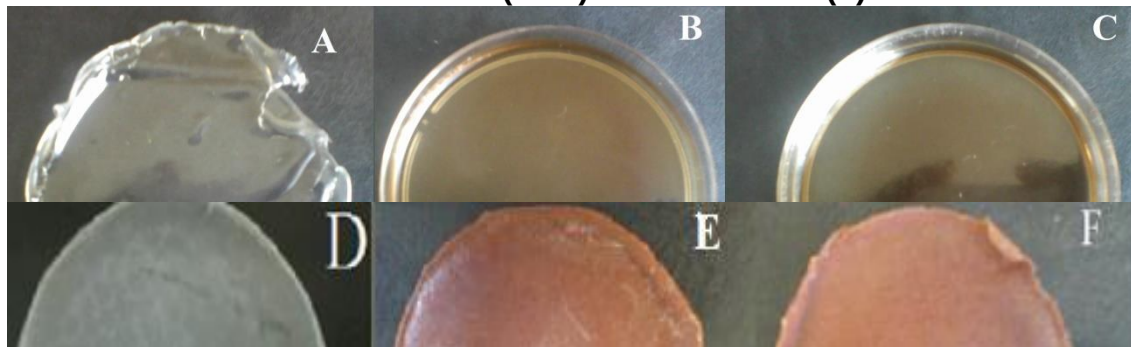
5.1 Desenvolvimento dos filmes poliméricos

Os filmes poliméricos preparados apresentaram-se macroscopicamente homogêneos e sem rachaduras (Figura 11). Os filmes poliméricos de alginato mostraram-se flexíveis e aderentes.

A partir dessa metodologia, foram sintetizados filmes poliméricos baseados em alginato com e sem a reticulação do cálcio e posteriormente incorporados com extratos de *A. colubrina*, que apresentaram semelhança entre os aspectos superficiais conforme descrito nos trabalhos de Souza (2008), Pasquine et al., (2012), Giménez et al., (2013) e Rhim et al., (2003), tais como aderência, flexibilidade e homogeneidade, salientando que nesse trabalho, os filmes poliméricos, foram sintetizados com uma quantidade menor alginato e glicerol, e apresentaram resultados satisfatórios. É importante destacar ainda, que as características observadas por inspeção visual, estão de acordo com as características requeridas para esse tipo de curativo cutâneo temporário, tais como, reologia comparada a da pele, facilidade de armazenamento, resistência ao cisalhamento e ampla disponibilidade (FERREIRA et al., 2011).

Observa-se ainda que no presente estudo houve a introdução de um agente de escoamento (Na_2PO_4) para os tratamentos que continham cálcio, esta substância foi utilizada para desacelerar o processo de reticulação das cadeias de alginato, tal estratégia permitiu a formação de filme de espessura uniforme.

Figura 11. Filme de alginato (A) FA, filme de alginato com extrato de com *A. colubrina* (Vell.) Brenan a 50% (B) FA50, filme de alginato incorporado com *A. colubrina* (Vell.) Brenan a 80% (C) FA80, filme de alginato reticulados com cálcio, (D) FACa, Filme de alginato reticulados com cálcio e incorporação do extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan a 50%, (E) FACa50 Filme de alginato reticulados com cálcio e incorporação do extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan a 80%. (F) FACa80.



Segundo Zactiti e Kieckbusch (2005), os filmes biodegradáveis podem ser utilizados como veículos de substâncias que apresente ação antimicrobiana ou antioxidante. Já a reticulação de filmes podem auxiliar tanto no aprisionamento dessas substâncias quanto na diminuição da solubilidade em água, o que pode auxiliar na liberação prolongada do extrato aprisionado (LIN et al., 2004; PILLAY e FASSIHI 1999).

5.2 Determinações das propriedades morfológicas

5.2.1 Teor de umidade

Para a avaliação do teor de umidade dos filmes de alginato e de alginato reticulados com cálcio, com e sem incorporação dos extratos de *A. colubrina*, foram verificados através das medidas de perda de peso conforme Ferreira (2005).

Tabela 2 Teor de umidade, em percentagem, para os filmes baseados em alginato com ou sem incorporação dos extratos, com ou sem reticulação do cálcio. Os resultados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão.

Teste	FA	FA50	FA80	FACa	FACa50	FACa80
Teor de umidade (%)	20,78 $\pm$ 0,004 ^{a,b}	21,33 $\pm$ 0,007 ^a	20,71 $\pm$ 0,004 ^{a,b}	18,95 $\pm$ 0,008 ^{b,c}	13,03 $\pm$ 0,01 ^d	16,87 $\pm$ 0,02 ^c

FA, filme de alginato; FAA50, filme de alginato com *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50%; FA80: filme de alginato com *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80%; FACa50, filme de alginato reticulados com cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50%; FACa80, filme de alginato reticulados com cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80%. As letras iguais expressam que não houve diferença significativa para o teste de Turkey para $p < 0,05$. Resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão.

As análises dos dados demonstram que os filmes de alginato (FA) apresentaram-se com um teor de umidade maior que os filmes de alginato reticulados com cálcio (FACa), o mesmo ocorre quando se compara as versões dos filmes com 50% do extrato (FA50 e FACa50) e 80% (FA80 e FACa80) (tabela 2).

Entretanto diferenças significativas quando se compara a adição de extrato, FA50 e FA80 não foram detectadas. Por outro lado, foram observadas diferenças de umidade entre filmes de FACa50 em relação a FACa e FACa80 (tabela 2).

Alguns fatores como a adição de cálcio, podem influenciar diretamente essa característica nos filmes poliméricos, uma delas é capacidade de tornar os filmes menos solúveis em meio aquoso (SILVA et al., 2009).

Os dados obtidos nesse trabalho estão de acordo com Rhim (2009) que desenvolveu filmes de alginato com reticulação de cálcio obtendo como resultado filmes com menor teor de umidade, o autor sugere que a interação do agente reticulante provavelmente afeta na hidrofiliidade dos filmes e, conseqüentemente, afetam a absorção de água nos filmes.

Norajit et al., (2010) desenvolveram filme de alginato reticulados com cálcio e incorporação de extratos de ginseng, a incorporação tanto do extrato quando a adição do cálcio ao filme acarretou em decréscimo no teor de umidade dos filmes poliméricos.

O teor de umidade auxilia na reidratação do tecido lesionado provavelmente na liberação das substâncias dos extratos produzidos. Mesmo apresentando menor teor de umidade devido sua menor hidrofiliidade causadas pelo íon, os filmes com reticulação de cálcio podem ser umedecidos

o que pode auxiliar tanto na liberação quando na manutenção da reidratação da pele lesionada.

5.2.1 Espessura

A espessura tem por definição a distância entre as duas superfícies principais do material. A partir desse parâmetro torna-se possível obter outras informações morfológicas sobre o material (transparência, propriedades mecânicas, etc.). Após a realização desses ensaios, verificou-se que os filmes desenvolvidos apresentaram variações de espessura entre 0,16 e 0,75 mm. Os filmes com extratos apresentaram diferenças significativas na espessura FA e FACa em relação a FA50, FA80, FACa50 e FACa80. Entretanto diferenças significativas entre filmes com e sem adição de cálcio não foram observadas FA/FACa, FA50/FACa50 e FA80/FACa80 ($p > 0,05$) (tabela 3).

Tabela 3 Médias das espessuras dos filmes de alginato com e sem adição de cálcio com e sem incorporação dos extratos de *A. colubrina* (Vell.) Brenan.

Teste	FA	FA50	FA80	FACa	FACa50	FACa80
Espessura (mm)	0,16±0,06 ^b	0,61±0,05 ^a	0,62±0,04 ^a	0,3±0,01 ^b	0,62±0,1 ^a	0,75±0,11 ^a

FA50, filme de alginato com *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50 %; FA80: filme de alginato com *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80%; FACa50, filme de alginato reticulados com cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50 %; FACa80, filme de alginato reticulados com cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80 %. As letras iguais expressam que não houve diferença significativa para o teste de Turkey para $p < 0,05$. Resultados estão expressos por média ± desvio padrão.

De acordo com Moraes (2013), os substitutos cutâneos geralmente apresentam espessuras mais finas que a derme humana, que possuem uma variação entre 0,5 e 2 mm, dependendo de alguns fatores, tais como, idade, gênero e área do corpo.

A respeito da interferência de agentes reticulantes na espessura de filmes, Rhim (2009) desenvolveu dois tipos de filmes um com mistura do agente reticulante cálcio e o segundo com imersão dos filmes de alginato em solução de cloreto de cálcio. Os filmes com mistura do agente reticulante apresentaram maior espessura, o que não foi observado neste trabalho.

Norajit et al., (2010) desenvolveram filmes de alginato incorporando extratos de ginseng, a incorporação do extrato da planta aumentou a

espessura dos filmes poliméricos, de forma semelhante que foi observado nesse trabalho.

5.2.2 Transparência

Entre as propriedades óticas dos filmes, podemos evidenciar a transparência e a opacidade dos mesmos. A opacidade de um material revela sua capacidade de bloquear ou não a passagem da luz.

A fim de se quantificar a transparência foram medidas as absorbâncias na região do visível (600 nm) dos filmes de alginato com ou sem incorporação do extrato de *A. colubrina* e com ou sem reticulação de cálcio (Tabela 4).

Tabela 4 Relação entre a absorbância e transparência nos filmes poliméricos de alginato com e sem adição de cálcio, com e sem incorporação dos extratos de *A. colubrina* (Vell.) Brenan.

Teste	FA	FA50	FA80	FACa	FACa50	FACa80
Transparência	12,564 ^a	2,909 ^b	0,629 ^c	N. T	N. T	N. T

FA, filme de alginato; FA50, filme de alginato com *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50%; FA80: filme de alginato com *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80%; FACa50, filme de alginato reticulados com cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50%; FACa80, filme de alginato reticulados com cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80%. As letras iguais expressam que não houve diferença significativa para o teste de Turkey para $p < 0,05$. N.T: não transparente.

O filme de alginato (FA) apresentou a maior transparência, por outro lado os filmes FA50 e FA80 apresentavam transparência significativamente menor, os filmes de alginato reticulado com cálcio FACa, FACa50 e FACa80 não apresentaram transparência.

Norajit et al. (2010) desenvolveram filmes com base em alginato com incorporação de extratos de planta. Esta associação influencia no produto final aumentando a opacidade dos filmes poliméricos.

5.3 Análises Espectroscópicas

5.3.1 Caracterização das matérias primas e dos filmes por espectrometria de absorção no ultravioleta e do visível (UV-Vis)

A espectrofotometria na região do UV-Vis é uma técnica baseada na interação da matéria com comprimentos de onda no espectro entre 700 a 200 nm, na qual o espectro eletrônico de absorção é o registro gráfico da resposta do sistema ao estímulo, tal técnica possui ampla aplicação na caracterização de uma série de propriedades de diversas espécies orgânicas e inorgânicas (NASCIMENTO et al., 2010). Nesse trabalho as análises espectrofotométricas foram utilizadas para verificar a incorporação do extrato de *A. colubrina* nos filmes poliméricos.

Figura 12 Espectro de absorção eletrônica na região do UV-Vis do ácido tânico e extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50% (A)

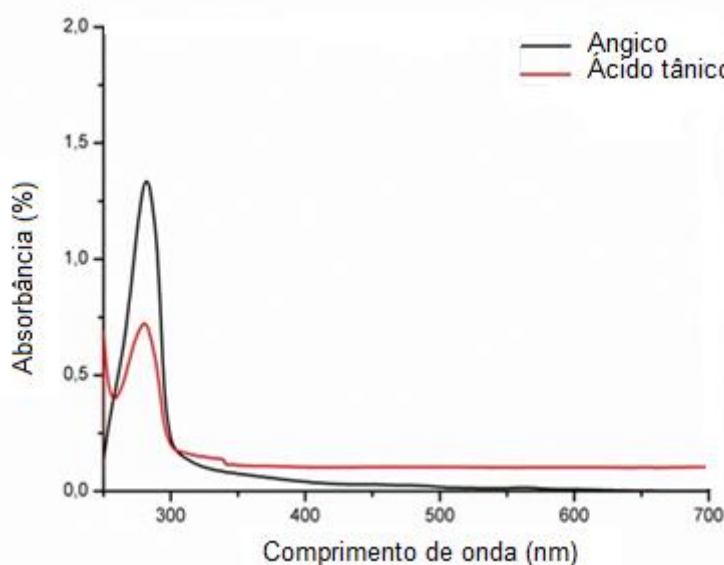
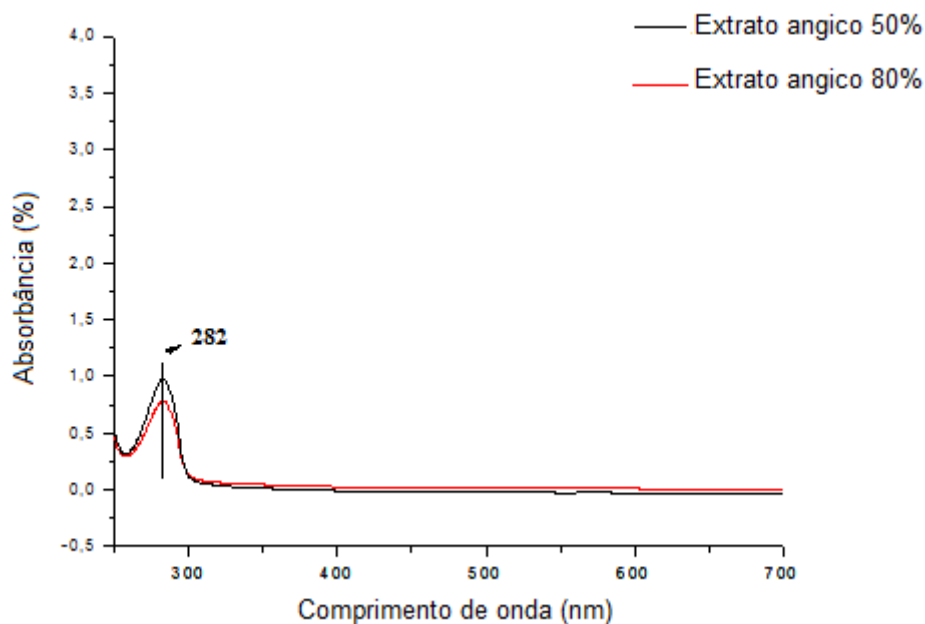


Figura 13. Comparação entre os máximos de absorbância dos extratos 50% e 80% (B).



Siqueira et al. (2012) realizou estudos por meio de análises fitoquímicas de extratos hidro alcoólicos, da casca do caule de *A. colubrina*, tal estudo demonstrou que taninos apresentam como compostos majoritários da planta. Araújo et al. (2008), classifica *A. colubrina* como uma das plantas com mais altos níveis de taninos, associando a presença desses compostos a sua ação anti-inflamatória e cicatrizante, que são ações reconhecidas por populações locais e que pode auxiliar na cura de feridas.

Figura 14. Espectro de absorção eletrônica na região do UV-VIS do filme de alginato.

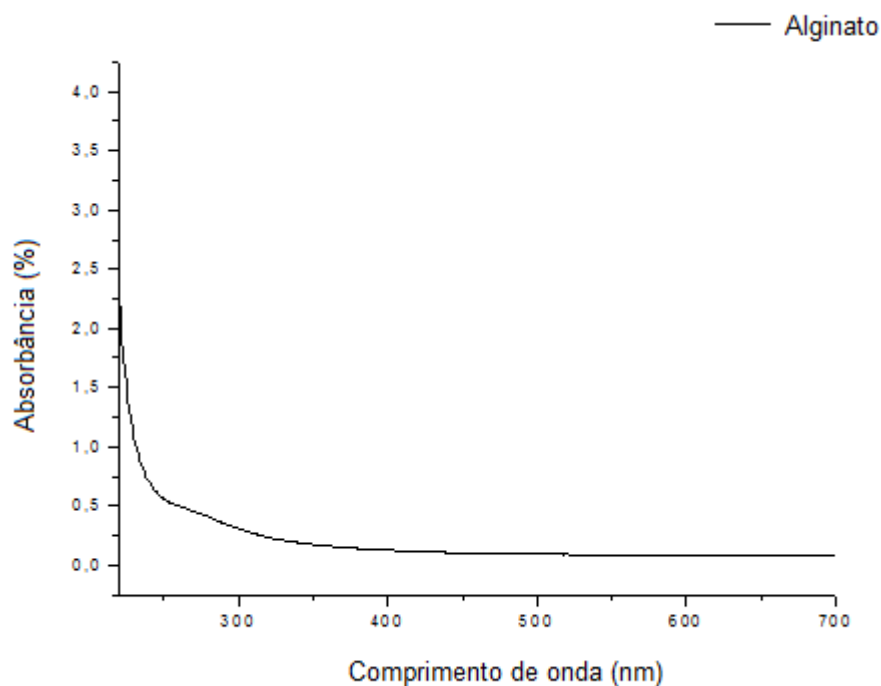
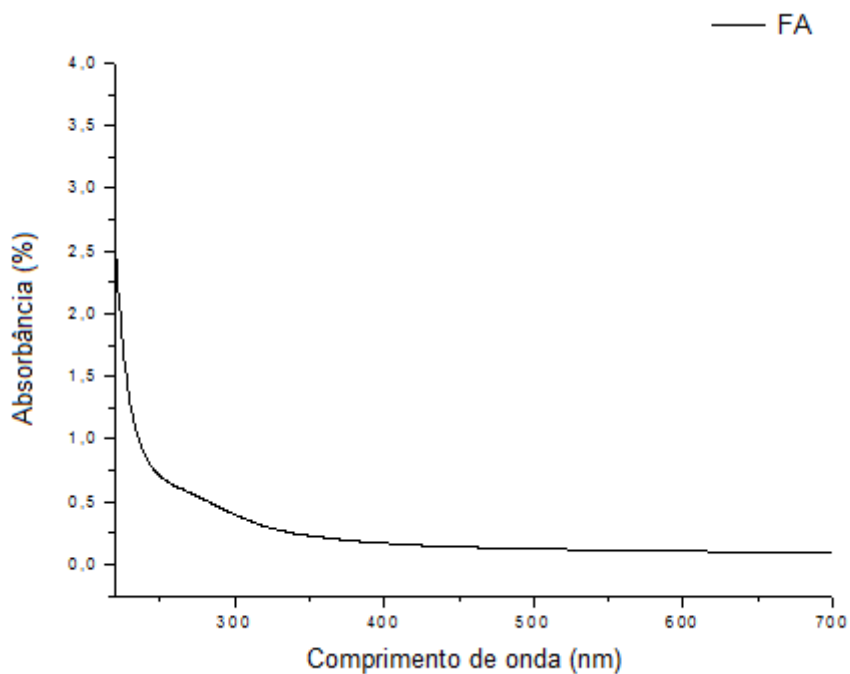
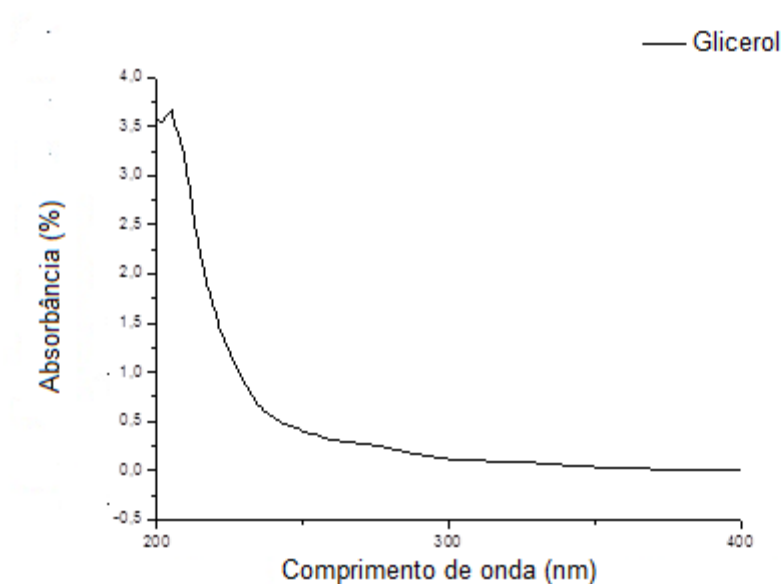


Figura 15. Espectro de absorção eletrônica na região do UV-VIS do filme de alginato reticulados com cálcio.



Para fins comparativos também foram realizados espectros do glicerol que foi utilizada como agente plastificante em ambos os filmes produzidos neste trabalho, a qual não apresentou picos em seu espectro (Figura 15).

Figura 16. Espectro de absorção eletrônica na região do UV-VIS do glicerol.



Ao analisarmos o gráfico de absorção do glicerol, pode-se observar que a mesma não possui nenhum máximo de absorção na região estudada (282 nm), o que nos permite inferir que sua incorporação ao filme não interfere nos máximos de absorção referentes aos extratos de *A. colubrina* que, como mencionado acima, possui picos característicos nessa região. Pode-se entender então que a incorporação do glicerol confere aos filmes sintetizados uma maior maleabilidade e uma melhor relação com a água, porém não interfere na interação dos filmes com a luz.

Com o intuito de verificar a concentração nos filmes produzidos, foi realizada uma curva de calibração baseada em ácido tânico (Merck), esta opção foi baseada nos relatos de Siqueira et al. (2012) que indicam a presença deste composto em extratos de angico. Entretanto, em paralelo também foram realizados ensaios para verificar o comportamento de curvas de calibração utilizando os próprios extratos a 50 e 80.

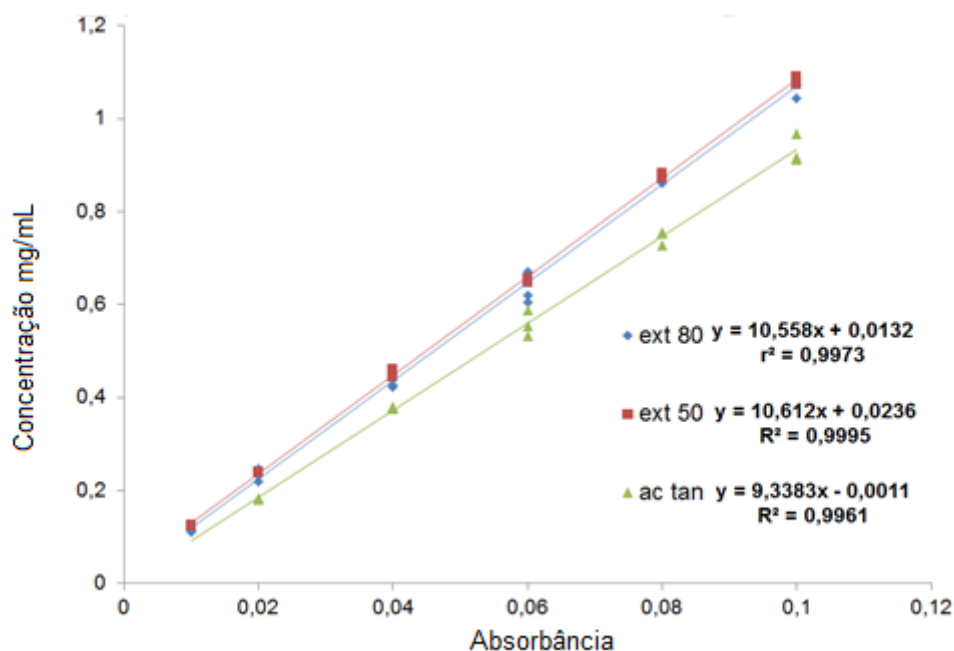
Após a realização das curvas padrões dos extratos de *A. colubrina*, foi possível verificar as diferenças nos coeficientes angulares (10,558 para o extrato 80% e 10,612 para o extrato 50% quando comparados a curva de ácido tânico (9,3383). (Figura 17).

Tais diferenças indicam que a utilização da curva padrão de ácido tânico x absorbância não correlaciona a priori, com a quantidade de extrato presente em amostras, entretanto, o uso de extratos para confecção de curvas padrão também não é desejável haja vista que a composição do mesmo pode variar de modo significativo ao longo do tempo e também entre indivíduos.

No presente estudo será utilizada as curvas padrões dos extratos para avaliar a liberação. Ressalta-se aqui dois aspectos, o primeiro relaciona-se a limitação do uso das curvas padrão para outros extratos de angico e a necessidade de desenvolver alternativas para análises de extratos por espectroscopia UV-Vis.

Nesse sentido Araújo et al. (2015), apontaram, como componentes principais no extrato de *A. colubrina*, a presença de Epigallocatequina galato, hiperina e o gallato. Estes dados sugerem a possibilidade de uso de um desses compostos para curva padrão.

Figura 17 Curvas de ácido tânico e extratos (50 e 80%)

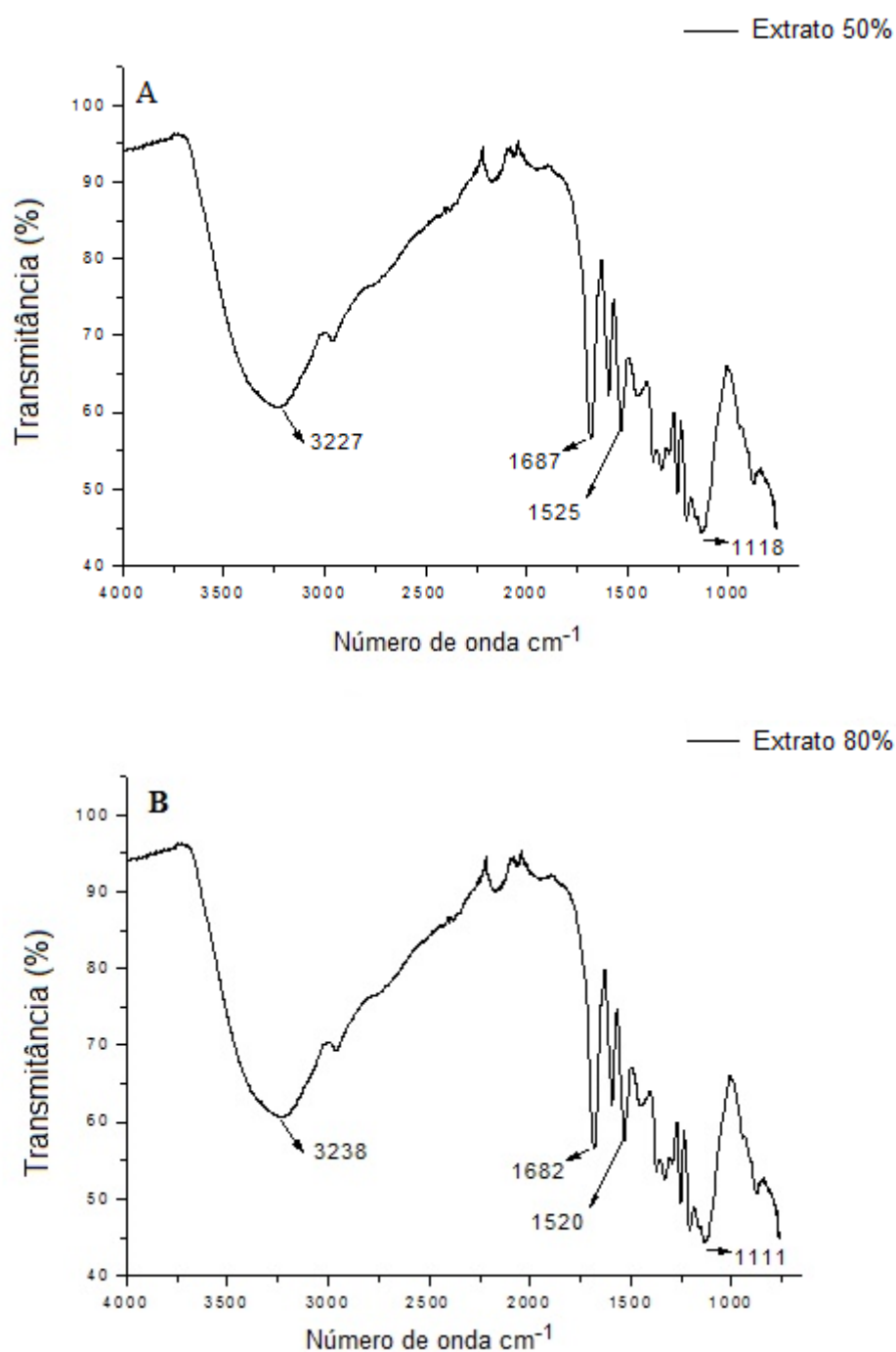


5.3.2 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os resultados das análises espectroscópicas na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) das matérias-primas utilizadas estão representados nas Figuras 17 a 19.

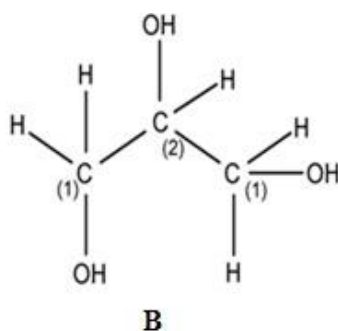
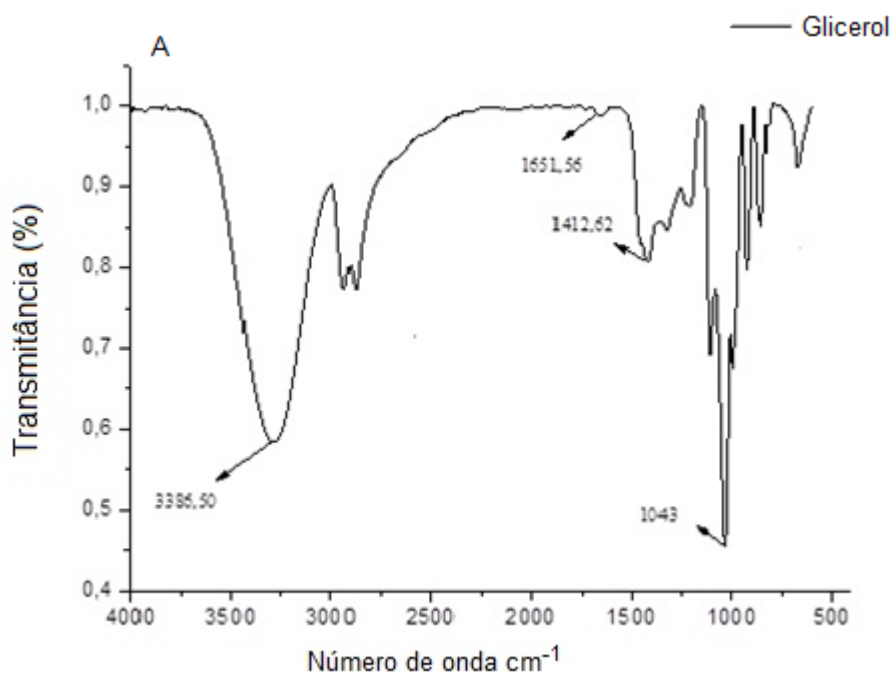
Em relação aos extratos de *Anadenanthera colubrina*, nas concentrações de 50% e 80% estes apresentaram os seguintes máximos a 3227 e 3238 cm^{-1} que são atribuídos à deformação axial de grupamento hidroxila (O-H), 1687 e 1682 cm^{-1} atribuídos à (COO⁻) assimétrico e 1525 e 1520 cm^{-1} atribuídos à vibração de deformação (C-OH) e 1108 e 1111 cm^{-1} às vibrações dos grupamentos C-O e C-C respectivamente para os extratos de 50 e 80% (Figura 17).

Figura 18. Espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier dos extratos de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50% (A) e 80% (B).



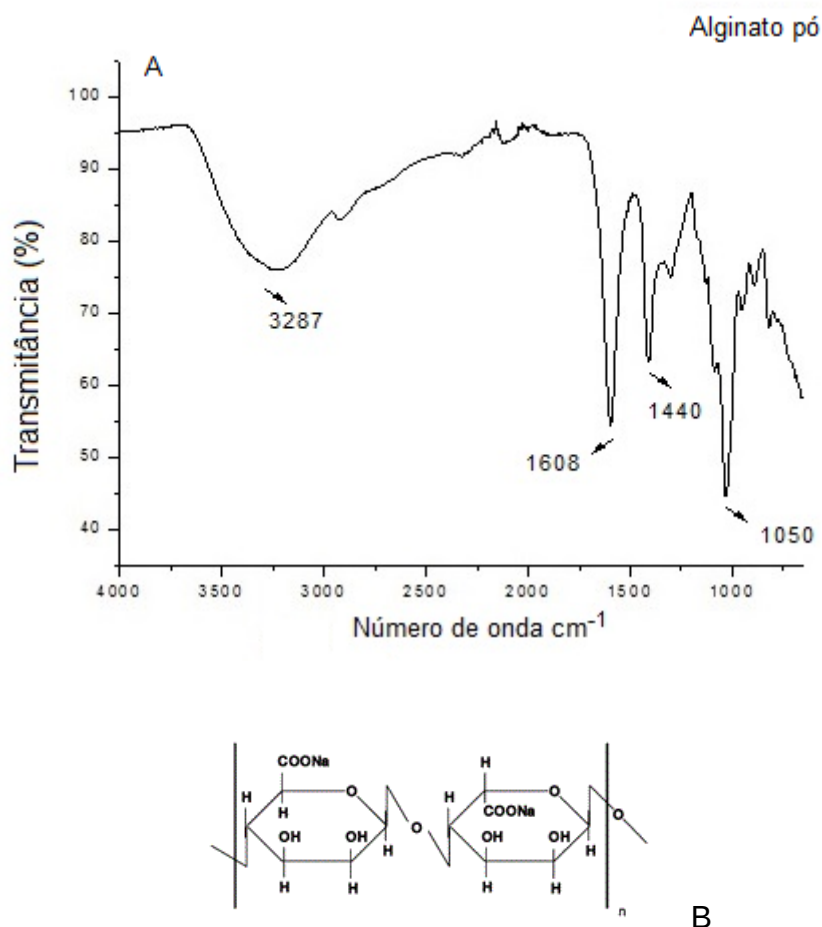
O glicerol apresentou os seguintes máximos: 3385 cm^{-1} que são atribuídos à deformação axial de grupamento hidroxila (O-H), 1651 cm^{-1} atribuídos ao estiramento vibracional na ligação hidroxila com um hidrogênio (H-O-H), 1412 cm^{-1} atribuídos à vibração de deformação (C-OH) (Figura 18).

Figura 19 (A) Espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier do glicerol (B) Estrutura química do glicerol



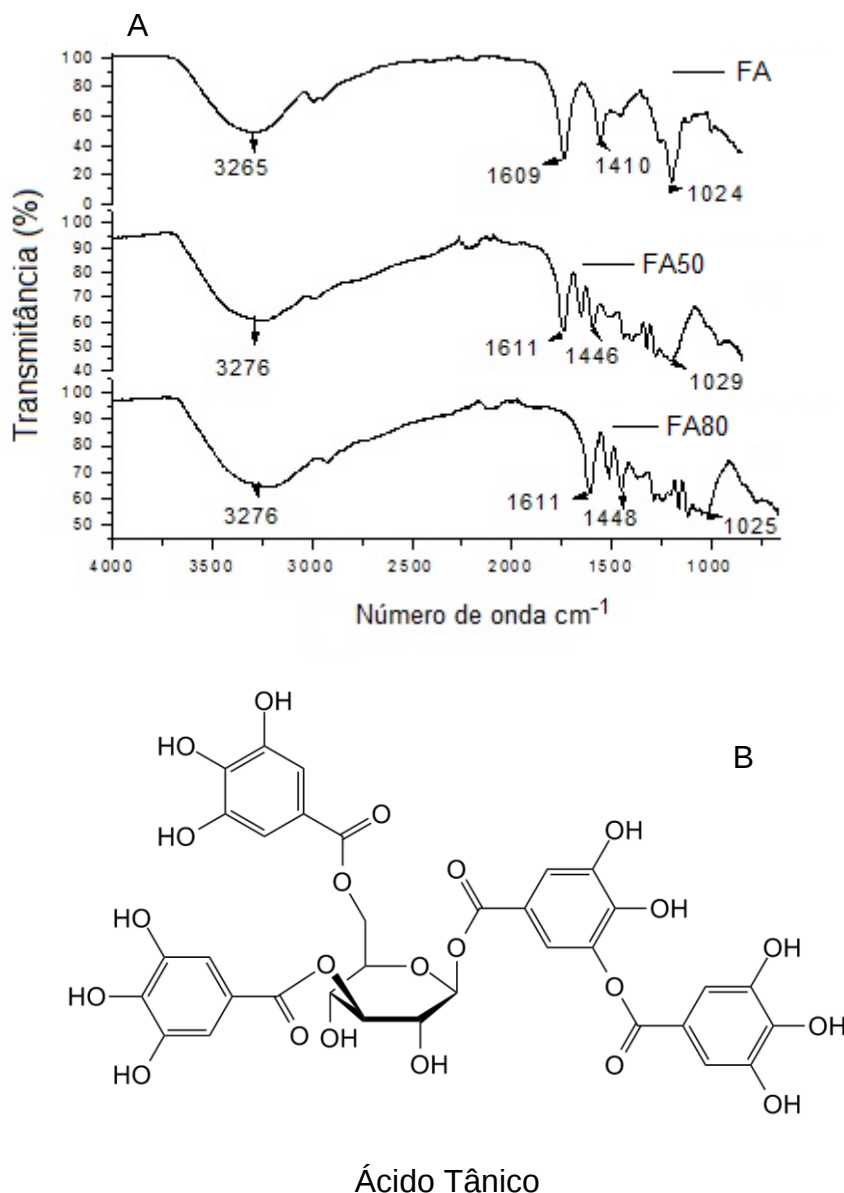
O alginato de sódio (pó) apresentou os seguintes máximos: 3287 cm^{-1} que são atribuídos à deformação axial de grupamento hidroxila (O-H), 1608 cm^{-1} atribuídos à (COO^-) assimétrico, 1440 cm^{-1} que são atribuídos à vibração de deformação (C-OH) e com contribuição assimétrica do grupamento (COO^-) e 1050 cm^{-1} que são atribuídos à vibração dos grupamentos (C-O) e (C-C) e deformação angular dos (C-O-C) dos anéis dos carboidratos presentes nas estruturas dos polímeros e nos grupamentos laterais (C-OH) e (C-H) (Figura 20).

Figura 20 (A) Espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier do alginato de sódio (pó). (B) Estrutura química do alginato de sódio.



Os filmes de alginato sem reticulação de Ca (FA, FA50 e FA80) apresentaram os seguintes máximos: entre 3260 a 3280 cm^{-1} que são atribuídos à deformação axial de grupamento hidroxila (O-H), 1600 a 1615 cm^{-1} atribuídos à (COO⁻) assimétrico, 1410 a 1450 cm^{-1} que são atribuídos à vibração de deformação (C-OH) e com contribuição assimétrica do grupamento (COO⁻) e 1020 a 1050 cm^{-1} que são atribuídos à vibração dos grupamentos (C-O) e (C-C) e deformação angular dos (C-O-C) dos anéis dos carboidratos presentes nas estruturas dos polímeros e nos grupamentos laterais (C-OH) e (C-H) (Figura 21).

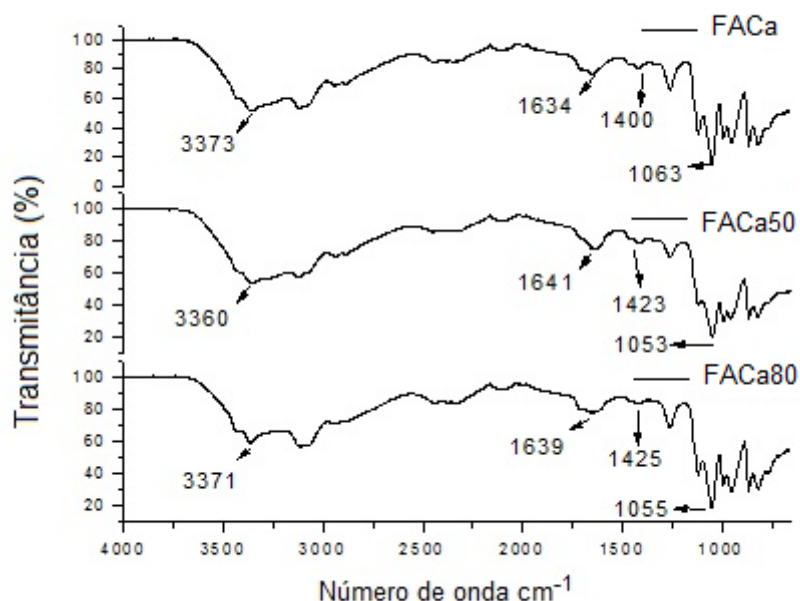
Figura 21 Espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier dos filmes de alginato com e sem incorporação dos extratos de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50%, 80% (A). (B) Estrutura química do ácido tânico.



Os filmes de alginato com reticulação de cálcio (FACa, FACa50 e FACa80) apresentaram os seguintes máximos: entre 3360 a 3375 cm^{-1} que são atribuídos à deformação axial de grupamento hidroxila (O-H), 1630 a 1650 cm^{-1} atribuídos à (COO^-) assimétrico, 1400 a 1425 cm^{-1} que são atribuídos à vibração de deformação (C-OH) e com contribuição assimétrica do grupamento (COO^-) e 1050 a 1065 cm^{-1} que são atribuídos à vibração dos grupamentos

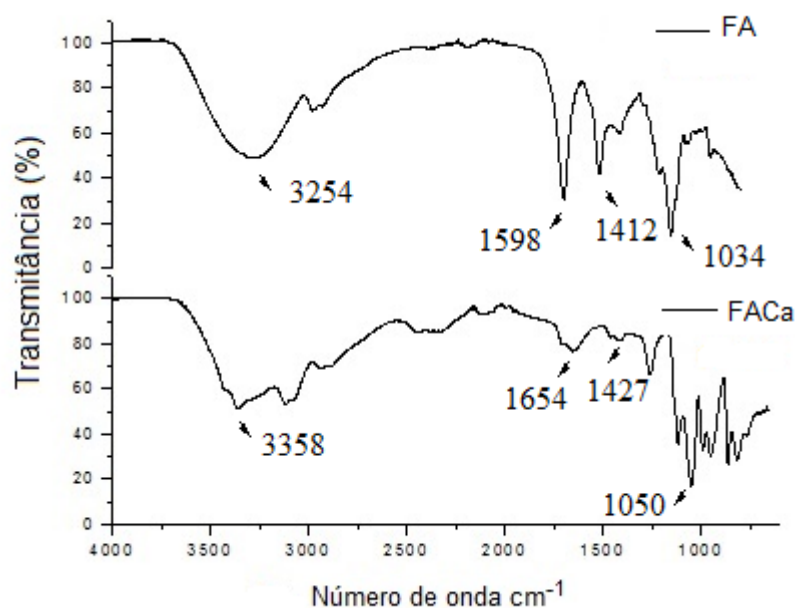
(C-O) e (C-C) e deformação angular dos (C-O-C) dos anéis dos carboidratos presentes nas estruturas dos polímeros e nos grupamentos laterais (C-OH) e (C-H) (Figura 22).

Figura 22 Espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier dos filmes de alginato com cálcio com e sem incorporação dos extratos de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50% e 80%.



Quando comparados os filmes de alginato e os filmes com reticulação de cálcio é possível evidenciar a modificação dos máximos entre 3300 a 3200 atribuídos à deformação axial de grupo hidroxila (O-H) presentes em suas estruturas, 1650 a 1550 (COO⁻), 1420 a 1450 referem-se à deformação axial simétrica de (COO⁻) em grupos funcionais carboxílicos dos ácidos algínicos. Ambas as modificações dos grupamentos carboxílicos assimétrico sugerem uma interação dos íons cálcio ao grupo carboxílico (Figura 23).

Figura 23. Espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier do filme de alginato e filme de alginato com reticulação de cálcio.



A tabela 5 sumariza as bandas de absorção observadas nas matérias-primas e nos filmes obtidos e a comparação destes com a literatura.

Tabela 5 Atribuição das bandas de absorção vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier.

Material	Frequência (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Referências ¹
Filmes poliméricos, alginato.	2951 - 2883	Deformação axial simétrica e assimétrica de C-H	(1) (2) (5) (6) (7) (8)
Filmes poliméricos, alginato.	3529 - 3269	Deformação axial da hidroxila (O-H)	(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9)
Filmes poliméricos, alginato, glicerol.	1361 - 1443	Deformação axial simétrica em grupos funcionais metileno (COO ⁻).	(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9)
Filmes poliméricos, alginato e glicerol.	1656 - 1600	Deformação assimétrica de COO ⁻ nos filmes de alginato	(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9)
Filmes poliméricos, alginato e glicerol.	1034 - 1153	Vibrações dos grupamentos C-O e C-C	(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9)

(1) ROGER et al. (2007); (2) LEAL et al. (2007); (3) GÓMEZ-ORDÓÑE et al. (2011); (4) PEREIRA et al. (2009); (5) SARTORI et al. (1996); (6) Paula et al. (2010); (7) HUQ et al. (2012); (8) LIJUOR et al. (1993); (9) PEREIRA et al. (2012).

5.4 Caracterização dos filmes poliméricos em relação a interação com os extratos de *A. colubrina* (Vell.) Brenan

5.4.1 Ensaios de interação com a água

5.4.1.1 Ensaio Liberação dos extratos de *A. colubrina* (Vell.) Brenan incorporados nos filmes poliméricos.

Ao analisarmos a representação gráfica da liberação dos extratos de *A. colubrina* é possível observar que nas primeiras 5 horas há uma taxa de liberação crescente e que após esse período, a taxa de liberação permanece constante até completar 96 horas em ambos os tratamentos (Figuras 24 e 25), não havendo alteração na concentração, o que foi considerado satisfatório, porém faz-se necessário um estudo mais aprofundado para avaliar se existe a possibilidade de uma liberação maior de quantidade do extrato ou se este resultado reflete uma possível saturação do sistema.

Figura 24. Representação gráfica da liberação do extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan dos filmes de alginato durante 24 h: A) Filme sem cálcio com extrato a 50% B) Filme sem cálcio com extrato a 80%

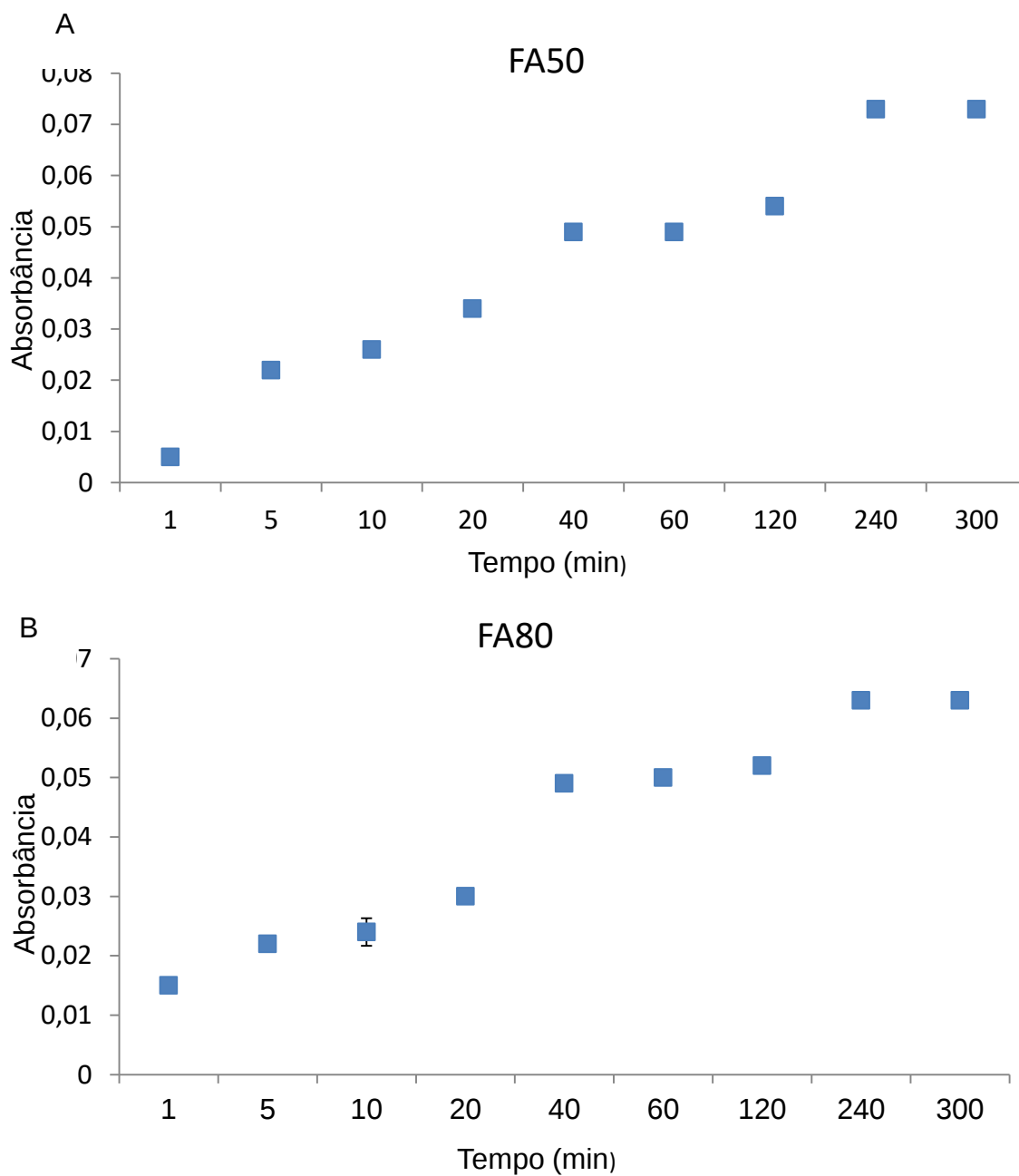
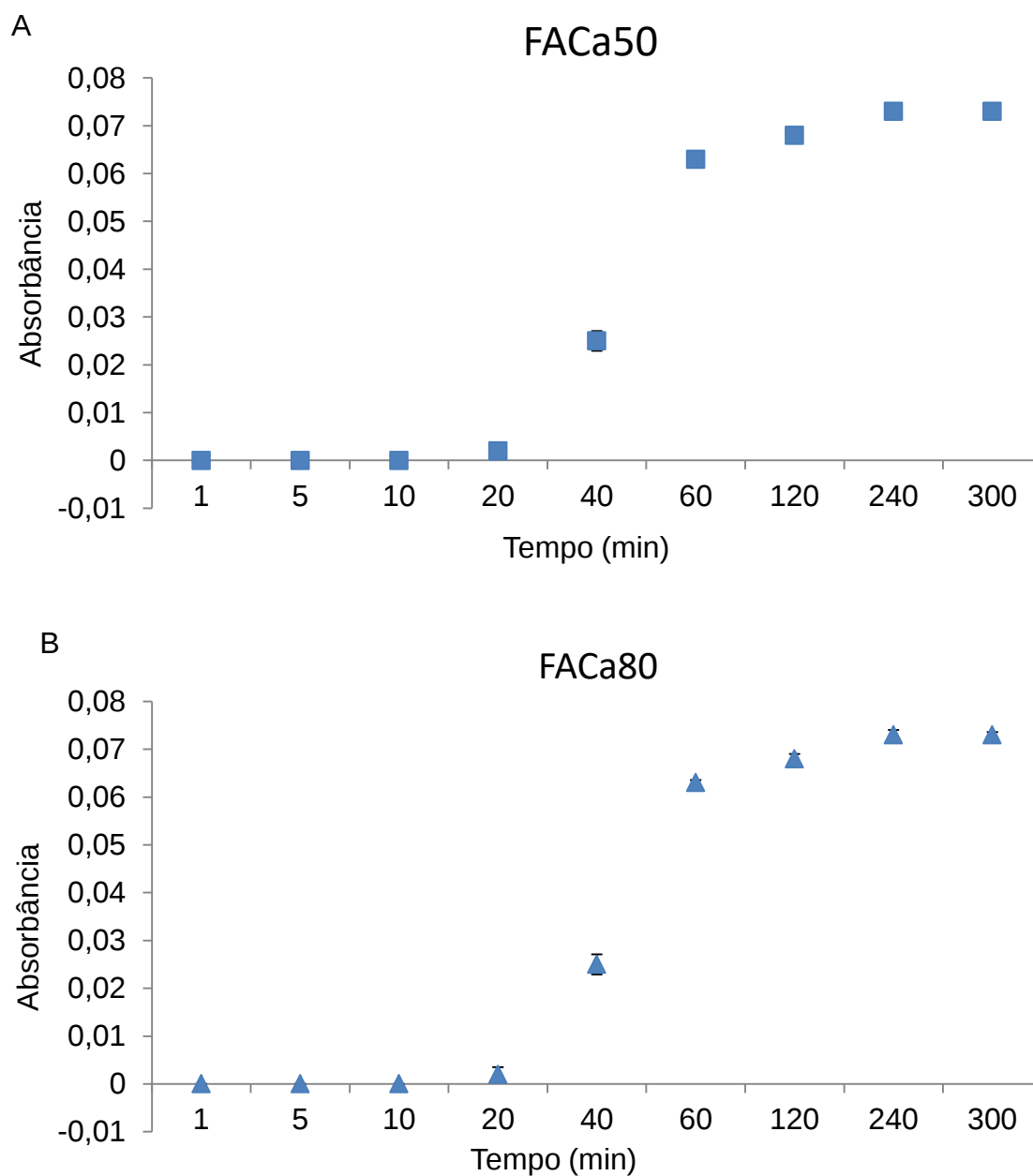


Figura 25. Representação gráfica da liberação do extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan dos filmes de alginato durante 24 h: A) Filme com cálcio com extrato a 50% B) Filme com cálcio com extrato a 80%



Kikuchi et al. (1997) obteve resultados semelhantes com a liberação do material encapsulado na matriz de alginato. No tempo inicial a liberação foi quase insignificante, porém logo em seguida foi observada uma liberação súbita e completa (libertação brusca) dentro de um intervalo de tempo curto, justificando que a integridade da malha do alginato permaneça pequena

durante os primeiros minutos na solução aquosa, e que posteriormente o rearranjo da malha permita a liberação da substância encapsulada.

Em sistemas de liberação controlada, a taxa de liberação da substância ativa é lenta e em velocidade constante, de modo a manter os níveis terapêuticos, reduzir os efeitos tóxicos, ou atingir qualquer outro fim terapêutico (European Pharmacopoeia, 1997).

Sistemas que apresentam liberação controlada de fármacos apresentam vantagens significativas, entre elas redução ou ausência dos efeitos adversos locais e sistêmicos, menor concentração do fármaco no organismo, redução do número de aplicações cotidianas, proteção do fármaco de uma possível degradação pelos componentes dos fluidos fisiológicos. (DE LA CRUZ PASTRANA et al., 2000; MANADAS, 2002)

Nos perfis de liberação testados, a liberação acontece mais rápida, nos filmes sem a reticulação do cálcio, em que cerca de 50% de sua liberação ocorre nos primeiros 30 minutos enquanto os filmes com a reticulação têm menos de 30% de sua liberação nesse mesmo período.

Estudos demonstram que a migração de drogas durante os passos de secagem e armazenagem do filme podem acarretar em uma distribuição heterogênea do fármaco na matriz de polímero e levar ao fenômeno de explosão de liberação (KISHIDA et al., 1998; MALLAPRAGADA et al., 1997).

O extrato de *A. colubrina* produzido nesse trabalho tem sua liberação prolongada devido à ação reticulante do cálcio na presença do ácido algínico, o que mantém sua ação antimicrobiana por mais tempo. Posteriormente pretende-se desenvolver melhor essa capacidade de prologar a liberação dos extratos encapsulados pela reticulação dos filmes produzidos.

Entretanto a liberação rápida, no sistema sem cálcio poderia ser benéfica por uma ação mais rápida sobre a pele, além de apresentar liberação mais constante. Entretanto, ensaios demonstraram a instabilidade do filme na presença de umidade (como demonstrado no ensaio antimicrobiano figura 24).

Em sistemas de liberação, a liberação do fármaco aprisionado em geral envolve dois processos, degradação e dissolução, processos que podem acontecer simultaneamente ou não. O processo de degradação ou liberação polimérica depende diretamente da degradação das cadeias poliméricas. Na presença de água a dissolução dos filmes de alginato ocorre rapidamente

liberando o conteúdo dos extratos no meio aquoso, em contrapartida a presença do agente reticulante Ca^{++} tende a diminuir o processo de difusão efetiva da liberação inicial dos extratos contidos no filme (TURBIANI et al., 2009).

5.4.1.2 Verificação da distribuição dos extratos de *A. colubrina* (Vell.) Brenan nos filmes poliméricos por espectroscopia UV-Vis.

Os filmes de alginato com a incorporação dos extratos de *A. colubrina* apresentaram um máximo de absorbância em 282 nm semelhante ao observado nas curvas padrões dos extratos produzidos 50 e 80%. As leituras das absorbâncias foram feitas nessa região de máximo (tabela 6). Também foi realizada a varredura dos filmes de alginato e os filmes reticulados com cálcio, ambos sem incorporação dos extratos, e os mesmos não apresentavam máximos na região característica dos extratos de *A. colubrina*, (Vell.) Brenan 50 e 80% (tabela 6).

Tabela 6. Distribuição obtida na região do UV-VIS dos filmes de alginato com incorporação *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50% e 80%.

Teste	FA50	FA80	FACa50	FACa80
Absorbância (%)	0,331±0,051	0,323±0,053	0,685± 0,145	0,735±0,178

FA50, filme de alginato com *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50%; FA80: filme de alginato com *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80%; FACa50, filme de alginato com adição de cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50%; FACa80, filme de alginato com adição de cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80%. Resultados estão expressos por média ± desvio padrão.

Outro fenômeno que provavelmente ocorreu simultaneamente é o descrito por Kishida et al. (1998), Mallapragada et al. (1997), em que da mesma forma que a difusão e migração de drogas ocorrem em meio aquoso esse processo pode afetar a distribuição da substância na matriz polimérica durante a secagem ocasionando uma distribuição heterogênea do extrato no filme devido o movimento da água para as superfícies do gel enquanto ocorre a evaporação. Os fármacos podem difundir por convecção em meio fluido, deixando uma distribuição irregular de extrato através do filme, com concentrações mais elevadas na superfície.

A adição do agente reticulante cálcio auxilia no processo de envolver as substâncias extraídas das cascas de *A. colubrina*, indicando um possível auxílio na manutenção da homogeneidade na distribuição do extrato no filme.

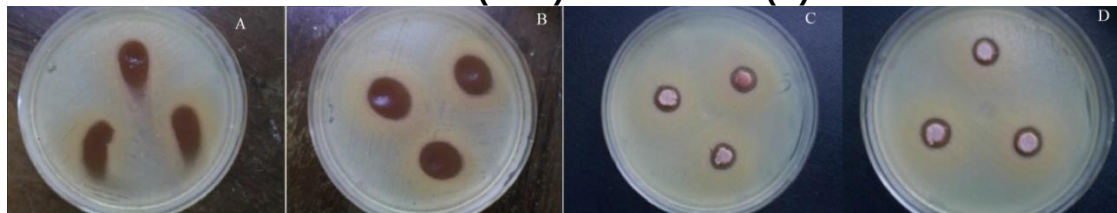
5.5 Avaliações da atividade antimicrobiana

No teste de difusão em disco para os filmes contendo cálcio e extratos (50 e 80%) não foi observada a formação de halos de inibição significantes frente a nenhum dos micro-organismos testados enquanto nos filmes sem a adição de cálcio houve a formação de uma sombra que difere da formação de halo, esta sombra é resultante da dissolução do filme, nessa sombra não há crescimento do micro-organismo devido provavelmente a presença do extrato no filme (Figura 26). Possivelmente o motivo pelo qual não se observou halos de inibição no teste realizado é a dificuldade de difusão no meio de cultura, dos extratos de *A. colubrina*, impregnados no filme reticulados com cálcio.

Nos testes de difusão de disco sem adição de cálcio foi observada a formação de uma sombra causada pela rápida dissolução do filme, que inibiu o crescimento dos micro-organismos, os filmes sem incorporação dos extratos foram utilizados como controle negativo em relação a atividade antimicrobiana e não apresentaram inibição do crescimento das cepas.

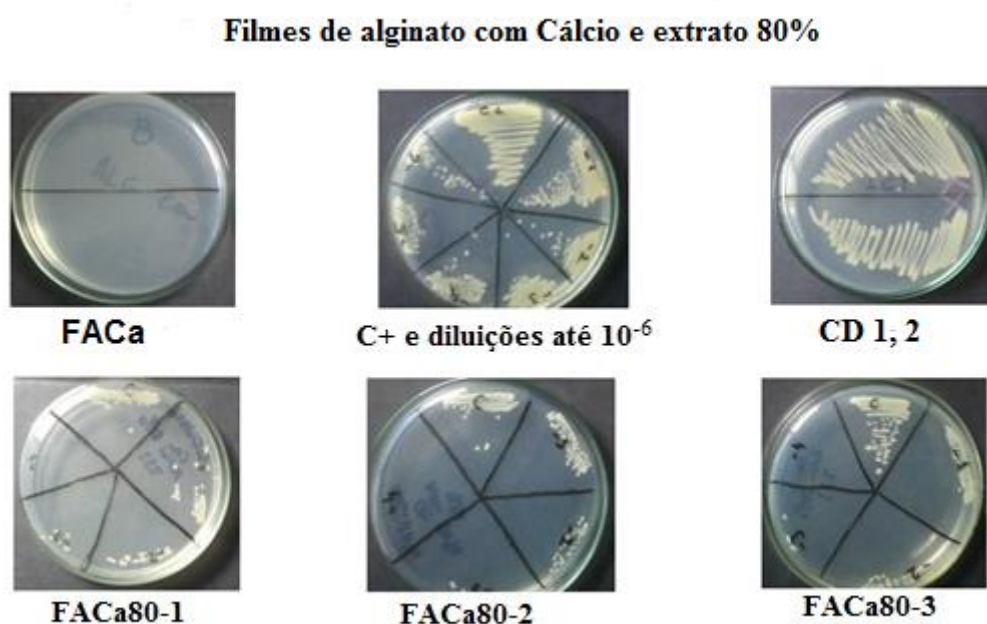
Pelo fato de haver a dificuldade da dissolução do filme na técnica inicialmente utilizada, o teste de avaliação da atividade antimicrobiana foi novamente realizado, utilizando uma segunda técnica, o teste de difusão em meio líquido, para que esta dificuldade de difusão do extrato não influenciasse no resultado final do experimento.

Figura 26. Resultado do teste de discos, utilizando-se os filmes poliméricos em placas semeadas com *S. aureus*. Filmes de Alginato com incorporação do extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50% (A), Filmes de Alginato com incorporação do extrato *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80% (B), Filmes de alginato com Cálcio e incorporação do *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50% (C), Filmes de alginato com Cálcio com incorporação do *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80% (D)



A partir destes dados, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-6} para o controle direto, e 10^{-4} para o tubo que continha filmes de alginato com incorporação dos extratos de *A. colubrina* 50% (FA50) e 80% (FA80) e os filmes de alginato com cálcio com incorporação dos extratos de *A. colubrina* 50% (FACa50) e 50% (FACa80), os filmes sem incorporação dos extratos foram utilizados como controles e nomeados de brancos com a finalidade de observar possível contaminação, o que não ocorreu (Figura 27). Após 24 horas estas diluições foram semeadas por esgotamento. Com o intuito de comparação as placas utilizadas para os tubos de ensaio C + foram diluídos até 10^{-6} , já para a solução nos tubos de ensaio DM foram utilizados os tubos puros e as diluições 10^{-1} a 10^{-4} . Os resultados da segunda parte teste de do teste de atividade antimicrobiana dos filmes esta apresentado na figura 25.

Figura 27. Resultados dos semeio em rede no teste de atividade antimicrobiana dos filmes com cálcio, incorporados com extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80% frente a *S. aureus* UFPEDA 731.



Legenda: FAcA: filme de alginato com reticulação de cálcio., C+ controle positivo diluições até 10^{-6} , CD: controle direto, FAcA80 1, 2, 3: filme de alginato reticulados com cálcio e incorporação do extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80%

Na tabela 7 é possível observar o número de unidades formadoras de colônias (UFC). Os filmes de alginato com extratos de *A. colubrina* apresentaram uma marcante atividade inibitória, quando comparados ao controle positivo.

Tabela 7. Contagem das unidades formadoras de colônia do semeio por esgotamento para os isolados clínicos *S. aureus* multirresistentes.

Micro-organismos	Direto	FA50	FA80	FAcA50	FAcA80
UFPEDA 700	INC 10^{-4}	73.10^{-3}	690.10^{-4}	131.10^{-4}	311.10^{-4}
UFPEDA 711	INC 10^{-4}	33.10^{-4}	345.10^{-3}	220.10^{-4}	6.10^{-1}
UFPEDA 731	INC 10^{-4}	59.10^{-4}	401.10^{-4}	99.10^{-4}	261.10^{-1}

Legenda: Direto, micro-organismo sem extratos. FAcA50, filme de alginato com *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50%; FA80: filme de alginato com *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80%; FAcA50, filme de alginato reticulados com cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50%; FAcA80, filme de alginato reticulados com cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* (Vell.) Brenan 80%. *S. aureus* multirresistentes UFPEDA 700, UFPEDA 711, UFPEDA 731. INC (incontáveis)

Os resultados demonstraram que houve inibição do crescimento dos isolados clínicos de *S. aureus*, corroborando com os dados da literatura em relação às bactérias de coleções de cultura (RODRIGUES et al., 2014; BAPTISTA, 2012).

Para a cepa UFPEDA 700 o filme de alginato com incorporação do extrato de *A. colubrina* 50% apresentou melhor inibição, já para as cepas UFPEDA 711 e UFPEDA 731 a melhor inibição foi para o filme de alginato reticulado com cálcio e incorporação do extrato de *A. colubrina* Brenan 80%.

6. CONCLUSÕES

A partir de cascas de *Anadenanthera. colubrina* (Vell.) Brenan foram produzidos e caracterizados extratos com diferentes teores hidro alcoólicos (50 e 80%). Os mesmos não apresentaram diferenças quando analisados por espectroscopias de UV-Vis e FTIR.

A partir da metodologia desenvolvida, foi possível sintetizar filmes de alginato com ou sem reticularização iônica e com ou sem extratos de *A. colubrina* (Vell.) Brenan pelo sistema de “casting”. Nos filmes reticulados com cálcio foi utilizando um agente de escoamento ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) que proporcionou a uniformidade do filme produzido.

Os filmes apresentaram-se macroscopicamente homogêneos e sem fissuras, aderentes, flexíveis.

A adição do cálcio aos filmes de alginato promoveu uma maior resistência a umidade, menor transparência e maior espessura.

Análise da distribuição do extrato incorporado ao filme por espectroscopia UV-vis indicou que os filmes sem adição de cálcio apresentaram-se mais uniformes. A caracterização dos filmes por espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) demonstrou que a adição dos extratos não foi detectada por essa técnica, entretanto quando adicionado o agente reticulante e o de escoamento observou-se a modificação do perfil da espectroscopia por FTIR.

Nos ensaios de liberação a adição do cálcio promoveu uma liberação tardia dos extratos. Enquanto os filmes sem reticulação liberaram maior conteúdo nos primeiros momentos. A adição dos extratos de *A. colubrina* mostrou-se eficaz no controle de *S. aureus* multirresistentes.

7. PERSPECTIVAS

Desenvolver sistema de liberação do dos extratos mais eficazes dosando diferentes quantidades de cálcio empregadas para a fabricação dos filmes, promovendo maior ou menor aprisionamento dos extratos na matriz polimérica para que haja liberação contínua e prolongada.

Realizar ensaios mecânicos para verificar o comportamento mecânico dos filmes produzidos.

Verificar a superfície dos filmes produzidos através da microscopia eletrônica de varredura.

8. REFERÊNCIAS

- ABBAH, S. A. LIU, J. LAM, R. W. GOH, J. C. WONG, H.K. **In vitro bioactivity of rhBMP-2 delivered with novel polyelectrolyte complexation shells assembled on an alginate microbead core template.** J. Control. Rel. 2012, 162, 364–372.
- ABE, L. T., MOTA, R. V. LAJOLO, F. M. GENOVESE, M. I., **Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L.** Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas, 27(2): 394-400, abr.-jun. 2007.
- AEHLERT, B. A. C.L.S. **Advanced Cardiac Life Support. Suporte Avançado de Vida em Cardiologia.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2007
- ALMEIDA, G. W. R. **Desenvolvimento e caracterização de filmes nanocompósitos de base celulósica e sua avaliação como embalagem ativa antimicrobiana.** 2010. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimento). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- ALRUBAIY, L. Al-Rubaiy K. K. **Skin Substitutes: A Brief Review of Types and Clinical Applications.** Oman Med J. 2009 January; 24(1): 4–6. doi: 10.5001/omj.2009.2
- ANDRADE, M. G. L., CAMELO, C. N., CARNEIRO, J. A., TERÊNCIO, K. P. **Evidence of changes in the healing process of burns in diabetic subjects: literature review.** Rev. Bras. Queimaduras. v. 12, n. 1, p. 42-48, 2013.
- ANDRADE, S. R. A., **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólicos sobre cepas resistentes de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Providencia rettgeri*.**, parabíba, João Pessoa 2013.
- ANGELO P. M., NASCIMENTO J. **Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão.** Rev Inst Adolfo Lutz, 66(1): p. 1-9, 2007.
- ARAÚJO, T. A. S., ALENCAR, N. L., AMORIM, N. L. E. L. C, Albuquerque, U. P. **A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge** Journal of Ethnopharmacology, vol. 120, no. 1, pp. 72–80, 2008.
- BABU, M. **Collagen based dressings—a review.** Burns. v. 26, n. 1, p. 54-62, 2000.
- BAPTISTUCCI, C. B. **Degradação do antibiótico Ciprofloxacina em solução aquosa por meio de processo oxidativo avançado baseado em ozônio.** Dissertação (Mestrado em Engenharia), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.
- BARRA, I. D., RODRIGUES, K. V. M. **Utilização de matrizes dérmicas no tratamento de queimaduras.** Rev. Bras. Queimaduras. v. 13, n. 2, p. 83-89, 2014.

BHALERAO, S. R., ROTE, A. R. **Application of uv spectrophotometric methods for estimation of ciprofloxacin and tinidazole in combined tablet dosage form.**

Int. J. Pharm. Sci. v. 4, n. 3, p. 646-467, 2012.

BLAINE, G. **Experimental observations on absorbable alginate products in surgery.** Annals of Surgery v. 125 N. 1, 1947.

BOLGIANI, A. N., SERRA, M. C. V. F. **Atualização no tratamento local das queimaduras.** Rev. Bras. Queimaduras. v. 9, n. 2, p. 38-44, 2010.

BRASIL 2007. **Agência Nacional de vigilância Sanitária. Investigação e controle de bactérias multirresistentes.** Acessado em: 11/06/2016. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/reniss/manual%20controle_bacterias.pdf

BUNHAK, E. J. MENDES, E. S., PEREIRA, N. C; CAVALCANTI, O. A. **Influência do sulfato de condroitina na formação de filmes isolados de polimetacrilato: avaliação do índice de intumescimento e permeabilidade ao vapor d'água.** Quim. Nova, v. 30, n. 2, p. 312-317, 2007.

CAMARGO, F. B. **Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo pantenol e avaliação dos seus efeitos hidratantes na pele humana por bioengenharia cutânea.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 2006.

CAMPELO, S. R. **Leishmania (L.) Amasonensis inibe a maturação e a função ativadora das células de Langerhans da pele tratadas com TNF- α E anti-CD40 in vitro.** 61 f. Tese (Doutorado em Neurociência e Biologia Celular). Universidade Federal do Pará, Belém. 2014.

CANDIAN, L.M. **Estudo do Polietileno de alta densidade reciclado para uso em elementos estruturais.** 153 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Estruturas). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2007.

CARVALHO S. M. KUHLEN I. A. PEREIRA M. J. L. **Protocolo de padronização do perfil infeccioso de crianças internadas na unidade de queimados.** Rev Bras Queimaduras. 2013; 12(2): p118-127.

CARVALHO, G. F. SILVA, R. M. V. MESQUITA, J. J. MEYER, P. F. RONZIO, O. A. MEDEIROS O. J. Nóbrega, M. M. **Avaliação dos efeitos da radiofrequência no tecido conjuntivo.** 2011.

Chaves S. C. S. **Ações da enfermagem para reduzir os riscos de infecção em grande queimado no CTI.** Rev Bras Queimaduras. 2013;12(3): p 140-144.

COSTA, H. O. SOUZA, F. C. **Avaliação da regeneração tecidual da pele de porco submetida à lesão térmica seguida de colocação de Biotissue®.** ACTA ORL/ Técnicas em Otorrinolaringologia. v. 23, p. 23-27, 2005.

COTTRELL, I. W. BAIRD, J. K. Gums. In: KIRK, R. E.: OTHMER, D. F. **Encyclopedia of chemical technology**. New York: John Wiley, 1980.p. 45-66. V. 12.

CRUZ, B.F. CORDOVIL, P. B. L., BATISTA, K. N. M. **Perfil Epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura**. Revista Brasileira Queimaduras; v.11, p.246-250, 2012.

DE LA CRUZ P. Y. BOZA R. A. ESPINO E., T. CARABALLO, I. **Pharmacokinetic characterization of oral sustained release formulations: factors that influence pharmacokinetic profiles**. Acta Farmaceutica Bonaerense, v. 19, p. 25-34, 2000.

DECHEN, A. R, CASTRO P. R, C. NACHTIGALL G. R. **Pragas e doenças em citros: fisiologia e nutrição mineral visão agrícola nº2** DEZ 2004

DUBSKÝ M. KUBINOVÁ Š. Širc J. Voska L. ZAJÍČEK R. ZAJÍCOVÁ A. **Nanofibers prepared by needleless electrospinning technology as scaffolds for wound healing**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2012;23(4):931-41.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. London: EDQM, p.194-198, 1997

FANG Y. M. A. TUNG, I. J. BRITT, S. YADA, D.G. **Dalgleish Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins**. Journal of Food Science, 67 (2002), p. 188–193

FERREIRA, F. C. ELISÂNGELA CORRADINI, E. AGNELLI, J. A. M. MARCONCINI, J. M. LUIZ H. C. MATTOSO, L. H. C. ROSA, M. F. **Absorção de Água, Solubilidade em Água, Propriedades Mecânicas e Morfológicas de Compósitos de Glúten de Milho e Poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV) Reforçados com Fibras de Coco Verde**. Polímeros, v. 23, n. 6, p. 807-813, 2013.

FERREIRA, M. C. PAGGIARO, A. O. ISAAC, C. NETO, N. T. SANTOS, G. B. **Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação**. Rev. Bras. Cir. Plást. v. 26, n. 4, p. 696-702, 2011.

FILHO, M. A. R. C. FERREIRA, R. B. NUNES, B. B. BORTOLUCCI, G. A. P. FONSECA, I. A. **Modificação Superficial de Ossos para Aplicações em Ortopedia**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra,

FORREST, R. D. **Early history of wound treatment**. Journal of the Royal Society of Medicine V. 75, Issue 3, 1982, P. 198-205

FORTES, T. M. L. SUFFREDIN, I. B. **Avaliação de pele em idoso: revisão da literatura**. Jor. Health Sci. Inst. v. 32, n. 1, p. 94-101, 2014.

GADOMSKA, B. R. GADOMSKI, W. **Water structure in nanopores of agarose gel by Raman spectroscopy**. The J. of Chem. Physics. v. 121, n 24, 2004.

GAMBA, D. PFLUCK, A. C. D. SOARES, P. P. LIMA, G. B. PETZHOLD, C. L. **Efeito da adição de um oligômero de l-ácido láctico a um poli(d,l- ácido láctico) nas propriedades mecânicas e na degradação hidrolítica de filmes e microfibras de PLA.** 12.º Congresso Brasileiro de Polímeros, Paraná, 2009.

GARCIA, A. Q. R. PEREIRA, T. C. B. DIAS, I. L. T. **Estudo das propriedades de fluxo no desenvolvimento de paracetamol pó veiculado em sachê.** Rev. Bras. Farm. v. 93, n. 4, p. 469-475, 2012.

GELATTI, L. C. Bonamigo, R. R. I. Becker, A. P. d'Azevedo, P. A. ***Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina: disseminação emergente na comunidade.** Anais Brasileiros de Dermatologia, 84(5), 501-506. (2009).

GHASEMLOU, M. KHODAIYAN, F. OROMIEHIE, A. YARMAND, M. S. **Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grains.** Food Chemistry, v.127, p.1496–1502. 2011.

GIMÉNEZ, B. LACEY, A. L. SANTÍN, E. P. CABALLERO, M. E. L. MONTERO, P. **Release of active compounds from agar and agarose gelatin films with green tea extract.** Food Hydrocolloids, v. 30, p. 264-271, 2013.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E. Rupérez. P. **FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds.** Food Hydrocolloids V. 25, Issue 6, Aug 2011,1514–1520.

HALIM A. S. KHOO T. L. MOHD S. J. Y. **Biologic and synthetic skin substitutes: An overview.** Indian J Plast Surg. 2010 Sep; 43: S23–S28.

HANSBROUGH, J. F. Naughton.G. K. **Temporary living skin replacement.** U.S. Patent No. 5,460,939. 24 Oct. 1995.

HATTORI, M. KUSUMOTO, L. T. Namba, T. Ishigami, T. Hara, Y. **Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*.** Chem. Pharm. Bull., v.38, p. 717-720, 1990.

HENRIQUE D. M. SILVA L. D. COSTA A. C. R. Rezende A. P. M. B. SANTOS J. A. S. MENEZES M. M. **Controle de infecção no centro de tratamento de queimados: revisão de literatura.** Rev Bras Queimaduras. 2013;12(4): p 230-234

JIN, G, . PRABHAKARAN M.P, . KAI D, . RAMAKRISHNA, S. **Controlled release of multiple epidermal induction factors through core-shell nanofibers for skin regeneration.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2013;85(3):689-98.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. (2013). **Histologia Básica** (12 ed.). GUANABARA KOOGAN.

KHANARIAN, N. T., HANEY, N. M., BURGA, R. A., LU, H. **A functional agarosehydroxyapatite scaffold for osteochondral interface regeneration.** *Biomaterials*, v. 33, n. 21, p. 5247–5258, 2012.

KIKUCHI, A, . Kawabuchi, M, . Sugihara, M, . SAKURAI Y, OKANO T. **Pulsed dextran release from calcium–alginate gel beads.** *J Control Release*, 1997, 47, 21–29

KIM, I-. Y, . SEO S-. J, MOON H-.S, . YOO M-. K, . PARK I-. Y, . KIM B-. C, . et al. **Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications.** *Biotechnology advances*. 2008;26(1) p:1-21.

KONDAVEETIA, S., CHEJARAA, D. R., SIDDHANTAA, A. K. **Synthesis of self-assembly of agarose-fatty acid ester nanoparticles.** *Indian Journal of Chemistry*. v. 53, p. 679-687, 2014.

KUMAR, P. **Classification of skin substitutes.** *Burns*, v. 34, n. 1, p.148-9, 2008.

LANDGRAF, T. N., BERLESE, A., FERNANDES, F. F., MILANEZI, M. L., MARTINEZ, R., Panunto-Castelo, A. **O receptor de aerobactina lutA, uma proteína isolada em coluna de agarose, não é essencial para a infecção por *Escherichia coli* uropatogênica.** *Rev. Latino-Am. Enfermagem*. v. 20, n. 2, p. 4-10, 2012.

LEAL, D., MATSUHIRO, B., ROSSIB, M., CARUSOC, F. **FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds** *Carbohydrate Research* 343 (2008) 308–316. 23 Oct 2007.

LIJOUR,Y., GENTRIC, E. , Deslandes, E., Guezennec J. **Estimation of the Sulfate Content of Hydrothermal Vent Bacterial Polysaccharides by Fourier Transform Infrared Spectroscopy** *Analytical Biochemistry* Volume 220, Issue 2, 1 August 1994, Pages 244-248 doi:10.1006/abio.1994.1334

LIMA, A. M. F., ANDREANI, L., SOLDI, V. **Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio.** *Quím. Nova*, v.30, n.4, p.832-837, 2007.

LIMA, J. S. F., OLIVEIRA, E. A., ARAÚJO, A. C. R. A., OLIVEIRA, M. M. **Infection in children with burns: Review of literature.** *Rev Bras Queimaduras*. v. 13, n. 2, p. 67-75, 2014.

LIN, Y., LIANG, H., CHUNG, C., CHEN, M., SUNG, H. **Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs.** *Biomaterials* V. 26, Issue 14, May 2005, Pages 2105–2113

LIU, X. PENG L. V. B. YAO, G. M. A, C. TANG, WU, Y. Y. HUO, P. PAN, J. SHIB, W. YANB,Y. **Selective degradation of ciprofloxacin with modified NaCl/TiO₂photocatalyst by surface molecular imprinted technology.**

Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, v. 441, p. 420– 426, 2014.

LOSI, P., BRIGANTI E. ERRICO, C. LISELLA, A, . SANGUINETTI, E, . CHIELLINI, F., et al. **Fibrin-based scaffold incorporating VEGF-and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice**. *Acta biomaterialia*. 2013;9(8):7814-21.

MACEDO, J. L. S., SANTOS, J. B. **Complicações infecciosas em pacientes queimados**. *Rev. Soc. Bras. Cir. Plást.*, v. 21, n. 2, p. 108-11, 2006.

Macedo, J. L. S., Santos. J. B. **Complicações Infecciosas em Pacientes Queimados**. *Rev Bras Cir Plást* 2006; 21(2): 108-11

MACHADO, T. R. **Elaboração e Avaliação de Filmes Biodegradáveis a base de Amido de Mandioca e Bagaço De Cevada**. 2013, 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso Química, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2013.

MACKIE, W., **Semi-quantitative estimation of the composition of alginates by infra-red spectroscopy** *Carbohydrate Research*. V. 20, Issue 2, Dec 1971, Pages 413-415 doi: 10.1016/S0008-6215(00)81397-X

MAES, N. B., Manara, L. M., Feijo, R., Araujo, E. J., Souza, J. A., PEREIMA, M. J. L. **The use of dermal regenerate templates in burned patients in a reference children's hospital of Santa Catarina: nine years of experience**. *Rev. Bras. Queimaduras*. v. 11, n. 1, p. 6-14, 2012.

MANADAS , R., PINA M. E., . VEIGA, F. **A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 38, n. 4, out./dez., 2002.

MANETTI L. M; . DELAPORTE, R. M; . LAVERDE A. **Metabólitos secundários da família bromeliaceae Secondary metabolites from bromeliaceae Family**. *Quím. Nova* vol.32 no.7 São Paulo 2009. doi: 10.1590/S0100-40422009000700035

MARQUES, M. D., AMARAL, V., MARCADENTI, A. **Epidemiological profile of major burn inpatients admitted in a trauma's hospital**. *Rev. Bras. Queimaduras*. v. 13, n. 4, p. 232-235, 2014.

McHUGH, D. J. 1987. **Production, properties and uses of Alginates**. In: **FAO Fisheries Technical Papers**, p. 58-115.

MEENA, R., SIDDHANTA, A. K., PRASAD, K., RAMAVAT, B.K., ESWARAN, K., THIRUPPATHI, S., GANESAN, M., MANTRI, V. A., RAO, P.V. S. **Preparation, characterization and benchmarking of agarose from Gracilaria dura of Indian waters**. *Carbohydrate Polymers*. v. 69, p. 179–188, 2007.

MEHROTRA, S., LYNAM, D., LIU, C., SHAHRIARI, D., LEE, I., TUSZYNSKI, M. **Time controlled release of arabinofuranosylcytosine (Ara-C) from agarose**

hydrogels using layer-by-layer assembly: An in vitro study. J. Biomat. Sci., Polymer Edition, 23(1–4), 439–463, 2012.

MELO, M. S., CORREIA, M. T. S. **Avaliação do perfil de glicoproteínas presentes em soros de indivíduos sadios e pacientes com dengue clássica e hemorrágica e, o potencial larvicida sobre *aedes aegypti* utilizando lectinas livres e imobilizadas.** XVIII CONIC II CONIT, Recife, 2010.

MEYAGUSKU, V. M. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo Ciprofloxacino.** 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, 2014.

MILLAN, S. L., Gemperli, R., Tovo, F. M., Mendaçolli, T. J., Gomez, D. S., Ferreira, M. C. **Estudo epidemiológico de queimaduras em crianças atendidas em hospital terciário na cidade de São Paulo.** Rev Bras Cir Plást. 2012;27(4):611-5

MOHAMMED, S., NIGATU, S. **Review on Livestock Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and its Zoonotic Importance.** International Journal of Microbiological Research 6 (3): 164-174, 2015. ISSN 2079-2093 Doi: 10.5829/idosi.ijmr.2015.6.3.95104

MOHITI-ASLI, M, . POURDEYHIMI, B, . LOBOA, E. G. NovelN., **silver-ion-releasing nanofibrous scaffolds exhibit excellent antibacterial efficacy without the use of silver nanoparticles.** Acta biomaterialia. 2014;10(5):2096-104.

MORAES, A. L., ARAÚJO, N. G. P., & BRAGA, T. D. L. (2016). **Automedicação: revisando a literatura sobre a resistencia bacteriana aos antibioticos.** Revista Eletrônica Estácio Saúde, 5(1), 122-132.

MORAES, J. O. **Propriedades de filmes de amido incorporados de nanoargilas e fibras de celulose.** 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,

MOREIRA, Ícaro Í. de SousaS.; PARENTE, Letícia L. Tarquinio T. de Sousa S. and FRANCO, Douglas D. Wagner. **Estudo do comportamento ácido-base da 4,4'-ditiodipiridina.** Quím. Nova [online]. 1998, vol.21, n., pp.545-550. Available from: doi:1590/S0100-40421998000500002.

MOSER, H., PEREIMA, R. R., PEREIMA, M. J. L. **Evolution of silver dressings in the treatment of partial thickness Burns.** Rev. Bras. Queimaduras. v. 12, n. 2, p. 60-67, 2013.

MOTTA, A. A.; AUN, M, . V; . KALI, J.; GIAVINA-BIANCHI, P. **Dermatite de Contato.** Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia.; v. 34(3):73-82, 2011

MUZZARELLI R. A. **Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone.** Carbohydrate Polymers. 2009;76(2):167-82.

NASCIMENTO, A. L. R. **Ação Antimicrobiana do Extrato de Eugenia Uniflora L. (Pitanga) sobre *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa* e *Escherichia Coli*.** 2013, 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

NASCIMENTO, J. A., Dionísio, A. G. G., do Nascimento, E. C. L., & Barbosa, S. K. (2010). **Análise screening de vinhos empregando um analisador fluxo-batelada, espectroscopia UV-VIS e quimiometria.** Quim. Nova, 33(2), 351-357.

NAYAK, A. K., LAHA, B., SEN, K. K. **Development of hydroxyapatite-ciprofloxacin bone-implants using.** Acta. Pharm. v. 61, n. 25–36, 2011.

NERY, J. C. **Obtenção e caracterização de filmes contendo alginato de sódio e quitosana para potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas.** 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), Belo Horizonte.

NICOLOSI, J. G., MORAES, A. M. **Biomateriais destinados à terapia de queimaduras: estudo entre o custo e o potencial de efetividade de curativos avançados.** In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. São Paulo, Universidade de Campinas, 2005.

NIEMELÄ, T., NIIRANEN, H., KELLOMÄKI, M., TÖRMÄLÄ, P. **Self-reinforced composites of bioabsorbable polymer and bioactive glass with different bioactive glass contents. Part I: Initial mechanical properties and bioactivity.** Acta Biomaterialia. v. 1, n. 2, p.235-242, 2005.

NOIA, M. Pimentel. **Análise morfológica do reparo de queimaduras de segundo grau submetidas ao tratamento com membrana de celulose microbiana associada ao laser AlGaInPA660 nm em ratos albinos wistar.** 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental). Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Universidade Federal da Bahia, Salvador.

NORAJIT, A, K., KIMB, K. M., Ryu, G. H. **Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract.** Journal of Food Engineering v 98, Issue 3, June 2010, Pages 377–384

NOVAK, R., ZENG, Y., SHUGA, J., VENUGOPALAN, G., FLETCHER, D. A., SMITH, M. T. **Single-cell multiplex gene detection and sequencing with microfluidically generated agarose emulsions.** Angewandte Chemie. v. 123, n. 2, p. 410–415, 2011.

OLIVEIRA, F. L., SERRA, M. C. V. F. **Infecções em queimaduras: revisão.** Rev. Bras. Queimaduras, v. 10, n. 3, p. 96-9, 2011.

OLIVEIRA, F. P. S., FERREIRA, E. A. P., CARMONA, S. S. **Crianças e adolescentes vítimas de queimaduras: caracterização de situações de risco ao desenvolvimento.** Rev. Bras. Cresc. Des. Hum. v. 19, n. 1, p. 19-34, 2009.

OLIVEIRA, R. N., THIRÉ, R. M., SOARES, G. D. A. **Caracterização de um hidrogel nanocompósito pva-prata para uso potencial como curativo.** 7.º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Natal, 2012.

ONOFRE, N. A. **Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos a partir de ágar, agarose e kefirana com incorporação de nanopartículas de prata.** 2014, 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M M, Mansur, H S. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações.** Editora: Cultura Médica, RJ, Brasil, 2012.

ORÉFICE, R. L., Pereira, M. M., Sa. H. **Biomateriais: fundamentos e aplicações** Cultura Médica, 2006

OSMAN, S. A., SOUZA, F. C., DOLCI, J. E. **Estudo experimental sobre a aplicação de película de celulose (bionext®) em área cruenta de ressecção de concha nasal de coelhos.** ACTA ORL / Técnicas em Otorrinolaringologia. v. 25, p. 304-311, 2007.

PAULA, H C. B., Oliveira, E. F., Abreu, F. O. M. S., Paula, R. C. M., Morais, A. M., Forte, M. M. C., **Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton Zehntneri Pax et Hoffm.** Polímeros, vol. 20, nº 2, p. 112-120, 2010

PEREIRA, L., Amado, A. M., Critchley, A. T., van de Velde, F., Ribeiro-Claro, P. J. A., **Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman).** Food Hydrocolloids V. 23, Issue 7, Oct, 2009, P. 1903–1909. doi:10.1016/j.foodhyd.2008.11.014.

PEREIRA, R., Carvalho, A., Vazc, D. C., Gil, M.H., Mendes, A., Bárto, P., **Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications.** International Journal of Biological Macromolecules 52 (2013) 221–230. dx.doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.09.031

PERNAMBUCO 2013a. **Secretaria Estadual de Saúde, Hospital da Restauração. Queimados.** Acessado em: 17/12/2013. Disponível em: <http://www.hr.saude.pe.gov.br/institucional/setores/queimados/>

PERNAMBUCO 2013b. **Secretaria Estadual de Saúde. Ações marcam Dia Nacional de Luta Contra Queimaduras.** Acessado em: 16/12/2013. Disponível em: <http://portal.saude.pe.gov.br/noticias/historica-2589/>

PESSOA, W. S., Estevão, L. R.M.; Simões, R. S, Barros, M E G;Mendonça, FS, Baratella-Evêncio, Liriane, & Evêncio, J. 2012. **Effects of angico extract (Anadenanthera colubrina var. cebil) in cutaneous wound healing in rats.** Acta Cirurgica Brasileira, 27(10), 655-670.

PIERMARIA, J. A., PINOTTI A., M., GARCIA, A., ABRAHAM, A. G. **Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization.** Food Hydrocolloids. v. 23, p. 684–690, 2009.

PIERMARIA, J. A.; BOSCH, A.; PINOTTI, A.; YANTORNO, O.; GARCIA, M. A.; ABRAHAM, A. G **Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FTIR spectroscopy.** Food Hydrocolloids, v.25, p.1261-1269, 2011.

PIERMARIA, J. A.; PINOTTI, A.; GARCIA, M. A.; ABRAHAM, A. G. **Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization.** Food Hydrocolloids, v.23, p. 684–690, 2009.

PILLAY, V. Fassihi, R. **In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract: II. Physicochemical characterization of calcium–alginate, calcium–pectinate and calcium–alginate–pectinate pellets.** Journal of Controlled Release V. 59, Issue 2, 20 May 1999, P. 243–256. doi:10.1016/S0168-3659(98)00197-7

PIRES, A. L. R., MORAES, A. M. **Avaliação do efeito do ph e da temperatura de secagem nas características de curativos de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata.** 7º Congresso Latino Americano de Biomateriais e Órgãos Artificiais. Natal, 2012.

PROTO, R. S., GOZZANO, R. N., MOREIRA, S. S., GONELLA, H. A. **Tratamento ambulatorial de queimaduras com prata nanocristalina em malha flexível: uma alternativa terapêutica.** ver. Bras. Queimaduras, v. 11, n.4, p. 226-9, 2012.

QUEEN, D. EVANS J. H. GAYLOR J. D. S. COURTNEY J. M. REID W. H. **Burn wound dressings - a review.** Burns. 1987;13: p 218–228Daglia M, Polyphenols as antimicrobial agents. Curr Opin Biotechnol.

QUEIROZ, A. C. C., MOTA, D. D. C. F., BACHION, M. M., FERREIRA, A. C. M. **Úlceras por pressão em pacientes em cuidados paliativos domiciliares: prevalência e características.** Rev Esc Enferm USP, v. 48, n. 2, p.64-71, 2014

QUEIROZ, A. C. C., MOTA, D. D. C. F., BACHION, M. M., FERREIRA, A. C. M. **Úlceras por pressão em pacientes em cuidados paliativos domiciliares: prevalência e características.** Rev Esc Enferm USP, v. 48, n. 2, p.64-71, 2014

RAJ, M. S., ARKIN, V. H., ADALARASU. M. A., JAGANNATH. M. **Nanocomposites Based on Polymer and Hydroxyapatite for Drug Delivery Application.** Indian J Sci. Techn., v. 6, n. 5, p. 4653- 4658, 2013.

RANGEL-MARRÓN M., MONTALVO-PAQUINI C., PALOU E., LÓPEZ-MALO A. **Optimization of the moisture content, thickness, water solubility and**

water vapor permeability of sodium alginate edible films. Conferences Recent Advances in Chemical Engineering, Biochemistry and Computational Chemistry. Pariz. 2013.

RAPHAEL, E. **Estudo de eletrólitos poliméricos a base de ágar para a aplicação em dispositivos eletrônicos.** 147 p. Tese (Doutor em Ciências). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

RECOUVREUX, D. O. S. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos.** 2008, 145 f. Tese em Engenharia Química - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

REHDER. , J., SOUTO. L. R. M., ISSA C. M. B. M., Puzzi M. B. **human dermis. Skin Cell Culture Laboratory at Faculdade de Ciências Médicas,...** Sao Paulo Med J 2004; 122(1):22-5.

REHM, B. H. A., **Alginate Production: Precursor Biosynthesis, Polymerization and Secretion. Alginates: Biology and Applications,** 55 Microbiology Monographs 13, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009

REMPEL, L. C. T., TIZZOT, M. R. P. A., VASCO, J. F. M. **Incidência de infecções bacterianas em pacientes queimados sob tratamento em hospital universitário de Curitiba.** Rev. Bras. Queimaduras, v.10, n. 1, p. 3-9, 2011.

RHIM, J. W. **Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films.** LWT - Food Science and Technology V. 37, I. 3, May 2004, Pages 323–330

RHIM, J. W., WANG, L. F., HONG, S. I. **Preparation and characterization of ágar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity.** Food Hydrocolloids. v.33, p.327-335, 2013.

ROCHA, F. S., SAKAI, R. L., SIMÃO, T. S., CAMPOS, M. H., PINTO, D. C. S., MATTAR, C. A., ALMEIDA, P. C. C., FAIWICHOW, L. **Avaliação comparativa do uso de hidroalginato com prata e o curativo convencional em queimaduras de segundo grau.** Rev. Bras. Queimaduras, v. 11, n. 3, p. 106-10, 2012.

RODRIGUES, B. F. F. S. **Engenharia de tecidos para regeneração da pele: retrospectiva e perspectivas futuras.** 2012. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

RODRIGUES, L. B. Aplicações de biomateriais em ortopedia. **Estudos Tecnológicos em Engenharia,** v. 9, n. 2, p. 63-76, 2013.

ROTINBERG, P., KELEMEN, S., GRAMESCU, M, . Rotinberg, H, . NUTA V. **Preclinical trial of the antitumoral therapeutic effectiveness of some**

natural polyphenolic biopreparations. Rom J Physiol. 2000 Jan-Dec;37(1-4):105-18.

SAHOO, S., CHAKRABORTI, C. K. NAIK, S., MISHRA, S. C., NANDA, U. N. **Structural Analysis of Ciprofloxacin-Carbopol Polymeric Composites by X-Ray Diffraction and Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy.** Trop. J. Pharm. Res. v. 10, n. 3, p. 273-278, 2011.

SAHOO, S., CHAKRABORTI, C. K., BEHERA, P. K. **FTIR and Raman spectroscopic investigations of a controlled release ciprofloxacin / carbopol940 mucoadhesive suspension.** Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. v. 5, n. 1, 2012.

SALCEDO, S. S. NIETO, A. VALLET-REGI. M. **Fosfato Hydroxyapatite / β -tricalc io / andaimes agarose macroporosasp ara engenharia de tecido ósseo.** Chemical Engineering Journal. v. 137, n. 1, p. 62-71, 2008.

SANCHES, E. A. **Estudo de XRD e SAXS aplicados   polianilina e a poli ( -metoxianilina)** 2011. 148 p. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia dos Materiais). Instituto de Física, Química e Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

SANTOS, André A. Luis L. dos et al . **Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar.** J. Bras. Patol. Med. Lab., Rio de Janeiro , v. 43, n. 6, p. 413-423, Dec. 2007 ..

SHAMSURI, A. A., DAIK, R. **Utilization of an Ionic Liquid/Urea Mixture as a Physical Coupling Agent for Agarose/Talc Composite Films.** Materials. v. 6, p. 682-698, 2013.

SHIRANE, H. Y. ODA, D. Y., PINHEIRO, T. C., CUNHA, M. R. **Implantes de Biomateriais em falha  ssea produzida na f bula de rato.** Rev. Bras. Ortop. v. 45, n. 5, p. 478-82, 2010.

Shively M. L., Coonts B. A., Renner W. D., Southard J. L., Bennett A. T. **Physico-chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system.** Journal of Controlled Release 33 (1995) 237-243

SILVA, C. R. MANIERO, M. G. PERES, M. S. GUIMARÃES, J. R. **ocorrência Ocorrência e degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados.** Quim. Nova, v. 37, n. 5, p. 868-885, 2014.

SILVA, M. C. C., PACHECO, J. S., FURTADO, F. V. S., MATOS FILHO, J.C., DAMASCENO, A. K. C. **Epidemiologia das infecções em queimaduras no nordeste do Brasil.** Rev. Eletr. Enf. v.11, n. 2, p.3904, 2009.

SILVA, M. F. MORAES, M. A., NOGUEIRA, G. M., RODAS, A. C.D. HIGA, O. Z., BEPPU, M. M. **Glycerin and Ethanol as Additives on Silk Fibroin Films: Insoluble and Malleable Films.** Inc. J. Appl. Poly. Sci. v. 128, p. 115–122, 2013.

SIQUEIRA, C. F. Q. CABRAL, D. L. V. SOBRINHO, T. J. S. P. **“Levels of Tannins and Flavonoids in Medicinal Plants: Evaluating Bioprospecting Strategies.”** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2012, Article ID 434782, 7 pages, 2012. doi: 10.1155/2012/434782

SKOULIKA, S. G., GEORGIU, C. A. **Rapid Quantitative Determination of Ciprofloxacin in Pharmaceuticals by Use of Solid-State FT-Raman Spectroscopy.** APPLIED SPECTROSCOPY. v. 55, n. 09, 2011.

SMIDSRØD O., GLOVER R. M., WHITTINGTON S. G., **Relative extension of alginates having different chemical composition,** . Carbohydr. Res., 27, 1973, 107–118.

SMIDSRØD, O., SKJÅK-BRÆK, G. **Alginate as immobilization matrix for cells.** Trends Biotechnol 8 (3), 71-78 (1990).

SOMBIÉ, B. C., YAMEOGO, J. G., SEMDÉ, R., HENSCHÉL, V., AMIGHI, K., EJONATHAN, GOOLEG., E. **Ciprofloxacina mono-oleína géis aquosos como implantes para o tratamento de osteomielite crônica: *in vitro* caracterização.** J Adv. Pharm. Technol. Res. v. 5, n. 4, p. 158-163, 2014.

SOUSA, A. M. M. **Aplicação de biopolímeros extraídos de algas na produção de embalagens biodegradáveis.** 113 f. Dissertação em Engenharia Química – Universidade do Porto, Porto, 2008.

SOUTO, L. R. M., Rehder, J. Vassallo, J., Cintra, M. L., Kraemer, M. H. S., Puzzi, M. B. (2006). **Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis.** SaoSão Paulo Medical Journal, 124(2), 71-76. Doi: 10.1590/S1516-31802006000200005

SOUZA, L. G. V., CARVALHO, C. W. P., MARCONCINI, J. M., ASCHERI, J. L. R. **Propriedades mecânicas de filmes biodegradáveis de amido de mandioca adicionados de nanofibrilas de algodão.** 10.º Congresso Brasileiro de Polímeros, Foz do Iguaçu, 2009.

SOUZA, M. V. N., ALMEIDA, M. V., SILVA, A. D., COURI, M. R. C. **Ciprofloxacin, an important fluoroquinolone against anthrax.** Rev. Bras. Farm. v. 85, n. 1, p. 13-18, 2004

SU, Y., CHU, B., GAO, Y., WU, C., ZHANG, L., CHEN, P., WANG, X., TANG, S. **Modification of agarose with carboxylation and grafting dopamine for promotion of its cell-adhesiveness.** Carbohydrate Polymers, v. 92 p. 2245–2251, 2013.

SUN, X, . CHENG, L, . ZHU, W, . HU, C, . JIN, R, . SUN, B, . et al. **Use of ginsenoside Rg3-loaded electrospun PLGA fibrous membranes as wound cover induces healing and inhibits hypertrophic scar formation of the skin.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2014;115:61-70.

TAN, H.; SHEN, Q.; JIA, X.; YUAN, Z.; XIONG, D. **Injectable nano-hybrid scaffold for biopharmaceuticals delivery and soft tissue engineering.** Macromol. Rapid Commun. 2012, 33, 2015–2022.

TAVARES, C. S., HORA, E. C. **Caracterização das vítimas de queimaduras em seguimento ambulatorial.** rev. bras. queimaduras, v. 10, n. 4, p. 119-23, 2011.

TURBIANI, F. R. B., KIECKBUSH T. G. **Mechanical and barrier properties of sodium alginate films obtained using calcium benzoate and/or calcium chloride as the crosslinking agent.** Braz. J. Food Technol., Campinas, v. 14, n. 2, p. 82-90, abr./jun. 2011 DOI: 10.4260/BJFT2011140200011

TURBIANI, F. R. B., KIECKBUSH T. G., GIMENES, M. L. **desenvolvimento Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de alginato de sódio reticulados com benzoato de cálcio.** Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR – Outubro/2009.

UNNITHANA, A. R., BARAKATB, N. A. M., PICHIAHD, P. B. T., GNANASEKARANE, G., NIRMALAB, R., CHAD, Y. S., JUNGE, C. H., NEWEHYF, M. E., KIMB, H. Y. **Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun polyurethane–dextran nanofiber mats containing ciprofloxacin HCl.** Carbohydrate Polymers. v. 90, p. 1786–1793, 2012.

VASQUES, C. T. **Preparação e caracterização de filmes poliméricos a base de amido de milho e polipirrol para aplicação como biomaterial.** 2007, 140 f. Tese em Química – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

VIERA, S. P. P. **Promoção da Absorção Cutânea de Fármacos: Estado da Arte.** 2013, 72 p. **Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas** - Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2013.

VILLANOVA, J. C. O., ORÉFICE, R. L., CUNHA, A. S. **Aplicações Farmacêuticas de Polímeros.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VINEREAN, H. V., GAZDA, L. S., HALL, R. D., SMITH, B. H. **Streptozotocin is responsible for the induction and progression of renal tumorigenesis in diabetic Wistar–Furth rats treated with insulin or transplanted with agarose encapsulated porcine islets.** Islets, v. 3, n. 4, p. 196–203, 2011.

WANG, H-. M, . CHOU, Y-.T, . WEN Z-. H, . WANG Z-. R, . CHEN C-. H, . HO M-. L. **Novel biodegradable porous scaffold applied to skin regeneration.** PloS one. 2013;8(6):e56330.

WANG, X, , YOU, C, . HU, X, . ZHENG, Y, . LI, Q, . FENG, Z, . et al. **The roles of knitted mesh-reinforced collagen–chitosan hybrid scaffold in the one-step repair of full-thickness skin defects in rats.** Acta biomaterialia. 2013;9(8):7822-32.

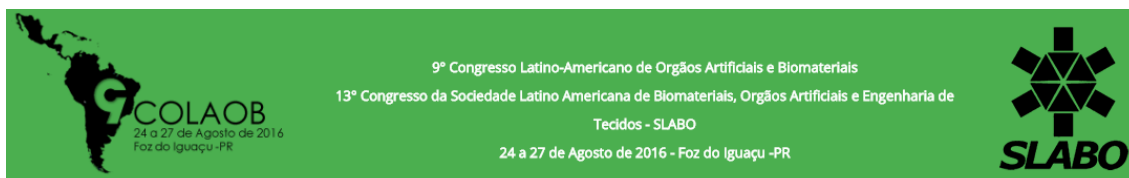
WONG, V. W., RUSTAD K. C, . GALVEZ M. G,. NEOFYTOU, E,. GLOTZBACH J. P,. JANUSZYK, M, et al. **Engineered pullulan–collagen composite dermal hydrogels improve early cutaneous wound healing.** Tissue Engineering Part A. 2010;17(5-6):631-44.

WUNDERLICH, B. L., MARCOLLA, B., SOUZA, J. A., ARAUJO, E. J., FEIJÓ, R., PEREIRA, M. J. L. **Curativo com pressão negativa e matriz de regeneração dérmica: uma nova opção de tratamento para feridas extensas.** Rev. Bras. Queimaduras, v. 10, n. 3, p. 78-84, 2011.

YANG, Y, . XIA, T, . ZHI, W, . WEI, L, . WENG, J, . Zhang, C, . et al. **Promotion of skin regeneration in diabetic rats by electrospun core-sheath fibers loaded with basic fibroblast growth factor.** Biomaterials. 2011;32(18):4243-54.

ZACTITI, E. M., Kieckbusch. **Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree.** Journal of Food Engineering V. 77, Issue 3, December 2006, P. 462–467 doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.07.015

**APÊNDICE A – TRABALHO APRESENTADO NO 13º CONGRESSO DA
SOCIEDADE LATINO AMERICANA DE BIOMATERIAIS, ORGÃOS
ARTIFICIAIS E ENGENHARIA DE TECIDOS - SLABO**



EFEITO DOS IONS Ca^{++} NA LIBERAÇÃO DE EXTRATOS DE *ANADENANTHERA COLUBRINA* EM FILMES POLIMÉRICOS BASEADOS EM ALGINATO, VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE SUBSTITUTOS TEMPORÁRIOS DE PELE

Diogo N. Gomes¹, Rafael. J.S.A Padilha², Yago E.O. Silva¹, Cláudia S.A. Lima², Thiago A.S. Araujo³, Kêsia X.F.R. Sena⁴, Ricardo Yara^{1}*

1: Departamento de Engenharia Biomédica - UFPE, Recife, Brasil

2: Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE, Recife, Brasil

3: Departamento de Farmácia - UFPE, Recife, Brasil

4: Departamento de Antibióticos - UFPE, Recife, Brasil

***e-mail: ricardo.yara@gmail.com**

Resumo

Substitutos temporários de pele auxiliam na regeneração cutânea e previnem infecções. Alginatos são biomateriais descritos na confecção deste tipo de dispositivo, associados a agentes antimicrobianos sintéticos ou naturais. *Anadenanthera colubrina* possui ações antimicrobianas e cicatrizantes. Este trabalho teve por objetivo verificar o efeito de íons Ca^{++} na liberação de extratos de *A. colubrina* incorporados em filmes de alginato. Foram verificadas propriedades físicas como: transparência, espessura e teores de umidade dos filmes, que foram caracterizados por espectroscopia de UV-vis e do Infravermelho. Adicionalmente foi determinado o perfil de liberação dos extratos incorporados e a ação antimicrobiana destes frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, e. Filmes sem incorporação de extratos apresentaram-se finos e transparentes. Análises espectroscópicas evidenciaram diferenças na incorporação dos extratos aos filmes. Observou-se uma pronunciada atividade bactericida frente às cepas de *S. aureus* multirresistentes. Os ensaios evidenciaram diminuição na liberação dos extratos de *A. colubrina* em filmes contendo Ca^{++} .

Palavras-chave: Alginato, *Anadenanthera colubrina*, Queimaduras, Substitutos Temporários de Pele.

1 INTRODUÇÃO

A pele é o primeiro sistema de defesa do ser humano, funcionando como uma barreira contra agentes físicos e patógenos. Por isso a pele deve ser reconhecida como o órgão periférico de defesa do sistema imunológico. Alguns fatores podem agredir gravemente essa barreira, em casos de perda dessa proteção se faz necessário uma intervenção com o intuito de promover a viabilidade celular dos tecidos não afetados e a regeneração dos constituintes da barreira cutânea. Um dos principais fatores para a perda de integridade cutânea são as queimaduras, de acordo com a Sociedade Brasileira de Queimaduras, no Brasil acontecem cerca de um milhão de casos por ano segundo o sistema de informação do SUS (sistema único de saúde) e o portal Brasil a queimadura é um dos principais fatores relacionados a acidentes domésticos que causam óbitos em crianças de 0 a 9 anos. Diante disso se faz necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento de pacientes com queimaduras, sobretudo para a elaboração de curativos com aditivos naturais. Neste contexto o alginato, polímero natural extraído de algas pardas, vem despontando como uma boa alternativa para a produção de filmes para a elaboração de substitutos temporários de pele.

Uma característica desejada em um substituto temporário de pele é que este possua ação contra patógenos oportunistas. Este atributo pode ser alcançado através da incorporação de um agente antimicrobiano. O extrato de *A. colubrina*, conhecido popularmente como angico, é um antibiótico natural.

Este trabalho teve por objetivo a produção de filmes poliméricos baseados em alginato com a incorporação de extrato de angico, visando obter um curativo interativo ou mesmo um novo substituto temporário de pele, eficaz e de baixa toxicidade, a fim de contribuir para o arsenal terapêutico no tratamento de queimaduras na pele e desta maneira, melhorar a eficiência na cicatrização e regeneração tecidual.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo dos extratos hidro alcoólicos

Foram coletadas as cascas do angico no município de Altinho (8°29'32"S × 36°03' 03"W), Pernambuco, a área de amostragem específica fica localizada na comunidade do Carão (08°35' 16,1"S × 36°05 ' 36,1" W), na região de Caatinga. Para a produção do extrato de *A. colubrina* foram pesadas 200g da casca moída seca do angico para 2 litros de solução 50% alcoólica e outra extração 80% alcoólica colocada em percolador e posterior retirada da solução a cada 48h até esgotamento por três vezes.

2.2 Produção dos filmes poliméricos e incorporação dos extratos

Os filmes de alginato (FA) foram obtidos pelo sistema de “casting”, que consiste na deposição da solução filmogênica sobre a placa de Petri. Os filmes de alginato de cálcio (FACa) foram produzidos através da adição do agente de escoamento $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e posterior adição do CaCl_2 na solução filmogênica. Após a obtenção de cada solução filmogênica do filme foi adicionado os extratos de angico. Para a solução filmogênica de alginato foi adicionado o extrato de angico a 50% formando filme de alginato angico 50% (FA50) e adicionado a outra solução extrato de angico 80% (FA80) às soluções filmogênicas com Cálcio foram criados os filmes Alginato de Cálcio com angico 50% (FACa50) e alginato acrescido de cálcio e angico 80% (FACa80).

2.3 Características físicas dos filmes

2.3.1 Espessura

A espessura dos filmes foi obtida com auxílio de um micrômetro 6”(Zaas precision), de precisão 0,01mm. Foram realizadas medidas de cada tratamento, em duplicata, tomando-se medida de 5 pontos diferentes de cada amostra, totalizando 10 medidas para cada tratamento. Os resultados foram expressos através da média das medidas de cada tratamento.

2.3.2 Transparência

Para determinação da transparência dos filmes foram relacionadas as medidas de absorbâncias a 600 nm pela análise no UV-visível modelo UV 1800 UV Espectrofotômetro (SHIMADZU – Japão), acoplado ao Software UV Probe, com a sua espessura dos filmes de acordo com a equação abaixo:

$$T = \frac{-\log A_{600}}{x} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

T = Transparência

A₆₀₀ = Absorbância em 600 nm

x = Espessura do filme em mm em que quanto menor o T, menor a transparência. Nesse trabalho valores de T negativos foram considerados não transparentes.

2.3.3 Teor de umidade

O teor de umidade dos filmes foi obtido através da medida de perda de peso. As amostras dos filmes foram analisadas em triplicata, foram pesadas em balança analítica (Shimadzu AUY 220) e em seguida aquecidas em estufa de secagem (Nova Técnica NT513) a 105 ± 1 °C, até peso constante. As amostras foram transferidas para um dessecador até atingir temperatura ambiente, e novamente pesadas. A umidade contida nas amostras foi relacionada à perda de peso, de acordo com a equação 2.

$$U\% = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

U% = porcentagem de umidade

M_i = Massa inicial

M_f = Massa final

2.4 Uniformidade da incorporação do extrato nos filmes UV-VIS

Essa análise foi realizada a partir da diluição total de três mm de diâmetro de cada filme polimérico em 10 mL de água destilada. Foi utilizado como padrão o ácido tânico, por similaridade cromatográfica, para realização de uma curva padrão de calibração.

A análise de absorção eletrônica na região do UV/VIS foi avaliada através de curvas analíticas da Absorbância versus Concentração do extrato de *A. colubrina*. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro de absorção UV/VIS modelo UV 1800 UV (SHIMADZU – Japão), operado pelo Software UV Probe.

2.5 Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As análises na região do Infravermelho (FT-IR) foram realizadas no laboratório de Biofísica Química (UFPE). O equipamento utilizado foi o Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR Spectrometer. As análises foram realizadas por reflectância.

2.6 Liberação do extrato de angico

Os filmes contendo extratos foram submetidos a ensaios de liberação controlada em água do Tipo I, durante 24 h. Os filmes permaneceram em meio aquoso e as alíquotas foram analisadas por UV-VIS (200 a 400 nm) em 06 intervalos, utilizando-se uma curva padrão de ácido tânico.

2.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foi empregado o método de difusão em meio líquido, utilizando-se micro-organismos do Banco de Culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA). Foram utilizadas culturas de *Staphylococcus aureus* isolado de ponta de cateter (UFPEDA 700) e *S. aureus* isolados de secreção de ferida operatória (UFPEDA 711 e UFPEDA 731). A partir de isolados clínicos com 24 h de cultivo, foram padronizadas as suspensões microbianas em solução fisiológica a 10^8 UFC/mL. Para a realização dos testes, 10 µL da suspensão dos micro-

organismos foram adicionados a tubos contendo 2 mL meios de cultura Mueller-Hinton (MH) líquido. A cada tubo foi adicionado um disco de 6 mm de diâmetro do filme polimérico contendo o extrato de angico (50% e 80%), em triplicata. Além disso, foram realizados os controles com tubos contendo o meio de cultura líquido e 10 µL da suspensão dos micro-organismos. O controle negativo, continha apenas o meio de cultura e o disco do filme sem incorporação do extrato.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extratos de angico

Os extratos hidro alcoólicos a 50% e 80%, apresentaram rendimentos de 16,92% e 18,08% respectivamente. Indicando um bom rendimento, quando comparado com o descrito na literatura.

3.2 Desenvolvimento dos filmes poliméricos

A partir da metodologia desenvolvida foram produzidos filmes poliméricos de alginato com e sem extratos de *A. colubrina* e foi desenvolvido um novo método de produção de filmes que utiliza agente de escoamento ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) na produção de filmes reticulados com Ca^{++} .

3.3 Características físicas dos filmes poliméricos

3.3.1 Espessura

Os filmes desenvolvidos apresentaram variações de espessura entre 0,16 e 0,75 mm. FA se apresenta mais fino quando em comparação com filmes com incorporação dos extratos de *A. colubrina* (Vell.) Brenan e efeitos semelhantes não foram observados quando os filmes são acrescidos do agente de reticulação Ca^{++} (tabela 3).

Tabela 3. Médias das espessuras dos filmes de alginato com e sem adição de cálcio com e sem incorporação dos extratos de angico

FA	FAA50	FAA80	FACa	FAACa50	FAACa80
0,16±0,06 ^d	0,61±0,05 ^a	0,62±0,04 ^a	0,3±0,01 ^d	0,62±0,1 ^a	0,75±0,11 ^a

.

Os filmes de alginato apresentaram menor espessura em relação aos filmes de alginato com a incorporação dos extratos de angico, indicando que a adição do extrato alterou essa propriedade.

Rhim (2004) desenvolveu dois tipos de filmes. Um com mistura do agente reticulante Cálcio e o segundo com imersão dos filmes de alginato em solução de cloreto de cálcio. Os filmes com mistura do agente reticulante apresentaram maior espessura, metodologia semelhante a usada nesse trabalho. A adição do agente reticulante provavelmente auxilia no aumento da espessura dos filmes de alginato.

De acordo com Moraes (2013), os substitutos cutâneos geralmente apresentam espessuras mais finas que a derme humana, que possuem uma variação entre 0,5 e 2 mm, dependendo de alguns fatores, tais como, idade, gênero e área do corpo.

3.3.2 Transparência

Os filmes de alginato apresentam-se transparentes. Porém, a adição de cálcio e outros componentes diminui a transparência, o que foi evidenciado com a diminuição da transparência nos filmes com cálcio e incorporação do extrato de *A. colubrina* que apresentou coloração avermelhada.

Alguns fatores influenciam na coloração do filme, dependendo diretamente, das materiais primas para produção do mesmo, como demonstrado na Tabela 02.

Teste	FA	FA50	FA80	FACa	FACa50	FACa80
Transparência	12,564 ^a	2,909 ^b	0,629 ^c	N. T	N. T	N. T

Legenda: FA, filme de alginato; FA50, filme de alginato com *A. colubrina* 50%; FA80: filme de alginato com *A. colubrina* 80%; FACa50, filme de alginato reticulados com cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* 50%; FACa80, filme de alginato reticulados com cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* 80%. As letras iguais expressam que não houve diferença significativa para o teste de Turkey para $p < 0,05$. N.P: não transparente.

Tabela 2. Médias da Transparência dos filmes de alginato com e sem adição de cálcio com e sem incorporação dos extratos de angico.

O filme de alginato (FA) apresentava-se transparente após secagem. Os filmes FA50 e FA80 apresentavam a coloração característica dos extratos de *A. colubrina* o que visivelmente diminuiu a transparência. Os filmes de alginato reticulados com cálcio (FACa) apresentam coloração branca que deixavam os filmes visivelmente opacos. A incorporação dos filmes reticulados com cálcio adicionava aos filmes de coloração branca a cor marrom o que visivelmente torna os filmes (FACa50 e FACa80) sem transparência.

3.3.3 Teor de umidade

Os filmes com reticulação de cálcio apresentaram-se com menor teor de umidade. A interação do agente reticulante provavelmente afeta a na hidrofiliabilidade dos filmes e, conseqüentemente, afeta a absorção de água nos filmes e manutenção desta durante o processo de secagem do filme (Tabela 3).

Tabela 3. Teor de umidade, em percentagem, para os filmes baseados em com ou sem incorporação dos extratos.

FA	FAA50	5	FACa	FAACa50	FAACa80
20,78±0,004 _{a,b}	21,33±0,00 _{7^a}	20,71±0,004 _{a,b}	18,95±0,00 _{8^{b,c}}	13,03±0,0 _{1^d}	16,87±0,0 _{2^c}

Diferentes letras em uma mesma linha correspondem a valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Rhim (2009), desenvolveu filmes de alginato com reticulação de cálcio obtendo como resultado filmes com menor teor de umidade.

3.4 Uniformidade na incorporação do extrato no filme por Espectroscopia UV-VIS

Para a análise espectroscópicas dos filmes incorporados com os extratos de angico 50% e 80% demonstram uniformidade na região de 282 nm (Tabela 4)

Teste	FA50	FA80	FACa50	FACa80
Concentração (%)	0,331±0,051	0,323±0,053	0,685± 0,145	0,735±0,178

Tabela 4. Concentração obtida pela absorção eletrônica na região do UV-VIS dos filmes de alginato incorporados ao extrato de angico 50% (A), 80% (B), filmes de alginato com cálcios incorporados ao extrato de angico 50% (D) e 80% (E) teste expresso em Mg/cm².

3.5 Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Nas análises dos filmes na Região do FT-IR (Figuras 2, 3 e 4), foi observado que a presença do Cálcio interferiu diretamente na alteração da estrutura química do filme de alginato, como observados na forma e na intensidade dos máximos, principalmente àqueles referentes ao estiramento das hidroxilas ($\sim 3200\text{ cm}^{-1}$) e grupamentos C-O (1650 cm^{-1}).

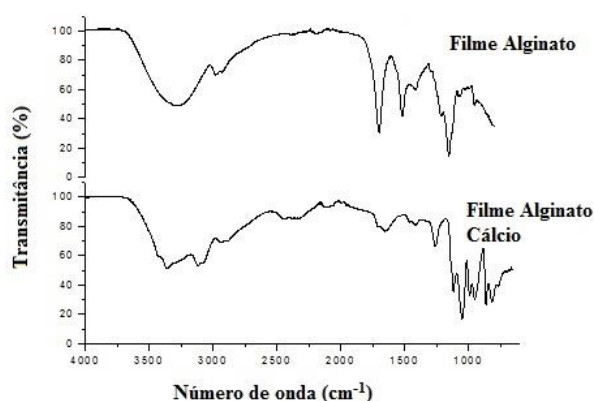


Figura 2: Espectros de FTIR dos filmes de alginato com e sem a presença do Cálcio.

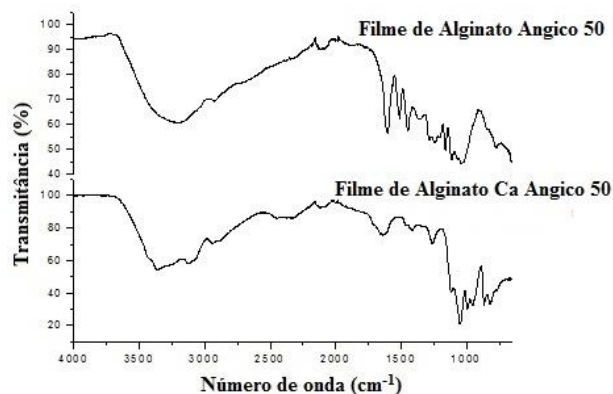


Figura 3 Espectros de FTIR dos filmes de alginato com incorporação do extrato a 50% com e sem a presença do Cálcio..

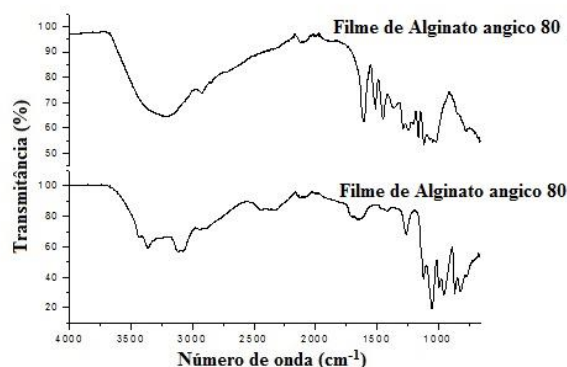


Figura 4 Espectros de FTIR dos filmes de alginato com incorporação do extrato a 80% com e sem a presença do Cálcio.

3.6 Liberação do extrato de Angico

Nos perfis de liberação controlada, verifica-se o fenômeno de “burst release” (explosão de liberação), que é a liberação de uma percentagem significativa do fármaco encapsulado, nos instantes seguintes ao sistema ter sido mergulhado no meio de liberação. Neste caso, verifica-se que a percentagem de fármaco é liberada nos primeiros 20 minutos. Já para os filmes sem cálcio, observa-se 50% de sua liberação nos primeiros 30 minutos enquanto os filmes com a reticulação, têm menos de 30% de sua liberação nesse mesmo período (Figura 5).

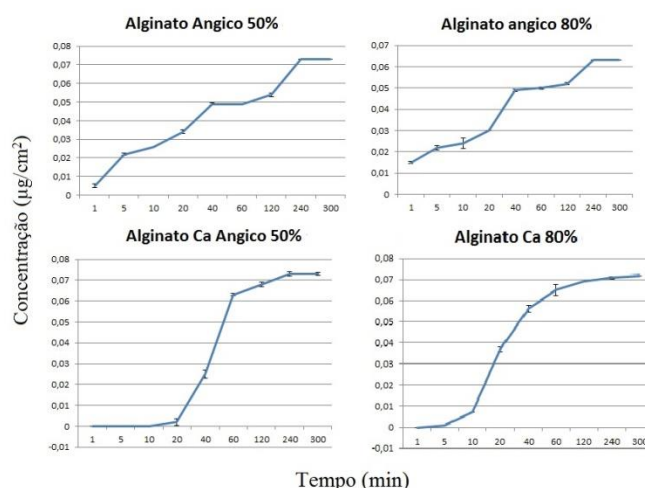


Figura 5 - Espectro da liberação do extrato.

Os filmes com reticulação de cálcio apresentaram uma liberação tardia, fenômeno que provavelmente deve-se a reticulação do cálcio, tornando o filme com maior hidrofiliabilidade.

Segundo Kishida et al (1998), Mallapragada et al (1997), a migração de fármacos durante os passos de secagem e armazenagem do filme, podem acarretar em uma distribuição heterogênea do fármaco na matriz do polímero e levar ao fenômeno de explosão de liberação.

3.7 Avaliação antimicrobiana

O extrato de *A. colubrina* a 80%, incorporado ao filme de alginato apresentou a melhor inibição de crescimento da colônia dos *S. aureus* resistentes UFPEDA 711 e UFPEDA 731, entretanto o filme de alginato incorporado com extrato 50% obteve melhor inibição das cepas UFPEDA 700.

Cepas <i>Staphylococcus aureus</i>	Direto	FA50	FA80	FACa50	FACa80
UFPEDA 700	INC 10^{-4}	73.10^{-3}	690.10^{-4}	131.10^{-4}	311.10^{-4}
UFPEDA 711	INC 10^{-4}	33.10^{-4}	345.10^{-3}	220.10^{-4}	6.10^{-1}
UFPEDA 731	INC 10^{-4}	59.10^{-4}	401.10^{-4}	99.10^{-4}	16.10^{-3}

Legenda: Direto, micro-organismo sem extratos. FAA50, filme de alginato com *A. colubrina* (Vell.) Brenan 50%; FA80: filme de alginato com *A. colubrina* 80%; FACa50, filme de alginato reticulados com cálcio

incorporado ao extrato de *A. colubrina* 50%; FACa80, filme de alginato reticulados com cálcio incorporado ao extrato de *A. colubrina* 80%. *Staphylococcus aureus* multirresistentes: UFPEDA 700 UFPEDA 711 UFPEDA 731; INC (incontáveis).

Tabela 5. Médias das UFCs (Unidades Formadoras de Colônias), de *S. aureus* multirresistentes, inoculadas sobre filmes de alginato co incorporação de Extratos de *A. colubrina*. .

Estudos relatam ação de extrato de *A. colubrina* contra *S. aureus* (RODRIGUES et al (2014); BAPTISTA (2012). Além da eficácia do ácido tânico frente ao *S. aureus* resistente (MRSA), segundo Akiyama et al (2001).

4 CONCLUSÕES

Neste estudo, foram obtidos filmes a base de alginato que foram caracterizados através dos ensaios físico-químicos, morfológicos e espectroscópicos, além de sua atividade frente a linhagens de *S. aureus* com o intuito de identificar as propriedades físicas e biológicas, aos fatores que possibilitarão a utilização como substituto temporário de pele, principalmente no tratamento de lesões cutâneas, auxiliando no processo cicatricial.

5 AGRADECIMENTOS

Aos Departamentos de Biofísica e de Antibióticos de UFPE

6 Referencias

CRUZ, B.F., CORDOVIL, P.B.L., BATISTA, K.N.M. Perfil Epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura. Revista Brasileira Queimaduras; v.11, p.246-250, 2012.

MOTTA, A.A.; AUN M,V,; KALI, J.; GIAVINA-BIANCHI, P. Dermatite de Contato. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia.; v. 34(3):73-82, 2011

Mallapragada, S. K. Peppas, N.A. Colombo, P. Crystal dissolution-controlled release systems. II. Metronidazole release from semicrystalline poly(vinyl alcohol) systems, J. Biomed. Mater. Res. 36 (1997) 125–130.

BAPTISTE, K. E. et al..Methicillin-resistant Staphylococci in Companion Animals. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 11, n. 12, p. 1942-1944, 2005.

BATISTA, J. S. OLINDA, R. G. MEDEIROS, V. B. RODRIGUES, C M. F. OLIVEIRA, A. F., PAIVA, E. S., FREITAS, C. I. A., MEDEIROS, A. C. Antibacterial and healing activities of buriti oil *Mauritia flexuosa* L. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online v. 42, n. 1, p. 136-141, 2012.

A. Kishida, A K. Murakami, H. Goto, M. Akashi, H. Kubita, T. Endo, Polymer drugs and polymeric drugs X: slow release of 5-fluorouracil from biodegradable poly(g-glutamic acid) and its benzyl ester matrices, *J. Bioact. Compat. Polym.* 13 (1998) 270–278.

BARRA, I. D., RODRIGUES, K. V. M. Utilização de matrizes dérmicas no tratamento de queimaduras. **Rev. Bras. Queimaduras.** v. 13, n. 2, p. 83-89, 2014.

MORAES, J. O. Propriedades de filmes de amido incorporados de nanoargilas e fibras de celulose 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films
Original Research Article LWT - Food Science and Technology, Volume 37, Issue 3, May 2004, Pages 323-330

EFFECT OF Ca^{++} IONS IN RELEASE OF *Anadenanthera colubrina* EXTRACTS IN POLYMERIC FILMS BASED ON ALGINATE, AIMING AT THE DEVELOPMENT OF SKIN TEMPORARY SUBSTITUTES.

ABSTRACT

Skin temporary substitutes help in regeneration and prevent infections. Alginates are described as biomaterials to manufacture this type of device, and can be associated with natural or synthetic antimicrobials. *Anadenanthera colubrina* has antimicrobial and healing activities. This study aimed to verify the effect of Ca^{++} ions in the release of *A. colubrina* extracts, incorporated in alginate films. Physical properties were observed as transparency, thickness and moisture contents of the films. They were characterized by UV-vis and infrared spectroscopy. Additionally it was determined the release of the incorporated extracts and their antimicrobial action against multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Films without incorporating extracts had shown fine and transparent. Spectroscopic analysis showed differences in the incorporation of the extracts to the films. There was a pronounced bactericidal activity against all strains of *S. aureus*. The tests showed decrease in the release of *A. colubrina* extracts in the films containing Ca^{++} .